



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS RESISTENTES
AL ARSÉNICO (As) Y AL CROMO (Cr) DE LA MICROCUENCA
DEL RÍO GALA DEL CANTÓN CAMILO PONCE ENRÍQUEZ**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORES: GREGORY GUSTAVO BURBANO BUSTAMANTE

GABRIELA CAROLINA LÓPEZ QUINTEROS

DIRECTORA: Ing. VERÓNICA LUCÍA CABALLERO SERRANO PhD.

Riobamba – Ecuador

2022

©2022, Gregory Gustavo Burbano Bustamante & Gabriela Carolina López Quinteros

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Nosotros, GREGORY GUSTAVO BURBANO BUSTAMANTE y GABRIELA CAROLINA LÓPEZ QUINTEROS, declaramos que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autores asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 11 de Febrero del 2022




Gregory Gustavo Burbano Bustamante
C.I. 230040504-6



Gabriela Carolina López Quinteros
C.I. 100413924-0

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación; Tipo: Proyecto de Investigación. **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS RESISTENTES AL ARSÉNICO (As) Y AL CROMO (Cr) DE LA MICRO CUENCA DEL RÍO GALA DEL CANTÓN CAMILO PONCE ENRÍQUEZ**, realizado por los señores: **GREGORY GUSTAVO BURBANO BUSTAMANTE** y **GABRIELA CAROLINA LÓPEZ QUINTEROS**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Andrés Agustín Beltrán Dávalos MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: ANDRES AGUSTIN BELTRAN DAVALOS	2022-02-11
Ing. Verónica Lucía Caballero Serrano Ph.D. DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN	VERONICA LUCIA CABALLERO SERRANO Firmado digitalmente por: VERONICA LUCIA CABALLERO SERRANO Fecha: 2022.04.19 10:58:00 -05'00'	2022-02-11
Dr. Celso Guillermo Recalde Moreno Ph.D. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	CELSO GUILLERMO RECALDE MORENO Firmado digitalmente por CELSO GUILLERMO RECALDE MORENO	2022-02-11

DEDICATORIA

Dedico este trabajo en primer lugar a mi madre Mercedes Bustamante quien es la persona más importante en mi vida y a quien le debo todo lo que soy hoy en día, por haber depositado toda su confianza en cada uno de mis retos siendo mi apoyo y no dudando ni un momento de mi capacidad e inteligencia. A mi padre Gustavo Burbano por haberme inculcado el amor por el estudio y haber alimentado mi hambre de superación siempre. A mi primo Cristian por ser mi ejemplo a seguir y haberme brindado su apoyo todo este tiempo. A mis hermanos Susana y Ernesto por siempre haber confiado en mi capacidad e inteligencia tomando como ejemplo cada uno de mis pasos. A mi sobrina Valentina por ser siempre esa motivación e inspiración de querer ser alguien más día a día. A mis tíos Pedro y Janeth, a mis primos Diana, Alison, Israel y Lionel por haberme acogido y brindado su apoyo en todo momento. A Fransheska por ser esa persona especial y haber estado a mi lado siendo parte de este logro, por su paciencia y amor que se han visto reflejados en mí como ese soporte, apoyo, motivación e inspiración para superar cada uno de los obstáculos que se me presentaban, y por siempre confiar en mis capacidades aun cuando yo dudaba de ellas. A mis queridos amigos Gaby L., Michelle M., David F., Daniel T., Michelle G., Gio, Fabian V., Paola G., Lizeth G., por siempre haber estado ahí para mí brindándome su apoyo y no dejándome desmayar durante toda esta etapa de mi vida.

Gregory

Con profunda admiración y respeto a mis padres Alfonso López, que con su ejemplo y enseñanza me enseñó desde pequeña a luchar por mis sueños y defender mis ideales y a mi mamá, Cecilia Quinteros, quien siempre me ha enseñado a no rendirme, a perseverar y ser constante sobre todas las cosas para lograr cualquier objetivo pese a cualquier adversidad, ellos, con amor supieron darme las herramientas necesarias para hacer llevadero este proceso lejos de mi hogar y me han guiado por el camino del bien. A mi abuela Francelina, mi motor de vida, quien siempre con su bendición me impulsó a llegar a mi meta. A mis hermanos, David y Victoria que han sido mi mayor motivación e inspiración cada día, quienes caminan en la vida a mi lado, me enseñan que el amor es incondicional pese a la distancia y toman como ejemplo cada uno de mis logros. A Stalin E., por su apoyo y cariño brindado en todo momento, quien creyó en mí cuando ni yo mismo lo hacía por ser mi motivación e inspiración en mis obstáculos y sobre todo mi fortaleza en cada derrota. A Paula R., Michelle H., Gregory B., David F., Daniel T., y Michelle G amigos incondicionales que siempre estuvieron pendientes de mí y nunca me dejaron rendirme.

Gabriela

AGRADECIMIENTO

Agradecemos en primer lugar a Dios por ser nuestra guía y fortaleza durante toda nuestra etapa académica y permitirnos cumplir esta meta tan anhelada de ser profesional.

A nuestros padres quienes han sido el pilar fundamental en nuestra vida, nuestro motor y fortaleza cada día, quienes nos ensaaron el valor de la constancia y la perseverancia para poder cumplir cada uno de nuestros objetivos personales y profesionales.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental por darnos la oportunidad de formarnos de manera íntegra, por habernos dejado soñar y experimentar en sus laboratorios, por la calidad humana y profesional con la que convivimos a lo largo de este proceso y por las experiencias que pudimos coleccionar durante todo este tiempo.

A la Dra. Maritza Yáñez, por abrirnos las puertas del laboratorio de Biotecnología, depositar su confianza en nosotros y permitirnos el uso de las instalaciones sin limitación alguna, por su paciencia, entrega y predisposición, y sobre todo por su apoyo incondicional necesario para que esta investigación pueda realizarse pese al momento tan delicado que pasamos a nivel mundial.

A la Ing. Verónica Caballero por haber aceptado el reto de dirigir este trabajo de investigación, por su guía y su paciencia la cual impulsó a realizar este trabajo.

Al Dr. Celso Recalde por habernos abierto las puertas del Grupo de Energías Alternativas y Ambiente y aceptar la iniciativa de realizar este trabajo de Identificación Molecular pese a las limitaciones que hemos tenido en este proceso y por siempre estar dispuesto a ayudar en este trayecto.

A nuestros amigos y compañeros Daniel T., David F y Michelle G., quienes nos enseñaron que caminando en grupo se puede llegar mucho más lejos, quienes nunca nos abandonaron, lucharon con nosotros cada día para sobresalir y hacer llevadero este proceso lejos de nuestro hogar, sin duda son nuestra familia chiquita con quienes compartimos innumerables momentos que atesoramos, son nuestro orgullo y familia para siempre.

A cada uno de nuestros familiares por siempre estar pendientes de nosotros y brindarnos esas palabras de aliento que han sido necesarias para cumplir con este sueño.

A todas esas personas que han formado parte de nuestra vida como estudiante queremos agradecerles por su sincera amistad, compañía, consejos, ánimo y apoyo brindado en cada etapa de este trayecto.

Gregory & Gabriela

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Agua contaminada por minería.....	4
1.2. Bacterias.....	4
1.2.1. Morfología bacteriana.....	4
1.2.1.1. Macroscópica.....	4
1.2.1.2. Microscópica.....	5
1.2.2. Bacterias resistentes a metales pesados.....	5
1.2.2.1. Principales bacterias resistentes al arsénico.....	6
1.2.2.2. Principales bacterias resistentes al cromo.....	6
1.3. Aislamiento y cultivos bacterianos.....	7
1.3.1. Aislamiento bacteriano.....	7
1.3.2. Cultivos bacterianos.....	8
1.4. Los metales pesados.....	8
1.4.1. Metales pesados.....	8
1.4.2. Arsénico.....	9
1.4.3. Cromo.....	9
1.4.4. Mecanismos de toxicidad de metales pesados.....	10
1.5. Interacción metal-bacteria.....	10
1.5.1. Resistencia y tolerancia bacteriana a metales pesados.....	10
1.5.2. Mecanismos de resistencia a metales pesados.....	11
1.5.2.1. Captura de iones en la célula bacteriana.....	11
1.5.2.2. Transformaciones medidas por enzimas.....	11
1.5.2.3. Expulsión de iones metálicos.....	11
1.6. EL ADN y técnicas de identificación molecular.....	12

1.6.1. ADN.....	12
1.6.2. <i>Métodos fenotípicos de identificación bacteriana</i>	12
1.6.2.1. <i>Características microscópicas</i>	12
1.6.2.2. <i>Características macroscópicas</i>	13
1.6.2.3. <i>Cultivo</i>	13
1.6.3. <i>Métodos moleculares de identificación bacteriana</i>	14
1.6.3.1. <i>ARNr 16S (rrs)</i>	15
1.6.3.2. <i>16S-23S ARNr</i>	15
1.7. Identificación molecular bacteriana	16
1.7.1. <i>Extracción y purificación de ADN</i>	16
1.7.2. <i>Amplificación de ADN bacteriano</i>	16
1.7.3. <i>Revelador por electroforesis en gel de agarosa</i>	17
1.7.4. <i>Secuenciación de ADN bacteriano</i>	18
1.7.5. <i>Comparación de secuencias</i>	18

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	19
2.1. Tipo de investigación	19
2.2. Diseño de la investigación	19
2.3. Etapas de la investigación	19
2.3.1. <i>Localización del estudio</i>	19
2.3.2. <i>Población de estudio</i>	19
2.3.3. <i>Tamaño de la muestra</i>	20
2.3.4. <i>Método de muestreo</i>	21
2.4. Muestreo	21
2.5. Aislamiento bacteriano	22
2.6. Cultivos puros	23
2.7. Ensayos de sensibilidad	24
2.8. Tinción Gram	24
2.9. Identificación molecular de bacterias	25
2.9.1. <i>Extracción y purificación de ADN bacteriano</i>	25
2.9.2. <i>Amplificación del gen 16s ARNr mediante reacción en cadena de la polimerasa</i>	26
2.9.3. <i>Secuenciación molecular</i>	27
2.9.4. <i>Identificación molecular bacteriana</i>	27

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1.	Aislamiento bacteriano	29
3.2.	Pruebas de sensibilidad	33
3.2.1.	<i>Arsénico</i>	33
3.2.2.	<i>Cromo</i>	34
3.3.	Tinción Gram	36
3.4.	Identificación molecular	37
3.4.1.	<i>Extracción y purificación de ADN bacteriano</i>	37
3.4.2.	<i>Amplificación del gen 16s ARNr mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real</i>	37
3.4.3.	<i>Secuenciación molecular</i>	38
3.4.4.	<i>Identificación molecular bacteriana</i>	39
	CONCLUSIONES	41
	RECOMENDACIONES	42
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Bacterias resistentes al arsénico	6
Tabla 2-1: Bacterias resistentes al cromo	7
Tabla 1-2: Coordenadas de toma de muestra.....	20
Tabla 2-2: Concentraciones por ensayo realizado	24
Tabla 1-3: Morfología de cepas aisladas.....	31
Tabla 2-3: Pruebas de sensibilidad con arsénico	33
Tabla 3-3: Pruebas de sensibilidad con cromo	34
Tabla 4-3: Tinción Gram de bacterias aisladas.....	36
Tabla 5-3: Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Morfología bacteriana: 1 cocos; 2 diplococos; 3 cocos en cadenas; 4 cocos en racimos; 5 cocos en tétradas; 6 cocobacilos; 7 bacilos; 8 bacilos bordes redondeados; 9 bacilos bordes rectos; 10 bacilos fusiformes; 11 y 12 bacilos curvos; 13, 14 y 15 espiroquetas	5
Figura 2-1: Estructura secundaria del ARNr 16S	15
Figura 3-1: Amplificación de ADN mediante PCR.....	16
Figura 4-1: Diagrama de los movimientos de los fragmentos de ADN a través del gel	17
Figura 5-1: Secuenciación automática de ADN	18
Figura 1-2: Mapa de ubicación de puntos de muestreo	20
Figura 2-2: Sitios de muestreo A: Río Chico B: Río Gala C: Río Tenguel	21
Figura 3-2: Muestreo A: Toma de muestra B: Medición de parámetros	22
Figura 4-2: Aislamiento bacteriano A: Preparación de muestra compuesta B: Preparación de diluciones C: Preparación del medio de cultivo	23
Figura 5-2: Cultivos puros	23
Figura 6-2: Medio de cultivo con óxido de cromo a 5000 ppm.....	24
Figura 7-2: Extracción de ADN bacteriano A: Toma de pellet bacteriano desde la caja petri B: Aplicación de reactivos y muestra de pellet a los tubos con perlas	25
Figura 8-2: Purificación de ADN A: Centrifugación de muestras B: Ubicación de pellet de ADN para posterior lavado y secado.	26
Figura 9-2: Amplificación de ADN A: Preparación y depósito de Master Mix en los tubos B: Programación de termociclador para PCR C: Preparación de gel de agarosa para Electroforesis	27
Figura 1-3: Bacterias aisladas A: Ch-R3 B: Ten-R1.....	29
Figura 2-3: Repliques de bacterias aisladas A: Gal-R3-C7 B: Gal-R3-C6 C: Gal-R3-C8 D: Gal-R2-C5 E: Ch-R3-C5 F: Ch-R1-C2.....	30
Figura 3-3: Pruebas de sensibilidad con arsénico a concentración de 10 ppm A: Ch-R1-C2 B: Gal-R3-C1	34
Figura 4-3: Pruebas de sensibilidad con cromo a concentración de 5000 ppm A: Ten-R1-C1 B: Gal-R3-C1	35
Figura 5-3: Tinción Gram A: Bacilos Gram – B: Cocos Gram +.....	36
Figura 6-3: Medición de calidad de muestra de ADN mediante Nanodrop 2000	37
Figura 7-3: Electroforesis de la amplificación con primers 27F/1492R. M: Marcador de peso molecular ABM 100pb Opti-DNA Marker	38

Figura 8-3: Comparación de las secuencias obtenidas	38
Figura 9-3: Elección del organismo	39

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: INFORME DE RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ag	Plata
As	Arsénico
Cd	Cadmio
Se	Selenio
Cu	Cobre
Pb	Plomo
Zn	Zinc
Cr	Cromo
Co	Cobalto
Hg	Mercurio
Ni	Níquel
AS₂O₃	Trióxido de arsénico
CO₂	Dióxido de carbono
CrO₂	Óxido de cromo
MnCl₂	Cloruro de manganeso
GEAA	Grupo de Energías Alternativas y Ambiente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
RNAsa	Ribonucleasa
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
CDFs	Facilitadores de difusión de cationes
STMs	Segmentos transmembranales
ATP	Adenosín trifosfato
RND	Resistencia, nodulación y división celular
ddNTPs	Didesoxinucleótidos
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
RDP	Ribosomal Database Project
RIDOM	Ribosomal Differentiation of Medical
IDNS	Integrated Database Network System

NTE INEM	Norma Técnica Ecuatoriana del Servicio Ecuatoriano de Normalización
PCA	Plate Count Agar
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
SDS	Dodecilsulfato sódico
BLAST	Basic local alignment search

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la identificación molecular de bacterias con capacidad metabólica para soportar altas concentraciones de Arsénico (As) y Cromo (Cr) de muestras de agua provenientes de la microcuenca del río Gala del cantón Camilo Ponce Enríquez, provincia del Azuay. Se realizó el respectivo aislamiento bacteriano mediante siembra por extensión de superficie en medio de cultivo PCA, estas muestras se incubaron a una temperatura de 25 grados Celsius. Tomando como punto de partida la caracterización macroscópica morfológica, se seleccionaron 27 colonias representativas para realizar siembras consecutivas o repliques correspondientes para la obtención de cultivos axénicos. Tras la realización de nueve repliques de cultivos puros se realizaron análisis de sensibilidad para arsénico con trióxido de arsénico desde 0.1 a 100 ppm, se obtuvieron 22 cepas resistentes y para cromo con dióxido de cromo, se obtuvieron 21 cepas resistentes desde 0.5 a 50000 ppm. La extracción y purificación de ADN se realizó por métodos convencionales lo cual consistió en la aplicación de tubos con perlas con buffer de extracción, β -mercaptoetanol, muestra bacteriana, y su homogenización en vortex donde se libera el material genético, a su vez se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría de microvolúmenes y se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa para posteriormente realizar PCR, los amplicones obtenidos fueron secuenciados en el laboratorio Macrogen donde se obtuvieron secuencias que fueron emparejadas en análisis bioinformático mediante BLAST y se logró identificar 16 especies bacterianas entre las más importantes se identificaron especies bacterianas pertenecientes a géneros como *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Aeromonas sp*, *Acinetobacter sp* y *Bacillus sp* las cuales están relacionadas a tratamientos de remoción de contaminación por metales pesados. Se sugiere investigar la resistencia de estos microorganismos en presencia de otros metales pesados, especialmente de aquellos relacionados con actividades mineras.

