

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: Ingenieras en  
Biotecnología de los Recursos Naturales**

**TEMA:  
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS RESISTENTES A  
CADMIO Y CROMO AISLADAS DE AGUAS CONTAMINADAS DE LA ZONA  
DE PAPALLACTA CANTÓN QUIJOS DE LA PROVINCIA DE NAPO**

**AUTORAS:  
KRUPSKAYA TAMARA BUSTOS VITERI  
JENNY JACQUELINE CACUANGO GUALACATA**

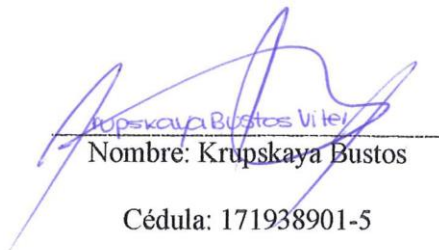
**TUTOR:  
LENIN JAVIER RAMÍREZ CANDO**

**Quito, Enero del 2017**

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotras, Krupskaya Tamara Bustos Viteri, con documento de identificación N° 171938901-5, y Jenny Jacqueline Cacuango Gualacata, con documento de identificación N° 172258186-3 manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: “Identificación molecular de bacterias resistentes a Cadmio y Cromo aisladas de aguas contaminadas de la zona de Papallacta cantón Quijos de la provincia de Napo”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

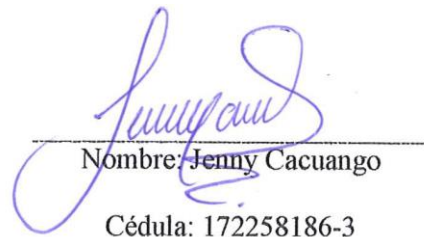
En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Krupskaya Bustos Viteri  
Nombre: Krupskaya Bustos

Cédula: 171938901-5

Fecha: Enero del 2017



Jenny Cacuango  
Nombre: Jenny Cacuango

Cédula: 172258186-3

Fecha: Enero del 2017

## **DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR**

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Identificación molecular de bacterias resistentes a Cadmio y Cromo aisladas de aguas contaminadas de la zona de Papallacta cantón Quijos de la provincia de Napo” realizado por Krupskaya Tamara Bustos Viteri y Jenny Jacqueline Cacuango Gualacata, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Enero del 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'L. J. R. C.', is written over a horizontal dotted line.

Lenin Javier Ramírez Cando

Cédula de identidad: 110425042-6

## DEDICATORIA

A mi madre Ruth, el motor de mi vida, mi más grande amor y mi mayor fortaleza, ella me inspira, me motiva y me brinda consejo y refugio cuando lo necesito, es ella quien ha estado en cada una de mis batallas y a quien siempre le debo mis victorias, porque si hay algo bueno en mí; es por ella.

A mi padre Felix, quien durante toda mi vida me ha inculcado la importancia del trabajo duro y la constancia, por enseñarme a vivir sin miedos y a buscar ser excelente en lo que haga o emprenda.

A mi hermano Lenin, mi amigo y compañero; en quien siempre he podido confiar y quien me ha apoyado incondicionalmente sin pedir nada a cambio, quien pese a lo difícil de la situación siempre ha estado de mi lado.

A mis abuelos, Celia y Segundo (†); que viven y vivirán siempre en mi corazón y que desde donde estén espero se sientan orgullosos de la persona que ayudaron a educar y vieron crecer.

A mis amigos, con los que he compartido buenos y no tan buenos momentos llenos de memorias y experiencias que nunca olvidaré.

Y por último a mis preciados y queridos maestros de toda la vida, el Dr. Guido Arias y al Lcdo. Enrique Castillo (†); quienes siempre me motivaron a ser una mejor versión de mí y me enseñaron que el éxito radica en amar lo que haces y siempre encontrar un motivo para ser feliz.

Krupskaya Bustos

## **DEDICATORIA**

A Dios, por todas sus bendiciones, por no soltar mi mano ni un solo instante y mantenerme a su lado siempre.

A mis amados padres, por ser el pilar fundamental de mi vida; a mi madre Susana por su inmenso amor, por siempre luchar por mi bienestar y ser ejemplo de sacrificio y dedicación, a mi padre Luis por enseñarme a enfrentar los retos que trae la vida y a luchar por cumplir mis sueños, por ser mi ejemplo de rectitud y honestidad. Son los ángeles que me dan las fuerzas necesarias para seguir adelante y nunca dejan de creer en mí, por su apoyo incondicional, consejos y valores, pero sobretodo porque todo lo que ahora soy es gracias a ellos.

A mis hermanas, Erika y Nati, amigas y compañeras, por reír y llorar junto a mí, por acompañarme en cada etapa de mi vida dándome fuerzas y aliento para seguir adelante.

A mis tíos y primos, en especial a mi tía Marianita y mi tío Humberto por ser mis segundos padres, por todo su amor y estar siempre pendientes brindándome su ayuda absoluta.

A mis abuelitos, por su ejemplo de bondad y amor.

A Juan Esteban, por ser como un hermano, por mil risas y aventuras a lo largo de todos estos años; a sus padres por ofrecerme todo su apoyo, cariño y permitirme ser parte de su familia.

A mis amigos, por todo el camino recorrido juntos, brindándome todo su cariño en los buenos y malos momentos, animándome a seguir a pesar de todos los obstáculos encontrados.

Jenny Cacuango

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Politécnica Salesiana, por ser nuestro segundo hogar durante los últimos años; donde tuvimos la oportunidad de conocer excelentes maestros y profesionales y de donde nos llevamos gratos recuerdos y enseñanzas.

A nuestro tutor, Ing. Lenin Ramírez Ms.C., quien nos brindó la oportunidad de trabajar a su lado y nos apoyó incondicionalmente durante este proceso.

A nuestros maestros que a lo largo de nuestra formación universitaria compartieron con nosotras sus valiosos conocimientos: Ing. Ivonne Vaca Ms.C, Ing. Jans Beltrán Ms.C, Ing. Hernán Ayala Ms.C, Ing. Laura Huachi Ms.C e Ing. Diana Calero Ms.C, y en especial a aquellos maestros que sin su ayuda no hubiese sido posible realizar este trabajo: Ing. María Fernanda Guevara Ms.C y Lcda. Germania Karolys.

Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad - CIVABI y sus colaboradores, especialmente a: Ing. Marco Ibarra, Ing. Edison Osorio e Ing. Erika Paredes por su colaboración y su paciencia durante la ejecución de este trabajo.

También deseamos extender un agradecimiento especial por su colaboración y apoyo a Cristian Anguisaca, Edgar Castañeda, Ing. Elizabeth Yugsi e Ing. María Fernanda Paredes, por ser parte de nuestro equipo de trabajo.

Finalmente a nuestras familias y amigos por su apoyo incondicional.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
1.1. Problema.....	2
1.2. Delimitación .....	2
1.3. Explicación del problema.....	3
1.4. Objetivo general y objetivos específicos .....	3
CAPÍTULO II: MARCO CONCEPTUAL .....	4
2.1. Consorcios bacterianos.....	4
2.2. Metales pesados.....	5
2.3. Mecanismos de toxicidad de los metales pesados .....	8
2.3.1. Mecanismos de toxicidad del Cd.....	9
2.3.2. Mecanismos de toxicidad del Cr.....	10
2.4. Resistencia y tolerancia bacteriana a metales pesados .....	11
2.5. Mecanismos de resistencia bacteriana a metales pesados .....	12
2.5.1. Reducción enzimática .....	13
2.5.2. Eflujo de metales por transporte activo .....	14
2.5.3. Secuestro intracelular y extracelular .....	14
2.5.4. Exclusión de metales por barrera de permeabilidad .....	15
2.6. Biotransformación y bioacumulación .....	15
2.7. Procesos Redox .....	16
2.8. Transferencia horizontal y vertical de genes .....	17
2.8.1. Mecanismos de transferencia horizontal.....	18

2.9. Extracción y purificación de ADN bacteriano .....	19
2.10. Métodos de identificación de consorcios bacterianos: fenotípicos y genotípicos.....	20
2.11. Índices de diversidad .....	21
2.12. Análisis estadísticos .....	22
2.12.1. Modelos lineales generalizados (GLM).....	23
2.12.2. Criterio de información bayesiano (BIC) .....	24
2.12.3. Análisis de varianza (ANOVA).....	25
2.12.4. Escalamiento multidimensional (MDS).....	26
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
3.1. Crecimiento bacteriano.....	27
3.2. Ensayo de sensibilidad .....	28
3.3. Extracción de ADN bacteriano.....	29
3.4. Cuantificación, amplificación y secuenciación de ADN bacteriano .....	30
3.5. Análisis e identificación bacteriana.....	34
3.6. Conservación de cepas bacteriana .....	35
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
4.1. Crecimiento bacteriano.....	36
4.2. Sensibilidad bacteriana.....	38
4.3. Cuantificación de ADN bacteriano .....	40
4.4. Identificación bacteriana .....	40
4.5. Discusión .....	45
BIBLIOGRAFÍA .....	51
ANEXOS .....	63



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del Cd y Cr .....	5
Tabla 2. Principales fuentes de emisión de Cd y Cr en Ecuador .....	8
Tabla 3. Diferencias entre bacterias resistentes y bacterias tolerantes a metales pesados.....	11
Tabla 4. Determinantes genéticos de resistencia a metales.....	12
Tabla 5. Funciones de vínculo más comunes utilizadas por los GLM.....	23
Tabla 6. Tipos de análisis de varianza .....	25
Tabla 7. Tipos de escalamientos multidimensionales .....	26
Tabla 8. Concentraciones de reactivos para la preparación de estándares de McFarland.....	28
Tabla 9. Concentraciones de Cd y Cr utilizadas para los ensayos de sensibilidad .....	29
Tabla 10. Criterios de información bayesiana en base a tres modelos lineales generalizados en función del crecimiento bacteriano .....	36
Tabla 11. Estimación entre los coeficientes obtenidos del análisis de varianza para el crecimiento bacteriano en función del medio de cultivo y el tiempo de incubación.....	38
Tabla 12. Crecimiento bacteriano de las muestras sometidas a pruebas de sensibilidad en agar Cetrimida a concentración 100x de Cd y Cr.....	39
Tabla 13. Crecimiento bacteriano de las muestras sometidas a pruebas de sensibilidad en caldo de cultivo a concentración 100x de Cd y Cr .....	39

Tabla 14. Crecimiento bacteriano de las muestras sometidas a pruebas de sensibilidad en caldo de cultivo a concentración 1000x de Cd y Cr .....	39
Tabla 15. Concentraciones de ADN bacteriano por muestra realizada mediante espectrofotometría de espectro total .....	40
Tabla 16. Concentración de ácidos nucleicos en función del total de bases por muestra.....	40
Tabla 17. Cantidad de secuencias de bacterias pertenecientes a un género específico presentes en las muestras secuenciadas .....	41
Tabla 18. Valores de los índices de diversidad para los géneros bacterianos presentes en las muestras secuenciadas.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias en la transformación de sustrato en productos por parte de una población individual y un consorcio.....	5
Figura 2. Separación de la doble cadena de ADN en hebras simples mediante adaptadores especiales para la formación de bibliotecas.....	31
Figura 3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante emPCR (reacción en cadena de la polimerasa basada en emulsión) .....	32
Figura 4. Secuenciación de ADN por síntesis con emisión quimioluminiscente detectada por una cámara CCD a través de una pieza de Silicio.....	33
Figura 5. Gráfico de barras de intensidades de luz “flowgram” (secuencia TCAG marcada al inicio para calibración del equipo).....	34
Figura 6. Análisis de varianza (ANOVA) para el crecimiento bacteriano en función del medio de cultivo y el tiempo de incubación .....	37
Figura 7. Escalamiento multidimensional (MDS) representando la similitud entre las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd2(2), LPS01Cd3 y LPS01Cd5(2)A en un espacio geométrico en base a las distancias entre muestras .....	43
Figura 8. Abundancia relativa de géneros bacterianos presentes en las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd3 y LPS01Cd5(2)A .....	44
Figura 9. Siembra de la muestra LPS01Cr3(B) en medio Cetrimida.....	71
Figura 10. Siembra de la muestra LPS01Cr2(2)A en medio Cetrimida .....	71
Figura 11. Siembra de la muestra LPS01Cr2(1) en medio Cetrimida .....	72
Figura 12. Siembra de la muestra LPS01Cr1(1)B en medio Cetrimida.....	72
Figura 13. Siembra de la muestra LPS01Cr1(1)B en medio Cetrimida.....	73

Figura 14. Siembra de la muestra LPS01Cr1 en medio Ceftriaxona.....	73
Figura 15. Siembra de la muestra LPS01Cd5(2)A en medio Ceftriaxona.....	74
Figura 16. Siembra de la muestra LPS01Cd3 en medio Ceftriaxona .....	74
Figura 17. Siembra de la muestra LPS01Cd2(2) en medio Ceftriaxona.....	75
Figura 18. Siembra de la muestra LPS01Cd1 en medio Ceftriaxona .....	75

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Primer paso en la reacción de Fenton.....	10
Ecuación 2. Segundo paso en la reacción de Fenton .....	10
Ecuación 3. Tercer paso en la reacción de Fenton .....	10
Ecuación 4. Ecuación del índice Margalef.....	21
Ecuación 5. Ecuación del índice de Menhinik .....	21
Ecuación 6. Ecuación del índice de Simpson.....	22
Ecuación 7. Ecuación del índice de McIntosh .....	22
Ecuación 8: Fórmula completa para calcular el criterio de información bayesiano (BIC) .....	24
Ecuación 9. Fórmula para calcular la varianza del error dentro del criterio de información bayesiano (BIC) .....	24
Ecuación 10. Fórmula condensada para calcular el criterio de información bayesiano (BIC) .....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Requisitos de muestras para secuenciación de genomas a través del servicio de secuenciación de genomas individuales de Macrogen .....	63
Anexo 2. Tabla de crecimiento bacteriano en base a tres variables (medio de cultivo, temperatura de incubación y tiempo de incubación).....	64
Anexo 3. Fotografías de los consorcios bacterianos .....	71

## RESUMEN

El Cadmio y Cromo son metales pesados altamente tóxicos en sus formas iónicas y constituyen un serio problema ambiental ya que tienden a acumularse resultando extremadamente difíciles de remover. En el campo de la biorremediación las bacterias han sido estudiadas por su capacidad de resistir altas concentraciones de metales pesados, ya que, dentro de su información genética guardan secciones que codifican mecanismos de resistencia que les permiten sobrevivir y adaptarse a ambientes contaminados.

Con el objetivo de identificar bacterias resistentes a Cd y Cr se sembraron consorcios bacterianos en tres medios de cultivo (PCA, agar Cetrimida y caldo de cultivo) a dos temperaturas (4°C y 37°C) y dos tiempos de incubación (24 y 48 horas), se evaluó la sensibilidad bacteriana a concentraciones de 2 y 20 ppm de Cd, y, 50 y 500 ppm de Cr.

Mediante la aplicación de modelos lineales generalizados, criterios de información bayesianos y análisis de varianza; se determinó que el medio de cultivo (agar Cetrimida y caldo de cultivo) y el tiempo de incubación influyen significativamente en el crecimiento bacteriano. Los ensayos de sensibilidad mostraron que los consorcios bacterianos son más sensibles a concentraciones de 2 y 20 ppm de Cd.

Finalmente se extrajo ADN de los consorcios bacterianos que mostraron resistencia en los ensayos de sensibilidad, se amplificó y secuenció el marcador 16s ARNr y mediante el alineamiento de secuencias se identificaron bacterias pertenecientes en su mayoría a los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*.

**Palabras clave:** Bacterias resistentes, metales pesados, cadmio, cromo, biorremediación

## ABSTRACT

Cadmium and Chromium are highly toxic heavy metals in their ionic forms, they're extremely hard to remove because they tend to accumulate becoming a serious environmental problem. The bacterial ability to resist high concentrations of heavy metals was been studied in the bioremediation field, the genetic information in bacterial genome contain sections that encode mechanisms that allow them to survive and adapt to polluted environments.

To identify Cd and Cr resistant bacteria, bacterial consortia were cultured in three growth medium (PCA, Cetrimide agar and culture broth) at two temperatures (4°C and 37°C) and two incubation times (24 and 48 hours), bacterial sensitivity was evaluated at 2 and 20 ppm Cd, and 50 and 500 ppm Cr concentrations.

The growth medium (Cetrimide agar and culture broth) and the incubation time were determined to influence significantly the bacterial growth through the application of generalized linear models, bayesian information criteria and analysis of variance. Sensitivity tests showed that bacterial consortia are more sensitive to 2 and 20 ppm Cd concentrations.

Finally, the DNA from bacterial consortia that showed resistance in the sensitivity assays was extracted, the 16s rRNA marker was amplified and sequenced, through the sequences alignment it could be possible identified Cd and Cr resistant bacteria mainly correspond to the genus *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Stenotrophomonas*.

**Key words:** resistant bacteria, heavy metals, cadmium, chrome, bioremediation



## INTRODUCCIÓN

Desde hace miles de años el ser humano se ha beneficiado de las bacterias sin saberlo, después de siglos de investigación y de descubrimientos que cambiaron el curso de la historia; el hombre empezó a utilizar y potenciar las diversas capacidades de las bacterias dentro de una vasta gama de áreas esenciales para su supervivencia. Sin embargo; y pese a esta larga historia, es apenas desde mediados del siglo XX que empezó a estudiarse el uso potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes (Gallego & Sánchez, 2003).

