

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE QUITO**

**CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**“INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES”**

**TEMA:**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CONSORCIOS BACTERIANOS  
RESISTENTES A METALES PESADOS PROVENIENTES DE AGUAS  
RESIDUALES DE UNA INDUSTRIA HIDROCARBURÍFERA EN LA  
PROVINCIA DE ESMERALDAS-ECUADOR**

**AUTORES:**

**CRISTIAN GABRIEL ANGUISACA ARIAS**

**EDGAR ANDRÉS CASTAÑEDA GONZÁLEZ**

**TUTORA:**

**GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIÉRREZ**

**Quito, Agosto del 2016**

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORES

Nosotros, Cristian Gabriel Anguisaca Arias con documento de identificación N° 1724219777 y Edgar Andrés Castañeda González con documento de identificación N° 1720442498, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: **“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CONSORCIOS BACTERIANOS RESISTENTES A METALES PESADOS PROVENIENTES DE AGUAS RESIDUALES DE UNA INDUSTRIA HIDROCARBURÍFERA EN LA PROVINCIA DE ESMERALDAS – ECUADOR”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero 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 autores 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.

Cristian Gabriel Anguisaca Arias

C.I. 171955271-1

Edgar Andrés Castañeda González

C.I. 172044249-8

Quito, 22 de agosto del 2016

## DECLARATORIA DE COAUTORÍA DE LA DOCENTE TUTORA

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, **“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CONSORCIOS BACTERIANOS RESISTENTES A METALES PESADOS PROVENIENTES DE AGUAS RESIDUALES DE UNA INDUSTRIA HIDROCARBURÍFERA EN LA PROVINCIA DE ESMERALDAS – ECUADOR”**, realizado por Cristian Gabriel Anguisaca Arias y Edgar Andrés Castañeda González, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Agosto del 2016

  
-----  
Germania Margarita Karolys Gutiérrez

CI: 1708492499

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
1. MARCO CONCEPTUAL .....	4
1.1. Contaminación por metales pesados .....	4
1.1.1. Resistencia de Bacterias a metales pesados .....	5
1.1.2. Mecanismos Bacterianos de Resistencia a Metales .....	6
1.1.3. Captura de Iones en la Célula Bacteriana .....	7
1.2. Importancia de los Microorganismos .....	7
1.2.2. Consorcios Microbianos .....	8
1.3. Biorremediación bacteriana.....	10
1.4. Métodos de Identificación Bacteriana .....	13
1.4.1. Pruebas Bioquímicas .....	14
1.4.2. Método Molecular .....	15
1.4.3. Métodos basados en Proteómica .....	16
1.5. Identificación molecular de microorganismos .....	17
1.5.1. Metagenómica .....	18
1.5.2. Filogenia mediante el gen rRNA 16S .....	19
1.5.3. Secuenciación de nueva generación (NGS) .....	20
1.5.3.1. Tecnología de Secuenciación .....	22

1.5.3.2. Análisis Bioinformático .....	23
2. MARCO METODOLÓGICO.....	24
2.1. Muestreo .....	24
2.2. Obtención de consorcios bacterianos .....	25
2.2.1. Selección de condiciones para el crecimiento de consorcios bacterianos .....	26
2.2.2. Pruebas de sensibilidad a metales pesados .....	26
2.2.3. Diseño experimental .....	28
2.2.3.1. Análisis de varianza .....	29
2.3. Crioconservación.....	29
2.4. Extracción y purificación del ADN genómico de bacterias. ....	30
2.4.1. Cuantificación de ADN Bacteriano .....	31
2.5. Amplificación del fragmento 16S y Secuenciación .....	31
2.6. Análisis Bioinformático .....	32
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
3.1. Descripción macro y microscópica de los consorcios bacterianos.....	34
3.3. Análisis de crecimiento en diferentes medios y temperaturas.....	36
3.4. Pruebas de sensibilidad a metales.....	38
3.5. Análisis Estadístico .....	41
3.5. Extracción de ADN .....	43
3.6. Secuenciación.....	44

3.7. Análisis de Secuencias .....	46
CONCLUSIONES .....	51
RECOMENDACIONES .....	52
BILBIOGRAFÍA .....	53
ANEXOS .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Localización de procedencia de las muestras de aguas contaminadas obtenidas de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas - Ecuador.....	24
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos para el análisis de crecimiento y remoción de metales de consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas - Ecuador .....	28
<b>Tabla 3.</b> Descripción macro y microscópica de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas - Ecuador .....	36
<b>Tabla 4.</b> Análisis de crecimiento de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas .....	38
<b>Tabla 5.</b> Disminución de la concentración de metales de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas .....	39
<b>Tabla 6.</b> Análisis de disminución de arsénico de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas - Ecuador.....	41
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la cuantificación por medio del equipo NanoDrop.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Análisis multivariado en relación a la disminución de metales de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas – Ecuador .....	42
<b>Figura 2.</b> Extracción de ADN de consorcios bacterianos en gel de agarosa.....	43
<b>Figura 3.</b> Total de lecturas por muestra analizada .....	45
<b>Figura 4.</b> Tamaño promedio de lecturas por muestra analizada .....	46
<b>Figura 5.</b> Resultados del análisis de BLAST en función de las secuencias consenso para el consorcio Re04Pb2(1)A .....	47
<b>Figura 6.</b> Resultados del análisis de BLAST en función de las secuencias consenso para el consorcio Re03As1 .....	48
<b>Figura 7.</b> Resultados del análisis de BLAST en función de las secuencias consenso para el consorcio Re06Cr1(2)A .....	49

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Visualización microscópica de los consorcios microbianos e imágenes bibliográficas de referencia.....	60
<b>Anexo 2.</b> Disminución de concentración de metales.....	61
<b>Anexo 3.</b> Resultados del análisis estadístico en R-project.....	62
<b>Anexo 4.</b> Reporte de resultados de secuenciación.....	64
<b>Anexo 5.</b> Resultados de Análisis Metagenómico realizado por World Fusion US.....	65

## RESUMEN

En el presente trabajo se identificó molecularmente consorcios bacterianos resistentes a metales, aislados de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas. Las muestras fueron inoculadas en cuatro medios de cultivo y se realizó pruebas de sensibilidad a metales, considerando los límites máximos de descarga establecidos en el TULAS: cadmio (0,2, 2 y 20 ppm), cromo (2, 25 y 50 ppm) y plomo (2, 10 y 20 ppm). El porcentaje de remoción del metal se evaluó a partir de espectrofotometría para cadmio, cromo y plomo y la remoción de arsénico mediante el kit Lovibond Test Arsénico (altamente sensible) No. 400700. Se aislaron cinco consorcios, de los cuales tres presentaron un porcentaje de remoción significativo: ReO3As1 (20,78%), ReO6Cr1(2)A (21%) y ReO4Pb2(1)A (22,49%). Para la identificación molecular se extrajo ADN utilizando el método propuesto por Ausubel, posteriormente se enviaron las muestras a MacroGen-Korea, donde se realizó el secuenciamiento de nueva generación, obteniéndose librerías genómicas de los fragmentos de la región del gen 16S ARNr, se generaron amplicones con un tamaño de 600 pb y se realizó la secuenciación con el equipo GS FLX Titanium. Los pirogramas formados fueron analizados mediante el programa Roche GS FLX software (v 3.0). La identificación se realizó con el programa BLAST. Los tres consorcios presentaron individuos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (Query Cover 99% e Ident 98%) y *Staphylococcus* (Query Cover 100% e Ident 99%). No se consiguió identificar especies. Estos géneros bacterianos encontrados han demostrado previamente su eficacia en procesos de biorremediación ambiental.

**Palabras clave:** identificación, consorcios, secuenciación, metales, biorremediación

## ABSTRACT

In this paper resistant bacterial consortia to metals were molecularly identified, isolated from wastewater of a hydrocarbon industry in the province of Esmeraldas. Samples were inoculated in four culture media and metal susceptibility testing was performed considering TULAS`s maximum discharge limits: cadmium (0.2, 2 and 20 ppm), chromium (2, 25 and 50 ppm) and lead (2, 10 and 20 ppm). Metal removal rate was evaluated by spectrophotometric for cadmium, chromium and lead and arsenic removal by Lovibond kit Arsenic Test (highly sensitive) No. 400700. Five consortiums were isolated, where three showed a significant percentage of metals removing activity: ReO3As1 (20.78%), ReO6Cr1 (2) A (21%) and ReO4Pb2 (1) A (22.49%). For molecular identification DNA was extracted using the method proposed by Ausubel, then the samples were sent to MacroGen-Korea, where the sequencing of new generation was performed, obtaining genomic libraries of fragments of the region of the 16S rRNA gene, amplicons were generated with a size of 600 bp and the sequencing was performed with the GS FLX Titanium equipment. The pyrograms formed were analyzed using the Roche GS FLX software (v 3.0) program. The identification was performed with the BLAST program. The three consortiums submitted belonging individuals to the genus *Pseudomonas* (Query Cover 99% and Ident 98%) and *Staphylococcus* (Query Cover 100% and Ident 99%). There was not possible identify species. These bacterial genera found have previously proved their effectiveness in environmental bioremediation processes.

**Keywords:** identification, consortia, sequencing, metals, bioremediation

## INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son elementos propios de la naturaleza de peso molecular alto, la acumulación de estos elementos produce efectos nocivos en el ecosistema, que pueden afectar a la salud humana. Las fuentes habituales de aguas residuales contienen grandes cantidades de metales como el arsénico, cromo, cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc. Cuando estos metales se encuentran en altas concentraciones en el cuerpo humano pueden causar alteraciones en la salud, para ello utilizan diferentes mecanismos de acción y lugares de acumulación en el organismo.

El arsénico es muy tóxico y causa daños al sistema neurológico, al sistema cardiovascular y está ligado a diversos tipos de cáncer como el de la piel. La exposición al plomo, aún a niveles bajos, afecta a niños y a adultos. En cantidades muy pequeñas, el plomo interfiere con el desarrollo del sistema neurológico, causa crecimiento retardado y problemas digestivos (Valdés, 1999). El cadmio es un contaminante generado como subproducto de la extracción de cobre, hierro y zinc, tiene posibilidades de acumulación en periodos largos en el organismo y puede dañar algunos órganos como el hígado, riñón, pulmón, huesos, testículos y placenta (Martínez, Souza, Bucio, Gómez, & Gutiérrez, 2013). Los altos nivel de Cromo pueden causar irritación en la mucosa nasal, generando moqueo, también hemorragias, úlceras y perforaciones en el tabique, al igual que reacciones alérgicas como enrojecimiento e hinchazón de la piel; si es ingerido puede causar malestar estomacal, convulsiones, daño al sistema hepático y úlcera, pudiendo causar cáncer y consecutivamente la muerte (ATSDR, 2001).

En la actualidad se buscan alternativas para el tratamiento de los metales pesados, ya que ciertos metales en bajas concentraciones son utilizados como bioelementos, micronutrientes o cofactores enzimáticos, pero en elevadas concentraciones son tóxicos. En el 2002 se especificó que “Los metales pesados no pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos” (Abollino, y otros, 2002).

El aumento de la concentración de metales en el agua se debe especialmente a contaminación de origen industrial, petrolero o minero. En el Ecuador en la provincia de Esmeraldas existe una acción petrolera importante, el oleoducto atraviesa los cantones con población más densa, entre los cuales se incluye la ciudad de Esmeraldas. La industria hidrocarburífera al igual que cualquier actividad extractiva causa impactos ambientales como la contaminación de aguas superficiales y producción de desechos en diferentes áreas. Se producen desechos sólidos y líquidos rutinarios y accidentales que se infiltran, generando efluentes, los cuales pueden ser inaccesibles para darles tratamiento (Acción Ecológica, 1999). La Biorremediación con microorganismos presenta una posible solución a la problemática, aunque, existe muy poca información acerca de los microorganismos con capacidad de biorremediación existentes en el Ecuador, debido al escaso desarrollo de investigaciones al respecto.

Para reducir los efectos producidos por la contaminación del agua con metales es importante conocer agentes biológicos con capacidad de actuar sobre los compuestos que provocan desequilibrios en el medio ambiente. La importancia de realizar este proyecto radica en identificar bacterias propias del lugar donde se ha producido contaminación del agua con varias sustancias nocivas y sus condiciones óptimas de crecimiento. Estos

microorganismos resultan de gran interés debido a que han desarrollado una eficiente capacidad para sobrevivir en estas condiciones. La identificación de las bacterias requiere resultados confiables y precisos, por tanto, la presente investigación tiene como objetivo identificar molecularmente consorcios bacterianos resistentes a metales pesados, a través del análisis de ácidos nucleicos procedentes de una muestra de los organismos que se desea analizar, por lo tanto es necesario realizar un proceso que incluye la extracción de ADN, amplificación del fragmento 16S, secuenciación y análisis Bioinformático. La información obtenida en el proyecto puede ser utilizada en lo posterior para desarrollar procesos de biorremediación que permitan mitigar los efectos de la contaminación de agua por metales.

## **1. MARCO CONCEPTUAL**

Los metales pesados se encuentran en la biósfera, distribuidos por la corteza terrestre en pequeñas cantidades, por diferentes motivos estos pueden acrecentar su concentración en ciertas zonas, ya sea por ciertas condiciones ambientales o por la intervención humana; los metales pesados pueden presentarse en diferentes formas químicas por ejemplo formando diversos compuestos, cumpliendo su ciclo en las cadenas tróficas o acumulándose (Morgante & González, 2010).

Las altas concentraciones de metales pesados producen contaminación ambiental afectando negativamente la salud y bienestar de los seres vivos además degradan los recursos naturales, se cataloga como metales pesados al plomo, cromo, zinc, cadmio, plata, arsénico, mercurio y cobre por otro lado los metales pesados pueden ser útiles como micronutrientes para la vida de los organismos vivos, pero cuando sobrepasan una cierta concentración se convierten en tóxicos (Navarrete, Urquiza, & Lucario, 2016).

### **1.1. Contaminación por metales pesados**

La acumulación de los metales pesados en el medio ambiente natural ha producido efectos en la evolución de la vida provocando el desarrollo de la homeostasis de los metales pesados, logrando así una adaptación espontánea del medio, a través del desarrollo de sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de elevadas concentraciones de iones metálicos para la célula. Debido a la pluralidad de los microorganismos, existen aquellos que son resistentes y los microorganismos tolerantes a los metales, los resistentes poseen mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, constituidos o inducidos por la presencia del metal, los tolerantes son indiferentes ante la presencia o ausencia del

elemento, estos dos tipos de microorganismos son primordiales para la captura de metales en sitios contaminados, ya que ambos pueden presentar capacidad de extraer estos contaminantes.