Palabras clave: <IDENTIFICACIÓN MOLECULAR>; <BACTERIAS>; <AISLAMIENTO>; <CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA>; <CULTIVOS AXÉNICOS>; <ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)>.

LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE
Número de identificación: 030001465
su BANCO CENTRAL DEL ECUADOR,
su ENTIDAD DE CERTIFICACIÓN DE
SIGNACIÓN SOBRE SU CUANTO,
serialNumber: 030001465,
c=LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2022.04.07 18:25:30 -0500'

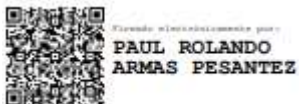


0638-DBRA-UTP-2022

SUMMARY

The aim of this research was the molecular identification of bacteria with metabolic capacity to resist high concentrations of Arsenic (As) and Chromium (Cr) present in water samples from Gala River micro-watershed, located in Camilo Ponce Enriquez county, Azuay province. The corresponding bacterial isolation was performed through an extensive surface sowing in PCA culture medium, these samples were incubated at 25 degrees Celsius. Considering the macroscopic morphological characterization as a starting point, 27 representative colonies were selected to perform consecutive sowings or copies to obtain axenic cultures. After performing nine copies of pure cultures, sensitivity analyses were performed for arsenic with arsenic trioxide from 0.1 to 100 ppm, obtaining 22 resistant strains, while for chromium with chromium dioxide, 21 resistant strains from 0.5 to 50,000 ppm were obtained. DNA extraction and purification were performed through conventional methods which were based on the application of pipes containing beads with buffer, β -mercaptoethanol extraction. On the other hand, bacterial sampling and its homogenization in vortex to release genetic material was carried out. DNA was also quantified through microvolume spectrophotometry and its integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis to subsequently perform PCR. The amplicons obtained were sequenced in the Macrogen laboratory where sequences were obtained and matched in BLAST bioinformatic analysis; thus, 16 bacterial species were identified. The most important bacterial species belonging to genera were: Enterobacter sp, Pseudomonas sp, Aeromonas sp, Acinetobacter sp and Bacillus sp, which have relation with contamination caused by heavy metal removal treatments. It is recommended to investigate the resistance of these microorganisms in other heavy metals, especially in those related to mining activities.

Keywords: <MOLECULAR IDENTIFICATION>; <BACTERIA>; <ISOLATION>; <MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION>; <AXENIC CULTURES>; <DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA)>.



INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el aumento desmedido de la minería ilegal de manera artesanal ha tenido como consecuencia el incremento de la contaminación debido a la presencia de metales pesados en sitios cercanos a cuerpos hídricos, ya que no se realiza utilizando técnicas adecuadas generando impactos sociales y ambientales que afectan directamente a los derechos del ambiente (Oviedo et al, 2017, p.437). La minería es uno de los sectores estratégicos del Ecuador siendo una de las actividades antropogénicas que ponen en vulnerabilidad al ambiente y al mismo tiempo exponen a la sociedad a cierta conflictividad en relación a la gran escala de explotación minera. Cabe mencionar los impactos negativos más referidos en el tema del impacto ambiental como es el caso Nambija, Ponce Enríquez, San Gerardo, San Bartolomé pertenecientes a la provincia del Azuay (Valencia, 2017, p. 133). El cantón Camilo Ponce Enríquez se ha convertido en foco de atención debido a la minería ilegal, la cual ha puesto en inminente peligro de contaminación a los ríos y efluentes de la cuenca hídrica del río Gala. Según el Plan de desarrollo y ordenamiento territorial se menciona que en el catastro realizado por la ARCOM en el año 2014 en el cantón Camilo Ponce Enríquez se encuentran 105 concesiones mineras que ocupan un 51.98% de la superficie total de dicho cantón entre las cuales se presencia un 9.49% de zonas mineras artesanales (Plan de desarrollo y ordenamiento territorial 2014-2030, 2014, p. 68). Las concesiones mineras tienen consecuencias medio ambientales graves las cuales atraen efectos negativos al medio ambiente, como por ejemplo, la mudanza de especies biológicas debido a la alteración de condiciones terrestres y acuáticas. Otro punto importante a mencionar es que el agua que es usada para consumo humano y regadío ha generado problemas de salud a los residentes de las comunidades asociados al drenaje ácido de minas de plata (Ag), arsénico (As), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg) y Níquel (Ni) (Valencia, 2017, p. 134). Los metales pesados son tóxicos en bajas concentraciones, y se acumulan en zonas costeras y estuarinas, también tienden a bioacumularse y biomagnificarse en organismos acuáticos es por ello que se deben tratar los metales pesados como contaminantes no biodegradables y proponer políticas de descontaminación (Pernía et al., 2018, p.90).

El Ecuador pese a ser considerado mundialmente como un país con una extensa biodiversidad, tiene muy pocos estudios; los temas afines a la biología molecular y bacteriana en sitios contaminados de manera antropogénica y en lugares biodiversos son muy pocos en relación a países vecinos que potencialmente tratan de promover investigaciones relacionadas al cuidado y preservación del medio ambiente. De la misma manera, en el cantón Camilo Ponce Enríquez al ser un sitio de minería ilegal, no se han destinado los recursos necesarios para realizar investigación microbiológica y/o molecular lo cual resulta preocupante al ser un lugar con muy poco control ambiental pese a ser un punto con índices de contaminación alarmantes.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la ciencia ha descrito técnicas mediante las cuales se pueden remover del ambiente metales pesados, dentro de estos procesos se puede implementar técnicas de biorremediación ambiental, en donde se usan microorganismos o sus derivados para lograr modificar sustancias peligrosas en elementos inofensivos para el medio ambiente. El proceso de biorremediación es muy complejo, requiere de análisis previos para garantizar la eficiencia entre ellos, la indagación de microorganismos que sean capaces de metabolizar, bioacumular o abatir niveles altos de contaminantes, tales como metales pesados y sustancias ajenas al medio ambiente; para lograr la búsqueda se requieren procesos de aislamiento y caracterización de microorganismos y puesta a prueba de organismos vivos frente a elevadas concentraciones de metales pesados para verificar si existe resistencia de los mismos a concentraciones ajenas a su medio de vida (Muñoz et al., 2019, p. 110).

Este trabajo de investigación propone identificar bacterias específicas con capacidad de resistencia a elevadas concentraciones de Arsénico (As) y Cromo (Cr), es por esto que se ha tomado como área de estudio la micro cuenca del río Gala que presenta contaminación antrópica por minería artesanal e ilegal con presencia de concentraciones de metales pesados elevadas debido a la falta de control minero y deficiencia de procesos adecuados de eliminación de los mismos.

Los resultados de esta investigación científica servirán como herramienta para procesos de biorremediación de ambientes con presencia de metales pesados, lo cual será a favor de poblados cercanos a sitios contaminados que están expuestos a condiciones que atentan contra su vida. La identificación molecular de estas bacterias será una guía para posteriores investigaciones enfocadas al uso de estas bacterias para elaboración de celdas de combustible microbianas y producción de energías alternativas, renovables y limpias. Este proyecto de investigación cuenta con la cooperación del Grupo de Energías Alternativas y Ambiente (GEAA).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

- Identificar bacterias resistentes al arsénico (As) y al cromo (Cr) de la micro cuenca del río Gala del cantón Camilo Ponce Enríquez.

Objetivos Específicos

- Cultivar cepas bacterianas de muestras líquidas provenientes de efluentes de la micro cuenca del río Gala.
- Evaluar la resistencia de bacterias al arsénico (As) y al cromo (Cr) mediante pruebas de sensibilidad.
- Determinar cepas resistentes al arsénico (As) y al cromo (Cr) mediante el método molecular de la PCR en tiempo real.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Agua contaminada por minería

El tratamiento del agua de minería ha generado grandes impactos ambientales que traen consigo contaminación del agua y el subsuelo. La contaminación del agua por minería está estrechamente relacionada con su gestión, pero en sí lo que agrava este problema es la cantidad de contaminantes tóxicos que intervienen en los procesos de minería y aún más cuando es ilegal y se lo realiza sin control ni gestión de desechos producidos, es así como se encuentran componentes como: As (arsénico), Cd (cadmio), Se (selenio), Cu (cobre), Pb (plomo), Hg (mercurio), Cr (cromo), Zn (zinc) entre los más importantes, los cuales son vertidos directamente al agua exponiendo a la población a peligros inminentes a la salud y a su vez los cambios de la calidad del agua que afectan al ambiente, flora y fauna (Menéndez & Muñoz, 2021, p. 143).

1.2. Bacterias

Las bacterias son microorganismos de vida libre, excepto algunas que necesitan de otra célula para sobrevivir, son organismos procariotas unicelulares que se duplican bajo el concepto de fisión binaria, poseen instrumentos mediante los cuales pueden producir energía y material genético para su ciclo vital. Están compuestas por estructuras como la membrana celular, ribosomas los cuales se encargan de la síntesis de proteína y ADN el cual contiene la información genética, estos componentes son comunes en diversos tipos bacterianos (Pérez & Mota, 2008, pp. 23-24).

1.2.1. *Morfología bacteriana*

1.2.1.1. *Macroscópica*

Al sembrar bacterias en medios sólidos es posible reconocer de manera simple sus colonias, este proceso se lleva a cabo en una siembra en medios selectivos y llevando a cabo procesos de incubación celular de entre 24 y 48 horas a una temperatura óptima que suele variar dependiendo del microorganismo en cuestión (Pérez & Mota, 2008, p. 26).

Las características de una colonia tienen que ver con su movilidad, su tamaño oscila entre los 0.5mm hasta llegar a compararse con proteobacterias que son las más grandes en tamaño, su forma, los bordes, la superficie poseen características propias en cada tipo de colonia bacteriana

y se describen de mejor manera (Figura 1-1). En relación con la coloración que adquieren puede ser verde, amarillo, blanco, etc. La conducta frente a la luz también es una característica importante y esta puede ser opaca o brillante. Se debe destacar que, entre las bacterias patógenas, las formas capsuladas suelen ser más peligrosas (Pérez & Mota, 2008, p. 27).

1.2.1.2. Microscópica

La rigidez celular es una característica importante y a la vez el determinante de la forma bacteriana. Las bacterias pueden presentar forma de cocos que suelen ser ovaladas o esféricas, bacilos o en forma de bastones rectos o curvos y espirilos o en forma espiral, pero así mismo, las bacterias pueden mostrarse unidas unas a otras formando diplococos, y si los planos de la división son muchos estos pueden ser racimos o *Staphylococcus*. Un microscopio óptico o electrónico puede mostrar claramente la forma microscópica bacteriana después de realizar el procedimiento de tinción Gram con colorantes catiónicos que son atraídos por componentes de carga negativa como son los ácidos nucleicos o sin tinción si son tratadas con glicerol o soluciones no acuosas (Pérez y Mota, 2006, p. 25). La morfología está definida de la siguiente manera: 1 cocos; 2 diplococos; 3 cocos en cadenas; 4 cocos en racimos; 5 cocos en tétradas; 6 cocobacilos; 7 bacilos; 8 bacilos bordes redondeados; 9 bacilos bordes rectos; 10 bacilos fusiformes; 11 y 12 bacilos curvos; 13, 14 y 15 espiroquetas (Figura 1-1).

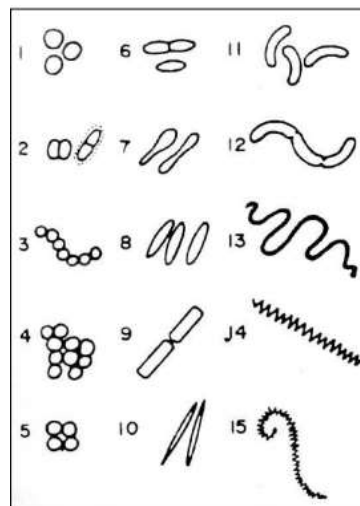


Figura 1-1: Morfología bacteriana

Fuente: (Pérez, & Mota, 2008).

1.2.2. Bacterias resistentes a metales pesados

Las bacterias son microorganismos muy complejos que usan para sus funciones catalíticas y procesos celulares metales a concentraciones traza, pero para concentraciones superiores han

desarrollado mecanismos para soportar efectos tóxicos de los metales pesados, los cuales pueden ser los que tienen que ver con elementos celulares que equilibran la toxicidad, ya sea mediante la captura de iones, o mediante enzimas que cambian el estado redox de metales estructurándolos a su forma menos tóxica y finalmente por transportadores localizados en la membrana que liberan efectos tóxicos desde el citoplasma de las células (Marrero et al., 2010, p.69).

Los mecanismos bacterianos que determinan la resistencia a metales pesados se encuentra transcrito por determinantes genéticos que codifican proteínas y están localizadas en el cromosoma bacteriano y/o en constituyentes, tales como plásmidos o transposones en donde los que han determinado mayor especificidad son los plásmidos, este mecanismo les permite oponerse a los efectos nocivos de los metales pesados en el ambiente y modificar las concentraciones de estos elementos (Marrero et al., 2010, p.71).

1.2.2.1. Principales bacterias resistentes al arsénico

Varios autores han determinado la resistencia de algunas especies bacterianas a metales como el arsénico como se muestra en la Tabla 1-1:

Tabla 1-1: Bacterias resistentes al arsénico

BACTERIA	FUENTE BIBLIOGRÁFICA
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	(Campos et al., 2007: p.152)
<i>Wautersia solanacearum</i>	(Campos et al., 2007: p.152)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(Campos et al., 2007: p.152)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(Campos et al., 2007: p.152)
<i>Burkordelia cepacea</i>	(Campos et al., 2007: p.152)
<i>Bacillus sp.</i>	(López, 2020, p.96)
<i>Bacillus simplex</i>	(López, 2020, p.96)
<i>Bacillus megaterium</i>	(López, 2020, p.96)
<i>Bacillus licheniformis</i>	(Prieto et al., 2018, p.23)
<i>Bacillus cereus</i>	(Prieto et al., 2018, p.23)
<i>Bacillus pumilus</i>	(Prieto et al., 2018, p.23)
<i>Bacillus subtilis</i>	(Prieto et al., 2018, p.23)
<i>Bacillus vietnamensis</i>	(Prieto et al., 2018, p.23)
<i>Bacillus gibsonii</i>	(Prieto et al., 2018, p.23)
<i>Acidovorax sp.</i>	(Bachate et al., 2009, p.152)
<i>Acidovorax borkumensis</i>	(Bachate et al., 2009, p.152)
<i>Escherichia coli</i>	(Bachate et al., 2009, p.152)
<i>Pseudomonas putida</i>	(Bachate et al., 2009, p.152)

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

1.2.2.2. Principales bacterias resistentes al cromo

Varios autores han determinado la resistencia al cromo de algunas especies bacterianas como se muestra en la Tabla 2-1:

Tabla 2-1: Bacterias resistentes al cromo

BACTERIA	FUENTE BIBLIOGRÁFICA
<i>Enterococcus avium</i>	(Menchaca, 2015, pp. 88)
<i>Escherichia coli</i>	(Menchaca, 2015, pp. 88)
<i>Escherichia fergusonii</i>	(Menchaca, 2015, pp. 88)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Menchaca, 2015, pp. 88)
<i>Serratia marcescens</i>	(Menchaca, 2015, pp. 88)
<i>Exiguobacterium acetylium</i>	(Okeke, 2008, pp. 1574)
<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	(Okeke, 2008, pp. 1574)
<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	(Okeke, 2008, pp. 1574)
<i>Exiguobacterium aestuari</i>	(Okeke, 2008, pp. 1574)
<i>Aeromona jandaei</i>	(Mora y Bravo, 2017, pp. 29)
<i>Aeromona hydrophila</i>	(Mora y Bravo, 2017, pp. 29)
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	(Mora y Bravo, 2017, pp. 29)
<i>Aeromona caviae</i>	(Loukidou et al, 2004, pp. 98)
<i>Kokuria sp.</i>	(Nesheli er al, 2017, pp. 12)

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

1.3. Aislamiento y cultivos bacterianos

1.3.1. Aislamiento bacteriano

El cultivo de microorganismos comprende procesos de aislamiento de la microbiota presente en una muestra, es decir el desprendimiento físico de los microorganismos. El desprendimiento físico de microorganismos, el cual se efectúa mediante procesos como: la dilución seriada de muestras, placas de las diluciones en agar y posterior la transferencia de colonias solas a otra placa. Otro método de aislamiento de bacterias es la filtración mediante filtros con características de poro específicas; para incrementar la certeza de las diluciones seriadas existe un procedimiento con un sistema de microdispensador MicroDrop (Hahn et al., 2019, p.315).