Actualmente son varios los esfuerzos enfocados en la aplicación de bacterias dentro de biorremediación, para ello es esencial realizar investigaciones que ofrezcan información acerca de las posibles especies que puedan utilizarse para este fin, desafortunadamente en este aspecto Ecuador posee una gran deficiencia ya que existe poca información sobre la diversidad bacteriana en el país; y aquella relacionada con biorremediación es aún menor. El desarrollo de industrias entre las que se encuentran la minería, producción de energía, combustibles y metalurgia; producen residuos que contienen metales que son liberados directa o indirectamente en el ambiente causando un grave problema de contaminación (Das, Vimala, & Karthika, 2008). Dentro de la larga lista de contaminantes generados por estos procesos, el Cd y Cr (considerados entre los contaminantes inorgánicos más peligrosos en el ambiente) son dos claros ejemplos de metales pesados que representan un constante peligro por resultar extremadamente difíciles de remover; afectando la capacidad de autodepuración de los ecosistemas, los ciclos biológicos, los ciclos biogeoquímicos, y consecuentemente la salud y el bienestar humano (Cañizares, 2000).

## **CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1. Problema**

La problemática de la contaminación ambiental hace que sea necesario desarrollar y aplicar nuevas tecnologías que mitiguen y remedien el impacto ocasionado mediante la utilización de métodos biológicos que ofrezcan una alta eficiencia en la remoción de los metales de interés con flexibilidad operacional tanto en sistemas in situ como ex situ (Vullo, 2003), por este motivo es fundamental identificar poblaciones de bacterias nativas que puedan ser utilizadas en investigaciones futuras orientadas a dar solución a los diversos problemas de contaminación en Ecuador y el planeta.

### **1.2. Delimitación**

Se partió de consorcios bacterianos aislados por el Grupo de Investigación en Ciencias Ambientales (GRICAM) de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito Campus Sur, estos consorcios fueron aislados a partir de efluentes contaminados de la zona de Papallacta en el cantón Quijos de la provincia de Napo y fueron obtenidos de industrias con expresa autorización y bajo reserva de nombres y demás información.

La zona de Papallacta se encuentra ubicada en la Región Oriental en las coordenadas 0°22'01"S 78°07'58"O, cuenta con una superficie total de 5853 Has a 3300 m.s.n.m con un clima frío andino de entre -10°C a 20°C. Posee una laguna para la que se reportan concentraciones elevadas de sólidos totales que pueden aumentar la turbidez del agua,

aumentar su temperatura y unirse a contaminantes tóxicos como los metales pesados (Ministerio de Ambiente, 2015).

### **1.3. Explicación del problema**

La hipótesis del presente trabajo de titulación es que existen bacterias nativas de la zona de Papallacta en el cantón Quijos de la provincia de Napo con resistencia a Cd y Cr.

### **1.4. Objetivo general y objetivos específicos**

El objetivo principal es identificar bacterias resistentes a Cd y Cr aisladas de aguas contaminadas de la zona de Papallacta en el cantón Quijos de la provincia de Napo. Los objetivos específicos incluyen cultivar consorcios bacterianos aislados de muestras líquidas provenientes de efluentes contaminados, evaluar el crecimiento bacteriano utilizando diferentes medios de cultivo, temperaturas y tiempos de incubación, realizar ensayos de sensibilidad a Cd y Cr, extraer ADN bacteriano, amplificar la región del marcador 16s ARNr, secuenciar los amplicones obtenidos, y, analizar las secuencias obtenidas mediante programas bioinformáticos para la identificación de bacterias.

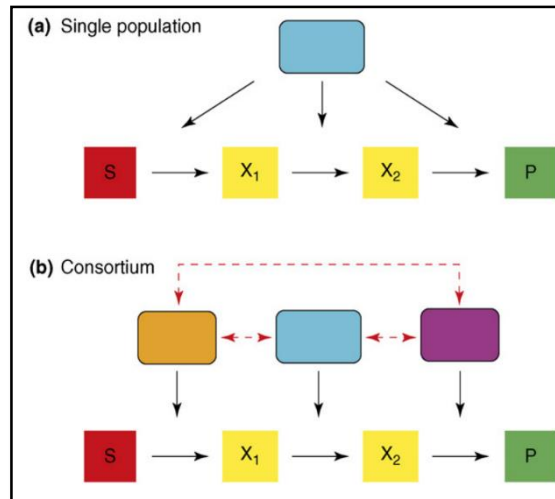
## CAPÍTULO II: MARCO CONCEPTUAL

### 2.1. Consorcios bacterianos

En la naturaleza pueden encontrarse poblaciones bacterianas aisladas perfectamente capaces de realizar funciones vitales (crecimiento, reproducción, entre otras), sin embargo, bajo ciertas circunstancias como medio de supervivencia estas especies pueden llegar a asociarse, esta estrategia se conoce como consorcio (Ochoa & Montoya, 2010).

Se define a un consorcio como una reunión de varias poblaciones microbianas de diferentes especies que se comportan como una comunidad actuando de forma sinérgica o sintrófica, en comparación a especies aisladas; los consorcios son más eficientes y se adaptan mejor a fluctuaciones ambientales (Brenner, You, & Arnold, 2008; Ochoa & Montoya, 2010). Existen dos características importantes para lograr la eficacia de estos sistemas: la primera es la comunicación a través de señales físico-químicas (intercambio de metabolitos o señales moleculares) entre las especies que lo conforman, lo cual da paso a la segunda característica, donde una vez recibida la señal se da la división del trabajo. En la Figura 1 se observa la diferencia entre especies aisladas y consorcios para transformar un sustrato (S) en un producto (P), en el caso (a) la población aislada debe sintetizar todas las enzimas que intervienen en reacciones intermedias para llegar al producto final, a diferencia del caso (b) en el que cada población que forma parte del consorcio cumple una función específica, dándole gran ventaja tanto para controlar el desequilibrio metabólico como para la conversión de compuestos gracias a que el mecanismo bioquímico es más especializado (Brenner et al., 2008).

**Figura 1.** Diferencias en la transformación de sustrato en productos por parte de una población individual y un consorcio



Fuente: Brenner et al., 2008

## 2.2. Metales pesados

Los metales pesados se encuentran en la corteza terrestre de forma natural e incluyen una serie de elementos de la serie de transición de la tabla periódica, presentan la característica común de poseer una densidad superior a 6 g/cm<sup>3</sup> y sus propiedades físicas en estado sólido incluyen: alta reflectividad, alta conductividad eléctrica y térmica, fuerza y ductilidad (Reyes et al., 2007). Dentro de estos elementos se encuentran el Cd y Cr (Tabla 1) que en trazas son esenciales para la vida, sin embargo, en concentraciones mayores resultan tóxicos ya que tienden a bioacumularse.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas del Cd y Cr

Metal	Símbolo	Número atómico	Masa atómica (g/mol)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)
Cadmio	Cd	48	112,4	8,6	765	321°C
Cromo	Cr	24	52,0	7,15	2642	1900°C

Fuente: International Programme on Chemical Safety, 2006

El Cd es un metal blanco azulado, dúctil y maleable situado en el grupo 12 dentro de la tabla periódica, posee un único catión ( $\text{Cd}^{2+}$ ) aunque puede formar compuestos en forma de sales iónicas (Baird, 2001), no se encuentra en estado puro pero puede asociarse con otros metales como el Cr, Pb y Zn. Este metal tiene una producción de 17.000 toneladas al año a nivel mundial de las cuales el 45% se destina para galvanizados, 21% a elaboración de pigmentos (plásticos, textiles, vidrios, cerámicas), 15,1% estabilizadores de plásticos (PVC), 7,5% en aleaciones (Al, Cu y Ag), 3% en baterías (pilas de Cd y Ni), y un 8,4% para otros usos que incluyen fotografía, elaboración de fotoconductores y células solares fotoeléctricas; este uso conlleva a la emisión de gases a la atmósfera y contaminantes a mantos acuíferos y suelos (Arroyo, Ortiz, Enrique, & Vicentina, 2013; Ramírez, 2002; Vázquez, 2005).

Se incorpora a la atmósfera como subproducto de la fundición del Zn, la quema de carbón y la incineración de residuos que contienen Cd, mientras que se incorpora al agua generalmente por descargas industriales y desechos mineros; se han encontrado concentraciones de más de 100 ppm en peso seco en sedimentos de puertos (Manahan, 2006). Estas descargas a la atmósfera y al agua representan un peligro constante por exponer a toda forma de vida a niveles tóxicos de Cd, que tiende a acumularse y magnificarse con el paso del tiempo.

Sumado a lo anterior, el uso de fertilizantes fosfatados dentro de la agricultura produce una acumulación de Cd en plantas y animales, y por lo tanto, en toda la cadena alimenticia hasta llegar al ser humano (Manahan, 2006). La exposición a este metal puede ocasionar daños en riñón, hígado, pulmón, páncreas, testículos, placenta y huesos (Satarug et al., 2010) por lo que pese a ser relativamente poco abundante es considerado extremadamente tóxico.

El Cr es un metal frágil, gris acerado y brillante, muy resistente frente a la corrosión que presenta estados de oxidación que van de  $\text{Cr}^{2+}$  a  $\text{Cr}^{6+}$ , los estados  $\text{Cr}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{3+}$  son los más estables,  $\text{Cr}^{4+}$  y  $\text{Cr}^{5+}$  son poco frecuentes y  $\text{Cr}^{6+}$  es el más tóxico y cancerígeno (Codd et al., 2001). En su estado  $\text{Cr}^{6+}$  se encuentra combinado con el oxígeno formando iones cromato o dicromato, en estado  $\text{Cr}^{3+}$  forma óxidos, hidróxidos, sulfatos y unido a materia orgánica en ambientes acuáticos y en suelos (Cervantes, 2001).

En trazas el estado  $\text{Cr}^{3+}$  es un nutriente esencial para el metabolismo de azúcares y grasas, y aunque su función no está definida por completo; aparentemente potencia la acción de la insulina (Flores et al., 1995). Se emplea básicamente en la metalurgia, industria química y para la fabricación de materiales refractarios pudiendo ingresar en la cadena trófica en cualquiera de las matrices (atmósfera, agua y suelo). También puede entrar en contacto directo con el ser humano por inhalación, ingestión y contacto cutáneo provocando daño al sistema respiratorio, tracto gastrointestinal y en casos de exposición crónica ocasiona cáncer de pulmón.

Ambos metales se integran a los organismos vivos en pequeñas concentraciones bioacumulables a través de los alimentos, agua y aire. La contaminación del agua es de particular interés ya que desde siempre ha sido un factor determinante para el bienestar de todos los seres vivos (Manahan, 2006).

Según el Ministerio del Ambiente de Ecuador (2006) la contaminación con metales pesados en el país es causada por la extracción minera, refinamiento de productos mineros, liberación al ambiente de efluentes industriales y manejo inadecuado de desechos metálicos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Principales fuentes de emisión de Cd y Cr en Ecuador

<b>Cd</b>	<b>Cr</b>
Baterías y pilas	Refinamiento del petróleo
Pigmentos para plástico y PVC	Industria de cuero
Estabilizadores para plástico y PVC	Producción de textiles
Pigmentos en pinturas	Galvanización
Galvanización	Pinturas
Catalizadores en la industria del plástico	Cerámicas
Conservadores en la industria del plástico	Fabricación de explosivos
Aleaciones	Fungicidas, tintas

**Fuente:** Ministerio de Ambiente, 2006

### **2.3. Mecanismos de toxicidad de los metales pesados**

Los metales pesados son altamente reactivos cuando se hallan en forma catiónica o enlazados a otros compuestos, ya que, bioquímicamente poseen afinidad hacia grupos funcionales (por ejemplo grupos sulfhidrilo) presentes en enzimas que catalizan reacciones críticas en un organismo, se ha descubierto que los iones metálicos interactúan con componentes celulares como el ADN y las proteínas, causando daños y cambios conformacionales que pueden alterar el ciclo celular (Beyersmann & Hartwig, 2008; Tchounwou, Yedjou, Patlolla, & Sutton, 2012).

Ejercen un efecto tóxico a través de mecanismos que afectan a diversos procesos bioquímicos, estos mecanismos complejos aún no son del todo conocidos, pero destacan aquellos relacionados con la interacción con metales esenciales por similitud electrónica, la formación de complejos metal-proteína con inactivación de su función, la inhibición enzimática de proteínas con grupos SH y la afectación de orgánulos celulares (Ferrer, 2003). Dentro de estos mecanismos existen factores que condicionan la toxicidad de estos compuestos (liposolubilidad, hidrosolubilidad, peso molecular, mecanismos específicos de transporte, etc.).



### 2.3.1. Mecanismos de toxicidad del Cd

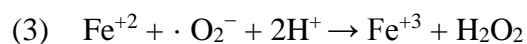
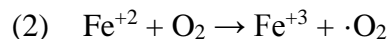
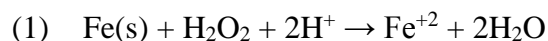
Los efectos tóxicos producidos por este metal están asociados a mecanismos relacionados con los transportadores de membrana que permiten el paso de metales nutritivos ( $\text{Ca}^{2+}$ , Fe, y Zn) a través de la membrana plasmática de la célula. Según Bridges & Zalups (2005), el  $\text{Cd}^{2+}$  puede interactuar con transportadores de membrana que participan en la absorción de metales nutritivos (esta interacción se produce gracias a un mecanismo de mimetismo catiónico donde el  $\text{Cd}^{2+}$  imita los sitios de unión de proteínas) y/o con los canales portadores de otros minerales nutritivos para la célula.

Rabenstein, Kadima, Webe & Mohanakrishnan (1983) apoyan la hipótesis de que un ion de  $\text{Cd}^{2+}$  puede formar complejos covalentes con ciertas biomoléculas que contienen un grupo sulfhidrilo (GSH, Cys, o Hcy) en ciertos compartimentos de la cuerpo. También es capaz de generar ROS (reactive oxygen species) de manera indirecta provocando daño en el ADN, proteínas, membranas, y, alterando la cadena de electrones mitocondrial (Belyaeva, Dymkowska, Wieckowski, & Wojtczak, 2008; Belyaeva, Glazunov, & Korotkov, 2004; Liu, He, Yan, Qi, & Zhang, 2011; Mao et al., 2011) reemplazando al Fe y Cu en proteínas de membrana y citosólicas como la ferritina; generando un incremento en el radical  $\text{OH}^-$  vía la reacción de Fenton (Arroyo, Ortiz, Enrique, & Vicentina, 2013). Por otro lado, también induce la expresión de NOXs (enzimas transmembranales que generan ROS), que están implicadas en una variedad de desórdenes que resultan en la muerte celular por apoptosis.

### 2.3.2. Mecanismos de toxicidad del Cr

El ion  $\text{Cr}^{6+}$  es la forma más tóxica del metal por su facilidad para atravesar membranas biológicas y ser transportado activamente al interior celular por el transportador de sulfato (Borst-Pauwels, 1981). La absorción microbiana del  $\text{Cr}^{6+}$  se da a través de los canales de transporte de sulfatos, una vez dentro del interior celular se generan intermediarios reducidos de Cr (hasta llegar a la forma de  $\text{Cr}^{3+}$ ) que en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalizan una reacción de tipo Fenton generando ERO (con el consecuente daño oxidativo) y produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y de ácidos nucleicos (Ercal, Gurer-Orhan, & Aykin-Burns, 2001; Liu & Shi, 2001), este daño oxidativo puede ocasionar mutagénesis y carcinogénesis por daño del ADN (Cervantes, 2001; Cheung & Gu, 2007).

La reacción directa de Fenton está mediada por  $\text{Fe}^{+2}$  (1), la presencia del ion  $\text{Fe}^{+3}$  desencadena reacciones que dan como resultado ROS (2) y (3) (Ramírez, 2015).



El  $\text{Cr}^{3+}$  forma compuestos relativamente inocuos por su insolubilidad y su incapacidad de atravesar membranas biológicas a bajas concentraciones por lo que no se considera tóxico, pero, en altas concentraciones puede llegar a presentar los mismos efectos tóxicos que el  $\text{Cr}^{6+}$  (Gutiérrez et al., 2010).

## 2.4. Resistencia y tolerancia bacteriana a metales pesados

Es común utilizar indiscriminadamente los términos resistencia y tolerancia bacteriana, sin embargo, la diferencia sustancial radica en los mecanismos involucrados (Tabla 3).

**Tabla 3.** Diferencias entre bacterias resistentes y bacterias tolerantes a metales pesados

<b>Bacterias resistentes</b>	<b>Bacterias tolerantes</b>
Mecanismos codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia del metal.	Mecanismos indiferentes a la presencia o ausencia del metal.

**Modificado de:** Marrero, Díaz, & Coto, 2010

Dentro de los mecanismos de resistencia existen dos tipos de sistemas de captura de cationes de metales pesados: el primero es rápido, inespecífico y depende del gradiente quimiosmótico existente a través de la membrana citoplasmática bacteriana, el segundo posee una gran especificidad de sustrato, es más lento, generalmente utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía en adición al gradiente quimiosmótico y se induce bajo condiciones nutricionales desfavorables o en alguna situación metabólica especial (Nies & Silver, 1995). A nivel genético, la resistencia a metales pesados se encuentra codificada por secciones del genoma bacteriano denominadas “determinantes genéticos”. Estos pueden ser plasmidios, transposones o ambos (Amoroso, Schubert, Mitscherlich, Schumann, & Kothe, 2000; von Rozycki & Nies, 2009), en el caso de los determinantes plasmídicos pueden llegar a ser altamente específicos confiriendo resistencia a concentraciones elevadas de metales pesados (Mergeay, 1991) y tienen la ventaja de pasar de una célula a otra por transferencia horizontal favoreciendo a corto plazo la adaptación bacteriana en ambientes contaminados (Marrero, Díaz, & Coto, 2010).