### **1.1.1. Resistencia de Bacterias a metales pesados**

Tenemos 65 elementos dentro de la tabla periódica denominados metales pesados, característicos por poseer un densidad de  $5 \text{ g/cm}^3$  en su forma básica, cuyo número atómico es superior a 20 (a excepción de los metales alcalinos y alcalino-terreos), se los puede encontrar naturalmente formando ciertos complejos como iones libres o también realizando reacciones redox, las cuales pueden resultar tóxicas para los organismos. Normalmente los metales no rebasan los umbrales de toxicidad si el medio natural no ha sido manipulado por el hombre, encontrándose de forma poco asimilable para los organismos, pero debido a la acción humana se ha producido un ascenso de estos metales en el medio ambiente de forma descontrolada, pudiendo ser accidental y deliberado, y principalmente generado por actividades agrícola o industriales. Existen ciertos metales que ejercen funciones catalíticas en algunas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, ya que son promotores de procesos celulares (cobalto, cobre, níquel y cinc), actúan como micronutrientes o cofactores enzimáticos, pudiendo estabilizar estructuras proteicas, pero este proceso es funcional solamente en una concentración adecuada. Muchas células contienen dos modos de captura de cationes de metales pesados, el primero es rápido aunque carece de especificidad, usado para una gran variedad de sustratos, el otro tipo es más específico, pero más lento y usa ATP como fuente de energía en la adición de gradiente quimiostático (movimiento de protones a través de un membrana); este mecanismo consumidor de energía es inducido en la célula cuando lo

necesita, ya sea en condiciones nutricionales desfavorables o en cierta condición metabólica especial. Cuando las concentraciones elevadas de metales se presentan la célula aglomera y acumula el metal por el sistema inespecífico, el catión del metal se transporta al citoplasma, a pesar de la elevada concentración de este, por motivo que estos transportadores inespecíficos se expresan constitutivamente. En consecuencia, la entrada no puede cerrarse, esta apertura se la considera como el primer motivo de que los iones metálicos son tóxicos. Cuando el gen que codifica el sistema transportador rápido e inespecífico se muta, se obtiene mutantes tolerantes a metales pesados; al estar estos elementos dentro de la célula en exceso pueden dar lugar a ciertos enlaces coordinados con aniones que bloquean grupos funcionales de enzimas, inhibir el sistema de transporte, desplazar metales esenciales desde sitios nativos de enlace e interrumpir la integridad de la membrana celular (Marrero, Díaz, & Coto, 2016).

### **1.1.2. Mecanismos Bacterianos de Resistencia a Metales**

Algunas especies de bacterias se encuentran sometidas a diferentes sistemas con diversidad de sustratos según el medio en el que se encuentren, muchos de los sistemas contribuyen a proteger la célula frente a metales dañinos, hay bacterias específicas, por lo tanto se encuentran solo en algunas especies bacterianas, colaborando con la capacidad para resistir metales pesados, por ejemplo en *Cupriavidus metallidurans* CH34 y *Serratia marcescens* C-1 se han identificado la inducción de genes y sobreexpresión, y proteínas relacionados con el estrés oxidativo, en respuesta a elevadas concentraciones de cobre y cobalto, respectivamente, este hallazgo fue uno de los primeros que ayudó a determinar los mecanismos celulares necesarios que ayudan a contrarrestar los efectos oxidativos de elevadas concentraciones de metales pesados en el interior celular de las bacterias

resistentes; estos sistemas son muy variados y entre ellos tenemos: 1) componentes celulares que capturan iones, neutralizando su toxicidad, 2) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides convirtiéndolos en formas menos tóxicas y 3) transportadores ubicados en la membrana que expulsan las especies nocivas desde el citoplasma celular (Marrero, Díaz, & Coto, 2016).

### **1.1.3. Captura de Iones en la Célula Bacteriana**

La acumulación y compartimentación de iones metálicos en la célula bacteriana puede ocurrir en la membrana, el espacio periplasmático (compartimiento que rodea al citoplasma en algunas procariotas) y el interior celular, donde la célula contiene polímeros estructurales y extracelulares que actúan como barrera de difusión. Los polímeros extracelulares son polímeros de la glucosa tipo glucógeno, son compuestos de almacenamiento de carbohidratos en el caso que exógenamente no estén disponibles, usados comúnmente como fuente de energía, los cuales tienen una interacción con los metales atrapándolos dentro de su estructura o proteínas que se unen al metal, lo cual impide que se produzcan interacciones con otras proteínas que son esenciales para el microorganismo (Marrero, Díaz, & Coto, 2016).

## **1.2. Importancia de los Microorganismos**

Los microorganismos desarrollan diferentes procesos vitales enfocados mayoritariamente a su alimentación, lo cual es útil para la obtención de energía mediante el consumo de nutrientes, cada microorganismos cumple con un rol en la biósfera, interactuado en el equilibrio natural e incorporando elementos previamente metabolizados, siendo de igual modo indispensables para el funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos, desde hace años los microorganismos se han utilizado para la obtención de diversos productos

mediante el aprovechamiento de sus capacidades metabólicas, algunos microorganismos anaerobios por ejemplo transforman el alimento por medio de la fermentación, en la industria minera se usan los microorganismos para el procesamiento de ciertos minerales, proceso llamado lixiviación microbiana que es aplicada en proyectos de remediación ambiental, ya que algunos microorganismos tienen la facultad de metabolizar y degradar determinadas sustancias consideradas como contaminantes, gracias a este proceso se acuñó el término de biorremediación, logrando exitosamente eliminar zonas contaminadas por derrames de la industria petrolera y derivados. La tecnología de la biorremediación utiliza el potencial metabólico de los microorganismos principalmente bacterias, al igual que hongos y levaduras, de manera que los contaminantes orgánicos se degraden en compuestos más simples, disminuyendo drásticamente la contaminación, consecuentemente son capaces estos microorganismos de limpiar terrenos o aguas contaminadas (Glazer & Nikaido, 1995).

Conforme el tiempo avanza la biotecnología descubre nuevos usos para los microorganismos, junto con la revolución de la ingeniería genética donde se introducen genes nuevos a los microorganismo para inducir a la célula a realizar nuevos procesos de interés mundial (Bionova, 2016).

### **1.2.2. Consorcios Microbianos**

Se define como consorcio a comunidades de bacterias que interactúan en conjunto. Cada especie de microorganismo presenta diferentes requerimientos nutricionales y energéticos, es por ello que la formación de consorcios podría resultar más beneficiosa que la utilización de una especie pura por ejemplo para la biolixiviación de un mineral ya

que ciertos compuestos que no son oxidados por una especie de microorganismo, pueden ser oxidados por la otra (Cáceres, 2015).

Las poblaciones microbianas (consorcios) actúan conjuntamente en un sistema complejo, donde todos se ven beneficiados de las actividades de los demás, su asociación es de tipo sinérgica (que comen juntos) o sintrófica, de forma que el crecimiento y el flujo cíclico de los nutrientes se conduce de una manera más eficiente que en las poblaciones individuales; Los organismos que forman el consorcio mantienen compatibilidad metabólica y ecológica, meramente cuando los factores ambientales permiten la coexistencia cercana entre estos (López, Domínguez, & García, 2007).

Los microorganismos que viven en asociaciones pueden resistir más a los cambios ambientales, al igual lograr la estabilidad de los miembros que la conforman, los miembros se comunican (interacción físico-químicas donde el emisor, el canal y el receptor de la información están identificados) ya sea por medio del intercambio de sustancias o señales moleculares, cada población detecta y responde a la presencia de otras en el consorcio. La acción de un consorcio depende de la combinación de acciones realizados por los organismos involucrados, la generación de un producto, requiere varias sendas para convertir el sustrato mediante la síntesis secuencial realizadas por intermediarios. Los consorcios pueden resistir la limitación de nutrientes gracias a su diversidad metabólica correspondiente a las diversas especies que lo conforman, por ejemplo una especie puede ser más activa en un periodo de limitación de nutrientes, pudiendo mantener la supervivencia del consorcio (Ochoa & Montoya, 2010).

El proceso de biorremediación fue probado con éxito en derrames accidentales de petróleo, como el caso del buque Exxon Valdez ocurrido en Alaska y el caso Prestige en 2002 frente a las costas de Galicia, en España. La biorremediación fue una herramienta de limpieza suplementaria a los mecanismos mecánicos tradicionales siendo la biorremediación una técnica menos agresiva al ya contaminado ecosistema y menos costosa (Blanch, 2010).

### **1.3. Biorremediación bacteriana**

La biorremediación se puede realizar *in situ* (mismo lugar) o *ex situ* (separando la porción contaminada y llevándola a ser tratada), la biorremediación consiste en agregar organismos vivos con ciertos nutrientes en los ambientes contaminados, se produce la descontaminación gracias a la capacidad natural de los organismos para transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas las cuales resultan menos nocivas y tóxicas, logrando una disminución de la contaminación ambiental (PQBio, 2016).

La biorremediación bacteriana se produce generalmente mediante dos mecanismos que pueden ayudar a un ecosistema a remediarse como la bioacumulación de sustancias tóxicas dentro del microorganismo estudiado y bioaugmentación que consiste en agregar microorganismos en un medio a más de los autóctonos, siendo estos microorganismos previamente probados y cultivados en el laboratorio u otro lugar. Se debe tomar en cuenta que en algunos casos los microorganismos exógenos no suelen comportarse bien en zonas ajenas a ellos, la razón podría ser que estos microorganismos no han sido cultivados en condiciones ambientales y nutricionales distintas con respecto a la zona contaminada o

debido a que han sido desplazadas por microorganismos autóctonos (Marin, Sanz, & Ramils, 2005).

Para lograr una biorremediación exitosa depende de algunos elementos: primero hay que tener en cuenta los microorganismos que están presentes en el medio contaminado, la concentración del contaminante y su toxicidad, y por último las condiciones del medio, los microorganismos deben tener una actividad correcta para lograr la biorremediación, es decir necesitan cantidades óptimas de nutrientes, temperatura y oxígeno que ayuden al desarrollo microbiano, colaborando al aumento de la velocidad de degradación de los compuestos contaminantes, disminuyendo progresivamente la toxicidad del medio, este proceso se puede dar en condiciones aerobias o anaerobias (PQBio, 2016).

La biotransformación es un tipo de biorremediación que se define como el proceso mediante el cual un organismo vivo modifica una sustancia química transformándola en otra diferente que en ocasiones es menos contaminante.

La degradación enzimática, se producen de forma natural o industrial por medio de la ingeniería genética, se modifican a las bacterias según el uso que se las quiera dar, actualmente las empresas producen masivamente residuos los cuales necesitan ser tratados necesariamente, así que las enzimas producidas por la industria biotecnológica podrían ser una solución eficaz, por ejemplo se aplican ciertos grupos de enzimas que hidrolizan polímeros complejos volviéndolos biodisponibles y al mismo tiempo que culminen su ciclo mediante la degradación con microorganismos.

Las enzimas utilizadas para transformar los metales pesados en su mayoría provienen de bacterias transformadas genéticamente, uno de los cambios o transformaciones

enzimáticas de los metales incluye la oxidación, reducción, metilación y desmetilación obteniendo compuestos hidrofóbicos o en otros casos compuestos de alta volatilidad (Cabañero, Madrid, & Camara, 2005).

Una gran variedad de microorganismos tienen la capacidad de solubilizar los metales a partir de depósitos metálicos insolubles, capacidad que se conoce como Biolixiviación, esta técnica es ventajosa al ser un proceso que requiere poca energía comparada con la extracción tradicional de metales de la fuente, este proceso no se ve afectado por el contenido metálico presente en la fuente, los residuos provenientes de minería están expuestos a biolixiviación natural no controlada que podría producir un lixiviado fuertemente ácido y contaminar fuertemente el ambiente, pudiéndose controlar con la biolixiviación controlada (Scragg, 2001).

Comúnmente la lixiviación microbiana se usa en menas de sulfuro de cobre el cual es muy hidrosoluble, aproximadamente la cuarta parte del cobre mundial se obtiene mediante el uso de la lixiviación; ejemplo el *Acidithiobacillus ferroxidans* y otras bacterias oxidadoras de metales catalizan la oxidación de minerales sulfurosos, lo que ayuda a solubilizar el metal, la susceptibilidad a la oxidación varía según los minerales, en cambio los que se oxidan con más facilidad presentan más actividad de lixiviación microbiana, como por ejemplo: las menas de sulfuro de cobre y hierro se lixivian con mayor facilidad que las menas de plomo (Scragg, 2001).

En la biolixiviación se usan microorganismos que tengan la capacidad de disolver los minerales, estos microorganismos funcionan como catalizadores biológicos, este proceso se encuentra mediado por el agua, oxígeno y un proceso biológico donde los

microorganismos son los promotores; existen los metales base los cuales se oxidan o corroen con mayor facilidad, por lo general este proceso se usa para recuperar el cobre y uranio e incluso oro al pasar por un pre tratamiento de minerales refractarios, actualmente esta tecnología ha sido probada en otro tipo de metales para evitar desperdicios al momento de la extracción minera (Vial & Enriquez, 2011).

#### **1.4. Métodos de Identificación Bacteriana**

Las bacterias estudiadas en el presente trabajo demostraron tener una significativa capacidad de reducir metales, debido a ello se requiere identificar en forma precisa estos microorganismos para aplicarlos en procesos de biorremediación. La importancia de realizar esta identificación se debe a que nos permite conocer con precisión el tipo de organismo, sus características morfológicas, fisiológicas y deducir sus posibles mecanismos de resistencia, con la finalidad de utilizar las propiedades de los microorganismos en beneficio del hombre evitando riesgos o efectos adversos (Bou, Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009).

La identificación bacteriana consiste asignar el microorganismo a un determinado taxón de acuerdo a la clasificación establecida, basándose en la determinación confiable de las características fenotípicas y/o genotípicas del mismo y la comparación de dichas características con los taxones relacionados a la clasificación considerada (Albanesi & Silverman, 2014).

La identificación bacteriana generalmente se realiza por medio de métodos tradicionales, basados en la observación de las características fenotípicas de los microorganismos, debido a que su realización y costo permite que esta técnica sea la más viable (Bou,

Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009). El método convencional de cultivo continúa siendo el método diagnóstico de elección cuando es factible efectuarlo, ya que permite el aislamiento bacteriano y su identificación (Cantón & Cercenado, 2010). Para identificar bacterias mediante este método se requiere analizar la agrupación, morfología colonial, propiedades, características morfológicas, la reacción ante la tinción Gram y sus reacciones metabólicas en los ensayos de producción de enzimas y reacciones de óxido-fermentación (CBTIS, 2013).