Frecuentemente se requieren aislamiento de procariontas, que suelen ser cepas de una especie o género en específico y este proceso suele facilitarse mediante la aplicación de medios de cultivo selectivos, que van en coordinación con condiciones selectivas o específicas de incubación o un tratamiento previo también específico para estas bacterias (Hahn et al., 2019, p.315).

En ocasiones el aislamiento tiende a ser dirigido a microorganismos fáciles de aislar, pero con menor abundancia celular o falta de selectividad en el medio de cultivo, para estos casos también se puede recurrir a cultivos de enriquecimiento, que incrementa significativamente la abundancia, estas muestras de enriquecimiento se añaden al agar e incrementan la capacidad de crecimiento (Hahn et al., 2019, p.316).

1.3.2. Cultivos bacterianos

Un cultivo bacteriano no es más que un procedimiento que tienen la finalidad de propagar microorganismos brindándoles condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo. Para que las bacterias puedan propagarse es necesario otorgarles nutrientes de acceso desde el punto de vista metabólico. Para obtener un cultivo microbiológico es importante monitorear bioelementos como: carbono, nitrógeno, azufre y fósforo, así como también vitaminas y controlar factores físicos como: el pH, temperatura, humedad y radiación, los cuales suelen ser importantes para el desarrollo bacteriano. Los microorganismos en fase de crecimiento realizan réplicas de sí mismos y requieren de los elementos que se encuentran en su composición química (Hernández et al., 2001, p.45).

Un cultivo que consta solamente de un tipo de microorganismo es conocido como cultivo axénico o puro y aquel que está determinado por una variedad de microorganismos es llamado cultivo mixto; así mismo es importante tener en cuenta la importancia de aspectos mediante los cuales se separa o aísla un organismo en cultivo axénico a partir de poblaciones mixtas (Hernández et al., 2001, p.49).

1.4. Los metales pesados

1.4.1. Metales pesados

Los metales pesados son un grupo aproximado de 40 elementos en la tabla periódica con una densidad de 5 g/cm³ que puede ser variable, masa y peso atómico por encima de 20 (Londoño, 2016, p.147).

Los metales pesados pueden estar en el medio ambiente de forma natural, ya sea mediante la erosión o por la actividad volcánica y de forma antropogénica en donde las principales formas de contaminación son la minería, uso de fertilizantes y pesticidas, vertidos industriales entre los más importantes; a su vez constituyen una parte importante en los sistemas biológicos, ya que suelen ser esenciales en cantidades diminutas para cumplir diversas funciones vitales (Ali et al., 2013, p.870). Uno de los principales problemas a nivel mundial es la contaminación por metales pesados, este tipo de contaminación antropogénica ocurre debido a la movilización de metales pesados mediante extracción de minerales, lo cual ha llevado a la liberación de estos elementos al medio. Cabe recalcar, que los metales pesados no son biodegradables y tienden a acumularse en el entorno—siendo así un riesgo para la salud humana y el ambiente. Este problema es cada vez más creciente con el aumento desmedido de la industrialización y la perturbación de los ciclos naturales (Ali et al., 2013, p.870).

1.4.2. Arsénico

El arsénico es un metaloide que pertenece al grupo V-A de la tabla periódica, su forma estable tiene un número atómico el 33, masa atómica de 74.9216 y una densidad de 5.73 g/cm³. Es cristalino y tiene tres formas alotrópicas que suelen ser amarillas, negras y grises. El arsénico posee capacidad para unirse de forma covalente con la mayoría de metales y no metales formando así estructuras orgánicas estables (Adriano, 2001, p.220).

Los principales compuestos de arsénico se usan de manera primordial en la agricultura para la producción de pesticidas y herbicidas, se estima que la producción mundial de As es de 75 a 100x10³ toneladas anuales, de los cuales los Estados Unidos usa la mitad, el 97% total de As producido es el trióxido de arsénico (As₂O₃) es importante recalcar que este compuesto se usa por sus efectos tóxicos (Adriano, 2001, p.220).

Este compuesto tóxico es el 20vo elemento más abundante en la corteza terrestre, distribuido de forma no homogénea en el mundo, también constituye un elemento cancerígeno y de riesgo biológico. El arsénico se puede encontrar de manera natural en la atmósfera, en el suelo, agua y organismos vivos, pero constituye un serio problema medio ambiental, debido a su simple transporte en condiciones naturales, sin embargo, la actividad minera, el uso de pesticidas, herbicidas y la utilización de As como suplemento de animales, ha llevado los niveles de contaminación a cifras alarmantes a nivel mundial (Rangel et al., 2015, p.104).

1.4.3. Cromo

El cromo es un metal pesado con número atómico 24, forma parte del grupo VI-B en la tabla de elementos químicos, tiene masa atómica de 52 u; este metal se disuelve muy fácilmente en ácidos minerales no oxidantes, de la misma manera tiene propiedades de maleabilidad y presenta un color plateado y brillante. El cromo se puede encontrar en dos formas: trivalente y hexavalente entre las cuales la trivalente es benigna mientras que la hexavalente es altamente tóxica (Adriano, 2001, p.316).

El cromo es un elemento resultante de la actividad industrial, el cual en su estado trivalente puede ser sustancial, pero suele alterarse a su forma hexavalente cuando se encuentra en condiciones ácidas, esta forma hexavalente es potencialmente tóxica para la salud humana causando enfermedades, mutaciones y cáncer (Benítez, 2011, p.26).

Este elemento químico es usado en grandes cantidades en la industria de la curtiembre de cuero; el cual es desalojado directamente al medio, en donde se acumula y sufre transformaciones o cambios de estado letales para el ambiente. Aproximadamente el 32% del cromo mundial es usado en esta industria, pero actualmente la industria minera, se ha convertido también en potencial contaminante por cromo en el mundo. El estado trivalente del cromo se puede encontrar en el

agua en forma soluble, pero el hexavalente se convierte en mucho más soluble y con movilidad entre sustratos perturbando el equilibrio ambiental de microorganismos y organismos vivos por su capacidad de filtración en las membranas (Benítez, 2011, p.26).

1.4.4. Mecanismos de toxicidad de metales pesados

La toxicología de los metales pesados está relacionada con el elemento metálico involucrado, sus características tóxicas, si este es orgánico, inorgánico, lipofílico o hidrofílico. Estas características son las que determinan la cinética de los contaminantes y objetivos biológicos, debido a la reactividad de estos elementos y su facilidad para acoplarse a la diversidad de moléculas orgánicas (Buriticá & Zamora, 2019, p.85).

Algunos organismos, han desarrollado procesos de bioacumulación para poder reservar el contaminante internamente, ya que no tienen la capacidad de mantener niveles óptimos de excreción, pero este mecanismo se ve agravado conforme suceden los eslabones de las cadenas tróficas debido al aumento de concentraciones de contaminantes (Buriticá & Zamora, 2019, p.85)

Pese a la gran diversidad de características químicas de los metales pesados hay varios mecanismos involucrados en la toxicidad de estos como son: el estrés oxidativo celular debido a la incapacidad de regular reacciones redox, inestabilidad genómica provocada por la inhibición del ADN y la inactivación de controles de crecimiento, por lo cual existe una proliferación desmedida de células (Beyersmann & Hartwig, 2008, p.493).

La toxicología de los metales pesados está regulada por características físicas y químicas como el estado de oxidación y los radios iónicos. De manera específica la geometría, los ligandos, el número de coordinación son desencadenantes de las interacciones de los metales (Beyersmann & Hartwig, 2008, p.494).

1.5. Interacción metal-bacteria

1.5.1. Resistencia y tolerancia bacteriana a metales pesados

La diferencia entre bacterias resistentes y tolerantes a metales pesados radica en los mecanismos que estas presentan: las primeras, presentan mecanismos codificados genéticamente constitutivos o inducidos por la presencia del metal, estos mecanismos son rápidos e inespecíficos y dependen de la existencia por medio de la membrana citoplasmática del gradiente quimiosmótico; las segundas presentan mecanismos indiferentes a la presencia o ausencia del metal, estos mecanismos son más lentos en comparación a los otros y poseen una alta especificidad de sustrato, por lo general, utilizan como fuente de energía la hidrólisis de ATP en adición del gradiente quimiosmótico y se induce bajo situaciones metabólicas especiales o condiciones nutricionales

desfavorables (Nies y Silver, 1994, p.187). Tanto las bacterias resistentes como las tolerantes poseen la capacidad de extraer metales pesados por medio de la captación de estos en lugares de contaminación por lo que hoy en día son consideradas de gran interés (Marreto, 2010, p.69).

1.5.2. Mecanismos de resistencia a metales pesados

Las bacterias poseen varios mecanismos de resistencia que les permiten tolerar a los metales pesados y los efectos que estos generan (Cervantes, 2006, p.203), estos mecanismos son el resultado de sistemas específicos de intervención de diversos sustratos que le permite a la célula bacteriana defenderse al interactuar sus componentes celulares con el metal pesado (Marreto, 2010, p.69). Entre los principales mecanismos se encuentran:

1.5.2.1. Captura de iones en la célula bacteriana

Neutralizan la toxicidad de los iones metálicos quedando atrapados en el interior de la célula por acción de los polímeros estructurales y los extracelulares con los que interactúan, evitando así su interacción con otras proteínas esenciales. El secuestro y acumulación de los metales se puede dar en la membrana, espacio periplasmático y el interior de la célula, aunque se han dado casos que dicha acción ocurre en el citoplasma como el caso específico de la *Pseudomonas aureginosa*. (Marrero, 2010, p.69).

1.5.2.2. Transformaciones medidas por enzimas

Las transformaciones de los metales por acción de las enzimas involucran reducción, oxidación, dimetilación y metilación, modificando así el estado de óxido reducción de los metales y transformándolos en formas tóxicas menores, o a su vez generando compuestos volátiles o bien poco solubles en agua (Marrero, 2010, p.69).

1.5.2.3. Expulsión de iones metálicos

Se expulsan especies tóxicas del citoplasma de la célula mediante transportadores de la membrana en base a dos sistemas:

1) Sistemas de expulsión de cationes

- Los CDFs (facilitadores de difusión de cationes) son polipéptidos de mediano tamaño con seis STMs (segmentos transmembranales), estos en la membrana interior cumplen la función de

homodímeros y a su vez se encargan de que los sustratos del espacio periplasmático, sean expulsados (Cervantes, 2006, p.203).

- Las ATPasas tipo P se encuentran en la membrana interna, cumplen la función de llevar iones al interior de la célula y a su vez se encargan de expulsar del espacio periplasmático metales tóxicos (Cervantes, 2006, p.203).

- Las proteínas de la familia RND en las especies bacterianas forman parte de los procesos de resistencia, nodulación y división celular, a su vez participan en la expulsión de metales tóxicos para ello deben estar ligadas a una pareja de polipéptidos auxiliares (Cervantes, 2006, p.203).

2) Sistema de expulsión de aniones

Presentan transportadores cuya función es expulsar oxianiones, cuya derivación es dada del cromo y del arsénico, incluyendo sistemas relacionados con ATPasas denominados quimiosmóticos (Cervantes, 2006, p.203).

1.6. EL ADN y técnicas de identificación molecular

1.6.1. ADN

El ácido desoxirribonucleico es la molécula que se encarga de transmitir a su descendencia todas las características genéticas almacenadas. El ADN contiene secuencias de información generadas por sus nucleótidos (elementos fundamentales de la estructura química del ADN) mismos que se encuentran organizados de manera lineal. El gen se define como la información que codifica un determinado carácter, se encuentran organizados de forma lineal y se agrupan para formar los denominados cromosomas, esto hace posible que genes que son vecinos se hereden juntos (Rocha, 2002, p.10).

1.6.2. Métodos fenotípicos de identificación bacteriana

Hoy en día los métodos convencionales para la identificación bacteriana se basan en las características fenotípicas debido a sus bajos costes de realización. Algunos de los principales métodos se describen a continuación:

1.6.2.1. Características microscópicas

El examen en fresco de muestras no teñidas para observación directa o con montaje salino en el microscopio permite verificar la presencia de las bacterias de interés y de otros organismos ajenos

como micelios, levaduras y demás parásitos y células. Este proceso facilita la evaluación la calidad de la muestra y observar la disposición y movilidad de las bacterias de interés. En ocasiones, la tinción es el primer y el único paso para identificar bacterias, las que más se usan son la tinción Gram y la de azul de metileno. La tinción Gram se emplea principalmente para definir la morfología, forma de agruparse y las propiedades de tinción permitiéndonos así clasificar a las bacterias en gramnegativas cuando adoptan el color rojo y grampositivas a las de color violeta (Gobernado & López., 2003, p.56).

Las pruebas bioquímicas comprenden pruebas como características microscópicas entre las que destacan características morfológicas, medios de cultivo y factores de crecimiento se relacionan directamente con las características físicas de las bacterias. También se incluyen pruebas bioquímicas, entre las cuales tenemos: pruebas de identificación previa como catalasa y oxidasa que son de lectura inmediata; pruebas rápidas que incluyen hidrólisis de hipurato, aminopeptidasas, indol y úrea; pruebas lentas asociadas análisis con DNAsa, fermentación de azúcares y reducción de nitratos entre las más importantes y finalmente pruebas de resistencia en los que destaca los antibióticos (Bou et al., 2011, p.602).

1.6.2.2. Características macroscópicas

La morfología es la identificación preliminar de microorganismos. Para su observación es necesario su análisis en medios no selectivos con cultivos frescos de las colonias de interés. Para la identificación es importante contar con un cultivo puro procedente de una misma célula y con un solo tipo de microorganismo. En estas condiciones es posible describir sus características de tamaño, forma, consistencia y color (Fernández, 2010, pp. 4-6).

1.6.2.3. Cultivo

Para que el cultivo de microorganismos sea exitoso se requiere de varios factores, entre los más importantes se encuentran:

1) Medios de cultivo

Los medios de cultivo deben cumplir con una serie de requisitos mínimos como: fuente de energía, fuente de carbono y una fuente de nitrógeno. En ciertos casos también es necesario vitaminas, factores o aminoácidos esenciales. Todo esto con el fin de que las bacterias satisfagan sus requerimientos nutricionales y se multipliquen en un rango de 18 a 24 horas (Fernández, 2010, pp. 4-6).

2) Requisitos de crecimiento

- Atmósfera

En base a este requerimiento se clasifican en: aerobias a las que crecen sólo en presencia de oxígeno, anaerobias son aquellas que solo crecen en ausencia de oxígeno, facultativas las que crecen tanto en ausencia como en presencia de oxígeno, microaerofílicas las que crecen mejor en una atmósfera con reducida concentración de oxígeno y capnofílicas las que requieren CO₂ adicional para crecer (Fernández, 2010, pp. 4-6).

- Temperatura

De acuerdo a este requerimiento se clasifican en: las que pueden crecer a temperaturas bajas de entre 2-5 °C y un óptimo de 10-30 °C (psicrofílicas), las que crecen en un rango de temperatura de 10-45 °C y un óptimo de 30-40 °C (mesofílicas) y las que crecen en un bajo porcentaje a 37 °C y un óptimo de 50-60 °C (termofílicas) (Fernández, 2010, pp. 4-6).

- Nutrición

Los requerimientos nutricionales son un punto fundamental para la identificación de los microorganismos de interés, determinando si es capaz de crecer en medios ordinarios, con adición de glucosa, suero, sangre, o si requieren factores de crecimiento específicos (Fernández, 2010, pp. 4-6).