## 2.5. Mecanismos de resistencia bacteriana a metales pesados

La resistencia a metales pesados es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustrato diferentes, pero que comparten las mismas funciones (Marrero et al., 2010). Dentro de este contexto, los mecanismos de resistencia se dan como respuesta a un estrés producido por la presencia de una sustancia potencialmente dañina para la bacteria.

**Tabla 4.** Determinantes genéticos de resistencia a metales en bacterias

Determinante genético	Metal al que confiere resistencia	Localización	Cepa bacteriana	Mecanismo involucrado
cad.	Cd(II)	pI258	<i>S. aureus</i>	Expulsión mediante ATPasa tipo P (CadA)
	Cd(II)	Crsoma	<i>C. metallidurans</i>	
chr.	Cr(VI)	pMOL28	<i>C. metallidurans</i> CH34	Eflujo mediante proteína de membrana (ChrA).
czc.	Cd(II)	pMOL30	<i>C. metallidurans</i> CH34	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CzcABC).
				Expulsión mediante transportador tipo CDF (CzcD). Expulsión mediante ATPasa tipo P (CzcP)
ncc.	Cd(II)	pTOM9	<i>A. xylosoxydans</i> 31A	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(NccABC).
	Cd(II)	pGOE2	<i>C. metallidurans</i> KTO2	
znt.	Cd(II)	Crsoma	<i>S. aureus</i>	Expulsión mediante transportador tipo CDF (RzcB).
	Cd(II)	Crsoma	<i>C. metalidurans</i> CH34	Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA)
	Cd(II)	Crsoma	<i>E. coli</i>	Expulsión mediante transportador tipo CDF (ZitB). Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA)

**Modificado de:** Marrero-Coto et al., 2010

Investigaciones de especies bacterianas como *C. metallidurans*, *S. aureus*, *E. coli*, etc., han permitido identificar plenamente el determinante genético, su localización y el mecanismo involucrado (Tabla 4).

### 2.5.1. Reducción enzimática

La reducción enzimática del  $\text{Cr}^{6+}$  a  $\text{Cr}^{3+}$  se ha sugerido como un mecanismo de resistencia en varios microorganismos, sin embargo, sólo algunas enzimas han sido caracterizadas (Cervantes & Campos, 2007). Por ejemplo, la proteína ChrR de *Pseudomonas pulida*, una flavoenzima situada en el periplasma que funciona como un dímero con actividad reductasa dependiente de NADH. La actividad de esta proteína genera flavin semiquinona por la reducción de cromato; transfiriendo los electrones del NADH al anión superóxido y generando especies de  $\text{Cr}^{5+}$  transitorias (minimizando que estas especies transitorias reaccionen con  $\text{H}_2\text{O}_2$  generando un exceso de ROS), protegiendo a las células del estrés oxidativo (Gonzalez, Ackerley, Lynch, & Matin, 2005).

En *Escherichia coli* se encuentra la cromato reductasa YieF (homóloga a ChrR de *P. pulida*) que transfiere tres electrones al  $\text{Cr}^{6+}$  para producir  $\text{Cr}^{3+}$ , también transfiere un electrón al oxígeno molecular para generar ERO (Ackerley et al., 2004). Otra enzima caracterizada en *E. coli* es la flavín reductasa Fre, que reduce el cromato mediante la formación de un complejo entre  $\text{Cr}^{3+}$  con el cofactor NAD (Ramírez et al., 2008).

Otros ejemplos son *Vibrio harveyi* que posee actividad cromato reductasa y *Paracoccus denitrificans* que posee una reductasa férrica FerB (Cervantes & Campos, 2007).

Existen también otras reductasas celulares que pueden llevar a cabo la reducción del cromato, como la DT-diaforasa, aldehído oxidasa, el citocromo P450 y algunas

nitrorreductasas (Banks & Cooke, 1986; Mikalsen, Alexander, Wallin, Ingelman-Sundberg, & Andersen, 1991).

### **2.5.2. Eflujo de metales por transporte activo**

Los microorganismos utilizan este mecanismo para exportar los metales tóxicos desde su citoplasma al espacio extracelular. Estos mecanismos pueden estar codificados a nivel crómico o en plásmidos. En el caso del Cr, se ha reportado la existencia del operón chrBACF de *Ochrobactrum tritici* 5bv11 que contiene el gen chrA que codifica para una proteína de membrana con actividad de eflujo, la cual expulsa el Cr<sup>6+</sup> desde el citoplasma hacia el exterior celular (Cervantes, 2001).

### **2.5.3. Secuestro intracelular y extracelular**

Las proteínas plasmáticas cumplen diversas funciones dentro de la célula bacteriana, una de ellas es prevenir la exposición de componentes celulares esenciales a compuestos que pudiesen resultar nocivos. El mecanismo involucrado en este proceso se conoce como secuestro intracelular o extracelular (dependiendo del lugar donde se lleve a cabo) mediante la unión a proteínas (Sueiro, 2012). Rouch, Lee, & Morby (1995) identificaron proteínas ricas en cisteína en *Pseudomonas* sp. capaces de secuestrar iones Cd<sup>2+</sup>, mientras que (Morel et al., 2009) observaron la presencia de un exopolisacárido producido por *Stenotrophomonas* sp. con la capacidad de secuestrar Cr<sup>6+</sup>.

#### **2.5.4. Exclusión de metales por barrera de permeabilidad**

La permeabilidad de la pared celular bacteriana es selectiva permitiendo el paso de solo ciertas sustancias. Algunas alteraciones en la composición de la pared celular, membrana o envoltura de un microorganismo son ejemplos de mecanismo de exclusión de metales por barrera de permeabilidad, ya que impiden el ingreso de los metales a la célula (Sueiro, 2012).

#### **2.6. Biotransformación y bioacumulación**

En vista de que los metales pesados no pueden ser degradados de forma biológica o química, actualmente se está considerando un nuevo enfoque; donde a través de la utilización de microorganismos capaces de acumular iones metálicos con cierto grado de especificidad se brinda una alternativa para la contaminación ambiental. Esta capacidad de acumulación se debe a que las membranas de dichos microorganismos poseen un polisacárido de naturaleza polianiónica que es susceptible de ligar metales (López & Modrego, 1994).

Los microorganismos con esta capacidad dependiendo del estado de oxidación en que se presente un metal y la especie que esté conformando; puede realizar dos transformaciones: la primera donde moviliza al metal transformándolo de un estado insoluble inicial (correspondiente a una fase sólida) a un estado soluble final (en fase acuosa), el segundo es conocido como lixiviación microbiana e inmoviliza el metal transformándolo de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida (Soto, Gutiérrez, Rey León, & González Rojas, 2010).

Otro mecanismo de interés que puede llegar a inmovilizar el metal de interés es la llamada bioacumulación, donde las especies metálicas son retenidas al interactuar con los fosfatos, proteínas y lípidos en el citoplasma celular compitiendo con los iones Na, K y Ca en los mecanismos biológicos; sus posibilidades de desarrollar una mayor capacidad absorbente dependen del tipo de microorganismo y su etapa de crecimiento (Soto et al., 2010)

El potencial de biosorción de metales por microorganismos es indiscutible, algunos de estos absorben metales en cantidades elevadas, además resultan de particular interés ya que resultan económicos en comparación a los métodos tradicionales; haciendo de su uso la forma más eficiente para la destoxificación de efluentes industriales que contienen metales (Cañizares, 2000).

## **2.7. Procesos Redox**

Koolman & Klaus-Heinrich (2005) afirman que las reacciones redox son transformaciones en las cuales los elementos participantes intercambian electrones, en estas reacciones siempre participan pares de compuestos que en conjunto se denominan sistemas redox. En estos sistemas se identifican dos tipos básicos de compuestos: el compuesto reducido que se conoce como agente reductor, y el compuesto oxidado conocido como agente oxidante (el agente reductor transfiere electrones al agente oxidante de tal manera que el primero se oxida y el segundo se reduce). Estos sistemas están ordenados de manera creciente y el lugar que ocupan depende de su potencial.

Según Domènech & Peral (2006) en un sistema ambiental es posible estimar los procesos de oxidación y reducción que ocurren en él siempre y cuando se conozcan los estados redox. En medios aireados el oxígeno se convierte en el principal aceptor de electrones



hasta que el oxígeno se agote, cuando esto sucede otras especies oxidantes toman su lugar como aceptores. Por otro lado el potencial redox del agua (denominado EH o rH) es un factor importante que mide la capacidad del agua de oxidar y reducir diversas sustancias presentes en ella (Marín, 2003). Mientras más elevado sea este potencial; más cantidad de oxígeno tendrá el agua, y por ende mayor cantidad de compuestos oxidados (Fe, Mn, sulfatos, nitratos, fosfatos, materia orgánica), por el contrario, mientras menor sea este potencial existirá menor cantidad de oxígeno y compuestos en estado reducido. Por esta razón se usa la información del potencial redox en el estudio de aguas residuales y sus respectivos procesos de depuración (Marín, 2003).

Se puede identificar la clase de agua con la que se está tratando mediante de este valor, por ejemplo: aguas que tienen valores rH entre 15 y 25 encajan en la categoría de aguas bien oxigenadas, aquellas que presentan valores rH entre 13 y 15 se encuentran en una transición, y por último valores  $< 13$  corresponden a aguas de fosas sépticas y sometidas a putrefacción.

## **2.8. Transferencia horizontal y vertical de genes**

La transferencia vertical ocurre cuando un organismo recibe material genético de sus antecesores, por ejemplo: de sus padres o de un ancestro del que desciende, por el contrario, la transferencia horizontal es el proceso por el cual un organismo transfiere material genético a otra célula que no es de su descendencia.

La transferencia horizontal es muy común entre bacterias incluso entre aquellas que son distantes, por ejemplo: cuando una célula bacteriana consigue algún tipo de resistencia puede transferir rápidamente estos genes a otras especies. El ejemplo más dramático de

esta transferencia es el aumento en la resistencia a antibióticos, no obstante, existen casos en los que esta capacidad puede ser utilizada para beneficio del ser humano como en el caso de los genes que codifican para la degradación de compuestos xenobióticos (Rozo & Dussán, 2010).

### **2.8.1. Mecanismos de transferencia horizontal**

Existen tres mecanismos a través de los cuales se puede dar la transferencia horizontal: la transformación, la transducción y la conjugación, pese a que los dos primeros son muy importantes para los organismos procariotas, el que más contribuye a la transferencia de información genética y el más común es la conjugación.

- La transformación es el resultado de la introducción, absorción y expresión del material genético del entorno (ADN o ARN) que altera genéticamente a la célula.
- La transducción se basa en el intercambio de ADN de una bacteria a otra a través de un virus bacteriano llamado bacteriófago (Llosa & de la Cruz, 2005).
- La conjugación radica en la transferencia de material genético mediante el contacto célula-célula entre una bacteria donante a una receptora (Rozo & Dussán, 2010), este proceso se da por medio de una estructura proteica que se conoce como pilus a través de la formación de un puente de conjugación que conecta los citosoles de ambos organismos. Un claro ejemplo de este caso es la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que tiene la capacidad de transferir eficientemente

ADN dentro del núcleo de células vegetales y sólo bajo condiciones de laboratorio en células animales y de levaduras (Llosa & de la Cruz, 2005).

La conjugación además de ser la responsable de transferir genes de resistencia a antibióticos, también lo es de la distribución de genes para la degradación de contaminantes orgánicos, es por eso que la presencia de donantes heterólogos eficientes en poblaciones bacterianas puede acelerar los procesos de transferencia de plásmidos, y, procesos de adaptación bacteriana a los cambios ambientales, llevando a tener tratamientos de biorremediación más eficientes (Rozo & Dussán, 2010; Wolska, 2003).

## **2.9. Extracción y purificación de ADN bacteriano**

Existen diversos métodos de extracción de ADN, dentro de estos se encuentra el desarrollado por Murray y Thompson en 1980, el cual se basa en la utilización de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB por sus siglas en inglés).

El CTAB es una sal de amonio cuaternario que actúa como surfactante catiónico por poseer grupos alquilo dentro de su estructura, es utilizado como solución tampón para la extracción de ácidos nucleicos por su capacidad de formar complejos con las proteínas y los polisacáridos (producidos por algunas bacterias Gram negativas) precipitando únicamente los ácidos nucleicos. Es una técnica ideal para la extracción de pequeñas cantidades de ADN a partir de muchas especies y también es útil para extracciones a gran escala (Murray & Thompson, 1980).

## **2.10. Métodos de identificación de consorcios bacterianos: fenotípicos y genotípicos**

Para la identificación bacteriana se efectúan pruebas primarias, secundarias y terciarias. En primera instancia se parte de la identificación fenotípica para lo que se utiliza el cultivo, este método permite aislar el microorganismo de interés, determinar su crecimiento y morfología, también permite analizar parámetros de sensibilidad, propiedades fisicoquímicas y metabólicas.

Esta identificación se basa en la comparación de características similares con bacterias conocidas, por ejemplo, se evalúa diferentes medios de cultivo (básicos, enriquecimiento, selectivos, diferenciales, cromogénicos), diferentes temperaturas de incubación (psicrófilas, mesófilas, termófilas) o diferentes atmósferas (aerobias estrictas, anaerobias estrictas, facultativas), para la morfología se realiza una tinción (azul de metileno o tinción Gram) para evidenciar el tamaño y forma de las bacterias.

Una vez definida la identificación fenotípica se recurre a pruebas bioquímicas que mediante una serie de reacciones enzimáticas identifica características metabólicas de las bacterias analizadas.

Los resultados de las pruebas antes realizadas se corroboran a través de pruebas moleculares, en taxonomía bacteriana el análisis de la región conservada 16s ARNr es la más usada. Esta región está constituida por una familia de multigenes que actúan como un marcador ya que a lo largo del tiempo no se ha modificado y se encuentra presente en todas las bacterias (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010), las secuencias resultantes se comparan con bases de datos públicas llegando a determinar hasta el género bacteriano. Para poder precisar la especie de las bacterias analizadas se requiere del análisis de genes más específicos.

## 2.11. Índices de diversidad

Se pueden definir como una medida estadística obtenida a partir de la comparación entre dos variables que expresan la diversidad biológica de una determinada zona, de acuerdo a esto se pueden distinguir zonas de alta, media y baja diversidad. Sin embargo, no todos los índices son iguales, ya que dependiendo de su sensibilidad al tamaño muestral y de su capacidad discriminadora; existen índices que ponen énfasis en la dominancia mientras que otros enfatizan la abundancia de especies.

Dentro de los índices que enfatizan en la riqueza de especies se encuentran Margalef (4) y Menhinik (5), ambos relacionan el número de especies y el número total de individuos. Margalef posee alta sensibilidad al tamaño muestral y aumenta de forma logarítmica con N, mientras que Menhinick incrementa al aumentar el tamaño de la muestra (Magurran, 1988; Magurran & McGill, 2010; Yáñez, 2014)

$$(4) \quad D_{Mg} = S - 1 / \ln N$$

$$(5) \quad D_{Mn} = S / \sqrt{N}$$

S = número de especies en el sitio de interés, N = número total de individuos

Por otro lado, (6) Simpson y (7) McIntosh hacen énfasis en la dominancia de especies, ambos trabajan en base a la abundancia relativa. La capacidad discriminadora de Simpson es moderada y su sensibilidad muestral baja, toma valores entre 0,0 y 1,0, cantidades inferiores a 0,01 se consideran de baja diversidad, de 0,34 a 0,66 de mediana diversidad y

valores superiores de alta diversidad (Yáñez, 2014); McIntosh es influenciado significativamente por el tamaño muestral.

$$(6) \quad D = \sum p_i^2$$

$P_i$  = número de individuos de la especie  $i$  dividido entre el número total de individuos de la muestra (Moreno, 2013, p. 41)

$$(7) \quad U = \sqrt{\left(\sum n_i^2\right)}$$

$n_i$  = la abundancia original de  $i$ -ésima especie (Lexerod & Eid, 2006; Yáñez, 2014).

Shannon calcula la uniformidad y equitabilidad de especies, su expresión de cálculo es:  $H' = \sum p_i * \ln p_i$ , siendo  $p_i$  = proporción de individuos con los que una especie aporta al total de individuos del sistema, sus valores se encuentran entre 0,0 y 5,0, se consideran de baja diversidad valores de entre 0, 1 a 1,5, mediana diversidad los de 1,6 a 3,0 y de ser superior a tres sitios; de alta diversidad (Magurran, 1988; Yáñez, 2014).

## 2.12. Análisis estadísticos

La estadística aporta herramientas que permiten organizar, procesar, analizar e interpretar datos, elimina criterios subjetivos y valida los resultados obtenidos. En este contexto existen dos fuentes de información dentro del análisis estadístico: los datos que generan “ruido” pero son "imparciales", y los modelos que ayudan a reducir el “ruido” pero son responsables de "sesgos" (Gu, 2013).