El método convencional no presenta un elevado grado de confiabilidad, por lo que es necesario la realización de ensayos complementarios que confieran resultados seguros para el investigador. Por este motivo se han desarrollado diversos métodos con mayor grado de confiabilidad, sin embargo, debido a su elevado costo los métodos genotípicos suelen reservarse para los casos en que no se pueden identificar los microorganismos mediante los métodos convencionales (Jaime, Vera, & Gutierrez, 2013).

El progreso científico ha permitido implementar técnicas con mayor grado de sensibilidad, especificidad y por lo tanto mayor confiabilidad, algunas de las más usuales se detallan a continuación:

#### **1.4.1. Pruebas Bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas son utilizadas para identificar de forma clara la presencia o ausencia de una enzima o grupo de enzimas dentro de un microorganismo o a su vez la existencia de una vía metabólica completa (UNAM, 2007). Esta técnica requiere de un cultivo bacteriano previo y no se las puede aplicar para identificar microorganismos en forma directa desde una muestra. Los métodos bioquímicos únicamente permiten obtener

la identificación más probable pero no definitiva, es decir que mostrarán el género o especie a la que el microorganismo analizado tiene mayor probabilidad de pertenecer, por lo tanto no pueden brindar una certeza absoluta (Bou, Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009). (Debido a estas limitaciones no se consideró esta técnica para el presente trabajo experimental).

Existen diferentes tipos de pruebas bioquímicas, entre las cuales destacan las siguientes: las pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias, como es el caso de la prueba de solubilidad en bilis; las pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa; también se consideran las denominadas pruebas lentas, con lectura de 18 a 48 h que incluirían la óxido-fermentación y finalmente las pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 h como las pruebas de ureasa e indol (Bou, Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009).

Entre los paquetes bioquímicos comerciales más usados para la identificación de bacterias se encuentran las pruebas API y Vitek, las cuales permiten la diferenciación entre grampositivas, gramnegativas y la identificación de bacterias entéricas, no entéricas, especies de Streptococcus, Listeria, Staphylococcus, Corynebacterium, Campylobacter, levaduras entre otras (UNAM, 2007).

#### **1.4.2. Método Molecular**

En el presente trabajo se realizó la identificación bacteriana mediante el método molecular debido a las ventajas que presenta esta técnica, como resultados confiables y precisos. Este método requiere el análisis de ácidos nucleicos procedentes de una muestra del organismo que se desea analizar. Generalmente se emplea enzimas de restricción para

cortar los ácidos nucleicos en regiones hipervariables (Cervantes, Mendoza, Pérez, & Pérez, 2010).

Una gran variedad de genes han resultado útiles como dianas moleculares en los estudios filogenéticos o taxonómicos de distintos géneros y especies de microorganismos, siendo el análisis del ARNr 16S el más importante. Debido a sus características de elevada conservación se lo considera como un marcador inicial y en varios casos se establece como un marcador suficiente para la identificación precisa (Clarridge, 2004).

Los métodos moleculares solventan algunas de las limitaciones que presentan las pruebas bioquímicas, sin embargo su aplicación no es universal, debido a que para su implementación requiere de un costo mayor y un alto grado de especialización por parte de los técnicos que lo realizan, razón por lo cual suelen estar centralizados en laboratorios o centros de referencia y reservados para estudios relevantes (Bou, Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009).

### **1.4.3. Métodos basados en Proteómica**

La proteómica constituye el estudio y caracterización de un conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Es considerado como un sistema avanzado derivado de la investigación molecular, que está en auge debido a su alta especificidad, pero es poco accesible debido a sus costos, motivo por el cual no fue posible utilizarlo en la actual investigación. Las técnicas de proteómica utilizadas frecuentemente se basan en los procesos de electroforesis y principalmente en la espectrometría de masas (Bou, Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009). La espectrometría de masas es una

técnica analítica que permite determinar con un porcentaje muy elevado de precisión la composición de diferentes elementos químicos existentes en una muestra de determinado microorganismos, al admitir la cuantificación de iones derivados de moléculas y separándolos en base a la relación masa/carga (Anhalt, 2011).

### **1.5. Identificación molecular de microorganismos**

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la caracterización de nuevos microorganismos, acerca de los cuales no se tenía información debido a que las técnicas tradicionales no permitieron su cultivo e identificación. (Jan & LeBorgne, 2001). La identificación molecular de bacterias emplea técnicas modernas que están basadas en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos en forma directa o de una muestra que contenga el microorganismo en cuestión, considerando la estructura, composición y ordenamiento de dichos ácidos, a diferencia de las técnicas tradicionales que estaban basadas en caracteres morfológicos, fisiológicos y estructurales. En la actualidad las técnicas moleculares tienen una gran aceptación debido a su sensibilidad, especificidad, rapidez y facilidad para ser automatizadas (Rodríguez-Herrera, y otros, 2009).

Las técnicas moleculares emplean los RFLP's o Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción para determinar las diferencias entre especies, basándose en la hibridación de ADN. Mediante la extracción ADN de un cultivo bacteriano puro o bien de una muestra infectada, la cual es tratada con enzimas de restricción con la finalidad de fragmentar el ADN en sitios específicos, para posteriormente separar estos fragmentos de ADN en un gel de agarosa mediante la técnica de electroforesis, debido a la diferencia

en tamaño y peso se evidenciará la diferencia en la migración de partículas (Mazzota, 2000). La etapa final del proceso consiste en el análisis de las secuencias obtenidas mediante programas bioinformáticos, comparándolas con bases de datos existentes identificando patrones de caracteres comunes y el estableciendo residuos de correspondencia entre secuencias. (Rozo & Franco, 2011).

### **1.5.1. Metagenómica**

Los métodos utilizados habitualmente no permitían el estudio de consorcios bacterianos como los obtenidos en la presente investigación, ya que requerían el aislamiento previo de las bacterias para poder identificarlas, mientras que las técnicas moleculares permiten investigar las poblaciones microbianas sin la necesidad de realizar aislamientos, evitando así los inconvenientes que pueden producirse durante el cultivo de los microorganismos (Chan, Wolf, Hepperle, & Casper, 2002). El desarrollo de la metagenómica ha contribuido a solventar estos inconvenientes, ya que permite el estudio de los genomas de comunidades enteras de microorganismos, en este caso consorcios bacterianos que presentaron inconvenientes para ser aislados. De esta forma la metagenómica constituye una herramienta de mucha utilidad y hace posible la elaboración de bibliotecas genómicas en las que se incluye muestras complejas de numerosos microorganismos (ArgenBio, 2007). Esta metodología persigue el aislamiento del material genético, su manipulación y estudio con el objetivo de construir genotecas de ADN, en las cuales quedará almacenada la información genética del estudio realizado, enriqueciendo el conocimiento de la elevada biodiversidad existente (Alguacil, 2010).

### **1.5.2. Filogenia mediante el gen rRNA 16S**

El gen 16S rRNA es considerado un marcador universal, utilizado como diana en estudios de identificación molecular bacteriano que permite una interpretación cuantitativa y directa (Mauricio & Herrera, 2012). Funciona como un cronómetro molecular, por presentar un elevado grado de conservación, manteniéndose bastante uniforme a lo largo de la evolución, y siendo poco afectado por las presiones ambientales y con una función esencial en la síntesis de las proteínas (Le-Borgne, 2009).

El ARNr 16S es un polirribonucleótido presente en la subunidad 30S del ribosoma celular bacteriano. Está codificado por el gen rrs o ARN ribosómico ARNr 16S, el cual cumple una función similar al gen ARNr 18S en células eucariotas. La secuencia del gen ARNr 16S tiene una longitud de 1.500 pb aproximadamente, caracterizada por la presencia de regiones variables especie-específicas y compuesta de 9 zonas variables, que van desde V1-V9 y zonas conservadas. Las zonas variables, ubicadas entre las zonas conservadas son analizadas para realizar una taxonomía comparativa que permita la identificación de los microorganismos (Bou, Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009).

La amplificación del fragmento de ARNr 16S se consigue mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), utilizando un termociclador a temperaturas y tiempos determinados para cada microorganismo y usando Primers específicos. Como sustrato se recurre habitualmente a ADN purificado a partir de un cultivo puro del microorganismo investigado (BIOTED, 2009).

Actualmente, los estudios relacionados a los patrones y procesos ecológico-evolutivos se desarrollan mediante el uso de marcadores moleculares altamente específicos,

determinándose la variación genética existente entre individuos, especies y poblaciones. Estos marcadores son segmentos de ADN que proporcionan valiosa información sobre la variación alélica y permiten al investigador determinar los rasgos distintivos entre individuos (Schlötterer, 2004).

Se han desarrollado diferentes métodos para realizar el proceso de extracción de ADN, entre los más utilizados se encuentran los métodos de ebullición, lisis alcalina, acetato de potasio, bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) y fenol-cloroformo (Fraga, Rodríguez, Fuentes, Castex, & Fernández-Calienes, 2004). En la presente investigación se empleó el método de fenol-cloroformo, debido a que es una técnica que posibilita la recuperación con un alto rendimiento de plásmidos de origen ambiental, de gran tamaño y ocasiones portadores de genes de resistencia a antibióticos (Chaves, 2003).

Para la amplificación del gen ribosomal 16S (16S ADN<sub>r</sub>) se realiza una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguida de 25 ciclos, una desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 50°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min y se utiliza los cebadores universales: Eubac 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Dunbar, Takala, Barns, Davis, & Kuske, 1999).

### **1.5.3. Secuenciación de nueva generación (NGS)**

La secuenciación consiste en determinar con exactitud la disposición de los nucleótidos (A, G, C y T) que conforman un oligonucleótido o secuencia corta de ADN. Se lo realiza mediante métodos Bioquímicos y moleculares, poniendo a disposición la información genética heredable de un organismo (Ingenieriagen, 2014). El método convencional

empleado para la secuenciación fue propuesto por Sanger, pero a pesar de los grandes logros obtenidos mediante este método y su importante rol durante el desarrollo de la era genómica, en la actualidad está siendo reemplazado por tecnologías denominadas de “nueva generación” que se caracteriza por obtener fragmentos (reads) pequeños, pero brinda una secuenciación rápida y de menor costo. La tecnología ideada por Sanger, tiene la limitación de solo poder realizar 96 o 384 reacciones en paralelo, ocasionando que la secuenciación mediante esta técnica sea costosa y el tiempo de obtención de resultados sea mayor en comparación a las tecnologías de nueva generación NGS (Rodríguez & Armengol, 2012).

Mediante la NGS es posible la secuenciación del genoma humano completo, de un organismo o de consorcios totales presentes en la muestra (Ogiza, Gamba, & Pereda, 2014). Estas secuencias aisladas obtenidas requieren el empleo de tecnología informática de última generación para su ensamblaje. La detección de variantes genéticas a partir de datos de NGS consiste en identificar diferencias en la secuencia de ADN de un individuo al compararlo con un ADN de referencia, esta información ayudará a la construcción de librerías de ADN. Los resultados obtenidos mediante NGS dependen forzosamente de la calidad del alineamiento y ensamblaje respecto a la referencia ya que las secuencias alineadas incorrectamente pueden producir falsos positivos y las secuencias no alineadas pueden ser fuente de falsos negativos (Rodríguez & Armengol, 2012).

Principalmente son tres las tecnologías de NGS utilizadas por la comunidad científica. Aunque existen otras tecnologías de secuenciación denominadas de segunda generación, ninguna de ellas ha demostrado obtener resultados prominentes como las siguientes instrumentos: 454 GS FLX de Roche, Genome Analyzer o HiSeq de Illumina y SOLiD

de Life Technologies. Estos instrumentos han sufrido considerables mejoras, han aparecido versiones de equipos de NGS con características limitadas en cuanto a su capacidad de secuenciación y su rendimiento. Algunos equipos que se puede mencionar son: equipos 454 GS Junior de Roche, MiSeq Personal Sequencer de Illumina e Ion Torrent de Life Technologies (Rodríguez & Armengol, 2012).

### **1.5.3.1. Tecnología de Secuenciación**

Para el desarrollo de esta investigación se empleó la tecnología GS FLX que es un método de secuenciación de nueva generación basado en la pirosecuenciación, la cual se fundamenta en el monitoreo en tiempo real de la síntesis de ADN (Medmol, 2009). Este tipo de secuenciación tiene un tiempo de ejecución de aproximadamente 10 horas, una potencia de  $5 \times 10^6$  pb y se puede ejecutar a partir de diversos tipos de ácidos nucleicos, como ADN genómico, cDNA, productos de PCR o BAC's. Las muestras analizadas primero deben ser reducidas a una librería de fragmentos de aproximadamente 200-800pb. Los fragmentos se adieren a adaptadores y se acoplan a nanoesferas y la secuenciación produce por síntesis de la cadena complementaria a la cadena molde gracias a la DNA polimerasa. El proceso de amplificación de fragmentos se efectúa en las propias nano-esferas (se considera como una nano-PCR). La identificación de las secuencias se realiza por un procedimiento basado en la pirosecuenciación, que es propicio para la re-secuenciación de genomas completos o de regiones diana, por lo cual es muy útil en procesos de identificación molecular (Ogiza A. , y otros, 2010).

### **1.5.3.2. Análisis Bioinformático**

El análisis bioinformático comprende el hallazgo de similitudes estructurales y funcionales, así como las incompatibilidades entre múltiples secuencias biológicas. Este proceso se lo puede realizar comparando la secuencia de interés (secuencia desconocida o en estudio) con las secuencias ya estudiadas y registradas en bases de datos y analizando sus variaciones (Rozo & Franco, 2011). Para este proceso se hace uso de algoritmos matemáticos, de manera que se pueden comparar entre múltiples secuencias biológicas en un tiempo corto. Para el análisis se realiza en primer lugar la alineación de las secuencias, determinándose de forma rápida cuales son secuencias repetitivas y cuales son distintas, para posteriormente realizar la búsqueda de patrones de carácter común y la identificación de residuos de correspondencia entre las secuencias relacionadas. Las especies emparentadas mostrarán gran similitud en cuanto a sus secuencias, por lo cual es preferible obtener secuencias largas que contengan regiones conservadas y regiones variables que permitan realizar una taxonomía comparativa e identificación, de forma que todos los grupos genómicos presentes sean identificados (Rozo & Franco, 2011).

## 2. MARCO METODOLÓGICO

### 2.1. Muestreo

La investigación se realizó a partir de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas. Se tomó 750 mL de agua de cada muestra en frascos estériles de color ámbar para evitar reacciones químicas en la muestra por efecto de la luz, se seleccionó seis sitios aleatorios de la industria de acuerdo a las etapas del proceso productivo conforme a la metodología propuesta por IDEAM (2007). Se consideró aguas sin tratamiento, con tratamiento primario, con tratamiento biológico, aguas después del proceso de clarificación (a la salida de dos clarificadores) y agua de lluvia.