1.6.3. Métodos moleculares de identificación bacteriana

Debido a las limitaciones que se suscitan en la identificación de bacterias a través de la aplicación de técnicas relacionadas con los sistemas, los métodos moleculares surgen como procedimientos alternativos y complementarios a los métodos fenotípicos. Una amplia gama de genes han sido utilizados como marcadores moleculares partiendo del ARNr 16S, que en numerosas ocasiones ha resultado más que suficiente para estudios de identificación taxonómicos y de filogenia, en aquellos casos que no es posible determinar géneros bacterianos debido a la alta homología genética o cambios recientes en la asignación taxonómica se emplean marcadores alternativos (Bou et al., 2001, p.602). A continuación, se detallan los marcadores moleculares más importantes:

1.6.3.1. ARNr 16S (*rrs*)

Presenta un alto grado de conservación por lo que actúa como un cronómetro molecular, se trata de un polirribonucleótido que se encuentra codificado por ADN ribosomal y que en el ribosoma bacteriano está incluido en la subunidad 30S. No se invalida su utilización debido a las mutaciones que pueden conducir a una resistencia fenotípica, su tamaño aproximado de 1500pb le permite diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas esto ya que se considera suficiente su polimorfismo interespecífico (Bou et al., 2001, p.603).

Las hélices universales de la estructura secundaria del ARNr 16S se numeran del 1 al 48, a partir del extremo 5' en orden de aparición. Se indican con Pa-b las hélices específicas de las procariotas, donde a es el número precedente de la hélice universal y b la numeración de la serie. En negrilla se representan las regiones relativamente conservadas, con líneas finas las regiones variables designadas de V1 a V9 tomando en consideración como exclusiva de eucariotas V4. En un número limitado de estructuras se presentan las regiones con líneas discontinuas (Fig. 2-1) (Del Rosario & Del Carmen, 2020, p.240).

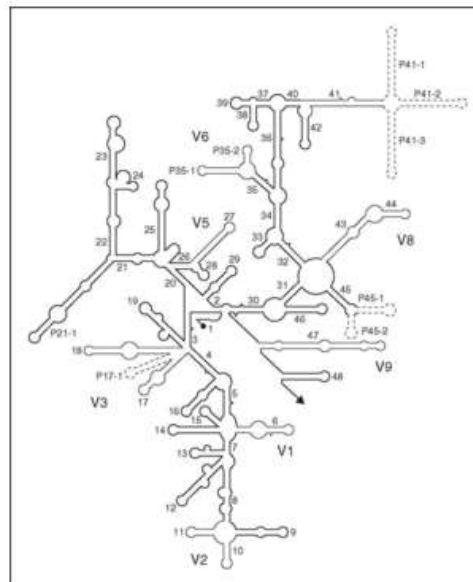


Figura 2-1: Estructura secundaria del ARNr 16S

Realizado por: (Del Rosario & del Carmen, M, 2020).

1.6.3.2. 16S-23S ARNr

Es considerado la base para identificación, filogenia y/o tipificación, ya que sus variaciones en número, tamaño y composición de las ITS del 16S-23S ARNr le permite poseer un grado elevado en diferentes géneros, en diferentes especies, en diferentes cepas y en una misma cepa como tal. Presenta una variable número en función al número de operones ARNr (Bou et al., 2001, p.603).

1.7. Identificación molecular bacteriana

1.7.1. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN se puede dar de distintas formas, ya sea por trituración o lisis hipotónica (rotura mecánica), por acción de detergentes, agentes caotrópicos o reducción con tioles (tratamiento químico) o por acción de la proteinasa k (digestión enzimática). Todas estas formas se caracterizan por la lisis celular, inactivación de enzimas nucleasas celulares y por la separación de los ácidos nucleicos de los restos celulares. En la actualidad se suele utilizar kits comerciales que incluyen su protocolo específico de extracción (Díaz, 2020, p.90).

Los métodos de purificación se basan en diferentes procesos y su elección dependerá de las características de la muestra, la cantidad tomada, el tipo de ácido nucleico y la técnica de identificación posterior a implementarse. Estos procesos son: extracción/precipitación, ultrafiltración, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad (Díaz, 2020, p.90).

1.7.2. Amplificación de ADN bacteriano

El método más empleado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), considerada en la biología molecular como una de las técnicas más revolucionarias e importantes debido a que *in vitro* permite obtener a partir de una molécula millones de copias de un fragmento de ADN. La PCR comienza con la separación o desnaturalización de la doble hélice del ADN por calentamiento a una temperatura de 90 a 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unen, luego se disminuye la temperatura de 40 a 60 °C para que los iniciadores se alineen a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región a amplificar, para finalizar se incrementa la temperatura a 72 °C para la síntesis de una nueva cadena en sentido 5' a 3' por acción de la unión de la ADN polimerasa con los iniciadores y así comenzar el proceso de replicación (Figura 3-1). En teoría este ciclo permite la generación de amplificación de más de dos billones de copias de ADN en 30 ciclos a partir de una única molécula (Espinosa, 2007, pp.526-528).

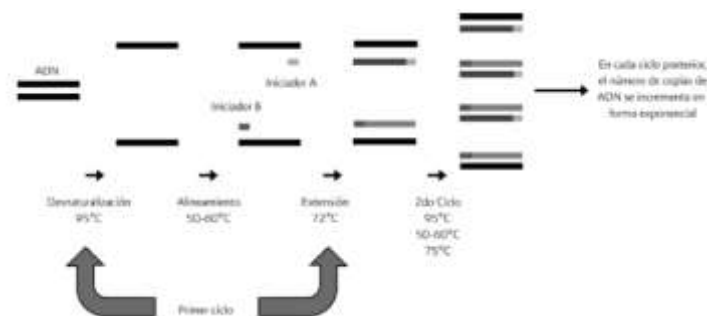


Figura 3-1: Amplificación de ADN mediante PCR

Elaborado por: (Serrato, 2009).

1.7.3. Revelador por electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica permite separar fragmentos de ADN por su carga y tamaño, esto por medio de la aplicación de una corriente en el gel con las moléculas de estudio, logrando que estas se separen unas de otras desplazándose en diferentes direcciones y a distintas velocidades. La totalidad de las moléculas de ADN poseen la misma cantidad de carga por masa por lo que los fragmentos de ADN únicamente se separan por su tamaño (Figura 4-1), es así que se nos permite visualizar cuántos de estos están presentes y la diferencia de tamaño respecto a otros. Además, permite determinar el tamaño de un fragmento de ADN al compararlo con fragmentos de tamaño conocido a escala estándar (Khan Academy, 2021, p.8).

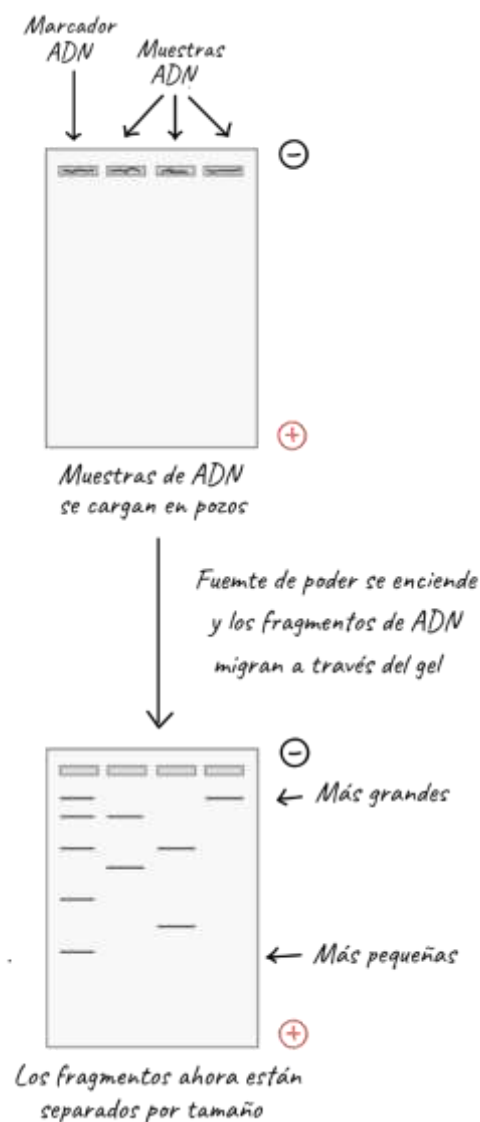


Figura 4-1: Diagrama de los movimientos de los fragmentos de ADN a través del gel

Fuente: (Khan Academy, 2021).

1.7.4. Secuenciación de ADN bacteriano

Técnica basada en la interrupción de manera controlada de la replicación de ADN in vitro, en el fragmento a secuenciar se realiza una PCR no convencional usando un solo iniciador y agregando dideoxinucleótidos (ddNTPs) que en el extremo 3' no poseen grupo hidroxilo y se encuentran marcados con fluoróforos o con reactividad. En el instante de la incorporación de un ddNTPs en la cadena de elongación su amplificación termina y se obtienen segmentos con longitud diferente terminando cada uno en un ddNTPs. Dichos fragmentos, se separan y son analizados de manera automática (Figura 5-1) o manual (Márquez, 2011, pp. 232-233).

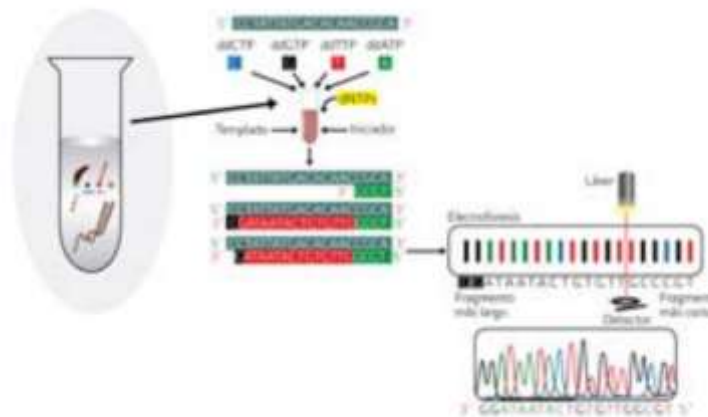


Figura 5-1: Secuenciación automática de ADN

Fuente: (Márquez, 2011).

1.7.5. Comparación de secuencias

Actualmente existen varias bases de datos de secuencias de nucleótidos de ADN de distintas especies tanto públicas como privadas. Las públicas son de acceso libre en internet entre las que destacan: National Center for Biotechnology Information (GenBank NCBI), European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Ribosomal Database Project (RDP) y Ribosomal Differentiation of Medical (RIDOM). Entre las bases de datos privadas destacan: Applied Biosystems (MicroSeq) y Integrated Database Network System (IDNS). Todas las bases de datos antes mencionadas permiten comparar la secuencia de nucleótidos de una parte del ADN obtenido con secuencias previamente identificadas (Del Rosario & del Carmen, 2004, p.242).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación

Es un tipo de investigación de tipo descriptiva ya que se cuenta con un único estudio realizado en la zona seleccionada y por ende no es posible obtener información suficiente. Experimental debido a que el presente estudio pretende determinar especies de bacterias resistentes al arsénico (As) y al cromo (Cr) mediante ensayos.

2.2. Diseño de la investigación

Es un tipo de diseño de tipo experimental con una variable de tipo dependiente (crecimiento bacteriano) y dos variables independientes (la temperatura registrada in situ en el momento del muestro y las diferentes concentraciones de arsénico (As) y cromo (Cr) a evaluarse en las bacterias).

2.3. Etapas de la investigación

2.3.1. Localización del estudio

El presente trabajo de investigación se lo realizó en la micro cuenca del río Gala ubicada el cantón Camilo Ponce Enríquez, el cual se localiza a 50 minutos de la ciudad de Machala, en la Provincia del Azuay al Sur Occidente (Figura 1-2). La micro cuenca limitada al Norte con los cantones Cuenca y Naranjal pertenecientes a las provincias del Azuay y Guayas correspondientemente, al Sur con la Parroquia Tendales del cantón el Guabo en la provincia del Oro, al este con Cuenca, Santa Isabel y Pucará todas pertenecientes al Azuay; y al oeste con las parroquias de Balao y Tenguel pertenecientes al Guayas (Vázquez & Durán, 2015, p.33).

2.3.2. Población de estudio

La población de estudio de la presente investigación son las bacterias resistentes al arsénico (As) y al cromo (Cr) presentes en la micro cuenca del río Gala del cantón Camilo Ponce Enríquez.

2.3.3. Tamaño de la muestra

Los puntos de muestreo se seleccionaron de acuerdo a 3 criterios: accesibilidad, representatividad y seguridad (Figura 2-2). La accesibilidad y seguridad enfocada en que los puntos son de fácil acceso tanto de vehículos como de peatones que permiten llevar los materiales, obtener y transportar las muestras. La representatividad enfocada en que los puntos de recolección representan el total de las características del recurso hídrico ya que son puntos estratégicos establecidos mediante el software informático ArcGis.

Por sistema de posicionamiento global se establecen 3 puntos de muestreo, cuyas coordenadas se muestran en la Tabla 1-2:

Tabla 1-2: Coordenadas de toma de muestras

MUESTRA	COORDENADAS	
1	-2.987172	-79.725952
2	-2.979343	-79.725684
3	-2.969681	-79.771900

Fuente: (GEAA-ESPOCH, 2019).

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.



Figura 1-2: Mapa de ubicación de puntos de muestreo

Realizado por: GEAA ESPOCH, 2019.



Figura 2-2: Sitios de muestreo A: Río Chico B: Río Gala C: Río Tenguel

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

2.3.4. Método de muestreo

El método de muestreo usado fue el aleatorio simple, el cual es parte de los métodos probabilísticos, este método se usa ya que se encarga de garantizar que todos aquellos individuos que componen una población en blanco, poseen una misma oportunidad de ser incluidos en la muestra (Otzen & Manterola, 2017, p.228).

2.4. Muestreo

Los tres puntos de muestreo fueron el Río Chico, Río Gala y el Río Tenguel. Las muestras se tomaron por triplicado, para ello se procede a usar recipientes de plástico estériles según lo establecido en la norma NTE INEM 2176 (2013, p.6), con una capacidad aproximada de 300 ml y con tapa de rosca. Primero se retira la tapa evitando tocar el interior de esta y del recipiente con los dedos manos o guantes (NTE INEM 2176, 2013, p.4), se introduce el recipiente en dirección contraria al flujo del agua evitando la adición de aire en la muestra por turbulencia, una vez lleno el recipiente se retira el exceso hasta tener las $\frac{3}{4}$ partes de la capacidad de este para que exista aireación y se asegure que los microorganismos sobrevivan, se lo cierra, se seca con la ayuda de toallas absorbentes y se sella con papel parafilm desde la tapa hasta la boca del recipiente para asegurar que no se abra. Se rotula según lo especificado en la norma NTE INEM 2176 (2012, p.9) incluyendo: fecha, hora y lugar del muestreo, detalles del punto de muestreo, método de recolección, nombre de quien realizó el muestreo, tipo de análisis y condiciones atmosféricas. Finalmente, se coloca en un cooler para su posterior transporte. Se miden los parámetros físicos in situ (pH, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto), para ello se empleará el uso de un

multiparámetro Hach Hd40d (Figura 3-2). Según el Centro Nacional de Sanidad Ambiental (2018, p.60), para el transporte de la muestra se considera en primer lugar evitar el contacto de la muestra con la luz, en caso que el transporte se prolongue durante más de 8 horas se realiza un seguimiento de la temperatura de manera continua. En el caso de las bacterias, el tiempo máximo de conservación incluido el transporte está en un rango de 12 a 18 horas; se incluye hielo evitando que este entre en contacto con la muestra y logrando que la temperatura bordee los 5 o más menos 3 °C.



Figura 3-2: Muestreo A: Toma de muestra B: Medición de parámetros

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

2.5. Aislamiento bacteriano

En este apartado se realizó el aislamiento en placa por banco de diluciones, para ello se utilizaron las muestras tomadas en el punto 2.4 y se realizó una muestra compuesta de cada punto con sus correspondientes triplicados (Figura 4-2). De cada muestra compuesta se tomó 10 ml y se añadió 90 ml de agua destilada. Luego se procedió a colocar en 7 tubos de ensayo 9 ml de agua destilada y fueron empleados para las diluciones de 10^{-1} a 10^{-7} . Se colocó 1 ml de la muestra original a la dilución 10^{-1} , de la 10^{-1} 1 ml a la 10^{-2} y así sucesivamente hasta llegar a la 10^{-7} (García, 2010, p.23).

Se procedió a preparar medio de cultivo PCA, este medio cultivo es empleado para monitorear y evaluar el crecimiento de bacterias, es no selectivo; para su preparación se disuelven 23.5 g de PCA en 1 litro de agua destilada y se esterilizó en autoclave. De las diluciones se tomó 0.1 ml de las tres últimas diluciones, es decir 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , se extendió esta cantidad con un asa de vidrio, se cerró la placa Petri y se incubó en posición invertida durante un lapso de 24 a 48 horas

a 25 °C (temperatura promedio tomada en los puntos de muestreo). Se repitió el procedimiento con cada muestra compuesta de cada punto. Finalizado el tiempo de incubación se confirmó visualmente por la morfología colonial el cultivo (García, 2010, p.23).

