



FACULTAD DE CIENCIAS

**PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN
BIOLOGÍA O QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
BACTERIAS RESISTENTES A COBRE Y ARSÉNICO
AISLADAS DE LA ZONA DE PUCHUNCAVI**

**Tesis para optar al grado de
Licenciada en Ciencias Mención Biología**

PAMELA DONOSO PIÑOL

Directora de Tesis

Prof. Dra. MARCELA ZHR TAJMUCH

**Valparaíso, Chile
2013**

A mi Familia y a Gonzalo,
Muchas gracias,
Los quiero.

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a mi familia, a mis padres Daniel y Marlene por todo lo que me han dado, por siempre estar a mi lado y darme todo su apoyo. A mis hermanos Dany, Paola y Alejandra que siempre se han preocupado por mí y dado ánimos aunque sea a la distancia; y por supuesto a mis sobrinos Carlos, Fabián, Noelia, Ariel y Rafaela, que siempre logran alegrarme el día.

A Gonzalo, por apoyarme siempre en las buenas y en las malas todos estos años, muchas veces teniendo más fe en mí que yo misma, muchas gracias amor.

Agradezco especialmente a la Prof. Dra Marcela Zahr T, mi profesora guía por todo su apoyo, ánimo y paciencia al guiarme en la realización de este trabajo, muchísimas gracias. También agradezco a las profesoras Dra. M. Gabriela Lobos y Dra. Carolina Yañez, por su disposición y ayuda.

Y Finalmente agradezco a todos mis profesores que tuve a lo largo de todos estos años por brindarme sus conocimientos. A mis compañeros de laboratorio, Sebastián y Juan Pablo, y a la señora Jimena por siempre darme una mano. A mis compañeros del programa de Licenciatura, los que ya se han ido y los que aún están, en especial a Lulu, Lily, Marcela, Verónica, Valeska, Erick, Caty, Valeria, Karol y Claudia, los cuales hicieron el camino mucho más ameno.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	8
2. ABSTRACT	10
3. MARCO TEÓRICO	12
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	24
6.1 OBJETIVO GENERAL	24
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1 RE-AISLAMIENTO DE CEPAS	25
7.2 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA	25
7.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	25
7.3.1 API® 20 NE BIOMÉRIEUX®	25
7.3.2 BIOLOG®	26
7.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	26
7.4.1 EXTRACCIÓN DE DNA POR SHOCK TÉRMICO	26
7.4.2 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR DEL GEN 16S rRNA.	27
7.5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	28
7.5.1 CEPAS CONTROL	28
7.5.2 DETERMINACIÓN DE C.M.I PARA COBRE (II) Y ARSÉNICO (V)	28

8. RESULTADOS	33
8.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	33
8.1.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA	33
8.1.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS	34
8.1.2.1 API® 20 NE	34
8.1.2.2 BIOLOG® GP2/GN2 MICROPLATE™	37
8.1.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS	45
8.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	48
8.2.1 DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A COBRE POR MEDIO DE C.M.I	48
8.2.2 DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A ARSÉNICO POR MEDIO DE C.M.I	49
9. DISCUSIÓN	50
10. CONCLUSIONES	55
11. PROYECCIONES FUTURAS	56
12. REFERENCIAS	57
13. ANEXOS	63
ANEXO 1 API® 20 NE	63
ANEXO 2 SOLUCIONES COBRE	64
ANEXO 3 SOLUCIONES ARSÉNICO	65
ANEXO 4 SECUENCIAS	66
ANEXO 5 RESISTENCIA A COBRE	71
ANEXO 6 RESISTENCIA A ARSÉNICO	72