Se recolectó 750 mL de aguas contaminadas de seis puntos aleatorios en cada etapa del proceso productivo de una industria hidrocarburífera, como se muestra a continuación:

**Tabla 1.** Localización de procedencia de las muestras de aguas contaminadas obtenidas de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas - Ecuador

Código	Fecha	Muestra	Sitio de Recolección
Re01	01/08/2015	Re 1.1	Salida del clarificador 1
Re02	01/08/2015	Re 2.1	Salida del clarificador 2
Re03	01/08/2015	Re 3.1	Inicio del Tratamiento Biológico
Re04	01/08/2015	Re 4.1	Agua con Tratamiento Primario
Re05	01/08/2015	Re 5	Agua sin Tratamiento
Re06	01/08/2015	Re 6	Agua de lluvia (cunetas de carretera)

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

## **2.2. Obtención de consorcios bacterianos**

La obtención de consorcios microbianos fue realizada por un equipo de trabajo del proyecto “Influencia de la temperatura y concentración de la fuente de carbono en la capacidad biorremediante de *Pseudomonas* spp., frente a cadmio y plomo” en los Laboratorios de Microbiología del Campus Sur de la Universidad Politécnica Salesiana. Para ello se empleó medio de cultivo agar Cetrimida y se agregó los metales: arsénico (10 ppm), cadmio (2 ppm), cromo (50 ppm) y plomo (100 ppm), concentraciones basadas en los límites de descarga a un cuerpo de agua dulce, establecidos en la tabla 10, anexo 1 del libro VI del “Texto unificado de legislación ambiental secundario” (MAE, 2015). Se realizó la siembra por duplicado, colocando 1 mL de muestra en cajas Petri sobre el medio de cultivo Cetrimida mediante la técnica descrita por Bailón, Cruz, & Cervantes (2003). Se incubó a 37 °C y se efectuó el control de crecimiento a las 24, 48 y 72 horas.

Se determinó la morfología y coloración de las colonias bacterianas, reportándose el tipo de borde, forma, superficie, color e intensidad de dicha coloración. Se observó microscópicamente la morfología celular, el tipo de agrupación y el tipo de tinción Gram: positiva (violeta) o negativa (roja) mediante la metodología propuesta por Buritica, Castañeda, Medina, & Vargas (2013). Se realizó resiembra de colonias a las 72 horas. Para la cuantificación de la concentración bacteriana se empleó técnicas de nefelometría con el equipo Levibond TurbiDirect SN 14/2285 y turbidimetría considerando la escala de McFarland de acuerdo a la metodología propuesta por Cabezas (2013).

### **2.2.1. Selección de condiciones para el crecimiento de consorcios bacterianos**

Para determinar las condiciones óptimas (temperatura y tipo de medio de cultivo) para el crecimiento de los consorcios bacterianos estudiados, se realizó el cultivo utilizando cuatro tipos de medios de cultivo: Caldo de cultivo mínimo, elaborado a base de levadura (4%), sacarosa (5%) y sulfato de sodio (1%); Agar Nutritivo comercial, elaborado a base de extracto de carne al 3% y peptona al 5%; Agar Cetrimida, constituido por polvo Cetrimida Agar Base al 45,3%; Plate Count Agar (PCA), elaborado con polvo PCA (23,5%). Los cuatro medios fueron diluidos en agua destilada, agitados y calentados hasta su ebullición mediante una plancha, se autoclavó los medios a una temperatura de 121°C durante 15 min y dispensados; para el caso del caldo de cultivo mínimo se colocó 250 mL de medio en matraces Erlenmeyer, mientras que para el caso de los medios Agar Nutritivo, Cetrimida y PCA se dispensó 25 mL en cajas Petri y 15 mL en tubos de ensayo con tapa rosca debidamente esterilizados. Se incubó las muestras durante tres días a tres diferentes temperaturas; 4°C, 36°C y temperatura ambiente, la cual oscilaba entre los 15 y 22°C, para determinar la influencia de la temperatura en el crecimiento de los consorcios bacterianos (Iañez, 1998).

### **2.2.2. Pruebas de sensibilidad a metales pesados**

Con el objetivo de determinar el efecto que produce la concentración de metales en el crecimiento de los consorcios bacterianos, se efectuaron pruebas de sensibilidad a metales, mediante la técnica de siembra en medio sólido (agar Cetrimida) y en medio líquido (Caldo de cultivo mínimo) con metales, los cuales fueron preparados de la misma forma que se describe en la sección 2.2.1. Tanto en medio sólido como líquido se utilizó como concentración inicial de cada metal: arsénico (10 ppm), cadmio (2 ppm), cromo (50 ppm)

y plomo (100 ppm). Se realizó ensayos aumentando la concentración 10 y 100 veces en caldo de cultivo mínimo, debido a que agar Cetrimida no solidifica al trabajar con elevadas concentraciones de estos metales. Los metales fueron añadidos después de esterilizar y dispensar los medios, con la finalidad de evitar la evaporación de los mismos. Para mantener las condiciones de esterilidad, los metales fueron depurados a través de un filtro de 0,5 micras antes de ser añadidos. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 72 horas y se monitoreó el crecimiento cada 24 horas (Cultek, 2006).

Para medir la disminución en la concentración de los metales se utilizó las siguientes concentraciones iniciales de cada metal: cadmio (0,2, 2 y 20 ppm), cromo (2, 25 y 50 ppm) y plomo (2, 10 y 20 ppm). Se midió la concentración final de cada metal con el método de espectrofotometría de absorción atómica mediante el equipo y lámparas Varian SpectrAA. Se realizó la respectiva curva de calibración para cada metal, se agitó la muestra mediante un agitador de tipo vórtex y se cuantificó la cantidad de metal residual de cada metal después de las 72 horas de incubación. No fue posible medir la cantidad de arsénico mediante espectrofotometría con el equipo utilizado debido a la ausencia de una lámpara necesaria para cuantificar este metal, por lo cual se utilizó el kit Lovibond Test Arsénico (altamente sensible) No. 400700, basado en la medición con varillas analíticas que contienen bromuro de mercurio (II) y forman halogenuros pardoamarillos mixtos de arsénico y mercurio, los cuales pueden medirse por comparación visual con una escala colorimétrica (Lovibond, 2012).

### 2.2.3. Diseño experimental

Para el análisis de crecimiento y remoción de metales, se utilizó un Diseño de Bloques Completamente al Azar DBCA de acuerdo a la metodología propuesta por Echavarría (2009). Se trabajó con 25 tratamientos por triplicado, es decir 75 unidades experimentales. Para los primeros 12 tratamientos se sembró los consorcios bacterianos utilizando los medios de cultivo: caldo de cultivo mínimo, agar nutritivo, Cetrimida y PCA, a tres diferentes temperaturas (4°C, 25°C y 37°C). Los siguientes 12 tratamientos se efectuaron sembrando los consorcios en caldo de cultivo mínimo con cada uno de los cuatro metales a tres diferentes concentraciones: arsénico (10, 100 y 1000 ppm), cadmio (2, 20 y 200 ppm), cromo (50, 500 y 5000 ppm) y plomo (100, 1000 y 10000 ppm). Finalmente se realizó 1 tratamiento control sin metales. Como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Tratamientos para el análisis de crecimiento y remoción de metales de consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas - Ecuador

Tratamiento	Descripción	Tratamiento	Descripción	Tratamiento	Descripción
<b>T1:</b>	PCA: 4°C	<b>T10:</b>	Agar Nutrit: 4°C	<b>T19:</b>	Cromo 500ppm
<b>T2:</b>	PCA: 25°C	<b>T11:</b>	Agar Nutrit: 25°C	<b>T20:</b>	Plomo 1000ppm
<b>T3:</b>	PCA: 37°C	<b>T12:</b>	Agar Nutrit: 37°C	<b>T21:</b>	Arsénico 1000ppm
<b>T4:</b>	Caldo: 4°C	<b>T13:</b>	Arsénico 10ppm	<b>T22:</b>	Cadmio 200ppm
<b>T5:</b>	Caldo: 25°C	<b>T14:</b>	Cadmio 2ppm	<b>T23:</b>	Cromo 5000ppm
<b>T6:</b>	Caldo: 37°C	<b>T15:</b>	Cromo 50ppm	<b>T24:</b>	Plomo 10000ppm
<b>T7:</b>	Cetrimida: 4°C	<b>T16:</b>	Plomo 100ppm	<b>T25:</b>	Control (sin metales)
<b>T8:</b>	Cetrimida: 25°C	<b>T17:</b>	Arsénico 100ppm		
<b>T9:</b>	Cetrimida: 37°C	<b>T18:</b>	Cadmio 20ppm		

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

### **2.2.3.1. Análisis de varianza**

Los efectos de las diferentes variables aplicadas fueron evaluados mediante el análisis de varianza, con el uso del programa informático R-Project versión 3.2.3. 2015. Se realizó una prueba de Tuckey al 5%, el cual es un método basado en la comparación entre medias para determinar el consorcio bacteriano que presentó mayor disminución de metales. Además se realizó un ANOVA, utilizando una prueba de dos vías con dos factores (factor 1: tipo de medio de cultivo y temperatura; factor2: metal y concentración), para determinar si la acción de una sola variable manipulada o la interacción entre las mismas es la responsable de los cambios significativos en los resultados.

Se considera que un valor de significancia menor a 0.05 permite rechazar la hipótesis nula, que establece para este caso, que las medias de los 25 tratamientos evaluados son iguales y aceptar la hipótesis alternativa es decir que al menos uno de los tratamientos realizados produce cambios significativos en cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de crecimiento y disminución de metales de los consorcios bacterianos estudiados (Barón & Téllez, 2005).

### **2.3. Crioconservación**

Con el objetivo de mantener el material celular de los consorcios estudiados, se crioconservó muestras por duplicado de cada consorcio. Las muestras se encuentran almacenadas en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana. El proceso de crioconservación con glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  permite mantener material biológico viable y de calidad. Para llevarlo a cabo se preparó suspensiones con los

consorcios bacterianos con una concentración aproximada a  $7.5 \times 10^8$  UFC/ml, determinada mediante escala de Mc Farland. Se colocó 100  $\mu$ l de cultivo bacteriano en suspensión en un en 1 mL de agar Cetrimida. Se agregó 100  $\mu$ l de glicerol al 10% y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , de acuerdo a la metodología propuesta por Sánchez & Corrales (2005).

#### **2.4. Extracción y purificación del ADN genómico de bacterias.**

Para la extracción de ADN genómico bacteriano se utilizó el método propuesto por Ausubel, y otros (1989). A partir de 1,5 mL de cultivo centrifugado a velocidad máxima y resuspendido en buffer Tris-EDTA (TE). El proceso de lisis celular fue inducido con dodecilsulfato sódico SDS al 10% y se trató la muestra con proteinasa K y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. A continuación se trató con NaCl/CTAB previamente calentado a  $65^{\circ}\text{C}$ . Se añadió cloroformo / alcohol isoamílico 24:1. Formándose una emulsión. Después de centrifugar por 5 min a 12000 rpm, se tomó la fase superior, se agregó fenol cloroformo alcohol isoamílico. Se añadió isopropanol para provocar la precipitación de ADN y se lavó con etanol 70%. Finalmente la muestra fue guardada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se resuspendió la muestra en TE y se trató con 1 $\mu$ L de solución de Rnasa a 10mg/mL. La muestra fue incubada a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 min (Ausubel, y otros, 1989).

Para la visualización se utilizó un gel de agarosa ultra pura 0,8%, en una solución tampón TBE (1X) y con 10  $\mu$ L de SYBR safe. En el primer pocillo del gel se colocó 8  $\mu$ L de marcador de peso molecular TrackIt 100bp DNA Ladder, en los siguientes pocillos se colocó muestras de 15  $\mu$ L, compuestas por 5  $\mu$ L de ADN y 10  $\mu$ L de Blue Juice 8x. Se

realizó la corrida con un Voltaje de 90V durante 40 min y se visualizó mediante el fotodocumentador, utilizando el programa GelCapture.

#### **2.4.1. Cuantificación de ADN Bacteriano**

Para evaluar la calidad de la muestra de ADN obtenida, se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm utilizando el equipo NanoDrop. Se limpió el dispositivo con 2  $\mu$ L agua de PCR y el lente objetivo con 2  $\mu$ L de TE. Se colocó una alícuota de 2  $\mu$ L de ADN y el programa informático determinó la relación 260/280. Se seleccionó las bacterias con valores entre 1,8 y 2 para realizar la secuenciación, debido a que se consideran de mayor pureza (Rada & Taboada, 1998).

#### **2.5. Amplificación del fragmento 16S y Secuenciación**

Se seleccionaron las mejores muestras en base al porcentaje de disminución de metales, para el proceso de secuenciación, el cual fue realizado en la empresa MacroGen-Korea, donde se empleó el secuenciador GS FLX serie Titanium. La tecnología se fundamenta en el monitoreo en tiempo real de la síntesis de ADN (Medmol, 2009).

El proceso inicia con obtención de librerías genómicas de fragmentos monocatenarios, para ello se realiza la fragmentación de ADN mediante un proceso físico denominado nebulización, cortando el ADN en fragmentos de 200 a 800 pb de longitud, a los cuales se agrega adaptadores A y B (con secuencias de hibridación) en sus extremos. El adaptador B permite la unión del fragmento a la librería por su extremo 3', gracias a que se encuentra biotinado, lo cual permite la inmovilización debido a la afinidad de la estreptoavidina por la biotina (Life Sequencing, 2008).

Para el proceso de amplificación, las esferas se introducen en una emulsión de agua y aceite de forma que cada esfera quede dentro de una gota con todos los reactivos y las enzimas necesarias para la PCR, en este caso se utilizó los primers 27F y 1492R específicos para el fragmento 16S ARNr. Se obtuvo un amplicón con cada secuencia de la librería repetida numerosas veces. Cada amplicón fue colocado en un pocillo que contenía enzimas Sulfurilasa y Luciferasa, se colocó las muestras en el secuenciador, se realizó el vertido con los nucleótidos y un lavado en forma cíclica hasta completar la síntesis de secuencias complementarias a la cadena molde gracias a la acción de la ADN polimerasa (Medmol, 2009). El secuenciador recogió los patrones luminosos generándose los respectivos pirogramas. Para el procesamiento de datos se utilizó el programa Roche GS FLX software (v 3.0), obteniéndose las secuencias de nucleótidos para su posterior análisis bioinformático (MACROGEN, 2016).