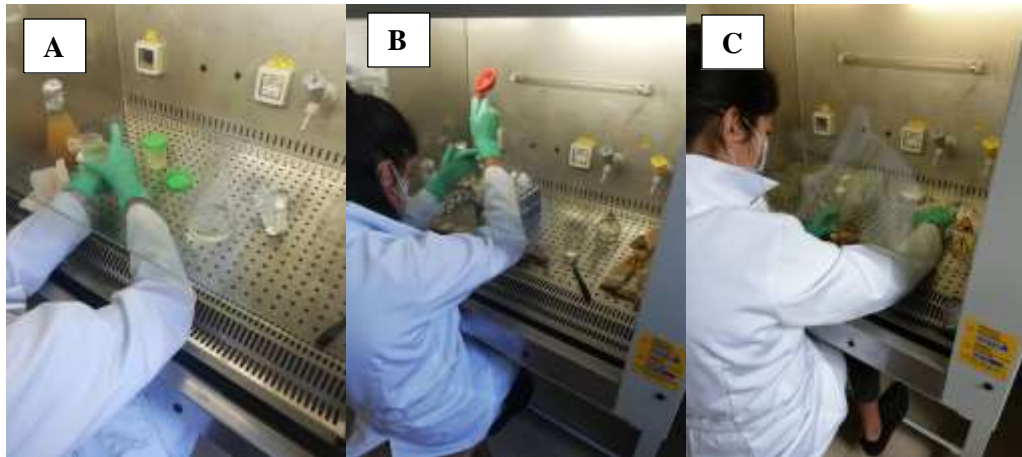


Figura 4-2: Aislamiento bacteriano A: Preparación de muestra compuesta B: Preparación de diluciones C: Preparación del medio de cultivo

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

2.6. Cultivos puros

Se tomaron 27 colonias escogidas al azar obtenidas en el aislamiento previo y se cultivaron de 24 a 48 horas en medio de cultivo PCA por triplicado y se aplicó la técnica de estriado en placa (Figura 5-2). Finalizado el tiempo de incubación se confirmó visualmente por la morfología colonial si el cultivo obtenido es puro (García, 2010, p.24).



Figura 5-2: Cultivos puros

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

2.7. Ensayos de sensibilidad

Para los ensayos de sensibilidad se empleó el medio de cultivo PCA a diferentes concentraciones del metal (As y Cr) tomando como punto de partida la legislación del AM 097-A (2015, p.24) de los límites permisibles de descarga en cuerpos de agua dulce. Según esta legislación, la concentración de As permisible es de 0.1 ppm y del Cr de 0.5 ppm. Las concentraciones empleadas para cada ensayo se detallan a continuación en la Tabla 2-2:

Tabla 2-2: Concentraciones por ensayo realizado

Metal	C1 (ppm)	C2 (ppm)	C3 (ppm)	C4 (ppm)	C5 (ppm)	C6 (ppm)	C7 (ppm)
Ar	0.1	1	10	100	-	-	-
Cr	0.5	5	50	500	5000	50000	-

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

Los reactivos empleados fueron trióxido de arsénico (As_2O_3) y óxido de cromo (CrO_2) (Figura 6-2) respectivamente para cada ensayo a las concentraciones ya establecidas.



Figura 6-2: Medio de cultivo con óxido de cromo a 5000 ppm

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

2.8. Tinción Gram

Para este proceso primero se colocó en el porta objetos una gota de agua previamente esterilizada, luego un fragmento de una colonia y se homogeniza, se flameó sobre el mechero, se colocó una gota de cristal violeta y se esperó por un minuto, se enjuagó con agua destilada, se colocó una gota de lugol y se esperó un minuto, se enjuagó con agua destilada, se colocó una gota de alcohol cetona y se esperó 30 segundos, se enjuagó con agua destilada, se colocó una gota de safranina durante un minuto, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar la placa al ambiente. Finalmente, se observó en el microscopio con el aumento 100x empleando suero fisiológico, aquellos que den

una coloración rosada tenue serán Gram negativas y las que tengan una coloración azul oscuro o violeta serán Gram positivas (García, 2010, p.27).

2.9. Identificación molecular de bacterias

2.9.1. Extracción y purificación de ADN bacteriano

Se aplicó el protocolo de extracción de ADN por métodos convencionales según lo descrito por (Wilson, 2001, pp. 2.4.1-2.4.5) que consiste en la aplicación de tubos con perlas de 1.5uL donde se añadieron 500 uL de buffer de extracción (CTAB, SDS, componentes del buffer) y 2 ul de β -mercaptoetanol, posteriormente se tomó aproximadamente 50mg de muestra bacteriana con un aza para depositar en los tubos con perlas, lo cual facilitará el proceso de homogenización de tejido y lisis celular con el fin de liberar el material genético. Adicionalmente a eso con un vórtex se agitó los tubos y se los incubó a baño maría por 30min, se añadió cloroformo congelado y se volvió a homogenizar nuevamente en el vórtex (Figura 7-2).

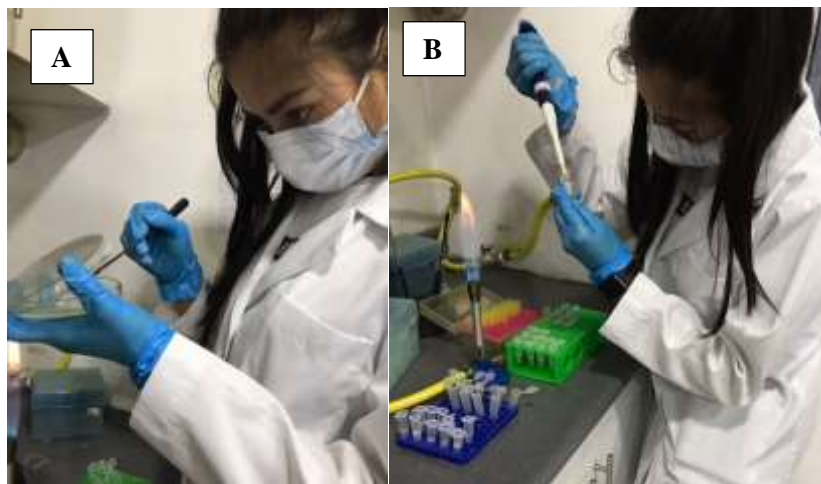


Figura 7-2: Extracción de ADN bacteriano A: Toma de pellet bacteriano B: Aplicación de reactivos y muestra de pellet a los tubos con perlas

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

Se centrifugaron los tubos a 14.500xg por 10min, se tomó el sobrenadante producto de este proceso sin mezclar las fases y se añadió a otro tubo estéril para añadir 30uL de etanol absoluto, 150uL de Acetato de sodio 3M y 300uL de etanol 70% filtrado para precipitar el ADN y se deja reposar a -20°C.

Posterior al tiempo de reposo de aproximadamente 12 horas, se centrifugó a 14.500xg por 15min y se eliminó nuevamente el sobrenadante tratando de ubicar el pellet y evitar que este se elimine,

este proceso se realizó en una cámara estéril y se realizaron dos lavados con 200uL de etanol al 70%, finalmente se realizó una centrifugación por 3min y se retiró el sobrenadante (Figura 8-2).

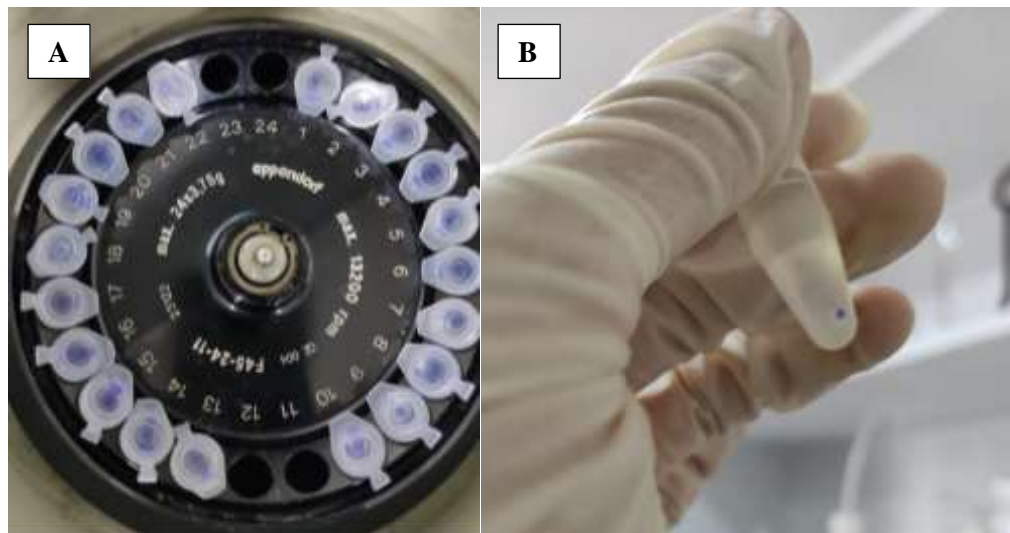


Figura 8-2: Purificación de ADN A: Centrifugación de muestras B: Ubicación de pellet de ADN para posterior lavado y secado

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

En la cámara de flujo laminar se dejó secar el pellet por 20 minutos y se resuspendió el pellet de ADN en 26uL de master mix preparado a base de 25uL de agua libre de nucleasas y 1uL de RNAsa para proceder a incubar a 37°C por 30 minutos. En esta etapa se pretende separar el ADN de las proteínas y lípidos. Generalmente las proteínas y lípidos se separan mediante la acción de solventes orgánicos y los grupos fosfato en medios acuosos (Cornejo et al, 2014, p.11).

Para poder visualizar la calidad del ADN extraído se realiza la medición en NanoDrop 2000 de Thermo Scientific™. El primer paso para uso de este equipo consiste en blanquear con 2uL de agua y proceder a la medición de cada muestra hasta obtener rangos de entre 100 a 300 ng/uL para realizar la PCR. Una particularidad importante del ADN es que absorbe la luz ultravioleta a 260nm para cuantificar por procesos de espectrofotometría (Cornejo et al, 2014, pp. 14).

2.9.2. Amplificación del gen 16s ARNr mediante reacción en cadena de la polimerasa

Mediante reacción en cadena de la polimerasa se realizó la amplificación de la región 16S de ADN usando el master mix del kit 2X PCR Taq Mastermix with Dye, el cual contiene polimerasa, buffer, buffer de carga, dNTPs y MnCl₂, también primers universales para amplificar la región 16S de la cadena de ADN, los cuales fueron el 27F y 1492R, agua libre de nucleasas y 2uL de muestra de ADN.

Para la PCR se usó el termociclador con la siguiente programación: la fase de desnaturalización con 94°C durante 3 minutos con 30 segundos, a continuación, la fase de hibridación a 53°C durante 30 segundos y se finaliza con la fase de elongación a 72°C durante 5 minutos con 45 segundos, por 35 ciclos.

Se visualizó los fragmentos obtenidos en gel de agarosa, 1% de fragmento de aproximadamente 1200pb, amplificado con los primers 27F y 1942R y marcador de peso molecular ABM 100pb Opti-DNA Marker el cual, corrió a 90V durante 35 minutos (Figura 9-2). Este proceso de electroforesis consiste en analizar la integridad de ADN y separar fragmentos de ADN y ARN de acuerdo a su tamaño (Cornejo et al, 2014, pp. 15).



Figura 9-2: Amplificación de ADN A: Preparación y depósito de Master Mix en los tubos B: Programación de termociclador para PCR C: Preparación de gel de agarosa

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

2.9.3. Secuenciación molecular

Los productos de la PCR fueron purificados por el método SANGER previo a la secuenciación y los amplicones que se procesaron en la PCR fueron enviados al “Macrogen sequencing order system” Corea para su posterior secuenciación molecular.

2.9.4. Identificación molecular bacteriana

Transcurridos los análisis de secuenciación molecular se obtuvieron secuencias de pares de bases, se hizo un ensamblaje del forward y el reverse mediante programas bioinformáticos y se generaron las secuencias de ADN, las cuales fueron comparadas usando bases de datos de

nucleótidos de GenBank del NCBI mediante la plataforma BLAST tomando en consideración el porcentaje de calidad de las cadenas, su longitud y el porcentaje de identidad.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento bacteriano

Se seleccionaron 27 cepas aisladas de las cuales 12 pertenecían a la muestra obtenida del Río Chico, 12 al Río Gala y 3 del Río Tenguel (Figura 1-3). Las cajas petri fueron etiquetadas de acuerdo a la siguiente nomenclatura: Ch-río Chico, Gal-río Gala y Ten-río Tenguel, R número de repetición de toma de muestra y C correspondiente al número de la cepa establecido del aislamiento. Posterior al aislamiento se procedió a describir de manera morfológica las 27 cepas aisladas (Tabla 1-3). Para obtener cultivos puros, se realizó 9 repiques de cada una de las 27 cepas (Figura 2-3).

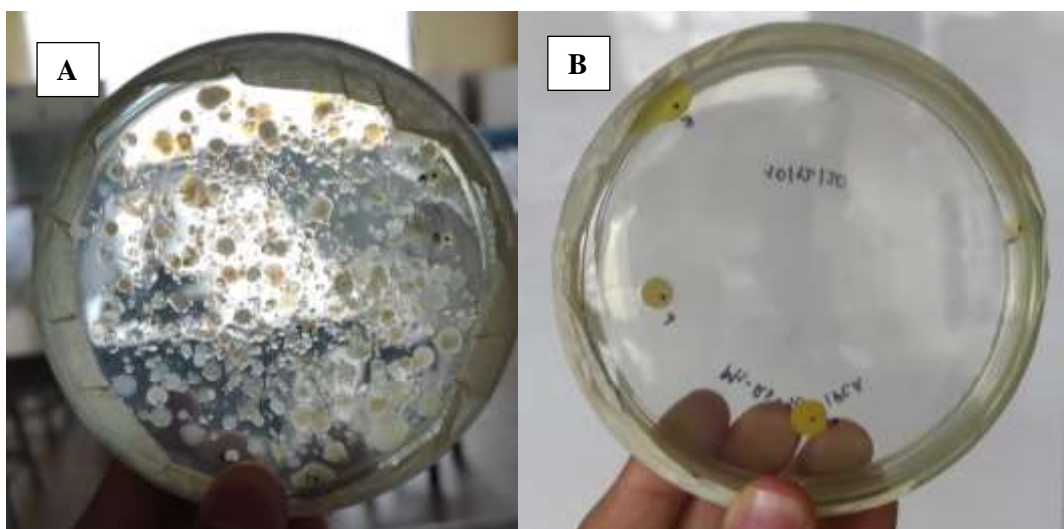


Figura 1-3: Bacterias aisladas A: Ch-R3 B: Ten-R1

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

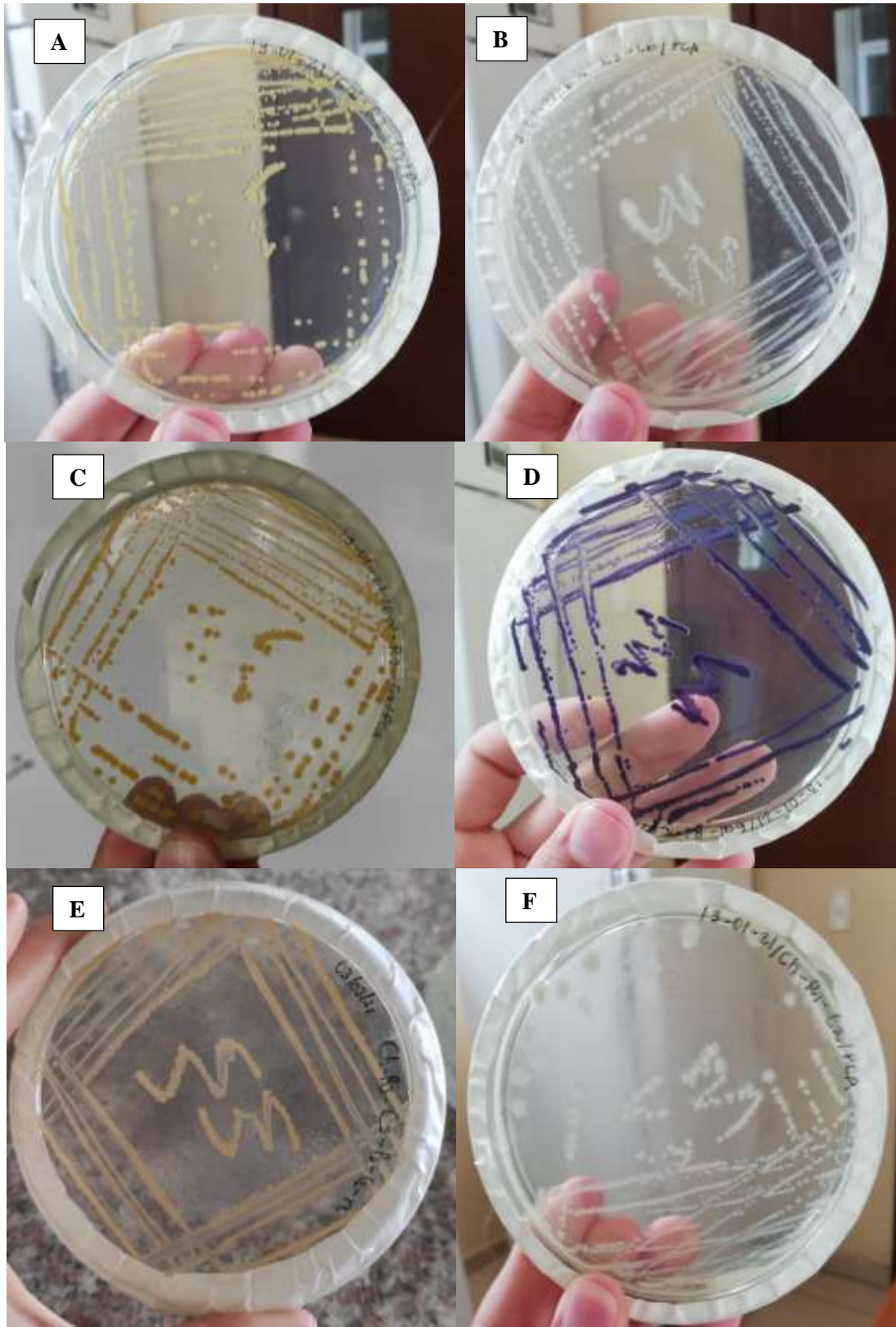


Figura 2-3: Repliques de bacterias aisladas A: Gal-R3-C7 B: Gal-R3-C6 C: Gal-R3-C8 D:
Gal-R2-C5 E: Ch-R3-C5 F: Ch-R1-C2

