

## ***Diversidad bacteriana en suelos de zonas contaminadas y no contaminadas de una mina de cobre***

### ***Bacterial diversity in soils from contaminated and uncontaminated areas of a copper mine***

<sup>1</sup>*Mariela Navas*, <sup>1</sup>*Javier Pérez*, <sup>2</sup>*Mario Prieto Godoy*, <sup>2</sup>*Alejandro Rodríguez Iglesias*, <sup>1</sup>*Alberto Masaguer*, <sup>1</sup>*Ana Moliner*  
<sup>1</sup>*Dpto. de Producción Agraria, Unidad de Edafología. ETSI Agraria, Alimentaria y de Bio-sistemas.*  
*Universidad Politécnica de Madrid. Avda. Complutense s/n 28040 Madrid. Marielajose.navas@upm.es*, <sup>2</sup>*Centro de Biotecnología y Genómica de Planta UPM, Campus de Montegancedo, Ctra M-40, km 38, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid*

#### **Resumen**

Para entender la dinámica ecológica del suelo es de primordial importancia realizar un esquema de la distribución filogenética de las distintas bacterias que viven en él. Los análisis moleculares, en especial el metagenómico, puede aportar información detallada sobre la diversidad, estructura y funcionamiento de los microorganismos presentes en un suelo, información que pueden servir como base para su manejo y recuperación. El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas en dos zonas de un suelo minero ubicado en la comunidad de Madrid. Los muestreos se realizaron en dos zonas de la mina identificadas como zona 1 (suelo no afectado) y zona 3 (zona de escombrera). Se realizaron análisis metagenómicos de las comunidades bacterianas presentes, con muestras de ambas zonas. Del total de secuencias bacterianas evaluadas, sólo el 1% mostró coincidencias en las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Los resultados mostraron que el número de secuencias del dominio Bacteria es mayor en la zona 1 que en la zona 3. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes filos de bacterias por zona, sí se observaron diferencias en cuanto al número de especies dentro de los diferentes filos y entre las zonas de muestreo.

Palabras clave: Suelo de mina, análisis metagenómico, diversidad bacteriana

#### **Abstract**

To understand the ecological dynamics of the soil it is of paramount importance to analyse the phylogenetic distribution of the different bacteria that live in it. Molecular analyzes, especially metagenomics, can provide detailed information on the diversity, structure and functioning of microorganisms present in a soil, information that can serve as a basis for their management. The goal of this study was to evaluate the diversity of bacterial communities in soil from two zones of a mine located in the community of Madrid. The study was conducted in the *Antigua Pilar* mine, located in the Southeast area of Colmenarejo, in the Northwest of the Community of Madrid. The samplings were carried out in two areas of the mine identified as zone 1 (unaffected soil) and zone 3 (zone with residues). Metagenomic analyzes of the bacterial communities present were carried out with samples from each zone. Of the total bacterial sequences evaluated, only 1% showed coincidences in the databases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The results showed that the number of sequences from the Bacteria domain is more abundant in zone 1 than in zone 3. Although no significant differences were found between the different bacterial phyla per zone, differences were observed in the number of species within each phylum and between the sampling zones.

Key words: Contaminated soil, metagenomic analyses, bacterial diversity

## Introducción

Las comunidades microbianas presentan atributos característicos, como la composición, diversidad o la dinámica en el tiempo, útiles para describir y comparar distintos hábitats. El análisis de una comunidad busca entender cuál es la estructura de los ensamblajes biológicos, cuál es su función y cómo cambian espacial y temporalmente. Las bacterias del suelo son conspicuas por su abundancia y ubicuas en los ambientes y suelos más extremos. El uso de técnicas moleculares ha demostrado que la diversidad de bacterias en el suelo es extremadamente alta. Análisis de diferentes suelos en zonas templadas han indicado que la mayoría de las bacterias encontradas pertenecen a grupos mayoritarios como el filo perteneciente a las Proteobacteria con las clases Alfa, Beta y Gammaproteobacteria, y los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria y Firmicutes (Nacke, 2011; Chen 2011). Caracterizar o cuantificar la diversidad de la comunidad bacteriana en un suelo servirá para tener un referente de su estructura y poder evaluar cambios de esas comunidades en estudios futuros de descontaminación de suelos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas en dos zonas de un suelo minero ubicado en la comunidad de Madrid. Las minas de cobre de la comunidad de Madrid se dejaron de explotar a principios del siglo XX, aunque hubo algún intento en los años 70. Estudios previos en la zona indican que existe una alta degradación química, que podría afectar zonas más allá de los límites de la mina, poniendo en peligro la calidad del medio ambiente, especialmente de un lugar protegido como es el Parque Regional del curso medio del río Guadarrama

## Materiales y Métodos

### *Descripción del sitio y muestreo*

El estudio se realizó en La mina *Antigua Pilar* localizada en la zona sureste del municipio de Colmenarejo, en el noroeste de la Comunidad de Madrid. Esta mina fue

abandonada en los principios del siglo XX y su principal extracción radicó en la extracción de Cu, alojado en el mineral *calcopirita* (Chamorro et al., 2014). Es importante recalcar que el municipio (Colmenarejo) se localiza dentro del Parque Regional del curso medio del río Guadarrama y su entorno y se encuentra próximo al embalse de Valmayor. La zona se sitúa entre los 780 y 815 m de altitud. Esos 35 m de diferencia en la altitud se extienden en unos 200 m de distancia lineal, lo que implica una fuerte pendiente media, llegando a superar en algunos puntos el 140 %. La temperatura media registrada es de 13,4 °C y una precipitación media de 637 mm. Los suelos de Colmenarejo son Cambisoles desarrollados a partir de litologías ácidas como granitos, gneises, esquistos, pizarras, micacitas y cuarcitas. Los muestreos se realizaron en dos zonas de la mina identificadas como la zona 1 (suelo no afectado) y Zona 3 (Zona de escombrera). Los muestreos se realizaron en la primavera del 2017. En cada uno de esas zonas se tomaron muestras compuestas de 10 submuestras a una profundidad de 15cm. Finalmente las muestras de suelo se sometieron a un análisis metagenómico.

### *Análisis metagenómico*

El análisis metagenómico es un conjunto de técnicas que nos permitió obtener todos los fragmentos de ADN que contienen las muestras de suelo con la finalidad de traducirlos a un lenguaje que puede ser leído (secuenciación) y compararlos con todas las huellas genéticas conocidas y publicadas hasta el momento, almacenadas en bases de datos como Gen Bank. Este análisis consistió en 4 pasos: **1).** extracción de ADN (un kit PowerSoil DNA isolation, MO-BIO). **2).** amplificación de todo el ADN mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional, con la diferencia que los cebadores que se utilizan se unen a todo el ADN que esté presente en la muestra. **3).** secuenciación a gran escala (pirosecuencia). **4).** Análisis bioinformático de los millones de secuencias obtenidas, y la comparación de las mismas con las

secuencias que se encuentran en todas las bases de datos (Gen Bank, NBCI). Así gracias a la homología entre ellas se identificó la estructura de la comunidad microbiana (riqueza de especies, diversidad y distribución) y finalmente para ordenar visualmente el conjunto de datos de la clasificación taxonómica se usó la herramienta bioinformática Krona (Ondov 2011, *Bioinformatics* 12:385)

### Resultados y discusión

Los resultados del análisis metagenómico en las diferentes zonas de la mina evaluadas mostraron que el número de secuencias perteneciente al dominio Bacteria para la zona 1 (zona no afecta por la contaminación) fue de 170.743, pero solo 1.230 corresponden con secuencias presentes en las bases de datos de National Center for Biotechnology Information (NBCI). En la zona 3 (escombrera) observamos una situación similar, donde se encontraron 131.709 secuencias y solo 1.191 correspondieron con secuencias presentes en la base de datos del NBCI. Con esta información deducimos dos aspectos a resaltar: en primer lugar, que solo el 1% de las bacterias encontradas en esas zonas están identificadas. Además, en la zona 1, hay una diversidad de bacterias mayor que en la zona 3. Esta última diferencia podría estar asociada con las características químicas de las zonas estudiadas. Estudios previos en la zona compararon la concentración de cobre y arsénico en la zona 1 y 3 y encontraron una mayor concentración de estos elementos en la zona 3, lo que podría explicar la abundancia de bacterias en esas zonas.

En cuanto a la abundancia de los diferentes filos perteneciente al dominio Bacteria (**Actinobacteria**, **Acidobacteria**, **Fermicutes**, **Bacteroidete** y **Proteobacteria**) no se observaron diferencias significativas entre las zonas estudiadas. Los filos más abundantes fueron Proteobacteria seguido de Fermicute y Actinobacteria. Pero al comparar números de especies correspondiente a los diferentes filos presentes en las diferentes zonas del estudio, (1 y 3) encontramos que la mayor variabilidad se observó, en

el filo Fermicute. Nosotros encontramos que 179 especies correspondiente al filo fermicute son comunes tanto, en zona 1 como la zona 3, pero hay 30 especies que están en zona 1 pero no lo están en zona 3 y, además, hay 20 especies del filo fermicute que no están en zona 1, pero que se encuentran presentes en la zona 3 (fig.1). En consecuencia, podemos inferir que la principal diferencia entre las zonas evaluadas está dada por la presencia y abundancia de las especies correspondiente a los diferentes filos de bacterias.

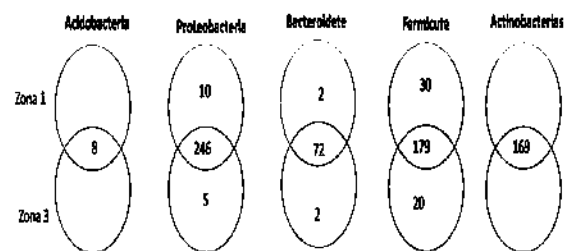


Fig. 1. Diagramas de Venn mostrando número de especies presentes de los diferentes filos de bacterias y en las zonas evaluadas

### Conclusiones

Los resultados mostraron que el número de secuencias del dominio Bacteria fue mayor en la zona no afectada. En ambas zonas de muestreo, el filo más abundante dentro del dominio bacteria fue Proteobacteria. Pero fue dentro del filo Fermicutes donde se observó el mayor número de especies no comunes entre las zonas estudiadas. Esta información puede servir como base para futuros estudios de descontaminación de suelos.

### Referencias bibliográficas

- Chamorro, H., González-Amezúa, C., Jordá, L. 2014. Antigua Pilar y la minería histórica en Colmenarejo, Ayuntamiento de Colmenarejo-Comunidad de Madrid, Madrid.
- Chen, L., Xiong, Z., Sun, L., Yang, J., & Jin, Q. 2011. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 40: 641-645.
- Nacke, H., Thürmer, A., Wöhlherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., & Daniel, R. 2011. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS one*, 6(2), e17000.
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics*, 12(1): 385.