## **2.6. Análisis Bioinformático**

Para analizar las secuencias obtenidas se utilizó el programa bioinformático Geneious R9.1.4 (Biommatter Ltd. 2005-2012), disponible en la web mediante licencia temporal. Este programa permitió procesar las secuencias contenidas en los archivos entregados por la empresa Makrogen-Korea, los cuales estaban disponibles en formato .qual y formato FastaQ. Se eliminó las secuencias de tamaño menor a 300 pb debido a que no contienen la suficiente información para la identificación bacteriana. Se escogió como referencia una secuencia de longitud mayor a 500 pb para elaborar un marco de referencia. Se ordenó las secuencias de acuerdo a su tamaño, se agrupó los fragmentos que presentaban tamaño

y sucesión de nucleótidos similares, obteniéndose una secuencia consenso. Se realizó el BLAST de una secuencia de cada grupo. Este proceso permite determinar el nivel máximo de identidad, establecer el grado de similitud y la posibilidad de homología entre secuencias (Cañizares & Blanca, 2015).

Se utilizó el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que realiza una comparación con la base de datos de nucleótidos desarrollada por el NCBI (National Center for Biotechnology Information), evaluándose la tendencia de los valores de QC (100%), E-Value ( $\leq 0$ ) e Ident (100%), considerándose para la identificación que un porcentaje de similitud del  $\geq 95$  al 99% define un género y una similitud del  $\geq 98,5\%$  define una especie (Bou, Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009). Las mismas secuencias fueron enviadas a la empresa World Fusion US, Inc, en la cual se realizó el análisis bioinformático utilizando BLAST con las condiciones de identificación: E-value  $\leq 1.0E-30$  e Identity (%)  $\geq 95\%$ . Los resultados obtenidos en los dos procesos fueron comparados para determinar la clasificación taxonómica de los microorganismos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Descripción macro y microscópica de los consorcios bacterianos

A partir de la selección realizada se obtuvieron cinco consorcios bacterianos, los cuales fueron observados mediante el microscopio. La formación de consorcios bacterianos se debe a que este tipo de bacterias presentan un estilo de vida sintrófico o sinérgico que permite el flujo cíclico de nutrientes de forma más efectiva y eficiente que en poblaciones individuales, por lo tanto los microorganismos no se desarrollaron con la misma eficacia de forma individual, justificándose los inconvenientes para aislar bacterias puras (López, Domínguez, & García, 2007).

Las características macroscópicas son similares para los cinco consorcios microbianos, las diferencias más notorias se presentan a nivel microscópico. Los resultados nos muestran que existió predominancia de bacilos Gram negativos (forma alargada y coloración rojiza), aislados y formando cadenas. En tres de las muestras se encontró además cocos Gram positivos (forma circular y coloración morado-azulada) en asociación con estas bacterias.

De acuerdo las características observadas se asoció los microorganismos estudiados con familias y géneros conocidos. Dentro del grupo de microorganismos con forma de bacilo Gram negativo los principales representantes pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* (Algorta & Schelotto, 2006). En cuanto a las bacterias con forma de cocos Gram positivos, los géneros más representativos los constituyen *Staphylococcus*, *Planococcus*, *Stomacoccus* y *Micrococcus*, pertenecientes a

la familia *Micrococaceae*, además de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* (Quispe & Castillo, 2014).

Los cinco consorcios bacterianos presentaron una morfología similar de las colonias, con forma circular, convexa y con bordes definidos, se observaron diferencias en su coloración. En base a estas características se asoció los consorcios bacterianos con géneros representativos. Las principales bacterias que presentan forma circular, convexa, bordes definidos y coloración blanquecina-amarillenta son las pertenecientes a los géneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*. Las colonias con forma circular, convexa, bordes definidos y coloración verdosa son características distintivas del género *Pseudomonas* (Calle, 2012).

Se evidenció concentraciones bacterianas similares para cuatro consorcios: ReO3As1 ( $1,46 \times 10^{-8}$  ufc), ReO6Cr1(2)A ( $1,52 \times 10^{-8}$  ufc), ReO6Cd1B ( $1,16 \times 10^{-8}$  ufc) y ReO4Pb2(1)A ( $1,70 \times 10^{-8}$  ufc). Solamente el consorcio ReO3As1A presentó una concentración bacteriana inferior a los demás consorcios ( $4,37 \times 10^{-7}$  ufc). Es importante considerar que la remoción se correlaciona de manera directamente proporcional con el crecimiento bacteriano, de acuerdo a lo mencionado por Araujo, y otros, (2006).

Las características macro y microscópicas registradas se detallan en la Tabla 3. Las imágenes de los consorcios en comparación con imágenes bibliográficas de referencia pueden observarse en el Anexo 1.

**Tabla 3.** Descripción macro y microscópica de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas - Ecuador

Código de la bacteria	Morfología	Tinción Gram	Agrupación	Morfología de la Colonia	Turbidez / Concentración
<b>ReO3As1</b>	Cocos; Bacilos	Positivos; Negativos	Cadenas y aislados	Circular, convexas, bordes definidos, Coloración verdosa-amarillenta, brillante.	88,6 NTU $1,46 \times 10^{-8}$ ufc
<b>ReO6Cr1(2)A</b>	Bacilos	Negativos	Cadenas y aislados	Circular, convexas bordes definidos, Coloración crema verdosa, brillante.	92,3 NTU $1,52 \times 10^{-8}$ ufc
<b>ReO6Cd1B</b>	Cocos; bacilos	Negativos	Aislados	Circular, convexas, bordes definidos, Coloración crema, opaca	69,2 NTU $1,16 \times 10^{-8}$ ufc
<b>ReO3As1A</b>	Cocos; Bacilos	Positivos; Negativos	Cadenas y aislados	Circular, convexas, bordes definidos, Coloración crema verdosa, opaca	22,8 NTU $4,37 \times 10^{-7}$ ufc
<b>Re04Pb2(1)A</b>	Bacilos	Negativos	Cadenas y aislados	Circular, convexas, bordes definidos, Coloración crema verdosa, brillante.	103,6 NTU $1,70 \times 10^{-8}$ ufc

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

### 3.3. Análisis de crecimiento en diferentes medios y temperaturas

Existieron notorios contrastes al utilizar distintos medios de cultivo y temperaturas para el crecimiento de consorcios bacterianos. Los resultados presentados en la Tabla 4. nos indican que el caldo de cultivo mínimo y el agar Cetrinida resultaron ser los medios óptimos para el crecimiento de las bacterias consideradas en el estudio porque permitieron el crecimiento de los cinco consorcios bacterianos. Esto se debe a que el agar Cetrinida contiene peptona de gelatina y el caldo mínimo levadura, componentes que favorecen el crecimiento microbiano.

Además, los microorganismos como *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Pseudomonas* tienen poca exigencia nutricional, generalmente crecen en medio a base de agar con Soya-Tripcaseína, Caldo Nutritivo, Agar Cetrimida y medio a base de Agar con sangre, caldo Casoy, entre otros (Merino, 2007).

El medio de cultivo PCA no fue apropiado para el crecimiento de las bacterias estudiadas, en concordancia con los ensayos realizados por Korshohn & Sogaard (1987), que manifiestan que en agar PCA los microorganismos aerobios muestran un crecimiento reducido. En Agar Nutritivo se produjo el crecimiento de solamente dos de los cinco consorcios bacterianos (ReO6Cr1(2)A y ReO4Pb2(1)A ), lo cual indica que no fue conveniente para las bacterias presentadas, a pesar de tratarse de un medio utilizado para el crecimiento de bacterias medianamente exigentes respecto a requerimientos nutritivos (Vorquímica, 1981).

Las temperaturas aplicadas no constituyeron un factor que altere en gran medida los resultados, únicamente en el consorcio ReO6Cd1B se evidenció que los microorganismos no presentaron crecimiento a 4°C en ningún medio, lo cual se atribuye a que a temperaturas inferiores al rango de tolerancia, las bacterias reducen la velocidad de crecimiento y los periodos de latencia tienden a alargarse (Madigan, y otros, 2004).

**Tabla 4.** Análisis de crecimiento de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas

Código de la bacteria	PCA: 4°C	PCA: 25°C	PCA: 37°C	Caldo: 4°C	Caldo: 25°C	Caldo: 37°C	Cetri-mida: 4°C	Cetri-mida: 25°C	Cetri-mida: 37°C	Agar Nut: 4°C	Agar Nut: 25°C	Agar Nut: 37°C	Σ
ReO3As1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	6
ReO6Cr1(2)A	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
ReO6Cd1B	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	4
ReO3As1A	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	6
ReO4Pb2(1)A	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9

(Presencia = 1; ausencia = 0)

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

### 3.4. Pruebas de sensibilidad a metales

La prueba de sensibilidad se realizó utilizando caldo de cultivo mínimo e incubación a 37°C, debido a que estas condiciones permitieron el crecimiento de los cinco consorcios bacterianos y el medio de cultivo líquido permitió cuantificar en el espectrofotómetro la cantidad existente de cada metal.

Los promedios de disminución de metales de cada consorcio se encuentran en un rango de 1,6% a 27,39% (Tabla 5.), estos valores son muy variables de acuerdo al consorcio bacteriano utilizado. En cuanto a los promedios de disminución para cada metal: cadmio (18,54%), cromo (17,14%) y plomo (19,42%), se afirma que estos valores están muy próximos a los porcentajes obtenidos al aplicar otros organismos biorremediadores como lechuga y pasto ryegrass que superan ligeramente el 20% (Lora & Bonilla, 2010).

**Tabla 5.** Disminución de la concentración de metales de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas

Código de la bacteria	∅ final 1 Cd (ppm)	Cd 1 (%)	∅ final 2 Cd (ppm)	Cd 2 (%)	∅ final 3 Cd (ppm)	Cd 3 (%)	Prom Cd (%)	∅ final 1 Cr (ppm)	Cr 1 (%)	∅ final 2 Cr (ppm)	Cr 2 (%)	∅ final 3 Cr (ppm)	Cr 3 (%)	Prom Cr (%)	∅ final 1 Pb (ppm)	Pb 1 (%)	∅ final 2 Pb (ppm)	Pb 2 (%)	∅ final 3 Pb (ppm)	Pb 3 (%)	Prom Pb (%)	Prom. Total Dismin. (%)
ReO3As1	0,17	13,33	1,57	21,67	18,95	5,27	13,42	8,90	11,00	19,27	22,93	34,67	30,67	21,53	1,37	31,67	8,03	19,67	13,83	30,83	27,39	20,78
ReO6Cr1(2)A	0,14	30,00	1,28	36,17	17,43	12,83	26,33	8,67	13,33	21,83	12,67	37,60	24,80	16,93	1,53	23,33	9,13	8,67	14,57	27,17	19,72	21,00
ReO6Cd1B	0,14	28,33	1,50	25,00	18,47	7,67	20,33	8,80	12,00	19,63	21,47	32,77	34,47	22,64	1,63	18,50	8,40	16,00	15,31	23,47	19,32	20,77
ReO3As1A	0,17	13,33	1,75	12,67	19,23	3,87	9,96	9,93	0,67	24,70	1,20	48,43	3,13	1,67	1,85	7,67	9,23	7,67	17,80	10,98	8,77	6,80
Re04Pb2(1)A	0,15	26,67	1,32	34,00	18,53	7,33	22,67	9,17	8,33	18,83	24,67	32,13	35,73	22,91	1,57	21,67	8,33	16,67	14,53	27,33	21,89	22,49
							18,54							17,14							19,42	18,37

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

Se muestra que el consorcio Re04Pb2(1)A tiene un porcentaje de disminución superior a los demás consorcios (22,49%), seguido por el consorcio ReO6Cr1(2)A con 21%, el consorcio ReO3As1 con 20,78%, el consorcio ReO6Cd1B con 20,77% y finalmente el consorcio ReO3As1A que presentó un porcentaje notoriamente inferior de 6,80%. Estos valores de disminución pueden atribuirse al tipo de bacteria y a su elevada concentración, que influye en gran medida en los procesos de biorremediación aumentando los porcentajes de remoción (Araujo, y otros, 2006).

La disminución de metales presentada se puede atribuir a las diversas interacciones metal-microorganismo existentes, que cumplen funciones de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados. Los microorganismos pudieron realizar dos posibles transformaciones, que dependen de factores como el estado de oxidación del metal y de las especies que conforman los consorcios. La primera vía de transformación se relaciona a la movilización del metal conocida con el término de biolixiviación y la segunda corresponde a la inmovilización del mismo. Los microorganismos resistentes a metales pesados poseen propiedades que emplean en mecanismos de inmovilización de metales pesados que incluyen: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimisorción, según la ruta metabólica que caracterice a los microorganismos presentes. Para conocer con exactitud cuál de estos procesos fue responsable de la remoción de metales, se debe realizar análisis químicos de residuos metálicos en la biomasa, estudios de nano partículas empleando columnas de lecho fijo o estudios de expresión genética relacionada a los genes presuntamente responsables de la biorremediación (Marrero-Coto, Díaz-Valdivia, & Coto-Pérez, 2010).

Los resultados de remoción de arsénico presentados permiten afirmar que los consorcios bacterianos redujeron la cantidad de arsénico en el medio. Los consorcios ReO3As1 y ReO4Pb2(1)A presentaron una mayor disminución de arsénico (Tabla 6), pero los valores obtenidos en esta prueba no presentan un alto grado de sensibilidad comparado con los datos registrados por espectrofotometría, por lo tanto no son considerados en el análisis estadístico. Los valores de arsénico (inicial y residual) observados en la escala colorimétrica son presentados en la siguiente tabla:

**Tabla 6.** Análisis de disminución de arsénico de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas - Ecuador

Código de la bacteria	As [] inicial ppm	As [] final ppm
ReO3As1	0,25	0,05
ReO6Cr1(2)A	0,25	0,10
ReO6Cd1B	0,25	0,10
ReO3As1A	0,25	0,10
ReO4Pb2(1)A	0,25	0,05

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

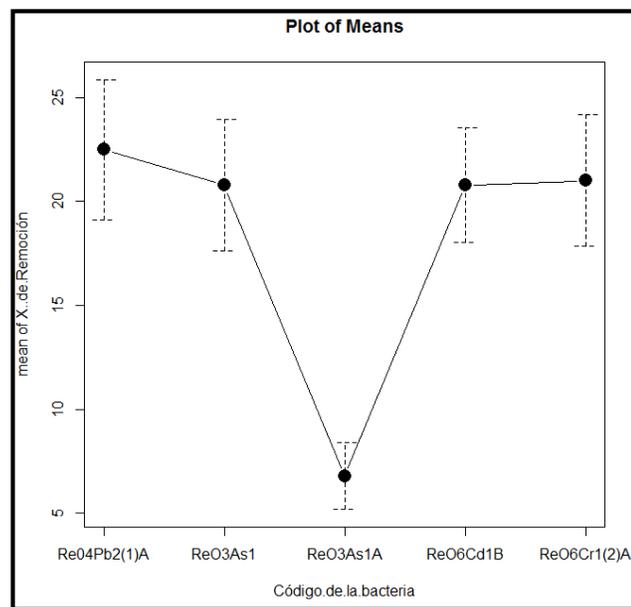
### 3.5. Análisis Estadístico

La prueba de Tuckey al 0,05 pone en evidencia dos grupos con diferencias significativas ( $p=0,004371$ ) (Anexo 3.). En el primero se agrupan los consorcios: ReO3As1, ReO6Cr1(2)A, ReO4Pb2(1)A y ReO6Cd1B, presentando porcentajes similares de disminución de metales, y el segundo grupo conformado únicamente por el consorcio

Re03As1A (Figura 1.), debido a que presentó porcentajes inferiores de disminución de metales.