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021

Tabla 1-3: Morfología de cepas aisladas

MUESTRA	CEPA	TAMAÑO			FORMA				BORDES			ELEVACIÓN			SUPERFICIE		LUZ TRANSMITIDA		LUZ REFLEJADA		COLOR	TEXTURA					
		PEQUEÑAS	MEDIANAS	GRANDES	CIRCULAR	PUNTIFORME	IRREGULAR	RIZOIDE	FUSIFORME	ENTEROS	ONDULADOS	LOBULADOS	FILAMENTOSOS	PLANA	CONVEXA	ELEVADA	LISA	RUGOSA	TRANSPARENTE	OPACA		BRILLANTE	MATE	SECA	VISCOSA	PASTOSA	CREMOSA
Ch-R1	C2			x	x				x				x			x			x		Amarillo medio				x		
	C4			x	x				x				x			x			x		Amarilla intensa				x		
	C5			x				x	x				x			x		x		x	Blanca				x		
	C6			x			x			x			x			x		x		x	Amarilla leve				x		
	C8			x				x				x	x			x		x		x	Crema				x		
Ch-R2	C9			x			x		x				x		x		x		x	Palo de rosa				x			
Ch-R3	C4			x			x			x			x			x		x		x	Beige				x		
	C5			x			x				x		x			x		x		x	Beige				x		
	C7			x	x				x				x			x		x		x	Beige				x		
	C8			x	x				x					x			x			x	Amarilla intensa				x		
	C9			x			x				x		x			x			x		x	Beige				x	
	C10			x	x				x						x	x			x	x	Beige				x		
Gal-R1	C1			x			x				x	x			x		x		x		Blanca		x				
	C4			x			x			x			x			x		x		x	Amarilla leve		x				
	C8			x			x			x			x			x			x		Amarilla leve				x		
	C9			x			x			x			x			x			x		Crema				x		
Gal-R2	C1			x			x				x	x				x			x		Blanca					x	
	C4			x	x				x				x			x			x		Amarilla intensa				x		

	C5			x			x					x					x	x		Morada					x
Gal-R3	C1			x	x				x			x					x		x	Amarilla leve		x			
	C5			x			x				x	x			x	x			x	Blanca		x			
	C6			x			x				x	x			x		x		x	Blanca					x
	C7			x	x				x			x			x		x	x		Naranja leve		x			
	C8			x	x				x			x			x		x		x	Blanca		x			
Ten-R1	C1			x			x				x	x			x		x		x	Blanca		x			
	C3			x	x				x			x			x		x	x		Naranja leve		x			
	C5			x	x				x			x			x		x	x		Amarilla leve				x	

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

3.2. Pruebas de sensibilidad

3.2.1. Arsénico

Se realizaron 5 ensayos de sensibilidad con trióxido de arsénico para evaluar la resistencia de las bacterias de acuerdo a lo establecido en la Tabla 2-2. Los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad al arsénico se detallan en la Tabla 2-3:

Tabla 2-3: Pruebas de sensibilidad con arsénico

RÍO	N° DE MUESTRA	CEPA	CONCENTRACIÓN (ppm)				
			0.1	1	10	100	1000
CHICO	1	Ch-R1-C2	x	x	x	x	
		Ch-R1-C4					
		Ch-R1-C5	x	x	x	x	
		Ch-R1-C6	x	x	x	x	
		Ch-R1-C8	x	x	x	x	
	2	Ch-R2-C9	x	x	x		
	3	Ch-R3-C4	x	x	x		
		Ch-R3-C5	x	x	x		
		Ch-R3-C7	x	x	x		
		Ch-R3-C8	x	x			
Ch-R3-C9		x	x	x			
Ch-R3-C10	x	x	x				
GALA	1	Gal-R1-C1	x	x	x	x	
		Gal-R1-C4					
		Gal-R1-C8	x	x	x		
		Gal-R1-C9	x	x	x	x	
	2	Gal-R2-C1	x	x	x		
		Gal-R2-C4					
		Gal-R2-C5					
	3	Gal-R3-C1	x	x	x		
		Gal-R3-C5	x	x	x		
		Gal-R3-C6	x	x	x	x	
Gal-R3-C7		x	x	x			
Gal-R3-C8							
TENGUEL	1	Ten-R1-C1	x	x	x		
		Ten-R1-C3	x	x	x		
		Ten-R1-C5	x	x	x		

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

Las cepas bacterianas más resistentes al trióxido de arsénico fueron aquellas que soportaron una concentración de 100 ppm, entre ellas se encuentran: Ch-R1-C2, Ch-R1-C5, Ch-R1-C6, Ch-R1-

C8, Gal-R1-C1, Gal-R1-C9 y Gal-R3-C6. Del total de las 27 cepas, 22 resistieron la concentración inicial de 0.1 ppm, aquellas que no resistieron dicha concentración fueron: Ch-R1-C4, Gal-R1-C4, Gal-R2-C4, Gal-R2-C5 y Gal-R3-C8. La concentración de 1000 ppm ninguna de las cepas consiguió resistir (Figura 3-3).

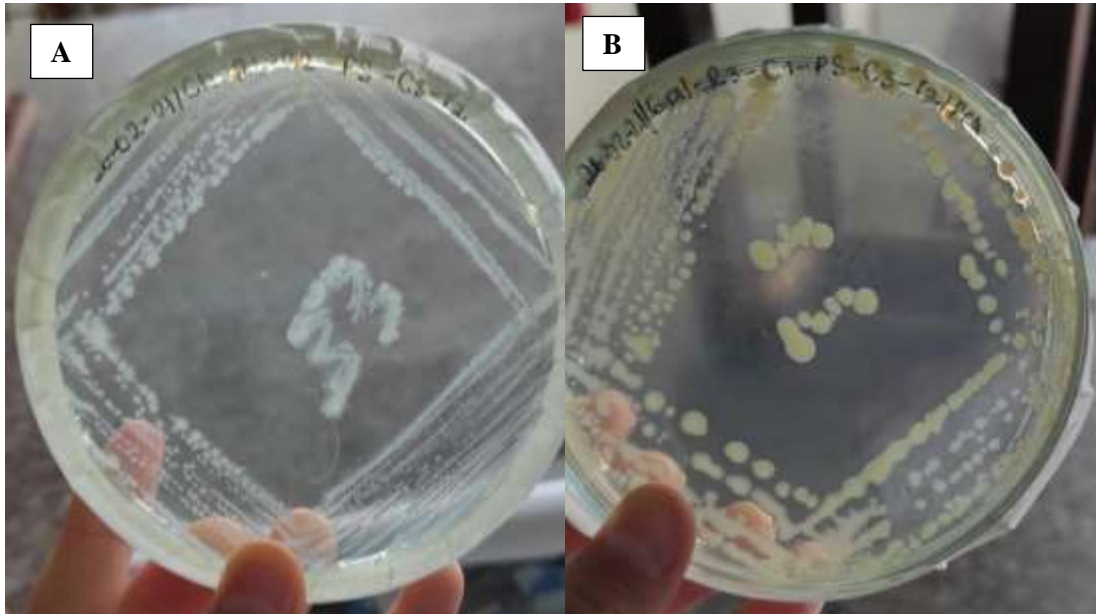


Figura 3-3: Pruebas de sensibilidad con arsénico a concentración de 10 ppm A: Ch-R1-C2 B: Gal-R3-C1

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

3.2.2. Cromo

Se realizaron 7 ensayos de sensibilidad con óxido de cromo para evaluar la resistencia de las bacterias de acuerdo a lo establecido en la Tabla 2-2. Los resultados de la sensibilidad al cromo se detallan en la Tabla 3-3:

Tabla 3-3: Pruebas de sensibilidad con cromo

RÍO	N° DE MUESTRA	CEPA	CONCENTRACIÓN (ppm)						
			0.5	5	50	500	5000	50000	500000
CHICO	1	Ch-R1-C2	x	x	x	x	x	x	
		Ch-R1-C4							
		Ch-R1-C5	x	x	x	x	x	x	
		Ch-R1-C6	x	x	x	x	x	x	
	Ch-R1-C8	x	x	x	x	x	x		
	2	Ch-R2-C9	x	x	x	x	x	x	
	3	Ch-R3-C4	x	x	x	x	x	x	
Ch-R3-C5		x	x	x	x	x	x		

		Ch-R3-C7	x	x	x	x	x	x	
		Ch-R3-C8	x	x	x	x	x	x	
		Ch-R3-C9	x	x	x	x	x	x	
		Ch-R3-C10	x	x	x	x	x	x	
GALA	1	Gal-R1-C1	x	x	x	x	x	x	
		Gal-R1-C4							
		Gal-R1-C8	x	x	x	x	x	x	
		Gal-R1-C9	x	x	x	x	x	x	
	2	Gal-R2-C1	x	x	x	x		x	
		Gal-R2-C4							
		Gal-R2-C5							
	3	Gal-R3-C1	x	x	x	x	x	x	
		Gal-R3-C5	x	x	x	x	x	x	
		Gal-R3-C6	x	x	x	x	x	x	
		Gal-R3-C7							
Gal-R3-C8									
TENGUEL	1	Ten-R1-C1	x	x	x	x	x	x	
		Ten-R1-C3	x	x	x	x	x	x	
		Ten-R1-C5	x	x	x	x	x	x	

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

Las cepas bacterianas más resistentes al óxido de cromo fueron aquellas que soportaron una concentración de 5000 ppm. Del total de las 27 cepas 21 resistieron la concentración inicial de 0.5 ppm, aquellas que no resistieron dicha concentración fueron: Ch-R1-C4, Gal-R1-C4, Gal-R2-C4, Gal-R2-C5, Gal-R3-C7 y Gal-R3-C8. La concentración de 500000 ppm ninguna de las cepas consiguió resistir (Figura 4-3).

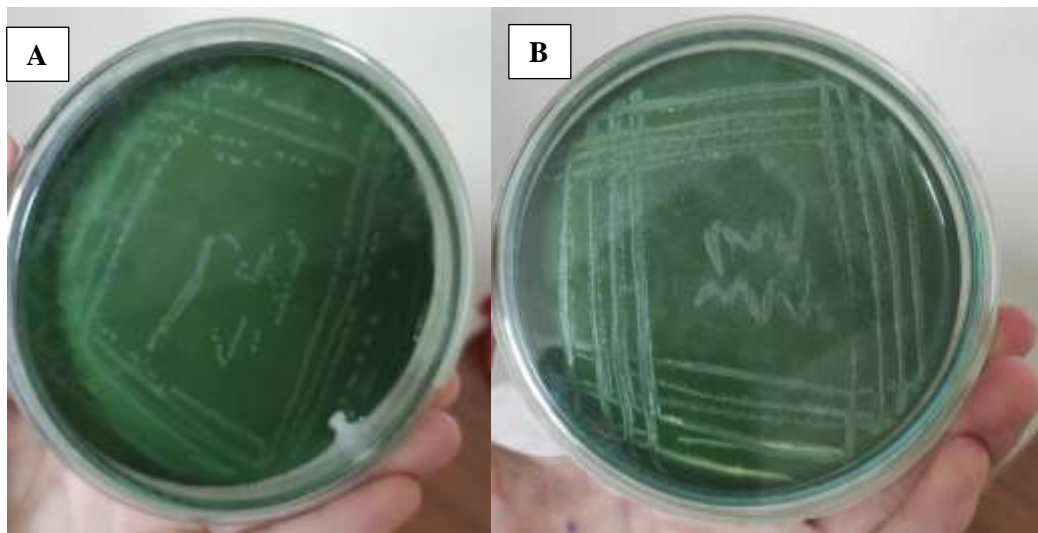


Figura 4-3: Pruebas de sensibilidad con cromo a concentración de 5000 ppm A: Ten-R1-C1
B: Gal-R3-C1

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

3.3. Tinción Gram

Posterior a las pruebas de sensibilidad se realizó la tinción Gram de las 27 cepas seleccionadas por duplicado (Figura 5-3). Los resultados se detallan en la Tabla4-3:

Tabla 4-3: Tinción Gram de bacterias aisladas

RÍO	MUESTRA	CEPA	TINCIÓN GRAM	
			Tipo	Forma
CHICO	1	Ch-R1-C2	G-	Bacilo
		Ch-R1-C5	G-	Bacilo
		Ch-R1-C6	G-	Coco
		Ch-R1-C8	G-	Bacilo
	2	Ch-R2-C9	G-	Bacilo
	3	Ch-R3-C4	G-	Bacilo
		Ch-R3-C5	G+	Bacilo
		Ch-R3-C7	G-	Bacilo
		Ch-R3-C8	G-	Coco
		Ch-R3-C9	G+	Coco
Ch-R3-C10		G+	Coco	
GALA	1	Gal-R1-C1	G-	Coco
		Gal-R1-C9	G-	Bacilo
	2	Gal-R2-C1	G-	Bacilo
	3	Gal-R3-C1	G-	Bacilo
		Gal-R3-C5	G-	Bacilo
TENGUEL	1	Ten-R1-C1	G+	Bacilo
		Ten-R1-C3	G-	Coco
		Ten-R1-C5	G-	Bacilo

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

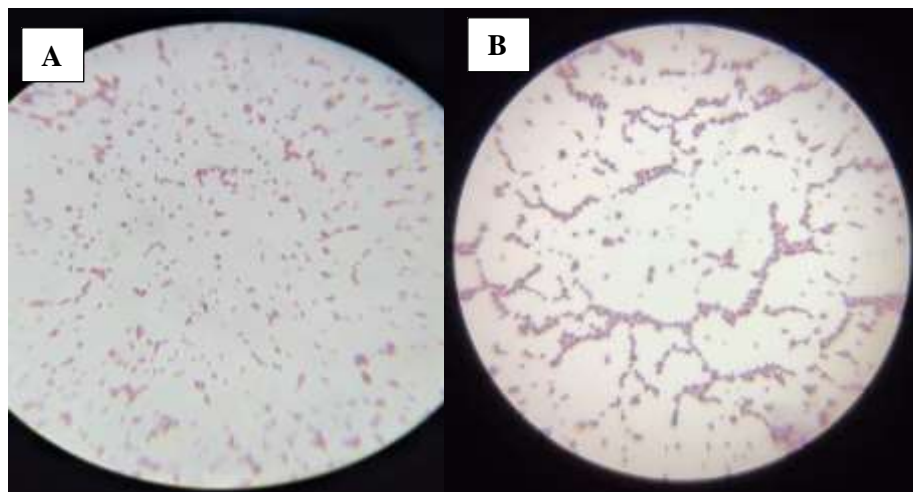


Figura 5-3: Tinción Gram A: Bacilos Gram – B: Cocos Gram +

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

3.4. Identificación molecular

3.4.1. Extracción y purificación de ADN bacteriano

Mediante métodos convencionales de extracción de ADN descrito en el apartado 2.9.1. se obtuvieron de 19 muestras de aproximadamente 100 mg de pellet de cada una, mismas que fueron cuantificadas mediante espectrofotometría de micro volúmenes y posteriormente se realizó una dilución hasta llegar a una concentración de aproximadamente 200 ng/ul para su posterior amplificación mediante PCR en tiempo real.