Por este motivo la estadística aporta también criterios de información y penalización que evitan “sesgos” manteniendo la imparcialidad de los datos, la elección de estos criterios debe basarse en una combinación de tres parámetros: la proporción de varianza muestral, el conocimiento del problema por parte del investigador y la razonabilidad e interpretación teórica de los resultados obtenidos (Caballero, 2011)

### 2.12.1. Modelos lineales generalizados (GLM)

Corresponden a un tipo de regresión lineal donde la distribución aleatoria de la variable dependiente se relaciona con la parte no sistemática a través de una función de enlace (McCullagh & Nelder, 1989). Se utilizan en estudios donde no puede asumirse que la varianza es constante debido a dos propiedades importantes que poseen: la estructura de los errores y la función de vínculo (Cayuela, 2009). En base a la estructura de los errores pueden aplicarse distintas distribuciones, por ejemplo: binomiales, exponenciales, gamma, Poisson entre otras, el tipo de datos determinará cuál utilizar como se observa en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Funciones de vínculo más comunes utilizadas por los GLM

Función de vínculo	Fórmula	Uso
Identidad	$\mu$	Datos continuos con errores normales (regresión y ANOVA)
Logarítmica	$Log \mu$	Conteos con errores de tipo Poisson
Logit	$Log \left( \frac{\mu}{n - \mu} \right)$	Proporciones (datos entre 0 y 1) con errores binomiales
Recíproca	$\frac{1}{\mu}$	Datos continuos con errores gamma
Raíz cuadrada	$\sqrt{\mu}$	Conteos
Exponencial	$\mu^n$	Funciones de potencia

**Tomado de:** Cayuela, 2009

### 2.12.2. Criterio de información bayesiano (BIC)

Es un criterio de selección entre conjuntos finitos de modelos, fue desarrollado por Gideon Schwarz en 1978 por lo que es conocido también como criterio de Schwarz (SBC). Está basado en un criterio bayesiano que introduce términos de penalización para el número de parámetros dentro de un modelo, estos términos mejoran el ajuste, aumentan el soporte o disminuyan la desviación del modelo; conformando un criterio válido para muestras grandes (Caballero, 2011).

El número de parámetros en este criterio se penaliza con la función  $\ln n$  como se observa a continuación:

$$(8) \quad BIC(k) = -2\ln L[\hat{\theta}(k)] + \ln(n) \cdot k$$

$k$  = número de parámetros independientes estimados,  $L[\hat{\theta}(k)]$  = función de verosimilitud de las observaciones,  $\hat{\theta}(k)$  = estimación máxima verosímil del vector de parámetros,  $n$  = tamaño de la muestra (Caballero, 2011)

Un equivalente para calcular el valor individual para cada modelo es:

$$(9) \quad BIC(M_j) = -2\ln L_j(\hat{\theta}_j|X) + k_j \cdot \ln(n)$$

$M_j$  = modelo,  $\hat{\theta}_j$  = estimador máximo verosímil del parámetro  $\theta_j$ ,

$k_j$  = número de parámetros libres dentro del modelo,  $L_j(\hat{\theta}_j|X)$  = verosimilitud del modelo (Caballero, 2011)



Finalmente una forma más manejable de la ecuación de BIC es la siguiente:

$$(10) \quad BIC = x^2 + k \cdot \ln(n)$$

Los valores BIC permiten escoger el modelo con mejor ajuste, con mayores variables explicativas o ambas, se considera como óptimo aquel modelo para el cual el valor BIC es mínimo ya que resulta ser el más probable a posteriori (Schwarz, 1978).

### 2.12.3. Análisis de varianza (ANOVA)

Está basado en conceptos de regresión lineal y permite establecer si existen diferencias significativas entre tratamientos, compara las medias de la variable dependiente evaluando uno o más factores en diferentes niveles. En su forma más simple es un procedimiento general para aislar las fuentes de variabilidad en un conjunto de mediciones con el propósito de determinar hasta qué punto el efecto de una variable independiente es un componente principal (Girden, 1992), pero existen otros tipos de análisis de varianza descritos en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Tipos de análisis de varianza

<b>Tipo de análisis de varianza</b>	<b>Modelo y propiedades del diseño</b>
De un solo factor	Las observaciones por tratamiento pueden ser desbalanceadas con un factor fijo
Balanceado	Requiere ser balanceado pero pueden utilizarse cualquier número de factores aleatorios y fijos con factores anidados y cruzados
Modelo lineal generalizado	Permite diseños no balanceados y covariables

**Modificado de:** Minitab Inc., 2016

Dentro del análisis de varianza se considera un valor  $p$  que determina la significancia de las variables, si el valor  $p$  es menor que el nivel de significancia se puede concluir que al menos un tratamiento es diferente.

#### 2.12.4. Escalamiento multidimensional (MDS)

Es una técnica multivariante de interdependencia que busca representar datos a través de la construcción de una configuración de puntos cuando se conoce una determinada información sobre proximidades entre objetos (Linares, 2001). Su principal objetivo es transformar juicios de similitud sobre un conjunto de datos y representar espacialmente en un gráfico la distancia existente entre ellos. En la Tabla 7 se observan los diferentes tipos de escalamiento multidimensional existentes, en comparación con otras técnicas como el análisis conjunto, análisis discriminante o el análisis factorial; ayuda obtener el grado de similitud entre datos de forma independiente a los juicios de los investigadores.

**Tabla 7.** Tipos de escalamientos multidimensionales

<b>Tipo de escalamiento multidimensional</b>	<b>Propiedades del escalamiento</b>
Directo	Comparación directa entre objetos (objetos-objetos)
Derivado	Comparación indirecta entre objetos (objetos-atributos)
Clásico	Se trata toda la muestra a la vez
Replicado	Se trata toda la muestra de forma segmentada

**Modificado de:** Vila, 2013

### **CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

Se partió de 10 consorcios bacterianos aislados por Grupo de Investigación en Ciencias Ambientales (GRICAM) identificados con los códigos LPS01Cd2(1), LPS01Cd5(2)A, LPS01Cd3, LPS01Cd1, LPS01Cr2(2)A, LPS01Cr3(B), LPS01Cr2(1), LPS01Cd2(2), LPS01Cr1 y LPS01Cr1(1)B.

#### **3.1. Crecimiento bacteriano**

Se evaluó el crecimiento bacteriano en base a tres variables: temperatura de incubación, tiempo de incubación y medio de cultivo; cada una con tres repeticiones.

Para preparar el caldo de cultivo se diluyó extracto de levadura (4%), sacarosa (5%) y sulfato de amonio (1%) en agua destilada, para el medio Cetrimida se diluyó 45,3 g del polvo Cetrimida Agar Base por litro de agua destilada y para el medio PCA se diluyó 23,5 g del polvo Plate Count Agar (PCA) por litro de agua destilada.

Los medios se esterilizaron por 45 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión en un autoclave horizontal Tuttnauer 3870M Manual Autoclave, se dispensaron 250 mL de caldo de cultivo en matraces Erlenmeyer estériles, 25 mL de Cetrimida en cajas Petri estériles, y 15 mL de PCA en tubos de ensayo con tapa rosca estériles.

Se sembró las muestras y se incubó durante 2 días con un monitoreo del crecimiento bacteriano cada 24 horas, las muestras que presentaron bajo crecimiento al final del segundo día se incubaron por otras 24 horas.

Para cuantificar el crecimiento bacteriano se utilizó nefelometría y turbidimetría, se preparó estándares de McFarland de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1,175% (p/v) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1% (v/v) como se observa en la Tabla 8. Se realizó una regresión lineal a partir de las mediciones del turbidímetro para obtener una ecuación para transformar unidades de NTU a UFC.

**Tabla 8.** Concentraciones de reactivos para la preparación de estándares de McFarland

Escala de McFarland	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,048M) (mL)	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (0,36N) (mL)	Volumen final (mL)
1	0,1	9,9	10,0
2	0,2	9,8	10,0
3	0,3	9,7	10,0
4	0,4	9,6	10,0
5	0,5	9,5	10,0
6	0,6	9,4	10,0
7	0,7	9,3	10,0
8	0,8	9,2	10,0
9	0,9	9,1	10,0
10	1,0	9,0	10,0

Elaborado por las autoras

### 3.2. Ensayo de sensibilidad

Para determinar la sensibilidad bacteriana se utilizó el método de siembra directa en caldo de cultivo y en agar Cetrimida; a los que se añadió dos concentraciones diferentes de Cd y Cr (Tabla 9) establecidas en base a los límites de descarga para cuerpos de aguas registrados en el Decreto 068 del Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundario. La preparación de los medios se realizó como se describió anteriormente, los metales (Cd y Cr) fueron añadidos posterior a la esterilización a través de un filtro de 0,5 micras. Se incubó por 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  con un monitoreo del crecimiento bacteriano cada 24 horas.

**Tabla 9.** Concentraciones de Cd y Cr utilizadas para los ensayos de sensibilidad

<b>Metal</b>	<b>Límite de descarga para cuerpos de agua (Decreto 068)</b>	<b>Concentración 100 veces superior (100x)</b>	<b>Concentración 1000 veces superior (1000x)</b>
Cd	0,02 ppm	2 ppm	20 ppm
Cr	0,5 ppm	50 ppm	500 ppm

**Elaborado por las autoras**

### **3.3. Extracción de ADN bacteriano**

Se extrajo ADN de 5 consorcios bacterianos con códigos LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd2(2), LPS01Cd3 y LPS01Cd5(2)A utilizando un protocolo basado en la técnica desarrollada por Murray y Thompson con bromuro de hexadeciltrimetilamonio o CTAB (Murray y Thompson, 1980).

Se colocó 1,5 mL de caldo de cultivo en tubos de microcentrífuga estériles de 2 mL, se centrifugó a velocidad máxima por 40 segundos y se eliminó el caldo de cultivo, el sedimento resultante se resuspendió en 576  $\mu$ L de Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA 1mM) y se añadió 30  $\mu$ L de SDS 10% y 3  $\mu$ L de proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL, se mezcló y se incubó por 1 hora a 37°C en un termobloque. Se añadió 100  $\mu$ L de NaCl 5M y 80  $\mu$ L de CTAB/NaCl (calentado a 65°C), se mezcló y se incubó por 10 minutos a 65°C. Se añadió 800  $\mu$ L de Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1 y se invirtió el tubo varias veces por 2 minutos para formar una emulsión, se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos.

La emulsión se separó en dos fases dentro del tubo, se transfirió la fase superior a un nuevo tubo estéril evitando los contaminantes de la interfase, se añadió un volumen de 789 de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico 25:24:1, se mezcló por 2 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. De nuevo se transfirió la fase superior de la emulsión a un

nuevo tubo estéril, se añadió 0,6 volúmenes de isopropanol, se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos hasta la precipitación del ADN, se eliminó el isopropanol y se lavó con etanol 70%. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, se eliminó el etanol, se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en 50  $\mu$ L de Tris-EDTA, se añadió 1  $\mu$ L de solución ARNsa (10 mg/mL) y se incubó a 65°C por 15 minutos.

La confirmación de presencia de ADN se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa. Para la preparación del gel se diluyó 0,4 g de UltraPure™ Agarose en 75 mL de TBE 1X, preparado a partir de TBE 10X (108 g de Tris-HCl, 55g de Ácido bórico y 40mL de EDTA 0,5M pH 8; aforado a 1000 mL con agua ultrapura), y se añadió 10  $\mu$ L de SYBR® Safe ADN Gel Stain.

Para la preparación de las muestras se tomó 2  $\mu$ L de ADN al que se añadió 5  $\mu$ L de 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer y se mezcló. Se utilizó 8  $\mu$ L de marcador de peso molecular TrackIt™ 100bp ADN Ladder. Se colocó las muestras en el gel previamente preparado y se realizó la electroforesis a 80 V por 30 minutos. Para la visualización del gel se utilizó un fotodocumentador MicroBIS de DNR Bio-Imaging Systems junto con el programa informático GelCapture.

#### **3.4. Cuantificación, amplificación y secuenciación de ADN bacteriano**

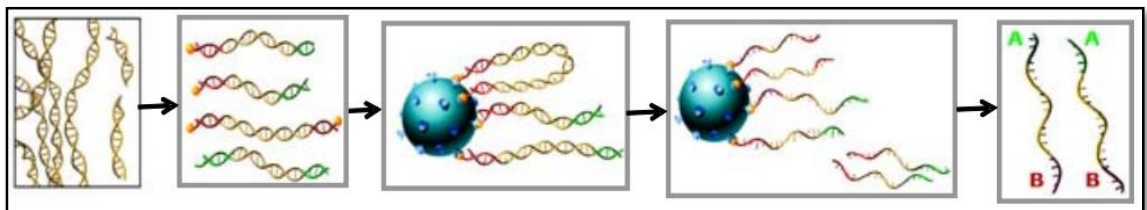
Los procesos de amplificación y secuenciación fueron realizados en MacroGen Korea (compañía biotecnológica especializada en genómica que realiza diferentes tipos de secuenciación), las muestras enviadas cumplieron con los estándares establecidos en el Anexo 1; tomados de la guía para presentación de muestras para secuenciación de genomas según MacroGen (2009).

Previo al envío de las muestras, se verificó la concentración de ADN bacteriano utilizando espectrofotometría de espectro total (220-750nm) en el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer, se cargó 1  $\mu$ L por muestra y la lectura se realizó a 260 y 280 nm (absorbancia), la concentración de ácidos nucleicos se obtuvo de la relación entre ambas absorbancias según lo establecido por Thermo Fischer Scientific Inc. (2008) en su manual de operación, posteriormente MacroGen cuantificó de nuevo la cantidad de ácidos nucleicos.

Las muestras seleccionadas para secuenciación se eligieron en base a los siguientes criterios: crecimiento bacteriano, respuesta a ensayos de sensibilidad y concentración de ácidos nucleicos después del proceso de extracción.

El equipo utilizado por MacroGen es un secuenciador Genome Sequencer FLX™ System cuyo funcionamiento se basa en tres etapas según 454 Life Sciences (2016). En la primera etapa se fragmenta el ADN bicatenario en secciones más pequeñas (aproximadamente 400 a 600 pb) y después se separa en hebras simples (hebras monocatenarias A y B) mediante adaptadores especiales, el conjunto de hebras monocatenarias de ADN forman bibliotecas como se observa en la Figura 2.

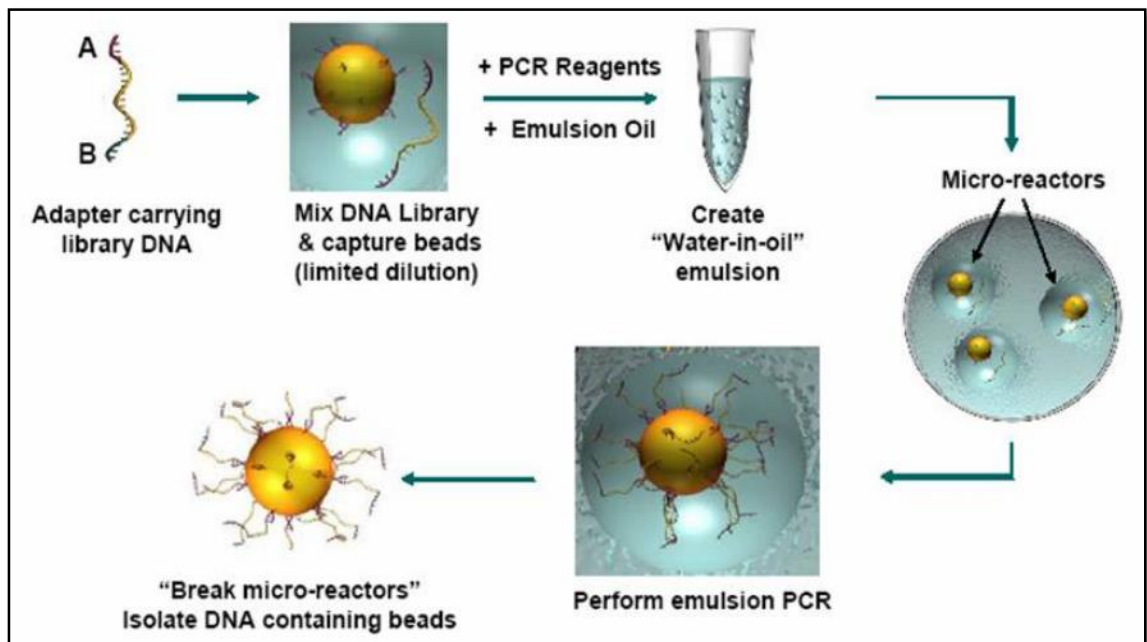
**Figura 2.** Separación de la doble cadena de ADN en hebras simples mediante adaptadores especiales para la formación de bibliotecas



Modificado de: 454 Life Sciences, 2016

En la segunda etapa se amplifican los fragmentos de ADN de las bibliotecas mediante emPCR (reacción en cadena de la polimerasa basada en emulsión), las cadenas se colocan en perlas de tamaño micrométrico junto con reactivos enzimáticos para PCR en una mezcla de agua, esta mezcla se inyecta en microtubos para centrifuga que contienen un aceite sintético, esta mezcla se somete a agitación ocasionando que el agua forme gotitas alrededor de las perlas (denominadas emulsión), los reactivos enzimáticos añadidos permiten que el fragmento de ADN aislado en cada gota sea amplificado en millones de copias de ADN. Cuando la reacción de PCR se completa, las perlas se tamizan del aceite y se limpian y aquellas cuentas que no tienen ADN son eliminadas como se observa en la Figura 3.