El Análisis estadístico multivariado estableció que no existe diferencia significativa entre la remoción de metales, presentándose un valor p de 0,07425;  $R^2$  igual a 0,2161 y un error standard de 8,962 con 30 grados de libertad (Anexo 3).

**Figura 1.** Análisis multivariado en relación a la disminución de metales de cinco consorcios bacterianos provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas – Ecuador



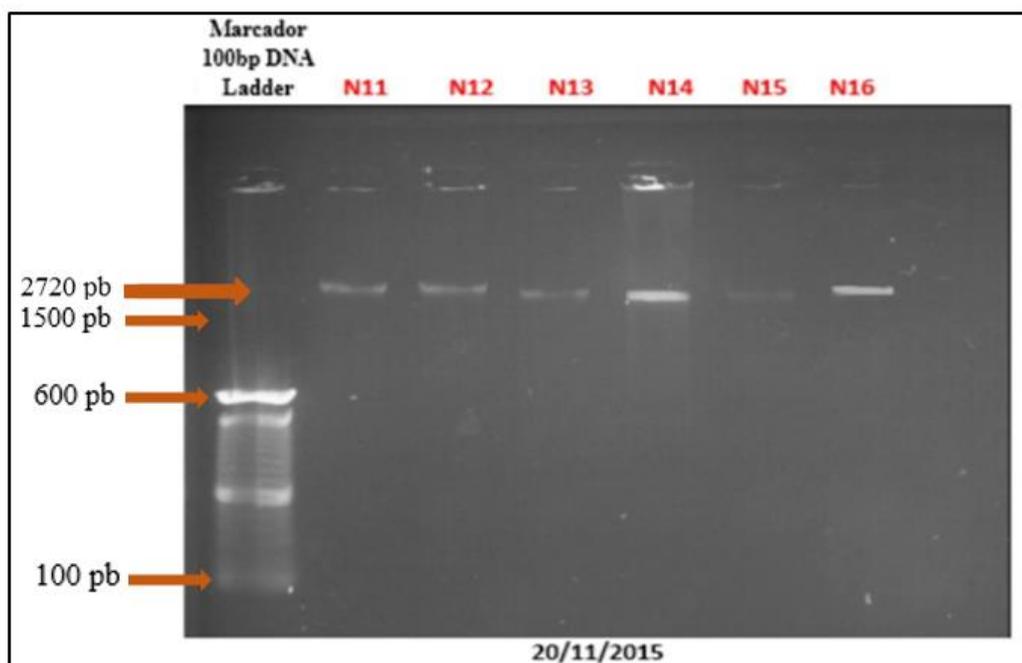
Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

De acuerdo a los resultados presentados se estableció que el consorcio Re03As1A presenta bajos porcentajes de disminución de metales (promedio 6,8%), mientras que el consorcio ReO6Cd1B no presenta crecimiento a bajas temperaturas (4 °C). Por este motivo fueron descartados para la extracción de ADN.

### 3.5. Extracción de ADN

El método aplicado en la extracción de ADN de los consorcios ReO3As1, ReO6Cr1(2)A y ReO4Pb2(1)A fue efectivo. Se obtuvo un ADN de buena calidad, al no presentar degradación evidente en el gel de electroforesis (Figura 2), presentándose una sola banda con peso superior a 2000 pb para cada consorcio.

**Figura 2.** Extracción de ADN de consorcios bacterianos en gel de agarosa



Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

La concentración de ADN registrada en el consorcio ReO6Cr1(2)A fue notoriamente mayor (1396,08 ng/ $\mu$ l) con una relación 260/280 de 2,01, el consorcio ReO3As1 presentó una concentración de 187,31 ng/ $\mu$ l con relación 260/280 de 1,65 y el consorcio ReO4Pb2(1)A una concentración de 136,48 ng/ $\mu$ l y una relación 260/280 igual a 1,66 (Tabla 7). Se desarrolló la medición con longitudes de onda 260 nm y 280 nm debido a que las proteínas tienen una absorbancia máxima a 280 nm y el DNA presenta un máximo

de absorción a 260 nm. Los valores registrados en los tres consorcios se aproximan al rango 1,8 – 2, considerado de elevada pureza (Rada & Taboada, 1998).

**Tabla 7.** Resultados de la cuantificación por medio del equipo NanoDrop

Código	User ID	Ext. Code	Date	Time	Concent. (ng/μl)	A260	A280	260/280
ReO3As1	Default	N14	10/12/2015	9:45	187,31	3,75	2,27	1,65
ReO6Cr1(2)A	Default	N7	10/12/2015	9:50	1396,07	27,92	13,92	2,01
Re04Pb2(1)A	Default	N16	10/12/2015	9:35	136,48	2,73	1,64	1,66

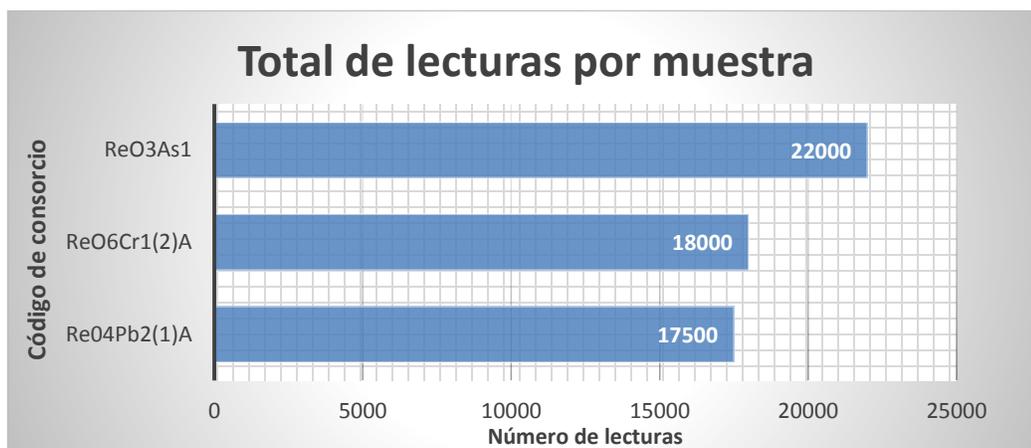
Nota: Datos obtenidos en el equipo NanoDrop, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2015.  
Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016.

### 3.6. Secuenciación

Se obtuvieron librerías genómicas de tipo Amplicon library(Lib-L) con concentraciones de:  $8,32 \times 10^{10}$  moléculas/μl en el consorcio Re06Cr1(2)A,  $3,81 \times 10^{10}$  moléculas/μl en el consorcio Re04Pb2(1)A y  $5,75 \times 10^{10}$  moléculas/μl en el consorcio ReO3As1. Se generaron amplicones con un tamaño de 600 pb para las tres muestras.

Se registró un total de lecturas de 22000 en el consorcio ReO3As1, 18000 en el consorcio ReO6Cr1(2)A y 17500 en el consorcio Re04Pb2(1)A (Figura 3.), relacionados a la cantidad de clones producidos en función de las cadenas moldes. Los amplicones generados en el proceso de amplificación contienen cada una de las secuencias de las librerías genómicas repetidas n cantidad de veces, por lo tanto mientras más grande sea el tamaño de las librerías existirá hasta un 99% de probabilidad de encontrar el fragmento de interés (Paredes & Yugsi, 2016)

**Figura 3.** Total de lecturas por muestra analizada

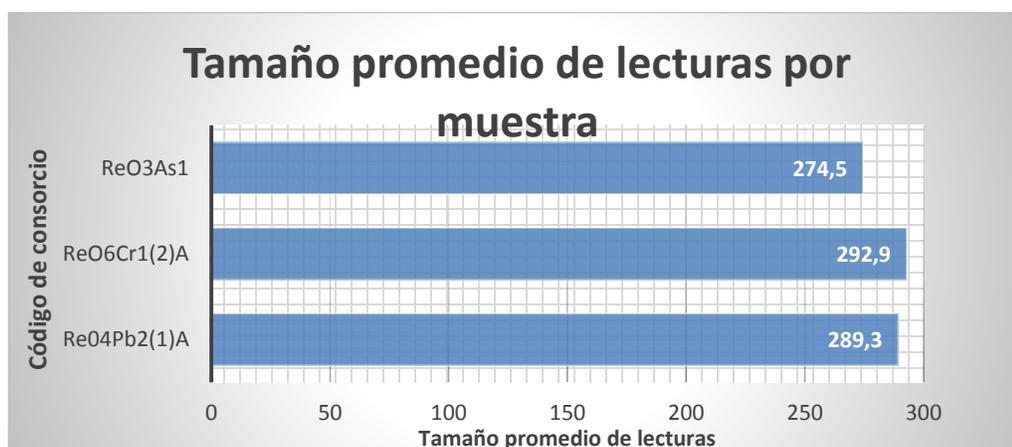


Nota: Obtenido del reporte FLX Raw Data generado por Macrogen, 2015.

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016.

Las secuencias obtenidas presentaron un tamaño promedio de 274,5 pb en el consorcio ReO3As1, 292,9 pb en el consorcio ReO6Cr1(2)A y 289 pb en el consorcio ReO4Pb2(1)A (Figura 4.). Para su análisis fue necesario descartar las secuencias con tamaños menores a 300 pb, teniendo en consideración que las secuencias de tamaño entre 300 y 600 pb permiten una identificación con similitud de  $\geq 94\%$  y las secuencias de longitud entre 600 y 825 pb permiten una similitud de  $\geq 96\%$  (Bou, Fernández, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2009).

**Figura 4.** Tamaño promedio de lecturas por muestra analizada



Nota: Obtenido del reporte FLX Raw Data generado por Macrogen, 2015.

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016.

### 3.7. Análisis de Secuencias

De acuerdo al BLAST realizado de las secuencias consenso se determinó que el consorcio ReO4Pb2(1)A podría estar conformado por varias especies del género *Pseudomonas* (Query Cover (QC) de 99% e Ident 98%). No se logró la identificación a un nivel taxonómico más específico debido a que existieron coincidencias para distintas especies de *Pseudomonas* con los mismos valores de QC e Ident (Figura 5.). Al comparar los resultados con el reporte del BLAST realizado por World Fusion US con un filtro E-value  $\leq 1.0E-30$  e Identity  $\geq 95\%$  (Anexo 5.), se confirma el género *Pseudomonas* y se establece una elevada probabilidad ( $>95\%$ ) de relacionar la especie con *Pseudomonas aff. chengduensis*.

**Figura 5.** Resultados del análisis de BLAST en función de las secuencias consenso para el consorcio Re04Pb2(1)A

```

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGAT
TCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAA
GGAAACGCTAAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATC
AGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAC
TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAAGTGGTCCAGACTCTACGGGAGCAGCA
GTGGGGAATGTTGGGACAATGGGGCGAAAGCCTGGATCCAGCCATGCCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGAAAAGCTAC
    
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas mendocina strain L6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gil1003108605JKT834848.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas alcaliphila strain Akq2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gil698376352IKM248330.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas nitroreducens strain S1-A5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gil430803209JKC139689.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas alcaliphila strain Akq2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gil698376352IKM248330.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chengduensis strain MBR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gil672238934INR_125523.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas plecoqlossicida strain RD_MAAMIA_05 16S ribosomal RNA gene, partial s</a>	652	652	98%	0.0	98%	<a href="#">gil985484528IKU597532.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain JMNMN2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	652	652	98%	0.0	98%	<a href="#">gil930155681IKR073007.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas parafulva strain FS04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	652	652	98%	0.0	98%	<a href="#">gil768965300IKP190118.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas plecoqlossicida strain NvZ12, complete genome</a>	652	4561	98%	0.0	98%	<a href="#">gil752308899ICP010359.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas taiwanensis strain IHB B 14565 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc</a>	652	652	98%	0.0	98%	<a href="#">gil724408580IKM817286.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas monteilii 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	652	652	98%	0.0	98%	<a href="#">gil659364974INR_121767.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas putida strain MDFPXXVIIIE319b 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc</a>	652	652	98%	0.0	98%	<a href="#">gil634225513IKJ535383.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas putida strain MDFPXXVIIIE318c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	652	652	98%	0.0	98%	<a href="#">gil634225512IKJ535382.1</a>

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

El consorcio Re03As1 podría estar conformado por individuos pertenecientes a los géneros: *Staphylococcus* y *Pseudomonas* (Figura 6.). El Blast relacionó al consorcio con las especies: *Staphylococcus aureus* con un (QC de 100% e Ident 99%), y *Pseudomonas mendocina* (QC de 100% e Ident 96%). Los resultados reportados por World Fusion US confirman la presencia de organismos de los géneros *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, además se menciona que podrían coexistir en este consorcio bacterias del género *Paracoccus* con una probabilidad mayor al 95%.

**Figura 6.** Resultados del análisis de BLAST en función de las secuencias consenso para el consorcio Re03As1

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGACGAGGAGCTTGCTCCT  
 CTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACT  
 CGGGAAACCGGAGCTAAATACCGGATAATATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGT  
 TTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAG  
 GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGA  
 CTCCTACGGGAGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGGACGAAAGCCTGACGGAGCAACG  
 CCGCGTGAGTGAT

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Staphylococcus aureus strain SAB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	694	694	100%	0.0	99%	<a href="#">gil1031204944IKX156339.1</a>

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGACGAGGAGCTTGCTCCT  
 CTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGT  
 TCCGAAAGGAAACGCTAAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCT  
 TGCGCTATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGAC  
 GATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTA  
 CGGGAGCAGCAGTGGGGAATAGTTGGACAATGAGCGAAAGCCTGATCCAGCCCATGCCCGCGT  
 GTGTGAAGAAGGTCTTCGGATT

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas sp. P65 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	636	636	100%	1e-178	96%	<a href="#">KF573429.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas mendocina strain PRM6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	636	636	100%	1e-178	96%	<a href="#">JN544146.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Pseudomonas sp. clone 5-D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	634	634	99%	4e-178	96%	<a href="#">EU305599.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas mendocina strain L6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	632	632	99%	2e-177	96%	<a href="#">KT834848.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacterium enrichment culture clone RB2LO04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	632	632	99%	2e-177	96%	<a href="#">KP684475.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured gamma proteobacterium clone Cld1-36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	632	632	99%	2e-177	96%	<a href="#">KM978312.1</a>

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

El consorcio Re06Cr1(2)A podría estar conformado por individuos del género *Pseudomonas* (QC de 99% e Ident 98% )(Figura 7.) Lo cual se confirmó al comparar los resultados con los presentados por la empresa World Fusion US (Anexo 5.). Se infirió una probabilidad mayor al 95% de relacionar la especie con *Pseudomonas aff. chengduensis*.

**Figura 7.** Resultados del análisis de BLAST en función de las secuencias consenso para el consorcio Re06Cr1(2)A

```

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAGGAGCTTGCTCCTTGATT
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGG
AACGCTAAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGAT
GAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTA ACTGGTC
TGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGT GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGCAGCAGTGGG
GAATAGTTGGGACAATGGGGACGAAAGCCTGATCCAGCCCATGCCCGCGTGTGTGAAGAAGGGTC
TTCGGATTGTA AAA
    
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas mendocina strain L6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gii1003108605IKT834848.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas alcaliphila strain Akq2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gii698376352IKM248330.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas nitroreducens strain S1-A5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gii430803209IKC139689.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas alcaliphila strain Akq2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gii698376352IKM248330.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chengduensis strain MBR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gii672238934INR_125523.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas alcaliphila strain BK-AG13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	658	658	99%	0.0	98%	<a href="#">gii604142072IKJ185384.1</a>

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

Mediante revisión bibliográfica se ha encontrado estudios que confirman la actividad biorremediadora de ciertos géneros bacterianos como *Pseudomonas* y *Staphylococcus*. De acuerdo a Escamilla & Díaz (2008), las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y *Staphylococcus* se han identificado como tolerantes a metales pesados y han desarrollado mecanismos que les permiten subsistir ante la toxicidad mediante mecanismos de tolerancia o resistencia. Los grupos de microorganismos más comprometidos con la reducción metales como cromo, plomo y mercurio son los pertenecientes a los géneros *Micrococcus* y *Pseudomonas* (Soto, Gutiérrez, Rey-León, & González-Rojas, 2010). Se ha demostrado el potencial de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y

*Micrococcus* para degradar hidrocarburos aromáticos (Bracho, Díaz, & Soto, 2004) y remediación de ambientes impactados con explosivos como TNT y PETN (García, 2011).

La sobrevivencia y la estabilidad de las bacterias es mejor cuando están presentes en cultivos mixtos es decir formando consorcios. Esto se debe a que cada cepa presenta diferencias significativas tanto fisiológicas como metabólicas trabajando en un cometabolismo, proporcionando óptimos resultados en el tema de biorremediación, se puede mencionar investigaciones como la realizada por Guevara (2010), en la cual se analizó dos consorcios bacterianos nativos en el que se integra a los géneros *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, los cuales se obtuvieron de una muestra de suelo contaminado con agua textil y se comprobó la eficacia en la remoción de cromo. En la investigación desarrollada por Muñiz (2015), se ha demostrado que las bacterias mejoran su capacidad para degradar hidrocarburos clorados al trabajar en conjunto con otras bacterias.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron cinco consorcios bacterianos adaptados a las condiciones del sector de operación de la industria hidrocarburífera de Esmeraldas, Ecuador.

El método de extracción propuesto por Ausubel permitió la obtención de ADN de buena calidad de tres consorcios bacterianos: ReO6Cr1(2)A con concentración 1396,08 ng/μl, ReO3As1 presentó una concentración de 187,31 ng/μl y el consorcio Re04Pb2(1)A una concentración de 136,48 ng/μl. El secuenciamiento de nueva generación permitió obtener secuencias de fragmentos de 600pb correspondientes al gen 16S ARNr.

Mediante el program BLAST se logró la identificación hasta género con un QC  $\geq 99\%$  y una Ident  $\geq 98\%$ . Las secuencias consenso analizadas confirmaron que los consorcios podrían estar conformados por bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, estos géneros bacterianos han demostrado previamente su eficacia en procesos de biorremediación ambiental. Los resultados reportados por World Fusion US mostraron una similitud en cuanto a identificación de géneros. World Fusion US identificó especies con un porcentaje de identidad del 95%, por lo que no se consideraron estos resultados.

Los medios óptimos para el crecimiento de las bacterias cultivadas fueron el caldo de cultivo mínimo y el Agar Cetrimida, mientras que el Agar PCA no permitió el desarrollo de los microorganismos estudiados.

Los consorcios bacterianos mostraron una elevada capacidad para disminuir la concentración de metales, con porcentajes de aproximadamente 20% de degradación, a excepción de la muestra ReO3As1A con un porcentaje de 6,8%.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar métodos de biorremediación bacteriana con los géneros *Pseudomonas* y *Staphylococcus* en aguas residuales contaminadas con metales para aprovechar su comprobada efectividad demostrada en este estudio y estudios relacionados. Se debe manipular estos microorganismos con precaución y en ambientes controlados debido a que generalmente son patógenos para los seres humanos.

Se recomienda desarrollar productos comerciales para biorremediación bacteriana y aplicar estas bacterias como consorcios, debido a que la sinergia entre estos microorganismos induce a un flujo cíclico de nutrientes y consecuentemente se promueve una mayor eficiencia energética.

Se sugiere profundizar en este estudio, mediante el método de identificación proteómica, debido a que nos permitiría conocer con mayor precisión taxonómica las bacterias analizadas, pero dicho proceso requiere mayor inversión económica.

Se propone desarrollar estudios similares en distintas industrias con elevados índices de contaminación y desarrollar programas de biorremediación mediante bacterias con la finalidad de mitigar los efectos que provocan las actividades industriales en el ambiente. Es recomendable crear en el Ecuador cryobanks con microorganismos beneficiosos que permita mantenerlos y aprovechar sus características.

## BILBIOGRAFÍA

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C., & Barberis, R. (2002). *Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles*. 119: Environmental Pollution.
- Acción Ecológica. (1999). *Acción ecológica, ALERTA #70*. Obtenido de <http://www.accionecologica.org/petroleo/refinerias/refineria-de-esmeraldas>
- Albanesi, A., & Silverman, J. (2014). *Identificación Bacteriana, Serie Didáctica*. Santiago del Estero - Argentina: FAyA - UNCE. Obtenido de <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioPruebasBioquimicas.htm>.
- Algorta, G., & Schelotto, F. (2006). Principales grupos de bacilos gramnegativos no exigentes. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 315-337.
- Alguacil, S. (2010). *Metagenómica, La microbiología del futuro*. Andalucía: Divulgación y Cultura Científica Iberoamericana.
- Anhalt, J. (2011). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*, 47:2, 19-25.
- Araujo, I., Montilla, M., Cárdenas, C., Herrera, L., Angulo, N., & Morillo, G. (2006). *Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Caracas: INCI v.31 n.4 .
- ArgenBio. (2007). *La Metagenómica*. Buenos Aires, Argentina: PQBio.
- ATSDR. (02 de 2001). <http://www.cvs.saude.sp.gov.br>. Obtenido de <http://www.cvs.saude.sp.gov.br>:  
[http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/60\)cromo.pdf](http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/60)cromo.pdf)
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., & Struhl, K. (1989). *Current protocols in molecular biology*. New York: Green Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Bailón, L., Cruz, R., & Cervantes, A. (2003). *Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificación Bacteriana*. Zaragoza: Academia.
- Barón, F., & Téllez, F. (2005). *Diferencias que presenta una variable numérica entre varios grupos*.

- Bionova. (11 de 05 de 2016). *bionova.org.es*. Obtenido de *bionova.org.es*:  
<http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema20.pdf>
- BIOTED. (2009). *PCR gen 16S ARNr bacteriano*. Madrid: Febiotec.
- Blanch, A. (2010). *Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente*. Barcelona.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez-Nieto, J., & Valdezate, S. (2009). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Madrid: ELSEVIER.
- Bracho, M., Díaz, L., & Soto, L. M. (2004). *Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela*. Maracaibo, Venezuela: Universidad del Zulia.
- Buritica, B., Castañeda, M., Medina, H., & Vargas, Y. (2013). Tinción de Gram y observación microscópica. *Academia*, Yupal, Colombia.
- Cabañero, A., Madrid, Y., & Camara, C. (2005). *Acumulación-interacción de especies de mercurio y selenio en tejidos animales: Desarrollo de nuevas metodologías de análisis*. Madrid.
- Cabezas, E. (2013). Desarrollo de un modelo de relación entre densidad óptica (método turbidimétrico) vs recuento en placa. *Academia*, 1-11.
- Cáceres, A. (2015). *Eficacia de los consorcios bacterianos y fúngicos nativos en la remoción de metales pesados por biolixiviación de los sedimentos de la laguna de colta del cantón colta*. Riobamba.
- Calle, S. (2012). *Atlas bacteriológico*. Lima: FAMV-UNMSM.
- Cantón, E., & Cercenado, R. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Madrid: Seince.
- Cañizares, J., & Blanca, J. (2015). *Alineamiento de secuencias*. Valencia: Bioinformática - UPV.
- CBTIS. (2013). Técnicas de identificación de bacterias. *MICROBIOLOGÍA*, 128.
- Cervantes, D., Mendoza, S., Pérez, T., & Pérez, N. (2010). *Identificación Molecular de Individuos*. México: UAA.

- Chan, O., Wolf, M., Hepperle, D., & Casper, P. (2002). Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificial partitioned acidic bog lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 119-129.
- Chaves, J. (2003). *Caracterización molecular del gen de la  $\beta$ -lactamasa shv-1 en Klebsiella pneumoniae*. Barcelona: IMIM - Universidad de Barcelona.
- Clarridge, J. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*, 40-62.
- Cultek. (2006). El medio de cultivo. *Soluciones y cultivos celulares: Protocolos y técnicas*, 02-04.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S., Davis, J., & Kuske, C. (1999). *Levels of bacterial diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning*. Appl. Environ MICROBIOLOGY.
- Echavarría, H. (2009). *Diseño de Bloques Completos al Azar (DBA)*. Medellín, Colombia: Unalmed.
- Escamilla, A., & Díaz, L. (2008). *Bacterias tolerantes a metales aisladas a partir de aguas naturales*. Coah, México: Laboratorio de Revaloración de Residuos, Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía, Cinvestav Saltillo.
- Fraga, J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., & Fernández-Calienes, A. (2004). *Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)*. La Habana, Cuba: Med Trop.
- García, E. (2011). *Recuperación y evaluación de la capacidad degradadora de consorcios bacterianos aislados de ambientes impactados con TNT y PETN*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Glazer, A., & Nikaido, H. (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Guevara, D. (2010). *Biorremoción de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio*. Sangolquí.

- Iañez, E. (1998). *Acción de los agentes físicos sobre las bacterias*. Chaco, Argentina: Hipertextos del área de Biología - UNNE.
- IDEAM. (2007). *Instructivo para la toma de muestras de aguas residuales*. Bogotá: SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGÍA - GRUPO LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL.
- Ingenieriagen. (2014). *ingenieriagen.weebly.com*. Obtenido de ingenieriagen.weebly.com: <http://ingenieriagen.weebly.com/la-secuenciacion-acuten-del-adn.html>
- Jaime, M., Vera, L., & Gutierrez, P. (2013). *Aislamiento de microorganismos presentes en el aire de los baños del bloque A de la Universidad el Bosque*. Bogotá, Colombia: Universidad El Bosque.
- Jan, J., & LeBorgne, S. (2001). Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. *BioTecnología*, 103-109.
- Korshohn, E., & Sogaard, H. (1987). *Colony counts in drinking water bacteriologic-importance of media and method*. 185: (1-2): Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B.
- Le-Borgne, S. (2009). *Marcadores filogenéticos alternativos al gene 16s rRNA en estudios de diversidad bacteriana*. México: XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Life Sequencing. (2008). *Preparación de la librería de DNA*. Obtenido de <http://www.lifesequencing.com/pages/protocolo-de-secuenciacion>
- López, T., Domínguez, L., & García, J. (2007). *Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción del vinagre*. México: IIX Congreso Nacional de Microscopía.
- Lora, R., & Bonilla, H. (2010). *Remediación de un suelo de la cuenca alta del río Bogotá contaminado con los metales pesados cadmio y cromo*. Bogotá: Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 13 (2): 61-70.
- Lovibond. (2012). *dl.lovibond.com*. Obtenido de dl.lovibond.com: [http://dl.lovibond.com/instructions/arsentestkit/ins\\_arsentestkit\\_es\\_lovi.pdf](http://dl.lovibond.com/instructions/arsentestkit/ins_arsentestkit_es_lovi.pdf)
- MACROGEN. (2016). *FLX Raw data report*. Korea: Macrogen Inc.

- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Brock, T., Rodríguez, C., & Sánchez, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. Murcia: Pearson Educación.
- MAE. (2015). Anexos: Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce. *Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria*, 73.
- Marin, I., Sanz, J., & Ramils, R. (2005). *Biotecnología y Medio Ambiente*. España: EPHEMERA.
- Marrero, C., Díaz, V., & Coto, O. (25 de 04 de 2016). *redalyc.org*. Obtenido de redalyc.org: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181221644010.pdf>
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). *Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones n la biorremediación*. La Habana: Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 41, núm. 1, enero-abril, 2010, pp. 67-78.
- Martínez, K., Souza, V., Bucio, L., Gómez, L. E., & Gutiérrez, M. (2013). *Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular*. Buenos Aires: Acta Toxicológica Argentina Vaol. 21(1).
- Mauricio, J., & Herrera, M. (2012). Filogenia Bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. *ARAREKO*, 1-10.
- Mazzota, G. C. (2000). *Identificación por ADN*. Mendoza, Argentina: Ediciones Jurídicas Cuyo.
- Medmol. (2009). *Pirosecuenciación*. Andalucía, España: FIBAO - Medicina Molecular.
- Merino, L. A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: una bacteria con personalidades múltiples*. Ciudad Autónoma de Buenos Aire: Rev. argent. microbiol v. 39, n. 3.
- Microbitos. (28 de 04 de 2015). <https://microbitos.wordpress.com>. Obtenido de <https://microbitos.wordpress.com>:  
<https://microbitos.wordpress.com/2015/04/28/pseudomonas-aeruginosa-p-putida-p-fluorescens-morfologia-medios-de-cultivo-enfermedades-y-mas/>
- Morgante, V., & González, J. (2010). *Identificación de nuevos mecanismos moleculares de resistencia a arsénico en microorganismos adaptados a ambientes acuáticos altamente contaminados con metales pesados*. Obtenido de <http://fundacionmapfre.com/ccm/content/documentos/fundacion/prev->

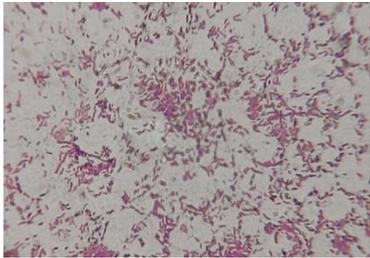
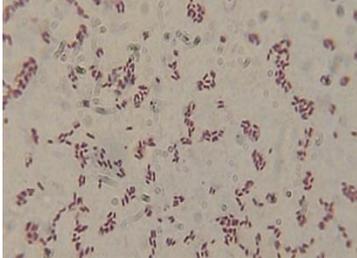
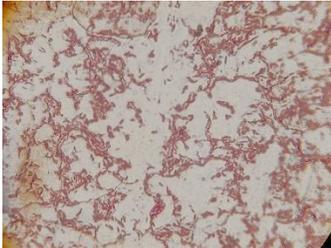
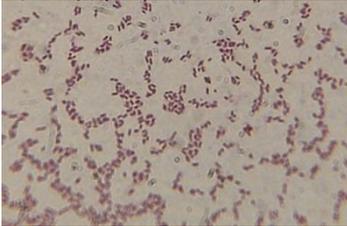
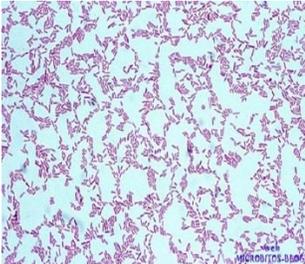
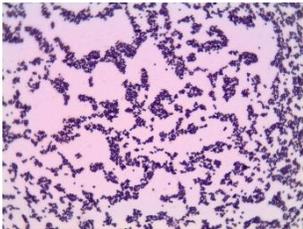
ma/proyecto/Identificacon-de-nuevos-mecanismos-moleculares-de-resistencia-a-arsenico-en-microorganismos-adaptados-a-ambientes-acuaticos-altamente-contaminados-con-metales\_pesados.pdf

- Muñiz, A. (2015). *Remediación de aguas contaminadas con hidrocarburos clorados (TCE) mediante bioaumentación y nanopartículas de hierro cero valente*. Asturias, España: Universidad de Oviedo.
- Navarrete, V., Urquiza, M., & Lucario, E. M. (22 de 04 de 2016). *iingen*. Obtenido de iingen: [http://proyectos2.iingen.unam.mx/Proyectos\\_2005\\_2006/07/7.1.3.pdf](http://proyectos2.iingen.unam.mx/Proyectos_2005_2006/07/7.1.3.pdf)
- Ochoa, D., & Montoya, A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Vol. XVIII, pág 56-57.
- Ogiza, A., Gamba, A., & Pereda, A. (2014). *www.genomamayor.com*. Obtenido de <http://www.genomamayor.com/servicios/secuenciacion-ngs/>
- Ogiza, A., Gamba, A., Pereda, A., Pérez, E., Lázaro, N., & Bettinelli, P. (2010). *Secuenciación de Nueva Generación*. Madrid: Biotecnología-Telefónica.
- Paredes, M., & Yugsi, I. (2016). *Identificación molecular de cepas de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica aisladas de pitahaya (Stenocereus queretaroensis f.a.c Weber)*. Quito: Repositorio digital - UPS.
- PQBio. (09 de 05 de 2016). *porquebiotecnologia.com.ar*. Obtenido de [porquebiotecnologia.com.ar](http://porquebiotecnologia.com.ar/): <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=46>
- Quispe, G., & Castillo, H. (2014). *Cocos Gram Positivos*. La Paz: Revista de Actualización Clínica Investiga, UMSA.
- Rada, A., & Taboada, G. (1998). Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en biología molecular. *BIOFARBO*, 63-66.
- Rodríguez, B., & Armengol, L. (2012). *Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal*. España.
- Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C., Ayala-Labarríos, L., Rocha-Revilla, J., Padilla-García, V., & Espinosa-Hernández, C. (2009). *Detección de*

- Microorganismos mediante Métodos Moleculares*. Coahuila, México: Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular. FCQ. Universidad Autónoma de Coahuila .
- Rozo, L., & Franco, J. (2011). *Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN*. Pereira, Colombia: Repositorio UTP.
- Sabalet, T. (2010). <http://fundacionio.org>. Obtenido de [http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus\\_aureus.html](http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html)
- Sánchez, L., & Corrales, L. (2005). *Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas*. Cundinamarca: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers –just a matter of fashion? *Nature Reviews*, 5: 63-69.
- Scragg, A. (2001). *Biotecnología medio ambiental*. Fishpond Australia: Acribia.
- 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*. Bogotá: Grupo de Investigación GRESIA, Universidad Antonio Nariño.
- UNAM. (2007). *Uso de Pruebas Bioquímicas y Técnicas Rápidas para la Caracterización*. México: Departamento de Biología FQUIM - UNAM.
- Valdés, V. (1999). La Contaminación por Metales Pesados en Torreón, Coahuila, México. *Texas Center for Policy Studies*, 2-5.
- Vial, C., & Enriquez, T. (05 de 2011). *slideshare*. Obtenido de slideshare: <http://es.slideshare.net/biovial09/impacto-y-repercusiones-de-la-biotecnologia-en-la-minera-a-nivel-latinoamericano-en-la-aplicacin-de-la-biolixiviacion-como-herramienta-de-la-biomineria>
- Vorquímica. (1981). *Medios de Cultivo para Microbiología*. Barcelona: ADSA = MICRO.

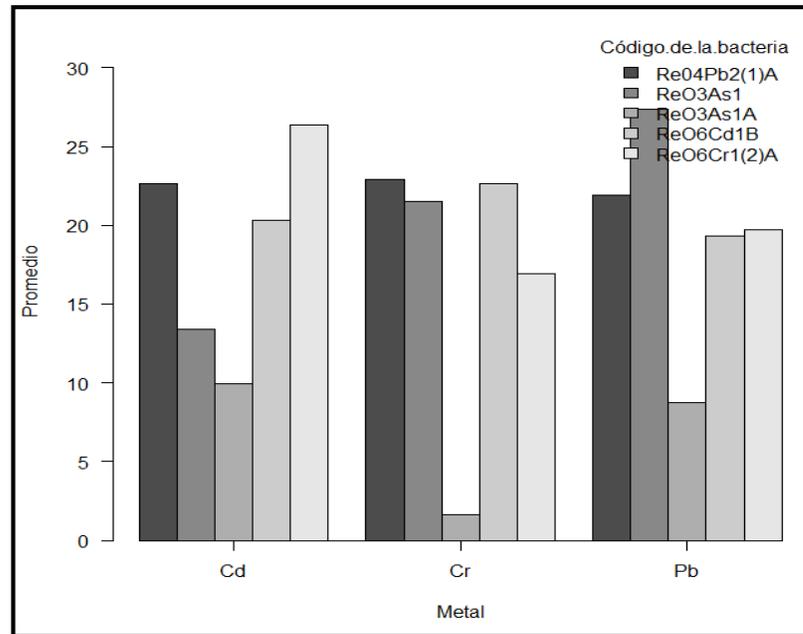
## ANEXOS

### Anexo 1. Visualización microscópica de los consorcios microbianos e imágenes bibliográficas de referencia

		
ReO3As1	ReO4Pb2(1)A	ReO6Cr1(2)A
		
ReO3As1A	ReO6Cd1B	<i>Pseudomonas sp.</i> Fuente: (Microbitos, 2015)
		
<i>Staphylococcus aureus</i> Fuente: (Sabaleta, 2010)		

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

## Anexo 2. Disminución de concentración de metales



Nota: generado en R-project

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

### Anexo 3. Resultados del análisis estadístico en R-project

```
Call:
lm(formula = remo ~ cb * m, data = a)

Residuals:
    Min     1Q  Median     3Q    Max
-15.337 -4.263  1.397  4.280 12.820

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      22.6667    5.1741   4.381 0.000133 ***
cb[T.ReO3As1]    -9.2433    7.3173  -1.263 0.216241
cb[T.ReO3As1A]  -12.7100    7.3173  -1.737 0.092650 .
```

Nota: resultados generados en R-project

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

```

cb[T.ReO6Cd1B]      -2.3333  7.3173 -0.319 0.752028
cb[T.ReO6Cr1(2)A]   3.6667  7.3173  0.501 0.619961
m[T.Cr]             0.2433  7.3173  0.033 0.973692
m[T.Pb]            -0.7767  7.3173 -0.106 0.916177
cb[T.ReO3As1]:m[T.Cr]  7.8667  10.3482  0.760 0.453071
cb[T.ReO3As1A]:m[T.Cr] -8.5333  10.3482 -0.825 0.416097
cb[T.ReO6Cd1B]:m[T.Cr]  2.0700  10.3482  0.200 0.842803
cb[T.ReO6Cr1(2)A]:m[T.Cr] -9.6433  10.3482 -0.932 0.358836
cb[T.ReO3As1]:m[T.Pb] 14.7433  10.3482  1.425 0.164558
cb[T.ReO3As1A]:m[T.Pb] -0.4067  10.3482 -0.039 0.968913
cb[T.ReO6Cd1B]:m[T.Pb] -0.2333  10.3482 -0.023 0.982160
cb[T.ReO6Cr1(2)A]:m[T.Pb] -5.8333  10.3482 -0.564 0.577145

```

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 8.962 on 30 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.4655, Adjusted R-squared: 0.2161

F-statistic: 1.866 on 14 and 30 DF, p-value: 0.07425

```
> anova(b)
```

Analysis of Variance Table

Response: remo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
cb	4	1523.91	380.98	4.7436	0.004371 **
m	2	39.75	19.88	0.2475	0.782347
cb:m	8	534.97	66.87	0.8326	0.581249
Residuals	30	2409.43	80.31		

---

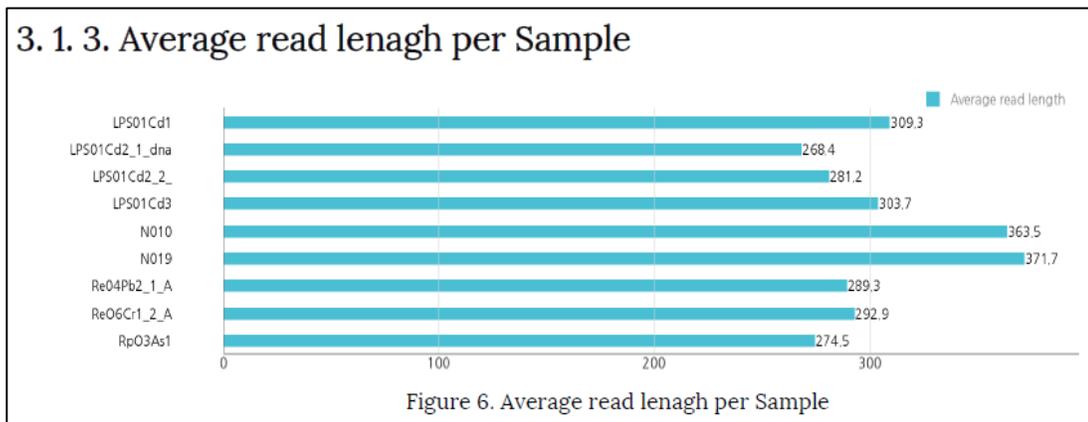
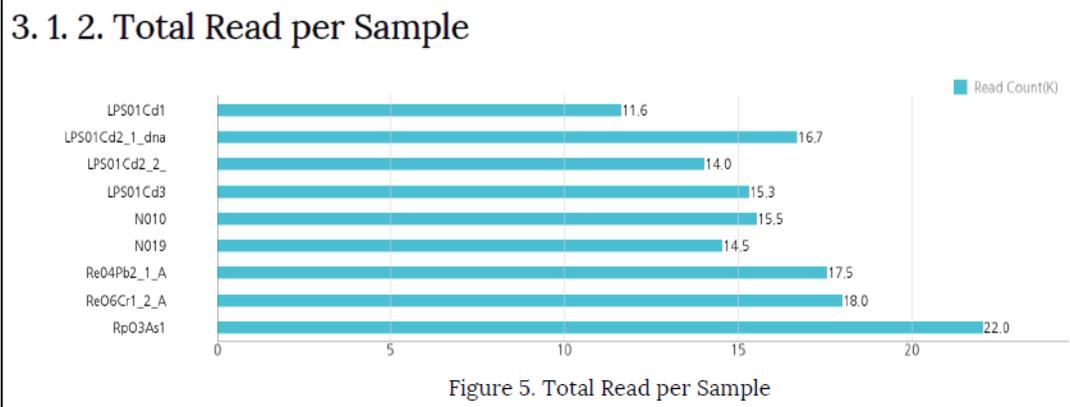
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> TukeyHSD(aov(b))
```

Nota: resultados generados en R-project

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016

## Anexo 4. Reporte de resultados de secuenciación



Fuente: (MACROGEN, 2016)

**Anexo 5.** Resultados de Análisis Metagenómico realizado por World Fusion US

Re04Pb2(1)A	Re03As1	Re06Cr1(2)A
Pseudomonas chengduensis,8385	Pseudomonas amygdali,453	Pseudomonas chengduensis,14258
Pseudomonas helmanticensis,169	Pseudomonas protegens,53	Pseudomonas amygdali,4
Pseudomonas amygdali,92	Stenotrophomonas maltophilia,19	Pseudomonas abietaniphila,1
Pseudomonas mendocina,55	Pseudomonas chengduensis,2	Not determined,3329
Pseudomonas abietaniphila,24	Pseudomonas abietaniphila,2	Unclassified hit,372
Pseudomonas jinjuensis,17	Pseudomonas pohangensis,1	No BLAST hit,23
Pseudomonas protegens,13	Pseudomonas chlororaphis,1	
Pseudomonas stutzeri,10	Pseudomonas helmanticensis,1	
Stenotrophomonas maltophilia,4	Staphylococcus haemolyticus,1	
Pseudomonas aeruginosa,3	Staphylococcus epidermidis	
Pseudomonas otitidis,2	Paracoccus marinus,1	
Pseudomonas parafulva,2	Pseudomonas aeruginosa,1	
Pseudomonas monteilii,2	Not determined,1993	
Stenotrophomonas panacihumi,2	Unclassified hit,369	
Stenotrophomonas rhizophila,1	No BLAST hit,69	
Pseudomonas pseudoalcaligenes,1		
Pseudomonas agarici,1		
Pseudomonas alcaliphila,1		
Not determined,8274		
Unclassified hit,457		
No BLAST hit,34		

Nota: Se realizó el BLAST con un filtro de E-value  $\leq 1.0E-30$  e Identity (%)  $\geq 95\%$

Elaborado por: C. Anguisaca & E. Castañeda, 2016