Figura 6-3: Medición de calidad de muestra de ADN mediante Nanodrop 2000

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

3.4.2. Amplificación del gen 16s ARNr mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Se obtuvo ADN de alta calidad en un rango de 100 a 300 ng/μl en base a la medición de espectrofotometría en Nanodrop 2000 para el posterior proceso de PCR convencional de las 19 muestras (Figura 6-3). Se ensambló la reacción de PCR visualizándose fragmentos de aproximadamente 1200pb en las muestras amplificadas con primers 27F/1492R.

Se visualizó en gel de agarosa 1 % de fragmentos de aproximadamente 1200pb, amplificado con primers 27F/1492R. M: Marcador de peso molecular ABM 100pb Opti-DNA Marker. Las bandas obtenidas desplegaron el tamaño descrito en la Figura 7-3:

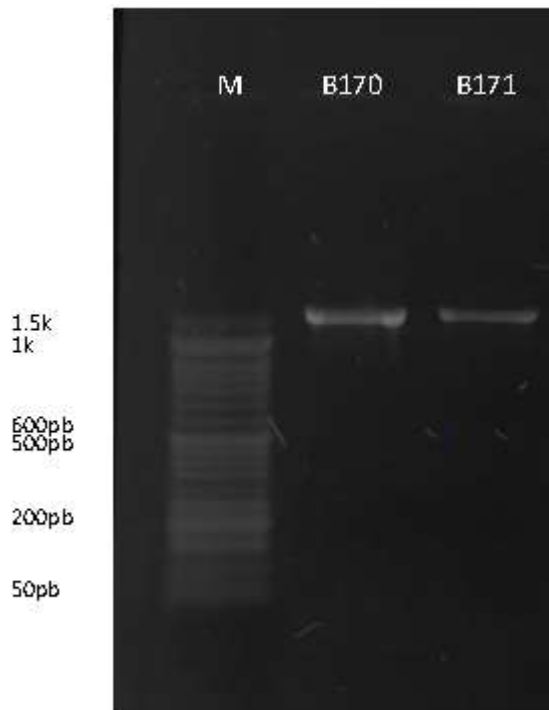


Figura 7-3: Electroforesis de la amplificación con primers 27F/1492R.

M: Marcador de peso molecular ABM 100pb Opti-DNA Marker

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

3.4.3. Secuenciación molecular

Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante la plataforma BLAST usando bases de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI teniendo en cuenta el porcentaje de calidad de las cadenas, su longitud y el porcentaje de identidad.

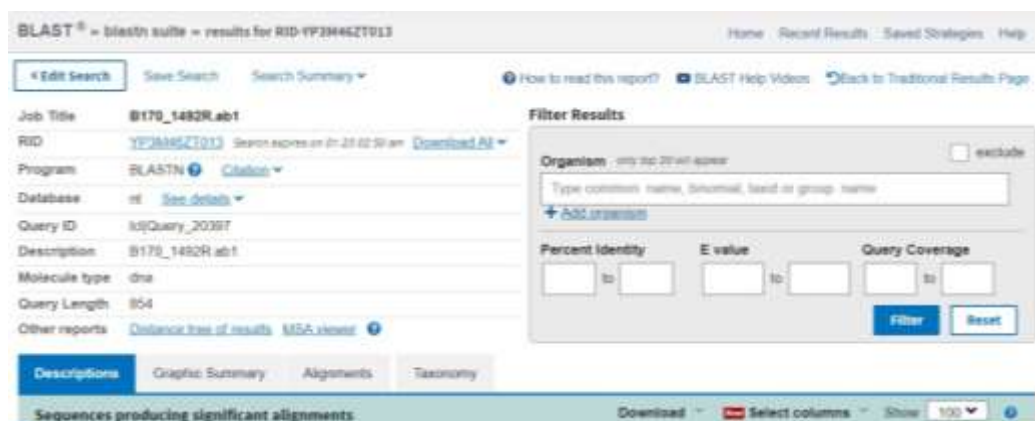


Figura 8-3: Comparación de las secuencias obtenidas

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

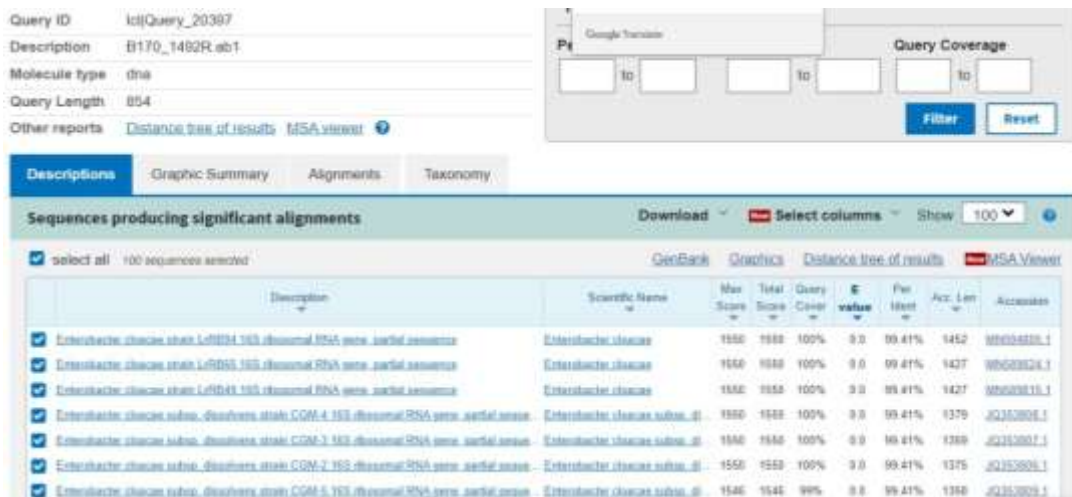


Figura 9-3: Elección del organismo

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

3.4.4. Identificación molecular bacteriana

Para una identificación molecular satisfactoria se sugiere un 99 % de identidad, en ese sentido se logró identificar que las muestras etiquetadas como: Ch-R1-C6, Ch-R3-C4, Gal-R1-C9, Gal-R2-C1, Gal-R3-C5 y Ten-R1-C5 tuvieron la calidad suficiente para lograr el ensamblaje entre las secuencias forward y reverse. En el resto de muestras, las secuencias no se alinearon, por lo que las búsquedas en la base de datos del NCBI se realizaron con las cadenas individuales obtenidas, tomando los resultados con mayor porcentaje de similitud.

Al secuenciar las muestras con el código Ch-R3-C8, Gal-R1-C1 y Ten-R1-C3 se obtuvieron secuencias cuya calidad no permite el análisis bioinformático por lo cual no se logró su identificación por comparación en las bases de datos del NCBI. Por ello, de las 19 cepas bacterianas, se identificaron 16 muestras con base a las secuencias obtenidas mediante la amplificación de la región 16s (Tabla 5-3).

Tabla 5-3: Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas

CEPA	LONGITUD	% DE CALIDAD	ORGANISMO	FRAGMENTO	% DE IDENTIDAD	Nº ACCESIÓN
Ch-R1-C2	854	86.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	16S	99.41	MN594805.1
Ch-R1-C5	704	73.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16S	99.01	CP080511.1
Ch-R1-C6	433	89.6	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	16S	99.40	MT613370.1
Ch-R1-C8	293	64.2	<i>Enterobacter sp.</i>	16S	98.98	CP080511.1
Ch-R2-C9	772	78.9	<i>Acidovorax defluvii</i>	16S	99.48	CP017184.1
Ch-R3C4	1350	81.8	<i>Aeromonas caviae</i>	16S	99.56	LS483441.1
Ch-R3-C5	583	91.2	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	16S	99.83	MT256271.1
Ch-R3-C7	161	58.4	<i>Acidovorax sp.</i>	16S	100	CP021361.1

Ch-R3-C9	531	78	<i>Kocuria sp.</i>	16S	100	LC556325.1
Ch-R3-C10	372	44.1	<i>Kocuria sp.</i>	16S	97.45	MN733351.1
Gal-R1-C9	1354	96.8	<i>Kosakonia oryziphila</i>	16S	99.04	NR_125587.1
Gal-R2-C1	1339	95.2	<i>Pseudomonas hamedanensis</i>	16S	99.78	CP077091.1
Gal-R2-C3	1356	94.1	<i>Kosakonia cowanii</i>	16S	99.63	CP019447.1
Gal-R3-C5	865	80.7	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	16S	99.16	MT020340.1
Ten-R1-C1	584	19.2	<i>Bacillus sp.</i>	16S	98.66	MT066090.1
Ten-R1-C5	1357	87.5	<i>Pantoea agglomerans</i>	16S	99.41	KY013009.1

Realizado por: Burbano, G; López, G, 2021.

De las cepas identificadas en la Tabla 5-3 existe evidencia bibliográfica que determina la resistencia al arsénico y el cromo. Las principales cepas resistentes al arsénico basados en otros estudios son: *Enterobacter cloaca* y *Bacillus sp*; por otro lado las principales cepas resistentes al cromo son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromona cavia*, *Exiguobacterium acetylicum* y *Kocuria sp*. En base al presente estudio se ha determinado la resistencia tanto al arsénico como al cromo de todas las cepas identificadas en la Tabla 5-3.

CONCLUSIONES

Las colonias fueron aisladas en agar sólido PCA a partir de muestras líquidas provenientes de la micro cuenca del río Gala, partiendo desde el primer aislamiento realizado mediante siembra por extensión se lograron identificar 27 cepas representativas, las cuales se replicaron 9 veces hasta obtener cultivos puros, los cuales fueron analizados mediante tinción Gram para validar la confiabilidad de las muestras obtenidas.

A partir de los cultivos puros, los cuales fueron caracterizados macroscópica y microscópicamente se realizaron ensayos de sensibilidad sometiendo las 27 cepas a condiciones con arsénico y cromo. Se emplearon reactivos como trióxido de arsénico (As_2O_3) desde 0.1ppm hasta 100ppm donde se consideraron 6 colonias resistentes y óxido de cromo (CrO_2) en concentraciones de 0.5ppm hasta 50000ppm donde se obtuvieron 21 colonias, los datos considerados se tomaron a partir de las cepas que resultaron más resistentes a condiciones extremas de concentración del reactivo empleado.

Se realizó la identificación molecular de las 21 cepas con mayor resistencia al arsénico y cromo, el punto de partida fue la obtención de ADN bacteriano, el cual fue extraído mediante métodos de extracción de ADN convencionales. De las 21 cepas se logró extraer el ADN de 19 muestras, las cuales fueron purificadas y cuantificadas mediante espectrofotometría de micro volúmenes. Se amplificó la región 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados y dichas secuencias fueron ensambladas usando programas bioinformáticos donde se obtuvieron 16 organismos identificados con calidad suficiente para lograr su ensamblaje entre las secuencias forward y reverse, los organismos identificados pertenecen a los géneros *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Bacillus sp*

RECOMENDACIONES

Se propone profundizar en el conocimiento de las características de organismos identificados, para posibles aplicaciones de celdas de combustible microbianas.

Se sugiere investigar la resistencia de estos microorganismos en presencia de otros metales pesados, especialmente de aquellos relacionados con actividades de minería.

Proponer ensayos de biorremediación usando consorcios bacterianos formulados con las cepas obtenidas en esta investigación.

GLOSARIO

Biorremediación: Es una técnica destinada a limpiar sitios contaminados in situ o ex situ de una forma muy práctica empleando los mismos microorganismos que habitan el medio de interés u otros microorganismos de otros sitios (exógenos) ya sea en presencia de oxígeno (aerobios) o ausencia de oxígeno (anaerobios). Las actividades metabólicas de estos microorganismos les permiten degradar, transformar o remover los contaminantes a metabolitos inocuos (Martínez et al., 2011, p.242).

Bioacumulación: Es la captación de un tóxico por un organismo vivo, esto desde un medio biótico y/o abiótico concentrándolo en el mismo organismo (Rand, 1995, p.54).

Biomagnificación: Es la transferencia de un xenobiótico desde el medio a un organismo vivo, dando como resultado una elevada concentración dentro de dicho organismo en comparación con la fuente original y con esto incrementando entre los niveles tróficos la concentración (Connell, 1989, p.1583).

Biodegradación: Es una descomposición orgánica realizada por microorganismos en donde los materiales se pueden transformar en sustancias más simples ayudando así en la eliminación de contaminantes o en el reciclaje de nutrientes de la naturaleza (Gómez y Sáiz, 2013, p.562).

Biodiversidad: Es la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente ya sea cada especie, entre especies y ecosistemas, dichos ecosistemas pueden ser terrestres o marinos y otros sistemas acuáticos, así como complejos ecológicos de los que forman parte (Dorado, 2010, p.5).

Bioenergía: Es la energía obtenida de material orgánico de origen biológico (seres vivos, sus excretas y restos no vivos), este material se lo conoce también como biomasa (Secretaría de medio ambiente y recursos naturales, 2018, p.1).

Nucleasa: Son enzimas que cuando reconocen un patrón de secuencia específico cortan el ADN de doble cadena (Castaño et al., 1997, p.87).

Pellet: Es una porción sedimentada que se acumula durante la centrifugación (GreenScript, 2020, p.1).

Buffer: Son sistemas tampón que añadiendo pequeñas cantidades de H^+ u OH^- impiden la variación de pH, actúan como dador y aceptor de protones siendo un par ácido- base conjugada (Túnez et al., 2006, p.4).

Primer: Es una secuencia corta de ADN con un número reducido de nucleótidos de entre 18 a 24 pares de base y que se utiliza en la PCR (Loftus, 2021, p.1).

Marcador de peso molecular: Es una herramienta usada durante el proceso de electroforesis con el fin de establecer el tamaño estimado de un fragmento de ADN (Muñoz, 2021, p.6).

Electroforesis: Es una técnica utilizada para separar ADN, ARN, proteínas u otras moléculas en base a su tamaño, esto por acción de corriente eléctrica sobre el gel (Austin, 2021, p.1).