**Figura 3.** Amplificación de fragmentos de ADN mediante emPCR (reacción en cadena de la polimerasa basada en emulsión)

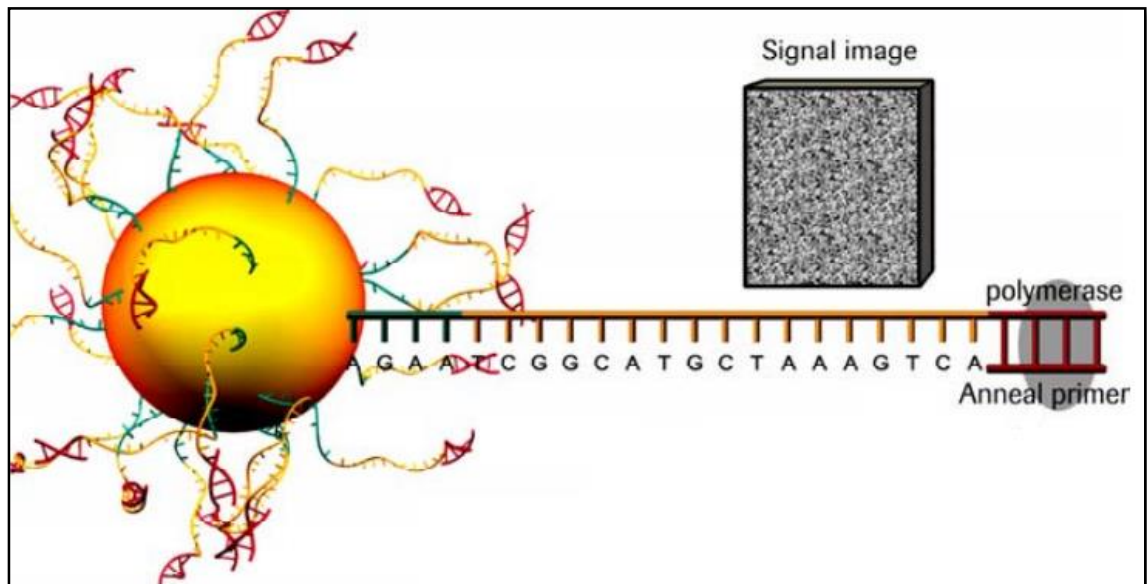


Fuente: 454 Life Sciences, 2016



Finalmente en la tercera etapa se utiliza un enfoque de secuenciación por síntesis donde las perlas de captura que contienen ADN fraccionado y amplificado se colocan junto con perlas enzimáticas en la placa PicoTiterPlate™, a esta placa se añaden diferentes reactivos incluyendo los nucleótidos A, C, G y T. Cuando estos nucleótidos se incorporan a las hebras de ADN se produce una reacción quimioluminiscente debido a la generación de productos químicos durante la incorporación de nucleótidos, esta reacción es detectada por una cámara CCD (recibe la luz entrante a través de una pieza rectangular de Silicio) como se observa en la Figura 4.

**Figura 4.** Secuenciación de ADN por síntesis con emisión quimioluminiscente detectada por una cámara CCD a través de una pieza de Silicio

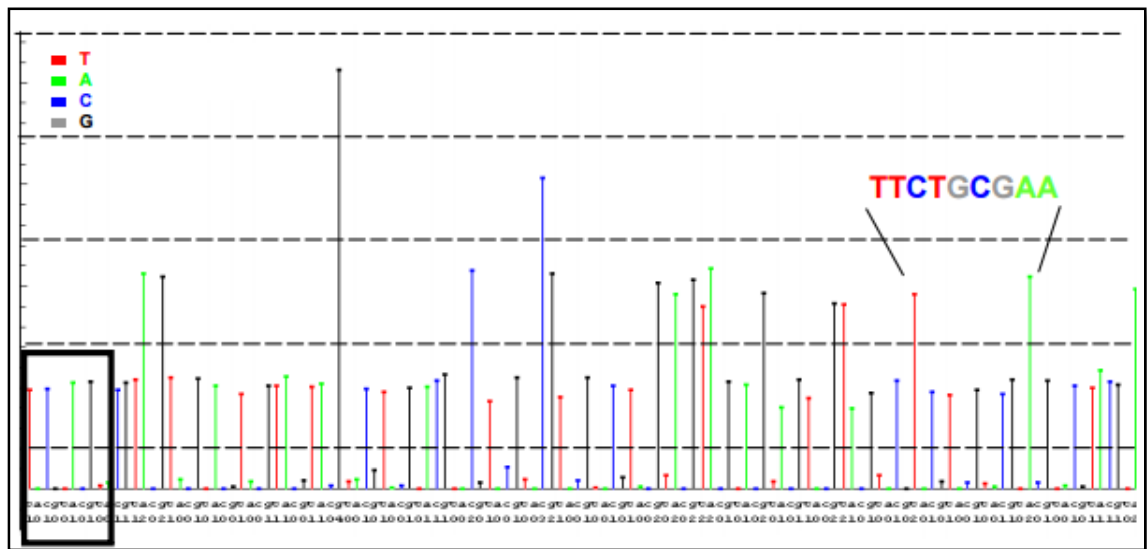


Modificado de: 454 Life Sciences, 2016

Esta señal quimioluminiscente es leída a continuación con el software Roche GS FLX software (v 3.0) generando un gráfico de barras de intensidades de luz llamado "flowgram" donde la intensidad de la señal es proporcional al número de nucleótidos

incorporados y la secuencia TCAG es utilizada al inicio para la calibración de la señal del equipo como se observa en la Figura 5.

**Figura 5.** Gráfico de barras de intensidades de luz “flowgram” (secuencia TCAG marcada al inicio para calibración del equipo)



Modificado de: 454 Life Sciences, 2016

### 3.5. Análisis e identificación bacteriana

El análisis de secuencias se realizó en World Fusion Bioinformatics USA (compañía biotecnológica especializada en análisis bioinformáticos) y la identificación bacteriana se efectuó mediante la utilización de los softwares BLAST (software basado en un algoritmo heurístico que compara la secuencia por identificar con millones de secuencias reportadas en bancos genéticos) y Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6.0.6 también conocido como MEGA 6.0.6.

Se seleccionó un fragmento altamente conservado del marcador 16s ARNr para la creación de una secuencia consenso en MEGA 6.0.6, se alinearon las secuencias presentes

en cada una de las muestras en base a la secuencia consenso y se corrió el software BLAST donde se cotejaron las secuencias de las muestras con las bibliotecas genéticas del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se consideró valores E (valores de significancia) iguales o mayores de 0,01 y porcentajes de similitud superiores al 95% para la asignación del taxón género y de 98% para el taxón especie.

### **3.6. Conservación de cepas bacteriana**

Se partió de suspensiones bacterianas con la concentración requerida según Leal & Ramírez (2005) de  $7,5 \times 10^8$  UFC/mL (Escala de Mc Farland 4), la viabilidad fue comprobada mediante siembra en caldo de cultivo e identificación microscópica, posteriormente en viales con glicerol al 10% se colocó 100  $\mu$ L por mL de medio de cultivo y finalmente se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Leal & Ramírez, 2005).

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Crecimiento bacteriano

Para determinar qué variable ejerció mayor influencia en el crecimiento bacteriano se midió la relación y significancia de las tres variables probadas, con los datos de crecimiento bacteriano reportados en el Anexo 2 se realizó una regresión lineal a través de la creación de modelos lineales generalizados (GLM) comparados entre sí mediante criterios de información bayesianos (BIC) utilizando una distribución de Poisson como función de enlace. El valor de 413,2275 registrado para el Modelo 2 en la Tabla 10 se seleccionó como el de mejor ajuste ya que su valor BIC es el menor entre los modelos representando mayores variables explicativas, mejor ajuste, o ambos (ver Pág. 25).

**Tabla 10.** Criterios de información bayesiana en base a tres modelos lineales generalizados en función del crecimiento bacteriano

Modelo	Variable dependiente	Variabales independientes	Grados de libertad	Valor BIC
Modelo 1	Crecimiento	Medio de cultivo	3	526,613
Modelo 2	Crecimiento	Medio de cultivo y tiempo de incubación	4	413,2275
Modelo 3	Crecimiento	Medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación	13	440,1233

**Elaborado por las autoras**

Se tomó como base las variables establecidas en el Modelo 2 para realizar un análisis de varianza (ANOVA) mediante una distribución de Poisson de donde estableció que las variables con mayor significancia y por ende que influyen directamente en el crecimiento bacteriano son el medio de cultivo (caldo de cultivo y agar Cetrimida principalmente) y el tiempo de incubación como se observa en la Figura 6.

**Figura 6.** Análisis de varianza (ANOVA) para el crecimiento bacteriano en función del medio de cultivo y el tiempo de incubación

```

Model: poisson, link: log

Response: Crecimiento

Terms added sequentially (first to last)

          Df Deviance Resid. Df Resid. Dev
NULL                178      254.46
Medio      2         8.14      176      246.32
Tiempo     1        118.59      175      127.73
    
```

```

Call:
glm(formula = Crecimiento ~ Medio + Tiempo, family = poisson,
     data = resultados)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.8720 -0.7499 -0.3342  0.2996  2.1551

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -3.098466   0.399689  -7.752 9.03e-15 ***
MedioCetrimida  0.359654   0.166997   2.154  0.0313 *
MedioPCA      -0.067823   0.184219  -0.368  0.7128
Tiempo         0.076236   0.008474   8.996 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

    Null deviance: 254.46  on 178  degrees of freedom
Residual deviance: 127.73  on 175  degrees of freedom
AIC: 400.48

Number of Fisher Scoring iterations: 5
    
```

Elaborado por las autoras

En base a los coeficientes 0; 0.001; 0.01; 1 obtenidos en el ANOVA (Figura 6) se realizaron 7 estimaciones combinando los coeficientes y sus diferentes niveles de

significancia. Se determinó que el valor 0,04215976 de la Estimación 3 (Tabla 11) justifica la influencia y el nivel de significancia reportado para el medio de cultivo y el tiempo de incubación, siendo el agar Cetrimida y una temperatura de 37°C las mejores condiciones para el crecimiento bacteriano. El criterio de selección entre las estimaciones fue el mismo que para el BIC (ver Pág. 25).

**Tabla 11.** Estimación entre los coeficientes obtenidos del análisis de varianza para el crecimiento bacteriano en función del medio de cultivo y el tiempo de incubación

<b>Estimación</b>	<b>Combinación de coeficientes utilizados</b>	<b>Valores de los coeficientes utilizados</b>	<b>Valor de la estimación</b>
Estimación 1	1	0	0,04511834
Estimación 2	1; 2	0; 0.001	0,06464709
Estimación 3	1; 3	0; 0.01	0,04215976
Estimación 4	1; 4	0; 1	0,04869248
Estimación 5	1; 2; 3	0; 0.001; 0.01	0,06040794
Estimación 6	1; 3; 4	0; 0.01; 1	0,04549953
Estimación 7	2; 3; 4	0.001; 0.01; 1	1,4444939

**Elaborado por las autoras**

#### **4.2. Sensibilidad bacteriana**

Se reportó el crecimiento con el signo “más” y la ausencia del crecimiento con el signo “menos“. A concentraciones 100 x en agar Cetrimida se observó mayor sensibilidad a 2 ppm de Cd en comparación a las 50 ppm de Cr (Tabla 12). Este ensayo no se realizó en agar Cetrimida a concentraciones 1000 x ya que el medio de cultivo presentó licuefacción después de añadir los estándares de los metales.

En el ensayo con caldo de cultivo se observó también mayor sensibilidad a concentraciones de 2 y 20 ppm de Cd en comparación a las 50 y 500 ppm de Cr (Tablas 13 y 14).

**Tabla 12.** Crecimiento bacteriano de las muestras sometidas a pruebas de sensibilidad en agar Cetrimida a concentración 100x de Cd y Cr

Código	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	Cd (2ppm)	Cr (50ppm)
LPS01Cd2(1)	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cd5(2)A	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cd3	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cd1	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cr2(2)A	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cr3(B)	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cr2(1)	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cd2(2)	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cr1	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cr1(1)B	72 horas	37°C	-	+

Elaborado por las autoras

**Tabla 13.** Crecimiento bacteriano de las muestras sometidas a pruebas de sensibilidad en caldo de cultivo a concentración 100x de Cd y Cr

Código	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	Cd (2ppm)	Cr (50ppm)
LPS01Cd2(1)	72 horas	37°C	-	-
LPS01Cd5(2)A	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cd3	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cd1	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cr2(2)A	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cr3(B)	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cr2(1)	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cd2(2)	72 horas	37°C	+	+
Cr(LPS01)3	72 horas	37°C	+	-
LPS01Cr1	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cr1(1)B	72 horas	37°C	-	-

Elaborado por las autoras

**Tabla 14.** Crecimiento bacteriano de las muestras sometidas a pruebas de sensibilidad en caldo de cultivo a concentración 1000x de Cd y Cr

Código	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	Cd (20ppm)	Cr (500ppm)
LPS01Cd2(1)	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cd5(2)A	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cd3	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cd1	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cr2(2)A	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cr3(B)	72 horas	37°C	+	+
LPS01Cr2(1)	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cd2(2)	72 horas	37°C	-	+
Cr(LPS01)3	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cr1	72 horas	37°C	-	+
LPS01Cr1(1)B	72 horas	37°C	-	+

Elaborado por las autoras

### 4.3. Cuantificación de ADN bacteriano

En la Tabla 15 se observa la cuantificación de ADN en función a la concentración en ng/uL, los valores reportados van desde 115, 83 ng/uL en la muestra menos concentrada; hasta 953,99 ng/uL en la muestra más concentrada, mientras que, en la Tabla 16 la cuantificación se realizó en función del total de bases de las secuencias; teniendo 3.595.997 bases la muestra menos concentrada y 5.645.855 la más concentrada.

**Tabla 15.** Concentraciones de ADN bacteriano por muestra realizada mediante espectrofotometría de espectro total

Código	Concentración (ng/uL)	A260	A280	260/280
LPS01Cd1	115,83	2,317	1,58	1,47
LPS01Cd2(1)	236,15	4,723	2,575	1,83
LPS01Cd2(2)	953,99	19,08	9,912	1,92
LPS01Cd3	177,58	3,552	2,082	1,71
LPS01Cd5(2)A	645,36	12,907	6,588	1,96

Elaborado por las autoras

**Tabla 16.** Concentración de ácidos nucleicos en función del total de bases por muestra

Código	Lecturas	Total bases	Longitud lectura
LPS01Cd1	11.626	3.595.997	309,31
LPS01Cd2(1)	16.691	4.479.312	268,37
LPS01Cd2(2)	14.017	3.941.625	281,2
LPS01Cd3	15.301	4.647.050	303,71
LPS01Cd5(2)A	15.530	5.645.855	363,55

Elaborado por las autoras

### 4.4. Identificación bacteriana

Dentro de las 5 muestras analizadas están presentes 11 géneros bacterianos: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Oceanospirillum*, *Gemmobacter*,



*Nesterenkonia*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Lysinibacillus* y *Cetobacterium*.

Considerando el número de secuencias de bacterias pertenecientes a un género específico (Tabla 17) se observa que el género *Pseudomonas* es el más abundante con 43.195 secuencias repartidas entre las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd2(2), LPS01Cd3 y LPS01Cd5(2)A, seguido por el género *Staphylococcus* con 17.730 secuencias repartidas entre las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1) y LPS01Cd5(2)A.

**Tabla 17.** Cantidad de secuencias de bacterias pertenecientes a un género específico presentes en las muestras secuenciadas

Código	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Gemmobacter</i>	<i>Nesterenkonia</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Cetobacterium</i>
LPS01Cd1	11.298	4	33	0	0	0	0	0	0	0	0
LPS01Cd2(1)	94	16.254	7	0	0	0	0	0	0	0	0
LPS01Cd2(2)	13.449	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LPS01Cd3	14.957	0	19	2	0	0	0	0	0	0	0
LPS01Cd5(2)A	3.397	1.472	2	0	2	1	1	1	1	1	1

Elaborado por las autoras

Los géneros restantes son menos abundantes ya que muestran una diferencia significativa en su número de secuencias a comparación de los dos géneros anteriores, por ejemplo, el género *Stenotrophomonas* cuenta con un total 61 secuencias repartidas entre las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd3 y LPS01Cd5(2)A, y, en los últimos lugares se observan los géneros *Oceanospirillum* (2 secuencias pertenecientes a la muestra LPS01Cd3), *Gemmobacter* (2 secuencias pertenecientes a la muestra LPS01Cd5(2)A) y

*Nesterenkonia*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Lysinibacillus* y *Cetobacterium* pertenecientes a la muestra LPS01Cd5(2)A con 1 secuencia cada uno.

Se evaluó la diversidad de géneros bacterianos mediante la aplicación de índices de diversidad (Tabla 18), dando como resultado “baja diversidad” según los índices de Simpson y Shannon para las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd2(2), LPS01Cd3 y LPS01Cd5(2)A, resultado similar al obtenido mediante los índices de Margalef, Menhinik y McIntosh para las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd2(2) y LPS01Cd3, siendo la excepción la muestra LPS01Cd5(2) que puede ser catalogada como de “alta diversidad” al ser la única muestra donde se reporta la existencia de los 11 géneros bacterianos identificados como se observa en la Figura 7.

**Tabla 18.** Valores de los índices de diversidad para los géneros bacterianos presentes en las muestras secuenciadas

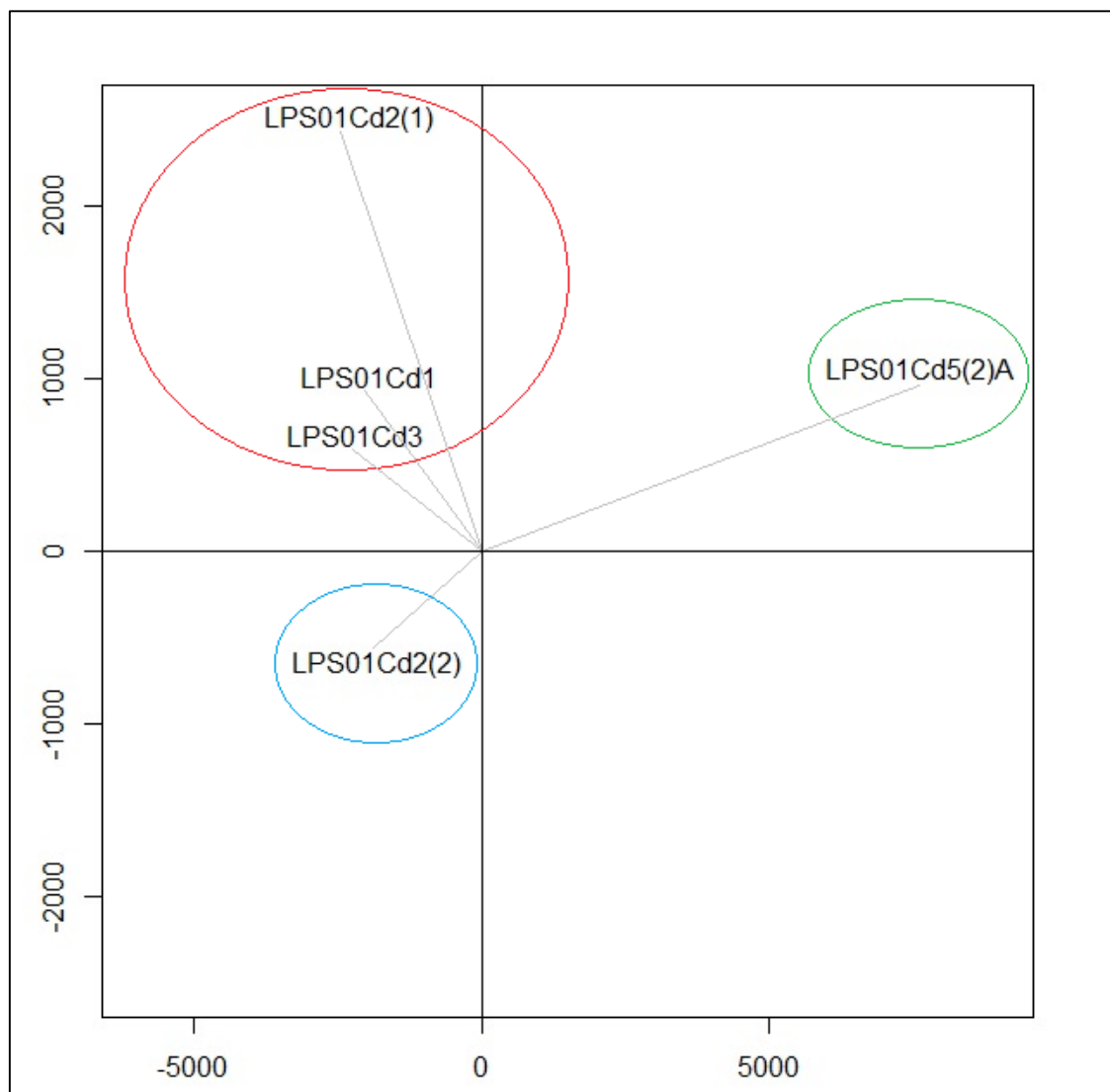
Código	Índice de Simpson	Índice de Shannon	Índice de Margalef	Índice de Menhinik	Índice de McIntosh
LPS01Cd1	0,0065	0,0231	0,2142	0,0282	11298,0493
LPS01Cd2(1)	0,0123	0,0391	0,2061	0,0235	16254,2736
LPS01Cd2(2)	0	0	0	0,0086	13449,0000
LPS01Cd3	0,0028	0,0111	0,2080	0,0245	14957,0125
LPS01Cd5(2)A	0,4242	0,6304	1,0597	0,1432	3702,2300

Elaborado por las autoras

Para evaluar la similitud entre muestras se utilizó un escalamiento multidimensional (MDS) donde se representó en un espacio geométrico las proximidades existentes entre muestras, como se observa en la Figura 6 existen 3 grupos bien definidos basados en la distancia geométrica desde el origen, en el primer grupo se encuentran LPS01Cd1, LPS01Cd3 y LPS01Cd2(1) en el cuadrante izquierdo superior, en el segundo grupo LPS01Cd2(2) en el cuadrante izquierdo inferior y en el tercer grupo LPS01Cd5(2)A en el cuadrante derecho superior. La distancia geométrica entre muestras refleja su grado de

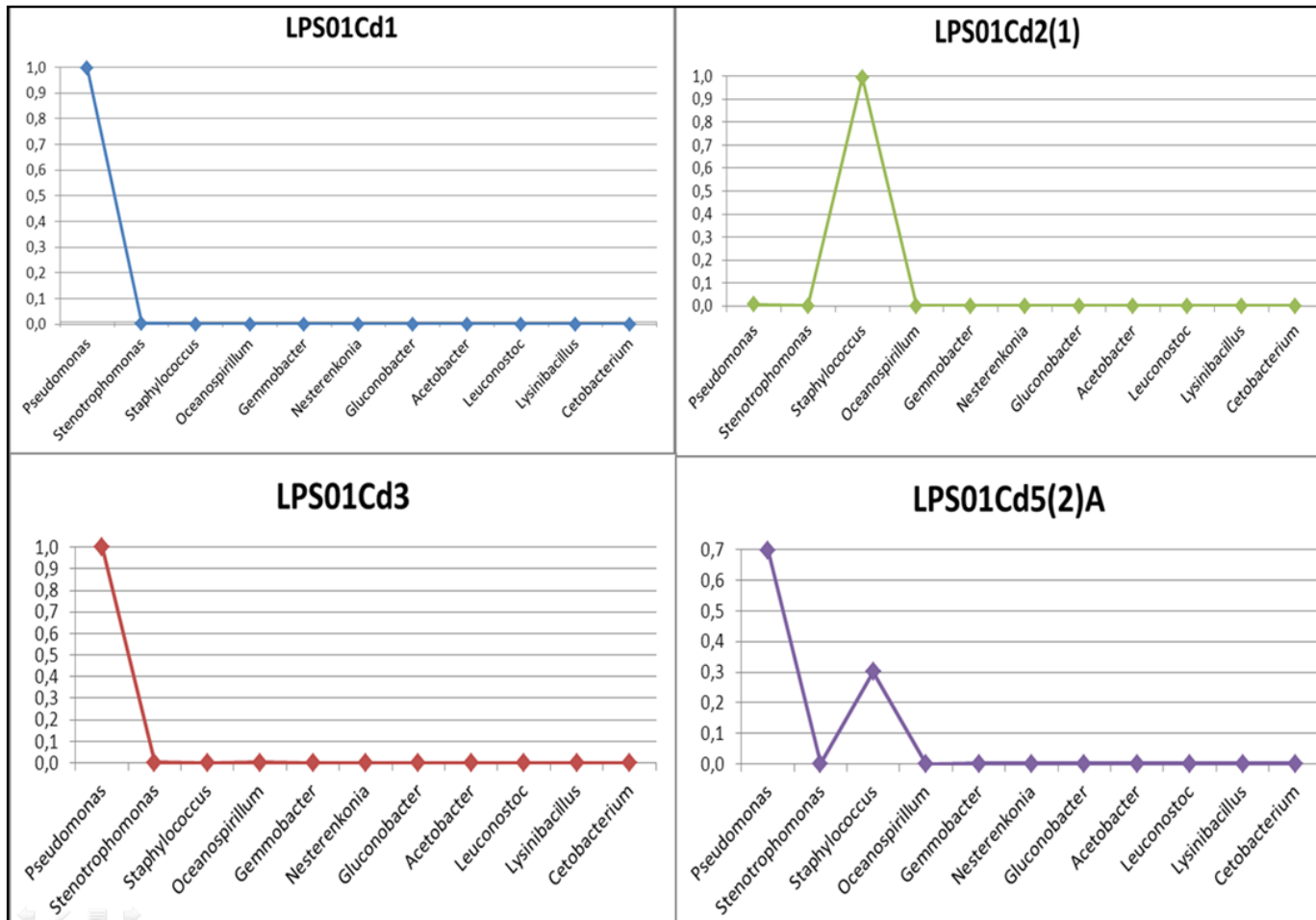
similitud; a mayor cercanía mayor similitud, en base a este criterio se observa que las muestras con mayor grado de similitud son LPS01Cd1 y LPS01Cd3, mientras que LPS01Cd5(2)A al ser más distante guarda mayor diferencia en relación a las muestras restantes (Figura 3).

**Figura 7.** Escalamiento multidimensional (MDS) representando la similitud entre las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd2(2), LPS01Cd3 y LPS01Cd5(2)A en un espacio geométrico en base a las distancias entre muestras



Elaborado por las autoras

**Figura 8.** Abundancia relativa de géneros bacterianos presentes en las muestras LPS01Cd1, LPS01Cd2(1), LPS01Cd3 y LPS01Cd5(2)A



Elaborado por las autoras

#### 4.5. Discusión

El aislamiento y cultivo de consorcios bacterianos dentro del laboratorio representa un gran reto, según Stewart (2012) las bacterias que se pueden cultivar en el laboratorio representan una pequeña fracción de la diversidad existente en la naturaleza y las especies no cultivadas que no crecen en los medios estándares juegan papeles críticos en el ciclo de carbono, nitrógeno y otros elementos.

En el presente trabajo se evaluó el crecimiento de consorcios bacterianos (aislados a partir de muestras de agua) en base al medio cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación. Los datos obtenidos en las diferentes repeticiones presentaron un alto grado de homogeneidad por lo que previo a realizar el análisis de varianza fue necesario crear modelos lineales generalizados (McCullagh & Nelder, 1989) relacionando la variable dependiente “Y” (crecimiento bacteriano) con las variables independientes “X” (medio cultivo, temperatura y tiempo de incubación). El resultado de estos modelos lineales permitió medir el nivel de interacción entre variables dependientes y de esta forma determinar qué interacción ejerce mayor significancia en el crecimiento bacteriano. Para la selección entre un grupo de modelos se requiere aplicar criterios de información que penalicen el número de parámetros en los modelos evitando así un sobreajuste como lo expresa Caballero (2011), en vista de esto se eligió un criterio de información bayesiano ya que su término de penalización es mayor que en otros criterios como el de Akaike (Schwarz, 1978), así, el modelo donde se relaciona el medio de cultivo y el tiempo de incubación es el que representa mayor nivel de interacción y que por ende explica mejor el comportamiento del crecimiento bacteriano.

Una vez seleccionado el modelo; este se sometió a un ANOVA para medir la influencia de las variables explicativas en la varianza y determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos como sugiere (Girden, 1992), sin embargo, este análisis tiene ciertas limitantes cuando los datos presentan un alto grado de homogeneidad, por lo que fue necesario añadir un criterio estadístico y probabilístico mediante la distribución de Poisson (Navarro et al., 2001), de esta manera la regresión lineal obtenida mostró que las diferencias significativas del caldo de cultivo, el medio Cetrimida y el tiempo de incubación explican el comportamiento del crecimiento.

Desde un punto de vista microbiológico, la diferencia de crecimiento entre los medios de cultivo pudo deberse a que estos consorcios no requieren de una fuente de carbono en el medio; pero sí requieren de nitrógeno, esto explicaría el escaso crecimiento en medio PCA (pese a tener una fuente de carbono de fácil acceso para los microorganismos) en comparación con el caldo de cultivo preparado a base de sulfato de amonio; y agar Cetrimida compuesto de bromuro de cetil trimetil amonio (tipo de amonio cuaternario). Estudios similares como el realizado por Martínez et al. (2010), mostraron buenos resultados cultivando bacterias resistentes a metales pesados (incluidos Cd y Cr) de los géneros *Pseudomonas* y *Staphylococcus* en medio Cetrimida.

Estos consorcios bacterianos no solo mostraron resistencia a Cd y Cr, sino también resistencia a antibióticos al crecer en un medio cuyo componente principal (bromuro de cetil trimetil amonio) tiene propiedades antibacterianas, un estudio realizado por Ji et al., (2012) evidencia la correlación entre los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) y la presencia de metales pesados en el medio, ya que estos últimos ejercen una fuerte presión de selección y actúan como factores complementarios para la abundancia de (ARGs).

La resistencia bacteriana está codificada por adaptaciones metabólicas y enzimáticas que les permiten sobrevivir en medios con altas concentraciones de metales pesados, dentro de los géneros identificados que poseen estas cualidades los más abundantes son *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, estudios similares como los realizados por (Cheng, 2003; Filali et al., 2000; Rajasekar & Mohankumar, 2016; Singh, Ramteke, & Shukla, 2013; Ugur & Ceylan, 2003) identificaron especies bacterianas resistentes a metales pesados correspondientes a estos géneros.

De los 10 consorcios aislados de las aguas contaminadas de la zona de Papallacta, 5 consorcios presentaron resistencia a Cd y Cr, se realizó la caracterización morfológica y se determinó que el 79,84% son bacilos Gram negativos en correspondencia con estudios similares realizados en la misma zona por Carrasco Cabrera (2007) que obtuvo 100% de bacilos Gram negativos, asimismo Valderrama & Téllez (2000) sostienen que zonas contaminadas con hidrocarburos son colonizadas en su mayoría por esta clase de bacterias. La identificación molecular basada en la secuenciación de las regiones conservadas del marcador 16s ARNr dio como resultado la presencia de *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Oceanospirillum*, *Gemmobacter*, *Nesterenkonia*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Lysinibacillus*, *Cetobacterium*. En un estudio similar realizado en un río contaminado de Cuba se aislaron bacterias del género *Pseudomonas*, *Stenotrophomas* y *Staphylococcus* resistentes a Cd, Cr y Pb, el 96% de estas cepas resultaron multiresistentes (Martínez et al., 2010).

En los ensayos de sensibilidad a concentraciones 100x y 1000x para ambos metales se obtuvo un crecimiento de 86%, las bacterias aisladas en el estudio de Martínez et al. (2010) tuvieron un crecimiento de 100% en Cr con concentraciones de 0,5, 1,0 y 1,5

mM.L<sup>-1</sup>, mientras que en medios con Cd con concentraciones de 0,5, 1,0 y 1, 5mM presentaron un crecimiento de 66%. Esta resistencia puede estar mediada por plásmidos; ya que proveen a las bacterias la capacidad de tolerar concentraciones de metales elevadas y presentan una gran ventaja ya que pueden transmitirse a otras bacterias gracias a la trasmisión horizontal de genes, varios estudios afirman que la transferencia de plásmidos aumenta a la par de la concentración de metales pesados como lo afirma (Marrero et al., 2010).

Los índices de diversidad de Simpson, McIntosh, Margalef, Menhinick y Shannon arrojaron resultados por debajo de los valores típicos considerados como diversos, esto se explica según la hipótesis de Valderrama & Téllez (2010) que existe menor diversidad de microorganismos ya que solamente aquellos que posean la estructura necesaria para utilizar compuestos tóxicos sobrevivirán, la complejidad de los compuestos existentes y tiempo durante el cual han estado expuestos los microorganismos. Según el Ministerio de Ambiente (2015) el agua de la zona de Papallacta posee una concentración de oxígeno disuelto de 7,88 mg/L considerada ligeramente reducida, este factor puede ser una limitante en la diversidad bacteriana ya que este es un gas del que dependen la mayoría de microorganismos.

Un análisis estadístico comparativo entre índices mostró las similitudes existentes entre muestras, el criterio aplicado fue un escalamiento multidimensional ya que supone una ventaja importante al arrojar resultados ajenos a los juicios de los investigadores mediante una representación espacial que evalúa la similitud por sobre distractores superficiales (Agarwal & Phillips, 2010), como resultado se observó cuán similares son entre si las muestras LPS01Cd1 y LPS01Cd3, aunque un poco más alejadas se encuentran las



muestras LPS01Cd2(1) y LPS01Cd2(2) y completamente aislada en un cuadrante diferente del espacio geométrico la muestra LPS01Cd5(2)A. Al observar la presencia/ausencia de géneros bacterianos en las muestras se entiende mejor estas similitudes, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas* aunque en diferentes cantidades; están presentes en las muestras LPS01Cd1 y LPS01Cd3, por otro lado hay mayor diversidad bacteriana (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Oceanospirillum*, *Gemmobacter*, *Nesterenkonia*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Lysinibacillus*, *Cetobacterium*) en LPS01Cd5(2)A haciéndola diferente y aislándola de las demás muestras.

En el campo de la biorremediación los consorcios bacterianos (conformados por bacterias de diferentes géneros como en el caso del presente estudio) brindan numerosas ventajas en comparación con cepas puras, según Salazar & Sánchez (2011) en un mismo consorcio es posible hallar diversas funciones y habilidades metabólicas debido a la variedad de microorganismos allí presentes, esto les permite soportar medios fluctuantes y realizar funciones complicadas que no pueden desarrollar de forma individual. Como indican Brune & Bayer (2012) las vías de señalización celular y de comunicación entre especies bacterianas probablemente sean procesos clave para diseñar funciones en consorcios sintéticos y naturales, por este motivo es necesario realizar estudios posteriores que ayuden a entender mejor la interacción entre los géneros que conforman los consorcios motivo de estudio del presente trabajo.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- Se identificaron bacterias nativas resistentes a Cd y Cr de la zona de Papallacta cantón Quijos provincia de Napo pertenecientes a los géneros: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Oceanospirillum*, *Gemmobacter*, *Nesterenkonia*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Lysinibacillus*.
- Para el cultivo de estos consorcios bacterianos se obtuvo mayor crecimiento al utilizar medios de cultivo con una fuente de nitrógeno (caldo en base a sulfato de amonio y medio Cetrimida), e incubar las muestras a 37°C durante 48 horas.
- Los consorcios bacterianos muestran mayor sensibilidad a Cd aún a concentraciones bajas de 2ppm, en contraste con la resistencia que presentan a concentraciones de hasta 500 ppm de Cr.
- El protocolo de extracción de ADN basado en la utilización de CTAB demostró ser eficaz ya que las concentraciones y pureza de ácidos nucleicos obtenidas cumplieron con los estándares requeridos para la amplificación y posterior secuenciación.
- El marcador ARNr 16s es extremadamente útil en la identificación bacteriana ya que al ser altamente conservado permite un alineamiento de secuencias confiable manejando valores de significancia iguales o superiores a 0,01 y de similitud de 95% para asignar el taxón “Género” a las bacterias presentes en los consorcios bacterianos secuenciados.

## BIBLIOGRAFÍA

- 454 Life Sciences. (2016). *How is genome sequencing done. Genome.*
- Ackerley, D., Gonzalez, C., Park, C., Blake, R., Keyhan, M., & Matin, A. (2004). Chromate-Reducing Properties of Soluble Flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 873–882.  
<http://doi.org/10.1128/AEM.70.2.873-882.2004>
- Agarwal, A., & Phillips, J. M. (2010). Universal Multi-Dimensional Scaling. *International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, 1149–1158.  
<http://doi.org/10.1145/1835804.1835948>
- Amoroso, M., Schubert, D., Mitscherlich, P., Schumann, P., & Kothe, E. (2000). Evidence for high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces spec.* *Journal of Basic Microbiology*, 40(5–6), 295–301.  
[http://doi.org/10.1002/1521-4028\(200012\)40:5/6<295::AID-JOBM295>3.0.CO;2-Z](http://doi.org/10.1002/1521-4028(200012)40:5/6<295::AID-JOBM295>3.0.CO;2-Z)
- Arroyo, S., Ortiz, B., Enrique, L., & Vicentina, C. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicológica Argentina*, 21, 33–49.
- Baird, C. (2001). Metales pesados: cadmio. In Reverte (Ed.), *Química ambiental* (Ilustrada, p. 648).
- Banks, R. B., & Cooke, R. T. (1986). Chromate reduction by rabbit liver aldehyde oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 137(1), 8–14.
- Belyaeva, E. A., Dymkowska, D., Wieckowski, M. R., & Wojtczak, L. (2008). Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(1), 34–42.

<http://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.017>

Belyaeva, E. A., Glazunov, V. V., & Korotkov, S. M. (2004). Cd<sup>2+</sup> versus Ca<sup>2+</sup>-

produced mitochondrial membrane permeabilization: a proposed direct

participation of respiratory complexes I and III. *Chemico-Biological Interactions*,

150(3), 253–70. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.019>

Beyersmann, D., & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: Recent insight

into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*.

<http://doi.org/10.1007/s00204-008-0313-y>

Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1981). Ion Transport in yeast. *Biochimica et Biophysica*

*Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 650(2–3), 88–127.

[http://doi.org/10.1016/0304-4157\(81\)90002-2](http://doi.org/10.1016/0304-4157(81)90002-2)

Brenner, K., You, L., & Arnold, F. (2008). Engineering microbial consortia: a new

frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 483–489.

<http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>

Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport

of toxic metals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, 274–308.

<http://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007>

Caballero D., F. F. (2011). *Selección de modelos mediante criterios de información en*

*análisis factorial. Aspectos teóricos y computacionales. Tesis doctoral.*

Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa

microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131–143. Retrieved

from <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi003f.pdf>

Carrasco Cabrera, D. G. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad

degradadora de hidrocarburos, comprobando su actividad enzimática.

- Cayuela, L. (2009). Modelos lineales generalizados (GLM). *Tutorial R*, 1–31.
- Cervantes, C. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 335–347. [http://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00057-2](http://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00057-2)
- Cervantes, C., Campos, J., Devarsb, S., Gutiérrez, F., Loza, H., Torres, J. C., & Moreno, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 335–347. [http://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00057-2](http://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00057-2)
- Cervantes, C., & Campos-García, J. (2007). Molecular Microbiology of Heavy Metals. In D. H. Nies & S. Silver (Eds.) (pp. 407–419). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [http://doi.org/10.1007/7171\\_2006\\_087](http://doi.org/10.1007/7171_2006_087)
- Cheng, S. (2003). Effects of Heavy Metals on Plants and Resistance Mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(4), 256–264. <http://doi.org/10.1065/espr2002.11.141.2>
- Cheung, K. H., & Gu, J.-D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(1), 8–15. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.05.002>
- Codd, R., Dillon, C. T., Levina, A., & Lay, P. A. (2001). Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell. *Coordination Chemistry Reviews*, 216–217, 537–582. [http://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)00408-2](http://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00408-2)
- Das, N., Vimala, R., & Karthika, P. (2008). Biosorption of heavy metals - An overview. *Indian Journal of Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.is.2009.02.003>
- Domènech, X., & Peral, J. (2006). Caracterización redox de sistemas terrestres. In

*Química ambiental de sistemas terrestres* (Editorial R, p. 109). Barcelona.

- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 529–39. <http://doi.org/10.2174/1568026013394831>
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología*. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por metales. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(SUPPL. 1), 141–153. <http://doi.org/10.4321/S1137-66272003000200008>
- Filali, B. K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F. Z., Talbi, M., & Blaghen, M. (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Current Microbiology*, 41(3), 151–156. <http://doi.org/10.1007/s0028400>
- Flores, Julio; López-Moreno, Sergio, Albert, L. (1995). La contaminación y sus efectos en la salud y el ambiente (pp. 227–246).
- Gallego, J., & Sánchez, J. (2003). Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige. *Industria Y Minería*, 351, 17–21. Retrieved from [http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/aspectos\\_tecnologicos\\_biorremediacion.pdf](http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/aspectos_tecnologicos_biorremediacion.pdf)
- Girden, E. R. (1992a). ANOVA: Repeated Measures. *Technometrics*, 35(4), 77. <http://doi.org/10.2307/1270301>
- Girden, E. R. (1992b). ANOVA: Repeated Measures. *Technometrics*, 35(4), 77. <http://doi.org/10.2307/1270301>

- Gonzalez, C. F., Aekerley, D. F., Lynch, S. V., & Matin, A. (2005). ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22590–22595.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M501654200>
- Gu, C. (2013). *Smoothing Spline ANOVA Models*. book, Springer New York.
- Gutiérrez, J. F., Espino, A. ., Coreño, A., Acevedo, F. ., G, R., & Fernández, F. . (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Y Algal*, 1, 47–63.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). (2006). Fichas Internacionales de Seguridad Química: Cadmio, 4–6.
- Koolman, J., & Klaus-Heinrich, R. (2005). Reacciones químicas: Fundamentos. In *Bioquímica: texto y atlas* (Ed. Médica, p. 32). Alemania.
- Leal, L. C. S., & Ramírez, L. C. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*, 3(4), 21–29.  
[http://doi.org/ISSN: 1794-2470](http://doi.org/ISSN:1794-2470)
- Lexerod, N. L., & Eid, T. (2006). An evaluation of different diameter diversity indices based on criteria related to forest management planning. *Forest Ecology and Management*, 222(1–3), 17–28. <http://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.10.046>
- Linares, G. (2001). Escalamiento Multidimensional : Conceptos Y Enfoques. *Revista Investigación Operacional*, 22(2), 173–183.
- Liu, K. J., & Shi, X. (2001). In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222(Vi), 41–47.  
<http://doi.org/10.1023/A:1017994720562>
- Liu, T., He, W., Yan, C., Qi, Y., & Zhang, Y. (2011). Roles of reactive oxygen species

- and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells. *Toxicology and Industrial Health*, 27(3), 249–256. <http://doi.org/10.1177/0748233710386408>
- Llosa, M., & de la Cruz, F. (2005). Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Research in Microbiology*, 156(1), 1–6.  
<http://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.07.008>
- López, J., & Modrego, A. (1994). Contaminación por metales pesados. In Editorial CSIC - CSIC Press (Ed.), *La Biotecnología y su aplicación industrial en España* (Ilustrada, p. 269). Madrid: Editorial CSIC.
- Macrogen. (2009). *Guía para la presentación de muestras para secuenciación de genomas a través del servicio de secuenciación de genomas individuales de Macrogen*.
- Magurran, A. (1988). Diversity indices and species abundance models. In *Ecological Diversity and Its Measurement* (Springer-S, p. 179). Croom Helm Ltd.  
<http://doi.org/10.1007/978-94-015-7358-0>
- Magurran, A. E., & McGill, B. J. (2010). Measurement of species diversity. In A. E. Magurran & B. J. McGill (Eds.), *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment* (ilustrada, p. 56).
- Manahan, S. E. (2006). Metales pesados. In Reverté S.A (Ed.), *Introducción a la química ambiental* (p. 760). España.
- Mao, W. P., Zhang, N. N., Zhou, F. Y., Li, W. X., Liu, H. Y., Feng, J., ... He, Z. J. (2011). Cadmium directly induced mitochondrial dysfunction of human embryonic kidney cells. *Hum Exp Toxicol*, 30(8), 920–929.  
<http://doi.org/10.1177/0960327110384286>
- Marín, R. (2003). Dinámica fisicoquímica de aguas: potencial redox. In *Fisicoquímica y*



*microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas*  
(Ediciones, p. 18 y 19). Madrid.

Marrero, J., Díaz, A., & Coto, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. (Spanish). *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, 41(1), 67–78. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=53990538&lang=es&site=ehost-live>

Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. (Spanish). *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, 41(1), 67–78.

Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M. E., Salgado, I., Olivares, S., ... Rodríguez, D. (2010a). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares Antibiotic and metals resistance in bacteria isolates from Almendares river . Facultad de Biología , Universidad de la Habana . Calle 25 # 455 entre J e I , Vedado , L. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1–10. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509038.pdf>

Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M. E., Salgado, I., Olivares, S., ... Rodríguez, L. (2010b). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares Antibiotic and metals resistance in bacteria isolates from Almendares river. *CENIC*, 41, 1–10.

Martínez, K., Souza, V., Bucio, L., Gómez, L., & Gutiérrez, M. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicológica Argentina*, 21, 33–49. Retrieved from [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-)

37432013000100004

- McCullagh, P., & Nelder, J. A. (1989a). *Generalized linear models. Monographs on Statistics and Applied Probability.*
- McCullagh, P., & Nelder, J. A. (1989b). Generalized linear models, no. 37. In *Monograph on Statistics and Applied Probability.*
- Mergeay, M. (1991). Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends in Biotechnology*, 9(1), 17–24. [http://doi.org/10.1016/0167-7799\(91\)90007-5](http://doi.org/10.1016/0167-7799(91)90007-5)
- Mikalsen, A., Alexander, J., Wallin, H., Ingelman-Sundberg, M., & Andersen, R. A. (1991). Reductive metabolism and protein binding of chromium(VI) by P450 protein enzymes. *Carcinogenesis*, 12(5), 825–31. <http://doi.org/10.1093/carcin/12.5.825>
- Ministerio de Ambiente. (2015). Papallacta. Retrieved from <http://suia.ambiente.gob.ec/web/humedales/papallacta>
- Ministerio del Ambiente de Ecuador. (2006). Información de Plomo y cadmio, 22. Retrieved from [http://www.chem.unep.ch/Pb\\_and\\_Cd/SR/Files/Submission GOV/Submis\\_GOV\\_ECUADOR.pdf](http://www.chem.unep.ch/Pb_and_Cd/SR/Files/Submission_GOV/Submis_GOV_ECUADOR.pdf).
- Morel, M. A., Ubalde, M. C., Olivera-Bravo, S., Callejas, C., Gill, P. R., & Castro-Sowinski, S. (2009). Cellular and biochemical response to Cr(VI) in *Stenotrophomonas* sp.: Research Letter. *FEMS Microbiology Letters*, 291(2), 162–168. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01444.x>
- Moreno, C. (2013). Métodos para medir la biodiversidad. *M&T–Manuales Y Tesis SEA*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight

plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4326.

<http://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>

- Navarro, a, Utzet, F., Puig, P., Caminal, J., & Martin, M. (2001). La distribución binomial negativa frente a la de Poisson en el análisis de fenómenos recurrentes. *Gaceta Sanitaria*, 15(5), 447–452. [http://doi.org/10.1016/S0213-9111\(01\)71599-3](http://doi.org/10.1016/S0213-9111(01)71599-3)
- Nies, D. H., & Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 186–199. <http://doi.org/10.1007/BF01569902>
- Ochoa, D., & Montoya, A. (2010). CONSORCIOS MICROBIANOS: UNA METÁFORA BIOLÓGICA APLICADA A LA ASOCIATIVIDAD EMPRESARIAL EN CADENAS PRODUCTIVAS AGROPECUARIAS. *Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación Y Reflexión*, 18(2), 55–74. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-68052010000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-68052010000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Rabenstein, Dallas; Isab, A; Kadima, W; Mohanakrishnan, P. (1983). A proton nuclear magnetic resonance study of the interaction of cadmium with human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 531–541. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Rajasekar, S., & Mohankumar, A. (2016). Antibiotic susceptibility and plasmid profile of heavy metal resistant *Pseudomonas* species, 9(2), 211–215.
- Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de La Facultad de Medicina*, 63(1), 51–64. <http://doi.org/1025 - 5583>
- Ramírez, L. (2015). Magnetite (Fe<sub>3</sub> O<sub>4</sub> ) nanoparticles: Are they really safe? *La Granja*, 21(1), 77–83. <http://doi.org/10.17163/lgr.n21.2015.07>

- Ramírez, M., Díaz, C., Vargas, E., Riveros, H., Campos, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals*, 21(3), 321–332. <http://doi.org/10.1007/s10534-007-9121-8>
- Reyes, M., Alvarado, I., Antuna, D., García, A., González, L., & Vázquez, E. (2007). Metales Pesados : Importancia Y Análisis, 1–3. Retrieved from [http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8815/ANÁLISIS DE ARSÉNICO Y METALES PESADOS EN E L AGUA 2.pdf?sequence=1](http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8815/ANÁLISIS%20DE%20ARSÉNICO%20Y%20METALES%20PESADOS%20EN%20EL%20AGUA%202.pdf?sequence=1)
- Rouch, D. a, Lee, B. T., & Morby, a P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 132–141. <http://doi.org/10.1007/BF01569895>
- Rozo, C., & Dussán, J. (2010). Análisis de transferencia horizontal de genes en ensayos de biorremediación con grasas recalcitrantes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 22–31. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=54490595&lang=es&site=ehost-live>
- Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., & Sens, D. A. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental Health Perspectives*. <http://doi.org/10.1289/ehp.0901234>
- Schwarz, G. (1978a). Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6(2), 461–464. <http://doi.org/10.1214/aos/1176344136>
- Schwarz, G. (1978b). Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6(2), 461–464. <http://doi.org/10.1214/aos/1176344136>
- Singh, Y., Ramteke, P. W., & Shukla, P. K. (2013). Isolation and characterization of heavy metal Resistant *Pseudomonas* spp . and their plant growth promoting

- activities. *Advances in Applied Science Research*, 4(1), 269–272.
- Soto, C., Gutiérrez, S., Rey León, A., & González Rojas, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Nova*, 195–205.
- Sueiro, F. (2012). *Caracterización de la resistencia a metales pesados y búsqueda de integrones en cepas de Delftia sp.*
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (Vol. 101, pp. 133–164). [http://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](http://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6)
- Thermo Fischer Scientific Inc. (2008). NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3. 7 User's Manual. *Thermo Fisher Scientific*, 5-1-4.
- Ugur, A., & Ceylan, Ö. (2003). Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Archives of Medical Research*, 34(2), 130–136. [http://doi.org/10.1016/S0188-4409\(03\)00006-7](http://doi.org/10.1016/S0188-4409(03)00006-7)
- Valderrama, B., & Téllez, J. (2000). Microbiología del petróleo y sus derivados. Retrieved from <http://myslide.es/documents/microbiologia-del-petroleo-y-derivados.html>
- Vázquez, A. (2005). Usos del cadmio, mercurio y plomo. In Botello, Rendón, Gold, & Agraz (Eds.), *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental : diagnóstico y tendencias* (2da ed., p. 338). Veracruz: Univ. J. Autónoma de Tabasco.
- Vila, N. (2013). *El análisis de escalamiento multidimensional*. Valencia.
- von Rozycki, T., & Nies, D. H. (2009). *Cupriavidus metallidurans*: Evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. <http://doi.org/10.1007/s10482-008-9284-5>

Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(Química). Retrieved from

<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.html>

Wolska, K. I. (2003). Horizontal DNA transfer between bacteria in the environment.

*Acta Microbiologica Polonica*, 52(3), 233–243.

Yáñez, P. (2014). Biodiversidad: Caracterización matemática fundamental. In *Ecología*

y *Biodiversidad: Un Enfoque desde el Neotrópico* (2014th ed., pp. 146, 148). Quito.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Requisitos de muestras para secuenciación de genomas a través del servicio de secuenciación de genomas individuales de Macrogen

Formato de la muestra	Requisitos de la muestra	Observaciones
Plásmido	* 100 ng/μl	Para la resecuenciación se requiere un mínimo de 5 μl
	* Volumen mínimo: 20μl	
16S	* Placa de Agarosa/Stock en Glicerol	N/A
	* ADNg: 30-50ng * Volumen mínimo: 20μl	
Producto PCR(purificado)	* 50 ng/μl	Para la resecuenciación se requiere un mínimo de 5 μl
	* Volumen mínimo: 20μl	
Producto PCR(No purificado)	* 100 ng/μl	N/A
	* Volumen mínimo: 20μl	
Secuenciación complicada	* 100 ng/μl	N/A
	* Volumen mínimo: 40μl	
Primer Walking	* El tamaño de Inserto, su tamaño al máximo 4kb	Secuenciación de cadena simple: 1μg/1kb de inserto -Si el tamaño del inserto es mayor a 4kb, es necesario enviar el clon en un cultivo estable en Agarosa

Tomado de: Macrogen (2009)

**Anexo 2.** Tabla de crecimiento bacteriano en base a tres variables (medio de cultivo, temperatura de incubación y tiempo de incubación)

Código	Repetición	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Medio de cultivo	Crecimiento
LPS01Cd2(1)	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	1	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cd2(1)	1	37°C	48 horas	PCA	1
LPS01Cd2(1)	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	2	37°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	3	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(1)	3	37°C	48 horas	PCA	1
LPS01Cd2(1)	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	1	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	1	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	1	37°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cd2(1)	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	2	4°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cd2(1)	2	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	2	37°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	3	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	3	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(1)	3	37°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cd2(1)	1	4°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd2(1)	1	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd2(1)	1	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(1)	1	37°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd2(1)	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(1)	2	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd2(1)	2	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(1)	2	37°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd2(1)	3	4°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd2(1)	3	4°C	24 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd2(1)	3	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(1)	3	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd5(2)A	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	1	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	1	37°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	2	37°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	3	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd5(2)A	3	37°C	48 horas	PCA	0

Continúa en la página 65



LPS01Cd5(2)A	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	1	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	1	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	1	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cd5(2)A	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	2	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	2	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	2	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cd5(2)A	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	3	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	3	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd5(2)A	3	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cd5(2)A	1	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd5(2)A	1	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd5(2)A	1	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd5(2)A	1	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd5(2)A	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd5(2)A	2	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd5(2)A	2	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd5(2)A	2	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd5(2)A	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd5(2)A	3	4°C	24 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd5(2)A	3	4°C	48 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd5(2)A	3	37°C	24 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd3	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd3	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd3	1	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cd3	1	37°C	48 horas	PCA	2
LPS01Cd3	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd3	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd3	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd3	2	37°C	48 horas	PCA	1
LPS01Cd3	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd3	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd3	3	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cd3	3	37°C	48 horas	PCA	1
LPS01Cd3	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd3	1	4°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cd3	1	37°C	24 horas	Caldo	1
LPS01Cd3	1	37°C	48 horas	Caldo	3
LPS01Cd3	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd3	2	4°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cd3	2	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd3	2	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cd3	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd3	3	4°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cd3	3	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd3	3	37°C	48 horas	Caldo	3
LPS01Cd3	1	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd3	1	4°C	48 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd3	1	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd3	1	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd3	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd3	2	4°C	48 horas	Cetrimida	1

LPS01Cd3	2	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd3	2	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd3	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd3	3	4°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd3	3	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd3	3	37°C	24 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd1	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd1	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd1	1	37°C	24 horas	PCA	2
LPS01Cd1	1	37°C	48 horas	PCA	3
LPS01Cd1	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd1	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd1	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd1	2	37°C	48 horas	PCA	3
LPS01Cd1	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd1	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd1	3	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cd1	3	37°C	48 horas	PCA	3
LPS01Cd1	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd1	1	4°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cd1	1	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd1	1	37°C	48 horas	Caldo	3
LPS01Cd1	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd1	2	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd1	2	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd1	2	37°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cd1	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd1	3	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd1	3	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd1	3	37°C	48 horas	Caldo	3
LPS01Cd1	1	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd1	1	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd1	1	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd1	1	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd1	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd1	2	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd1	2	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd1	2	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd1	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd1	3	4°C	24 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd1	3	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd1	3	37°C	24 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr2(2)A	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(2)A	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr2(2)A	1	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cr2(2)A	1	37°C	48 horas	PCA	3
LPS01Cr2(2)A	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(2)A	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr2(2)A	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(2)A	2	37°C	48 horas	PCA	2
LPS01Cr2(2)A	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(2)A	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr2(2)A	3	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(2)A	3	37°C	48 horas	PCA	2

LPS01Cr2(2)A	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(2)A	1	4°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cr2(2)A	1	37°C	24 horas	Caldo	1
LPS01Cr2(2)A	1	37°C	48 horas	Caldo	3
LPS01Cr2(2)A	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(2)A	2	4°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cr2(2)A	2	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(2)A	2	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr2(2)A	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(2)A	3	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(2)A	3	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(2)A	3	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr2(2)A	1	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(2)A	1	4°C	48 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr2(2)A	1	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(2)A	1	37°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr2(2)A	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(2)A	2	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(2)A	2	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(2)A	2	37°C	48 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr2(2)A	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(2)A	3	4°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr2(2)A	3	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(2)A	3	37°C	24 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr3(B)	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr3(B)	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr3(B)	1	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cr3(B)	1	37°C	48 horas	PCA	3
LPS01Cr3(B)	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr3(B)	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr3(B)	2	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cr3(B)	2	37°C	48 horas	PCA	3
LPS01Cr3(B)	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr3(B)	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr3(B)	3	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr3(B)	3	37°C	48 horas	PCA	1
LPS01Cr3(B)	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr3(B)	1	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr3(B)	1	37°C	24 horas	Caldo	1
LPS01Cr3(B)	1	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr3(B)	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr3(B)	2	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr3(B)	2	37°C	24 horas	Caldo	1
LPS01Cr3(B)	2	37°C	48 horas	Caldo	3
LPS01Cr3(B)	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr3(B)	3	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr3(B)	3	37°C	24 horas	Caldo	1
LPS01Cr3(B)	3	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr3(B)	1	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr3(B)	1	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr3(B)	1	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr3(B)	1	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr3(B)	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr3(B)	2	4°C	48 horas	Cetrimida	2

LPS01Cr3(B)	2	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr3(B)	2	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr3(B)	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr3(B)	3	4°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr3(B)	3	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr3(B)	3	37°C	24 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr2(1)	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(1)	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr2(1)	1	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cr2(1)	1	37°C	48 horas	PCA	2
LPS01Cr2(1)	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(1)	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr2(1)	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(1)	2	37°C	48 horas	PCA	1
LPS01Cr2(1)	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(1)	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr2(1)	3	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr2(1)	3	37°C	48 horas	PCA	2
LPS01Cr2(1)	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(1)	1	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(1)	1	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(1)	1	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr2(1)	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(1)	2	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(1)	2	37°C	24 horas	Caldo	1
LPS01Cr2(1)	2	37°C	48 horas	Caldo	3
LPS01Cr2(1)	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr2(1)	3	4°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cr2(1)	3	37°C	24 horas	Caldo	1
LPS01Cr2(1)	3	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr2(1)	1	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(1)	1	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr2(1)	1	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(1)	1	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr2(1)	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(1)	2	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(1)	2	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(1)	2	37°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr2(1)	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(1)	3	4°C	24 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr2(1)	3	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr2(1)	3	37°C	24 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd2(2)	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(2)	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd2(2)	1	37°C	24 horas	PCA	1
LPS01Cd2(2)	1	37°C	48 horas	PCA	2
LPS01Cd2(2)	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(2)	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd2(2)	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(2)	2	37°C	48 horas	PCA	2
LPS01Cd2(2)	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(2)	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cd2(2)	3	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cd2(2)	3	37°C	48 horas	PCA	1

LPS01Cd2(2)	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	1	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	1	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	1	37°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	2	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	2	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	2	37°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	3	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	3	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	3	37°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cd2(2)	1	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(2)	1	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd2(2)	1	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd2(2)	1	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cd2(2)	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(2)	2	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(2)	2	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd2(2)	2	37°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cd2(2)	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(2)	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cd2(2)	3	4°C	48 horas	Cetrimida	1
LPS01Cd2(2)	3	37°C	24 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr1	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1	1	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1	1	37°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1	2	37°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1	3	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1	3	37°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	1	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	1	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	1	37°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cr1	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	2	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	2	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	2	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr1	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	3	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	3	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1	3	37°C	48 horas	Caldo	1
LPS01Cr1	1	4°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr1	1	4°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr1	1	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr1	1	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr1	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr1	2	4°C	48 horas	Cetrimida	0

LPS01Cr1	2	37°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr1	2	37°C	48 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr1	3	4°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr1	3	4°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr1	3	4°C	48 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr1	3	37°C	24 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr1(1)B	1	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	1	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	1	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	1	37°C	48 horas	PCA	3
LPS01Cr1(1)B	2	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	2	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	2	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	2	37°C	48 horas	PCA	1
LPS01Cr1(1)B	3	4°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	3	4°C	48 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	3	37°C	24 horas	PCA	0
LPS01Cr1(1)B	3	37°C	48 horas	PCA	3
LPS01Cr1(1)B	1	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	1	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	1	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	1	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr1(1)B	2	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	2	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	2	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	2	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr1(1)B	3	4°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	3	4°C	48 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	3	37°C	24 horas	Caldo	0
LPS01Cr1(1)B	3	37°C	48 horas	Caldo	2
LPS01Cr1(1)B	1	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr1(1)B	1	4°C	48 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr1(1)B	1	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr1(1)B	1	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr1(1)B	2	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr1(1)B	2	4°C	48 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr1(1)B	2	37°C	24 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr1(1)B	2	37°C	48 horas	Cetrimida	3
LPS01Cr1(1)B	3	4°C	24 horas	Cetrimida	0
LPS01Cr1(1)B	3	4°C	24 horas	Cetrimida	2
LPS01Cr1(1)B	3	4°C	48 horas	Cetrimida	1
LPS01Cr1(1)B	3	37°C	24 horas	Cetrimida	3

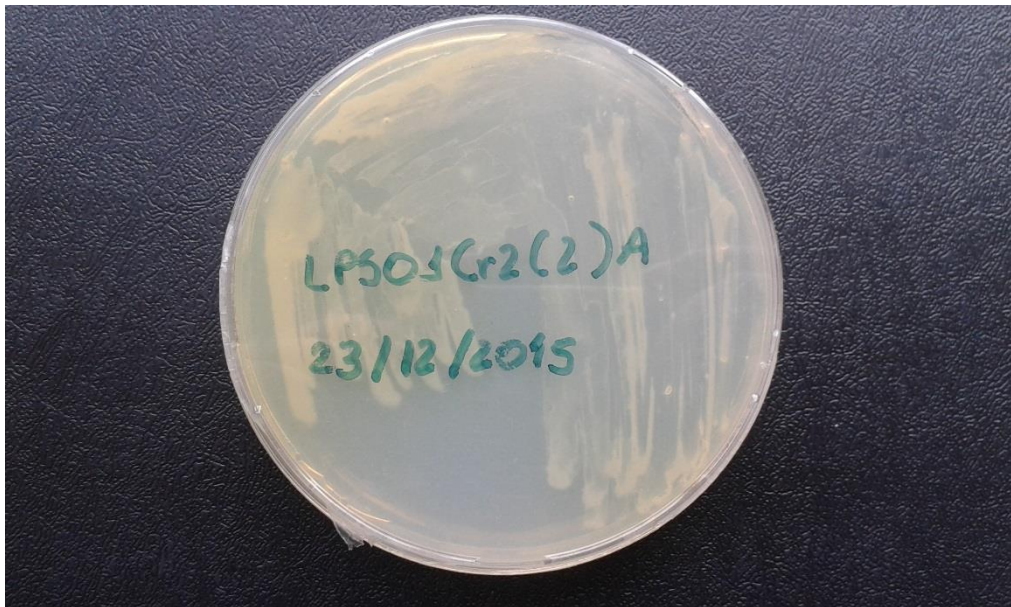
(Nota: La escala utilizada para evaluar el crecimiento va de 0 a 3, siendo 0= sin crecimiento; 1= poco crecimiento; 2= crecimiento intermedio; 3= abundante crecimiento)

**Elaborado por las autoras**

**Anexo 3. Fotografías de los consorcios bacterianos**



**Figura 9.** Siembra de la muestra LPS01Cr3(B) en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**

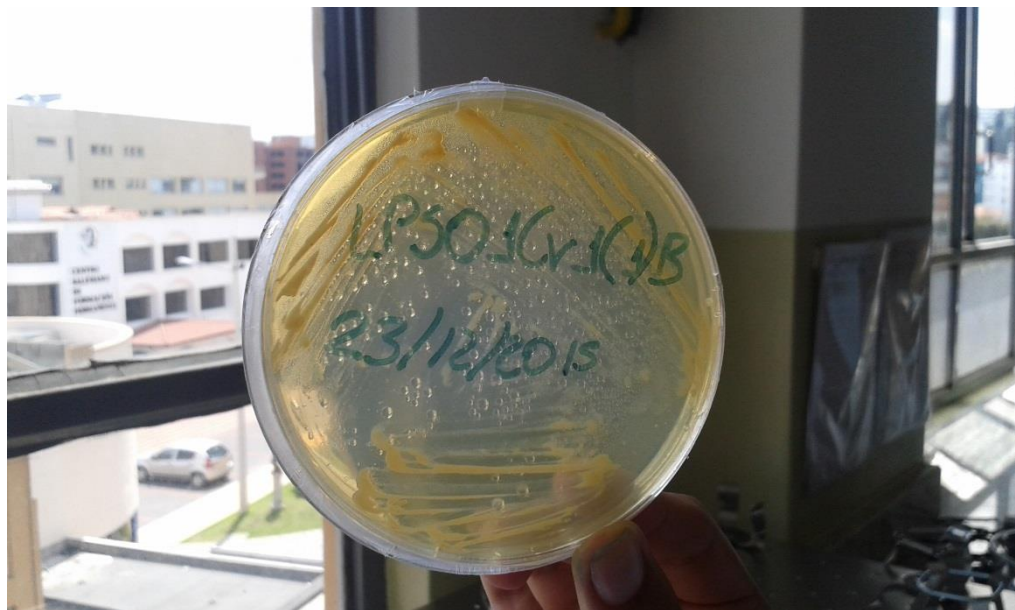


**Figura 10.** Siembra de la muestra LPS01Cr2(2)A en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**



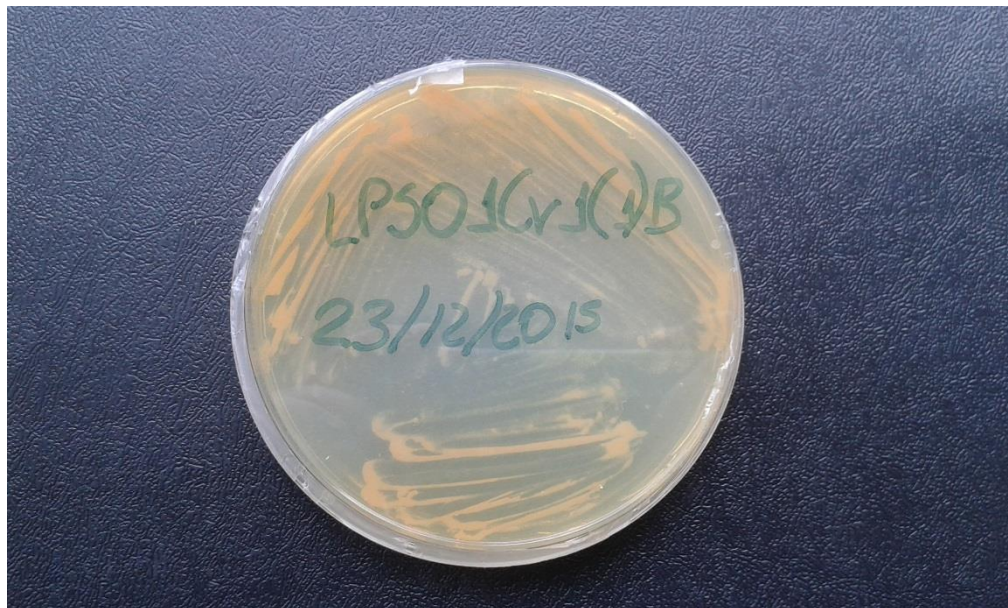


**Figura 11.** Siembra de la muestra LPS01Cr2(1) en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**



**Figura 12.** Siembra de la muestra LPS01Cr1(1)B en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**





**Figura 13.** Siembra de la muestra LPS01Cr1(1)B en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**



**Figura 14.** Siembra de la muestra LPS01Cr1 en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**

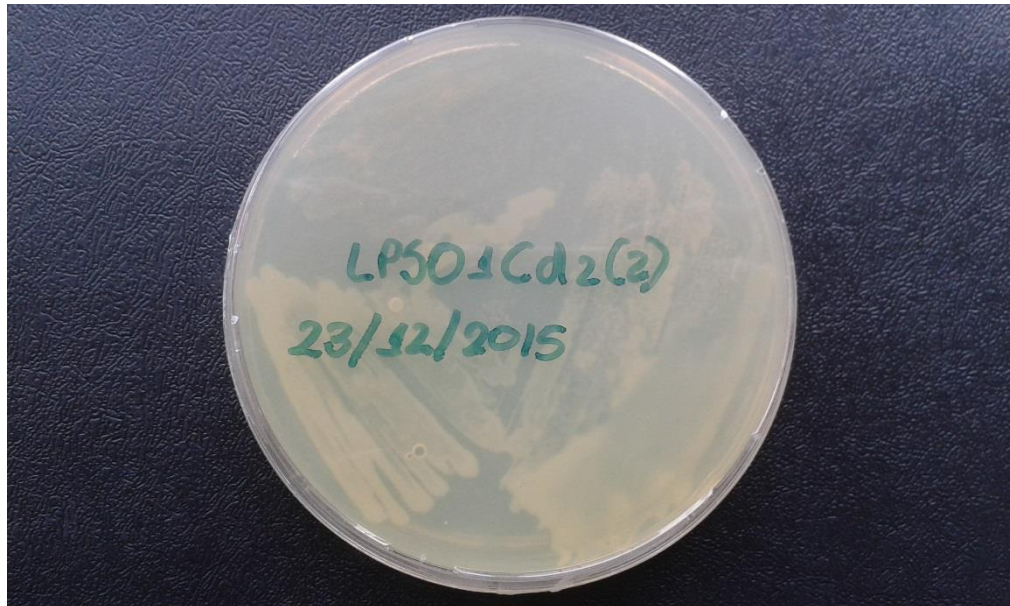


**Figura 15.** Siembra de la muestra LPS01Cd5(2)A en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**



**Figura 16.** Siembra de la muestra LPS01Cd3 en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**





**Figura 17.** Siembra de la muestra LPS01Cd2(2) en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**



**Figura 18.** Siembra de la muestra LPS01Cd1 en medio Cetrimida. **Elaborado por las autoras.**