BIBLIOGRAFÍA

ADRIANO, D. *Trace Elements in Terrestrial Environments*. [En línea]. Segunda Edición. New York, USA. Springer Publisher, 2001. [Consulta: 25 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-21510-5#about>

ALI, H., et al. “Phytoremediation of heavy metals- Concepts and applications”. *Chemosphere*. [En línea], 2013, (Pakistán) (91)7, pp 869-881. [Consulta: 24 de octubre de 2021]. ISSN 0045-6535. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653513001914>

AUSTIN, C. *Electroforesis* [blog]. [Consulta: 26 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis#:~:text=La%20electroforesis%20es%20una%20t%C3%A9cnica,a%20trav%C3%A9s%20de%20un%20gel.>

BACHATE, S., et al. “Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains”. *Journal of Applied Microbiology*. [En línea], 2009, (Milan, Italy) (107)1, pp 145-156. [Consulta: 21 de octubre de 2021]. ISSN 1364-5072. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2009.04188.x>

BENITEZ, N. “Producción limpia y biorremediación para disminución de la contaminación por cromo en la industria de curtiembres”. *Ambiente y sostenibilidad*. [En línea], 2011, (Cali, Colombia) (1)1, pp. 25-31. [Consulta: 26 de octubre de 2021]. ISSN 2339-3122. Disponible en: https://www.academia.edu/28695336/PRODUCCI%C3%93N_LIMPIA_Y_BIORREMEDIACI%C3%93N_PARA_DISMINUCI%C3%93N_DE_LA_CONTAMINACI%C3%93N_POR_CROMO_EN_LA_INDUSTRIA_DE_CURTIEMBRES_Cleaner_production_and_bioremediation_for_reduction_of_pollution_in_the_industry_of_chrome_tannery?auto=citations&from=cover_page

BEYERSMANN, D., & HARTWIG, A. “Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and celular mechanisms”. *Archives of Toxicology*. [En línea], 2008, (Bremen, Germany) (82)1, pp 493-512. [Consulta: 01 de noviembre de 2021]. ISSN s/n .Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00204-008-0313-y>

BOU, C., et al. “Enfermedades infecciosas y microbiología clínica”. *Elsevier Doyma* [en línea], 2011, (España) 29(8), pp 601-608. [Consulta: 05 noviembre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <http://clinicainfectologica2hnc.webs.fcm.unc.edu.ar/files/2018/03/M%C3%A9todos-de-Identificaci%C3%B3n-bacteriana.pdf>

BOU, G., et al. “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología”. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. [En línea], 2011, (España) (29)8, pp 601-608. [Consulta: 24 de octubre de 2021]. ISSN 0213-005X. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-identificacion-bacteriana-el-laboratorio-S0213005X11001571>

BURITICÁ, S., & ZAMORA, G. *Medicina de la conservación y enfermedades de la fauna silvestre: Efectos de los metales pesados sobre la diversidad*. [En línea]. Primera Edición. Colombia. Biogénesis editorial, 2019. [Consulta: 01 de noviembre de 2021]. Disponible en: https://www.academia.edu/44053729/Medicina_de_la_conservaci%C3%B3n_y_enfermedades_de_la_fauna_silvestre

CAMPOS, V., et al. “Aislamiento de bacterias resistentes a arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la quebrada Camarones, región Parinacota. Chile”. *Revista Gayana*. [En línea], 2007, (Concepción, Chile) 71(2), pp 150-155. [Consulta: 20 de octubre de 2021]. ISSN 0717-6538. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-65382007000200003&script=sci_arttext&lng=p

CASTAÑO, L; et al. “Enzimas de restricción”. *Educación continua* [en línea], 1997, (España) 46(1), pp. 87-92. [Consulta: 26 noviembre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/anales/46-1-24.pdf>

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AMBIENTAL. *Metodología para la toma de muestra de microorganismos altamente patógenos en las matrices ambientales aire, agua y suelo/sedimento* [en línea]. Madrid-España: Instituto de salud Carlos III, 2018. [Consulta: 30 junio 2021]. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-f06e501959>

CONNELL, D. “Biomagnification by aquatic organisms – a proposal”. *Chemosphere* [en línea], 1989, (Gran Bretaña) 19(10), pp. 1573-1584. [Consulta: 26 noviembre 2021]. ISSN 0045-6535. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0045653589905018>

DEL ROSARIO, M., & DEL CARMEN, M. “Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica”. *Elsevier* [en línea], 2004, (España) 22(4), pp. 238-245. [Consulta: 24 noviembre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>

DIZ, A. “Técnicas de biología molecular en el diagnóstico enfermedades infecciosas”. *Revista para profesionales de la salud* [en línea], 2020, (España), pp. 88-111. [Consulta: 24 noviembre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>

DOREDO, A. *¿Qué es la biodiversidad?* [en línea]. Madrid-España: Fundación biodiversidad, 2010. [Consulta: 26 noviembre 2021]. Disponible en: <http://biblioteca.esepoch.edu.ec/Tutoriales/Norma%20ISO%20690.pdf>

CERVANTES, C., et al. “Interacciones microbianas con metales pesados”. *Latinoamericana de Microbiología* [en línea], 2006, (México) 48(2), pp. 203-2010. [Consulta: 19 octubre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062v.pdf>

ESPINOSA, L. *Guía práctica sobre la técnica de PCR* [en línea]. Ciudad de México-México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007. [Consulta: 24 noviembre 2021]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf>

FERNÁNDEZ, A., et al. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* [en línea]. España: eimc, 2010. [Consulta: 21 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

GARCÍA VALDÉS, Elena. *Prácticas de microbiología* [blog]. [Consulta: 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>

GREENSCRIPT. *Pellet* [blog]. [Consulta: 26 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.genscript.com/biology-glossary/2248/pellet>

GOBERNADO, M., & LÓPEZ, J. “Identificación bacteriana”. *Elsevier* [en línea], 2003, (España) 21(2), pp. 54-60. [Consulta: 21 octubre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-13059086>

GÓMEZ, G., & SÁIZ, C. “Biodeterioro de monumentos y biorremediación: Estado actual y perspectivas futuras”. *IRNAS* [en línea], (España) 79(1), pp. 502-579. [Consulta: 26 noviembre 2021]. ISSN 1697-428X. Disponible en: <http://ebook.ranf.com/anales7904/files/assets/common/downloads/page0049.pdf>

HAHN, M., et al. “Isolation and cultivation of Bacteria”. *The Structure and Function of Aquatic Microbial Communities*. [En línea], 2019, (Mondsee, Austria) (7), pp 313-351. [Consulta: 23 de octubre de 2021]. ISSN s/n. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-16775-2_10#citeas

HERNÁNDEZ, A., et al. *Microbiología y Parasitología Médicas Tomo I*. [En línea]. El Vedado, La Habana, Cuba. Editorial Ciencias Médicas, 2001. [Consulta: 23 octubre de 2021]. Disponible en: https://www.academia.edu/19506852/Microbiolog%C3%ADa_y_Parasitolog%C3%ADa_M%C3%A9dicas_Tomo_I

KHAN ACADEMY. *Introducción a ingeniería genética* [blog]. [Consulta: 24 noviembre 2021]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/v/introduction-to-genetic-engineering>

LOFTUS, S. *Iniciador cebador* [blog]. [Consulta: 26 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Iniciador-o-cebador>

LONDOÑO, L., et al. “Los riesgos de los metales pesados en la salud humana”. *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*. [En línea], 2016, (Colombia) (14)2, pp 145-153. [Consulta: 24 de octubre de 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n2/v14n2a17.pdf>

LÓPEZ PÉREZ, María Elena. *Estudio de microorganismos resistentes a arsénico obtenidos del metagenoma de suelos del Estado de Guanajuato (Trabajo de Titulación)*. (Doctoral). [En línea] Universidad de Guanajuato, Irapuato, México. 2020. pp. 96-97. [Consulta: 29 de noviembre de 2021].

2021]. Disponible en: http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/4566/1/MARIA%20ELENA%20LOPEZ%20PEREZ_Tesis_24.pdf

LOUKIDOU, M., et al. “Equilibrium and kinetic modeling of chromium (VI) biosorption by *Aeromonas cavia*”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. [En línea], 2004, (Grecia) (242)1, pp 93-104. [Consulta: 23 de octubre de 2021]. ISSN 0927-7757. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775704002948#!>

MÁRQUEZ, L., et al. *Secuenciación de fragmentos de ADN* [en línea]. Ciudad de México-México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2011. [Consulta: 24 noviembre 2021]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/secuenciacion.pdf>

MARRERO, C., et al. “Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación”. *CENIC Ciencias Biológicas* [en línea], 2010, (La Habana, Cuba) 41(1), pp. 67-78. [Consulta: 19 octubre 2021]. ISSN 0253-5688. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181221644010.pdf>

MARTÍNEZ, A., et al. “Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes”. *Revista internacional contaminación ambiental* [en línea], 2011, (México) 27 (3), pp. 241-252. [Consulta: 26 noviembre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v27n3/v27n3a9.pdf>

MENCHACA LÓPEZ, Dora Nely. Aislamiento e identificación de bacterias metalófilas resistentes a Cromo Hexavalente con potencial aplicación en procesos de Biorremediación. (Trabajo de Titulación). (Maestría). [En línea] Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México. 2015. pp. 88-90. [Consulta: 29 de noviembre de 2021]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/11393/1/1080215523.pdf>

MENÉNDEZ & MUÑOZ. “Contaminación del agua y suelo por los relaves mineros”. *Paideia XXI* [en línea], 2021, (Perú) 11(1), pp. 141-154. [Consulta: 24 de noviembre 2021]. ISSN 2519-5700. Disponible en: <http://revistas.urp.edu.pe/index.php/Paideia/article/view/3622/4588>

MORA, A., & BRAVO, E. “Aislamiento de microorganismos electrogénicos con potencial para reducir cromo hexavalente”. *Acta biológica colombiana*. [En línea], 2017, (Cali, Colombia) (22)1, pp. 27-36. [Consulta: 23 de octubre de 2021]. ISSN 0120-548X. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-548X2017000100003&script=sci_abstract&tlng=es

MUÑOZ MORALES, Julieta Mariana. Generación de marcadores de peso molecular para la identificación de fragmentos de ADN (ácido desoxirribonucleico) para ensayo de electroforesis [en línea] (Trabajo de titulación). (Licenciatura) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. 2021. pp. 1-73. [Consulta: 26 noviembre 2021]. Disponible en: <http://biblioteca.esepoch.edu.ec/Tutoriales/Norma%20ISO%20690.pdf>

MUNOZ, L; et al. “Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú)”. *Revista Peruana de Biología*. [En línea], 2019, (26)1, pp.109-118. [Consulta: 20 de enero de 2022]. ISSN 1727-9933. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332019000100013

NESHELI, M., et al. “Biosorption potential of Cr (VI) by *Kokuria sp.* ASB107, a radio-resistant bacterium isolated from Ramsar, Iran”. *Chemistry and Ecology*. [En línea], 2017, (Tehran, Iran) (34)2, pp 163-176. [Consulta: 23 de octubre de 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02757540.2017.1399126>

NIES, D., & SILVER, S. “Ion efflux involved in bacterial metal resistances”. *Journal of Industrial Microbiology* [en línea], 1995, (Estados Unidos) 14(2), pp. 186-199. [Consulta: 26 noviembre 2021]. ISSN 0169-4146. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7766211/>

NTE INEM 2176:2013. Agua. Calidad del agua. Técnicas de muestreo.

OVIEDO, R., et al. “Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociado a la actividad Minera”. *ResearchGate* [en línea], 2017, (Ecuador) 2(4), pp.437-441. [Consulta: 06 octubre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/322325642_Contaminacion_por_metales_pesados_en_el_sur_del_Ecuador_asociada_a_la_actividad_minera

OKEKE, B. “Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium sp.* GS1”. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. [En línea], 2009, (Montgomery, USA) (35)12, pp 1571-1579. [Consulta: 23 de octubre de 2021]. ISSN 1367-5435. Disponible en: <https://academic.oup.com/jimb/article/35/12/1571/5993812>

OTZEN, T., & MANTEROLA, C. Técnicas de muestreo sobre una Población a Estudio. Scielo [en línea], 2017, (Chile) 35 (1), pp. 227-232. [Consulta: 28 junio 2021]. ISSN 0717-9502: Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v35n1/art37.pdf>

PERNÍA, B., et al. “Determinación de cadmio y plomo en agua, sedimento y organismos bioindicadores en el Estero Salado, Ecuador”. Scielo [En línea], 2018, (Ecuador) 9(2), pp. 89-105. [Consulta: 06 octubre 2021]. ISSN 1390-6542. Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-65422018000200089

PÍREZ M & MOTA M. “Morfología y estructura bacteriana”. *Temas de bacteriología y virología médica* [en línea], 2008, (Colombia) 2(1), pp. 23-42. [Consulta: 24 de noviembre de 2021]. ISSN s/n Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

PRIETO, C., et al. “Identificación y análisis de genes ars en cepas de Bacillus hipertolerantes a arsénico, aisladas de pozas termales de Araró, México”. Revista TIP. [En línea], 2018, (México) (21) 1, pp. 22-29. [Consulta: 21 de octubre de 2021]. ISSN 1405-888X. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2018000321103

Plan de desarrollo y ordenamiento territorial 2014-2030 [En línea]. Camilo Ponce Enríquez-Ecuador: Dirección de Planificación Urbana y Rural- GAD Cantonal Camilo Ponce Enríquez, 2014. [Consulta: 06 octubre 2021]. Disponible en: http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/0760033860001_PDYOT_DIAGNOSTICO_16-03-2015_11-00-54.pdf

RAND, G. *Fundamentals of aquatic toxicology* [en línea]. Segunda edición. Estados Unidos. Taylor y Francis, 1995. [Consulta: 26 noviembre 2021]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=nTHWicichfoC&pg=PR1&hl=es&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false

RANGEL, E., et al. “Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos”. Terra Latinoamericana. [En línea], 2015, (México) (33)2, pp 103-118. [Consulta: 25 de octubre de 2021]. ISSN 2395-8030. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-57792015000200103&script=sci_abstract&tlng=pt

ROCHA, P. “Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite”. *Palmas* [en línea], 2002, (Colombia) 23(2), pp. 9-17. [Consulta: 21 octubre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <https://blogs.ead.unlp.edu.ar/geneticamuseo/files/2018/04/Art%C3%ADculo-extraccion-ADN-en-plantas.pdf>

SECRETARÍA DEL AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. *¿Qué es la bioenergía de biomasa?* [blog]. [Consulta: 26 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/que-es-la-energia-de-biomasa?idiom=es#:~:text=Tambi%C3%A9n%20conocida%20como%20bioenerg%C3%ADa%20es,y%20sus%20restos%20no%20vivos.&text=La%20formaci%C3%B3n%20de%20biomasa%20se,por%20el%20proceso%20denominado%20fotos%C3%ADntesis>.

SERRATO, A., et al. *PCR: Reacción en cadena la polimerasa* [en línea]. Ciudad de México-México: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 2009. [Consulta: 24 noviembre 2021]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>

TÚNEZ, I., et al. “pH y amortiguadores: tampones fisiológicos”. *Departamento de bioquímica y biología molecular* [en línea], 2006, (España) 1(1), pp. 1-11. [Consulta: 26 noviembre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/06%20pH%20AMORTIGUADORES.pdf>

VALENCIA, F. “Zonificación de contaminación por metales pesados en San Bartolomé.” *Memorias y Boletines de la Universidad del Azuay* [En línea], 2017, (Ecuador) 2(11), pp. 133-138. [Consulta: 06 octubre 2021]. ISSN s/n. Disponible en: <http://revistas.uazuay.edu.ec/memorias/article/view/57>

VÁSCONEZ ECHEVERRÍA, Luis Alberto, & DURÁN DURÁN, Wilmer Santiago. *Evaluación ambiental de la cuenca del río Gala del cantón Camilo Ponce Enríquez* [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. 2015. pp. 33. [Consulta: 2021-06-28]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8809/1/UPS-CT005022.pdf>

ANEXOS

ANEXO A: INFORME DE RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Aislamiento e identificación molecular de microorganismos –
Gabriela López / Gregory Burbano
Informe No.: A-253
Técnico Responsable: Francisco Garrido, Ing.
Fecha: 29/09/2021

Resultados

Código IDgen	Código original	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
B170	chr1 c2	854	86.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	165	99.41	MN594805.1
B171	chr1 c5	704	73.9	<i>Enterobacter sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	165	99.01 99.01	MT613370.1 CP080511.1
B172	chr1 c6	433	89.6	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	165	99.40	CP017184.1
B173	chr1 c8	293	64.2	<i>Enterobacter sp.</i>	165	98.98	JQ396392.1
B174	chr2 c9	772	78.9	<i>Acidovorax defluvi</i>	165	99.48	NR_026506.1
B175	chr3 c4	1350	81.8	<i>Aeromonas caviae</i>	165	99.56	LS483441.1
B176	chr3 c5	583	91.2	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	165	99.83	MT256271.1
B177	chr3 c7	161	58.4	<i>Acidovorax sp.</i>	165	100	CP021361.1
B178	chr3 c8			-			
B179	chr3 c9	531	78	<i>Kocuria sp.</i>	165	100	LC556325.1
B180	chr3 c10	372	44.1	<i>Kocuria sp.</i>	165	97.45	MN733351.1
B181	galr1 c1			-			
B183	galr1 c9	1354	96.8	<i>Kosakonia aryziphila</i>	165	99.04	NR_125587.1
B184	galr2 c1	1339	95.2	<i>Pseudomonas homedanensis</i>	165	99.78	CP077091.1
B185	galr3 c1	1346	94.1	<i>Kosakonia cowanii</i>	165	99.63	CP019447.1
B186	galr3 c5	865	80.7	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	165	99.16	MT020340.1
B187	tenr1 c1	584	19.2	<i>Bacillus sp.</i>	165	98.66	MT068090.1
B188	tenr1 c3			-			
B189	tenr1 c5	1357	87.5	<i>Pantoea agglomerans</i>	165	99.41	KY013009.1

Nota: Los resultados con un porcentaje de identidad menor al 99% no permiten asegurar que el aislado corresponde a esa especie. Es posible que se trate de una especie no descrita o una especie para la cual no hay referencias en la base de datos.

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen