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 SOLUCIÓN FINAL COBRE	30
TABLA 2 SOLUCIÓN FINAL ARSÉNICO	31
TABLA 3 MORFOLOGÍA BACTERIANA	33
TABLA 4 CARACTERIZACIÓN DE COLONIAS	34
TABLA 5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS API 20 NE	35
TABLA 6 GP2 MICROPLATE™	37
TABLA 7 GN2 MICROPLATE™	41
TABLA 8 IDENTIFICACIÓN FILOGENETICA	46
TABLA 9 C.M.I COBRE	48
TABLA 10 C.M.I ARSÉNICO	49
TABLA 11 SOLUCIÓN STOCK COBRE	64
TABLA 12 SOLUCIONES PATRONES COBRE	64
TABLA 13 SOLUCIÓN STOCK ARSÉNICO	65
TABLA 14 SOLUCIÓN FINAL ARSÉNICO	65
TABLA 15 RESISTENCIA A COBRE	71
TABLA 16 RESISTENCIA A ARSÉNICO	72

ÍNDICE DE IMÁGENES

FIGURA 1 PUCHUNCAVÍ, REGIÓN DE VALPARAÍSO	12
FIGURA 2 PERFIL PCR	27
FIGURA 3 POSICIÓN DE CEPAS EN PLACA PARA DETERMINACIÓN CMI	31
FIGURA 4 GEL AGAROSA	45
FIGURA 5 API® 20 NE	63

1. RESUMEN

Los metales pesados y metaloides como el cobre y el arsénico, se encuentran en su forma natural a bajas concentraciones en el medio ambiente, pero debido a la actividad humana (agrícola, industrial y urbana) estos valores pueden incrementarse, lo cual puede producir efectos dañinos para todos los organismos. El cobre es un elemento esencial a bajas concentraciones y el arsénico es un metaloide no esencial, que en sus formas As(III) y As(V) puede producir efectos adversos. Ambos metales están presentes en la zona de Puchuncaví, región de Valparaíso, siendo el cobre encontrado en muy altas concentraciones, mientras que el arsénico en concentraciones ligeramente altas para estándares de suelo internacionales.

Como las bacterias son capaces de sobrevivir en sitios altamente contaminados por medio del uso de genes de resistencia a metales pesados, el objetivo de este trabajo fue caracterizar e identificar bacterias autóctonas, resistentes a cobre y/o arsénico de la zona de Puchuncaví. Para ello se estudiaron catorce cepas provenientes de esta zona, aisladas en estudios anteriores, las cuales fueron caracterizadas morfológicamente por medio del método de tinción Gram y la observación de colonias, encontrándose ocho cepas Gram negativas y seis cepas Gram positivas, tres de ellas Gram variables, todas con diferentes características en sus colonias.

Así también fueron caracterizadas bioquímicamente, por medio del kit API 20 NE de *Biomérieux* y Biolog® GN2/GP2 MicroPlate™, dando como resultados distintos perfiles bioquímicos para cada cepa. Posteriormente por medio de la amplificación del gen 16S rRNA, diez de las catorce cepas fueron identificadas molecularmente, dando como resultado distintos géneros los cuales fueron, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*; todas conocidos por poseer especies resistentes a metales.

Las catorce cepas fueron estudiadas para determinar su resistencia a Cu(II) utilizando el método de concentración mínima inhibitoria (C.M.I); donde se encontraron tres cepas resistentes a cobre 2A4, C4 y D5, con un C.M.I de 250, 275 y 200ppm respectivamente, siendo 2A4 perteneciente al género *Arthrobacter* conocido por poseer especies resistentes a metales como *Arthrobacter oxydans* y C4 al género *Pedobacter* con especies resistentes como *Pedobacter saltans*.

En el caso del arsénico diez de las catorce cepas tuvieron una tolerancia a As(V), con una concentración de 46.69mM, el máximo estudiado en este trabajo, teniendo en cuenta que a 100mM son consideradas bacterias altamente resistentes a arsénico, aunque en estudios conocidos este valor es usualmente superado.

Finalmente podemos decir que debidos a sus características morfológicas, bioquímicas e identificación molecular, todas las cepas corresponden a especies distintas aunque algunas comparten el mismo género. Siendo tres de ellas 2A4, C4 y D5 de especial interés para potenciales estudios sobre genes de resistencia a cobre y biorremediación de suelos contaminados.

2. ABSTRACT

Heavy metals and metalloids such as copper and arsenic are found in their natural form at low concentrations in the environment, but because of human activity (agricultural, industrial and urban) these values may be increased, which could produce harmful effects on all organisms. Copper is an essential element at low concentrations and arsenic is a metalloid nonessential, than in their As (III) and As (V) forms can cause side effects. Both metals are present in the zone of Puchuncaví, Valparaíso region, and copper being found in very high concentrations, while arsenic in slightly higher concentrations for international standards of soil.

Because the bacteria are able to survive in highly contaminated sites through the use of genes for resistance to heavy metals, the objective of this study was to characterize and identify indigenous bacteria resistant to copper and/or arsenic on the area of Puchuncaví. For this fourteen strains from this area were studied, isolated in previous studies, which were morphologically characterized by the method of Gram staining and observation of colonies, finding eight strains Gram negative and six strains Gram positive, including three Gram variables, all with different characteristics in their colonies.

Thus also were characterized biochemically, using the API® 20 NE kit of Biomérieux and Biolog® microplate GN2/GP2™, giving as results different biochemical profiles for each strain. Subsequently by means of amplification of 16S rRNA gen, ten of the fourteen strains were identified phylogenetically, resulting in different genus which were, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*; all known to possess metal resistant species.

The fourteen strains were tested for resistance to Cu (II) using the method of minimal inhibitory concentration (M.I.C); where three copper-resistant strains 2A4, C4 and D5 with a M.I.C of 250, 275 and 200 ppm respectively were found, being 2A4 belonging to the genus *Arthrobacter* species known to possess resistant metals such as *Arthrobacter oxydans* and C4 to the genus *Pedobacter* with a species resistant *Pedobacter saltans*. In the case of arsenic ten of the fourteen strains had a tolerance to As (V), with a concentration of 46.69mM, the maximum studied in this work, considering that at 100mM are considered highly arsenic resistant bacteria, in known studies although this value is usually overcome.

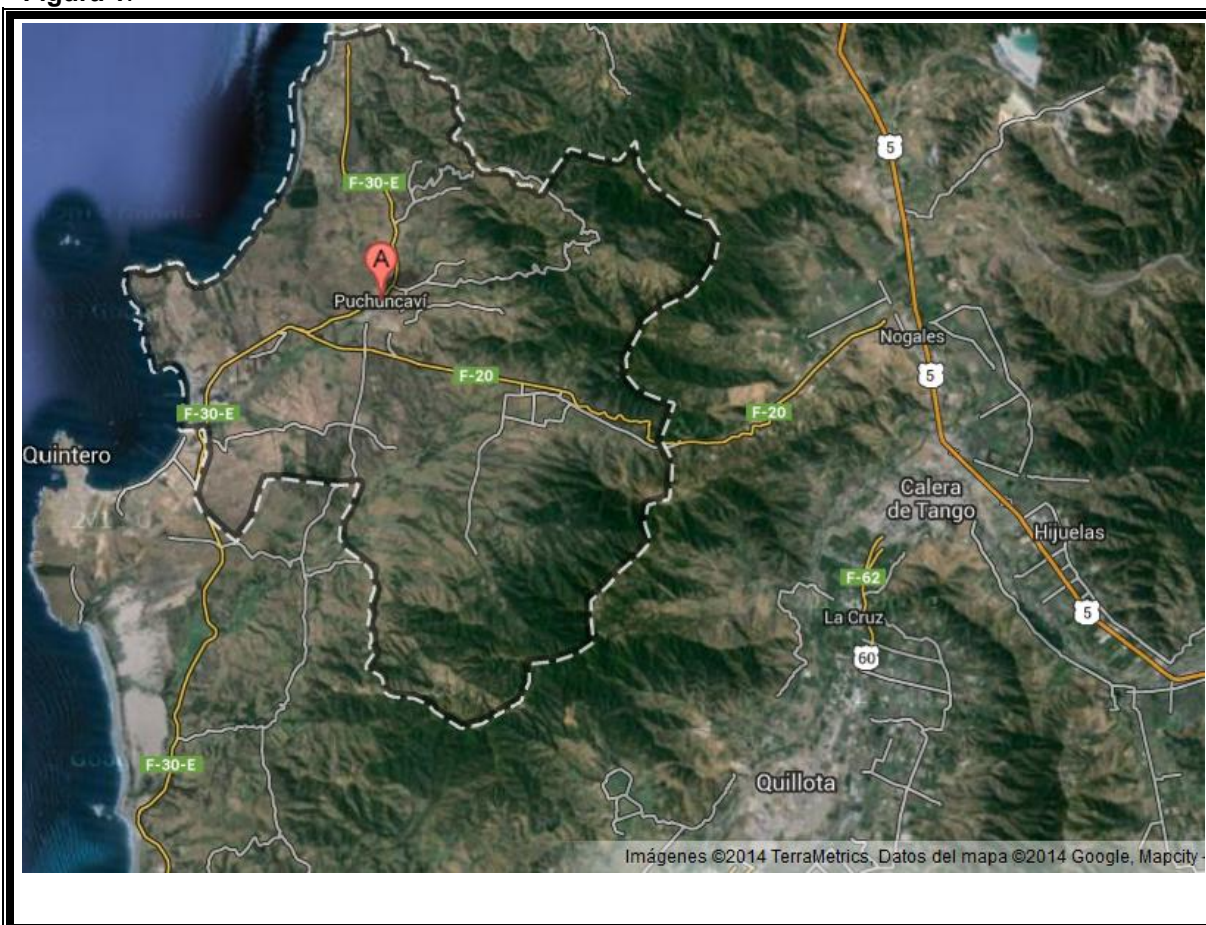
Finally we can say that due to their morphological, biochemical and molecular identification, all strains belong to different species although some share the same genus. Three of them being 2A4, C4 and D5 of special interest to potentials studies on copper resistance genes and bioremediation of contaminated soils.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes Generales

Debido a las cercanías de las industrias; los suelos del Valle de Puchuncaví (Fig.1) se encuentran afectados por más de treinta años de emisiones atmosféricas provenientes de la fundición de Ventanas. Estas emisiones contienen dióxido de azufre (SO_2) y material particulado rico en Cu, Pb, Zn y As. Los suelos actualmente son ácidos y presentan altas concentraciones de metales pesados (Muena et al.2010), por lo cual pone en gran riesgo la salud pública de la población ya que esta, se encuentra cerca de la zona urbana, así también como la actividad agrícola que se produce en el sector, la cual es de gran importancia para la región de Valparaíso.

Figura 1.



Puchuncaví, región de Valparaíso.

Fuente Google Earth.2014

3.2. Metales pesados

Metales pesados es un término colectivo general, el cual se aplica a un grupo de metales y metaloides con una densidad atómica mayor a 4000kgm^{-3} o 5 veces mayor que el agua. (Hashim et al.2011).

Los metales pesados, pueden ser esenciales y no esenciales para los organismos vivos. Los metales pesados esenciales: son aquellos que son necesarios en pequeñas cantidades para funciones vitales fisiológicas y bioquímicas. Un ejemplo de ellos fierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn) y níquel (Ni).

Los metales pesados no esenciales: como arsénico (As), no son necesarios para cualquier función fisiológica o bioquímica (Hazrat et al. 2013).

Mientras que algunos metales pesados son importantes y esenciales a niveles trazas, en los microorganismos producen efectos negativos a altas y bajas concentraciones.

Como se sabe, los metales pesados están presentes en forma natural en el medio ambiente, pero sus concentraciones se encuentran frecuentemente elevadas por la contaminación, introducida por diferentes causas antropogénicas, debido a intensas actividades industriales, la minería, fundiciones, disposición de lodos de aguas residuales, aplicación de pesticidas, fertilizantes inorgánicos y emisiones atmosféricas. También se sabe que muchas operaciones de minería y fundiciones, complejos industriales y sitios de tiro contienen metales muy tóxicos, como Cadmio (Cd), Plomo (Pb), y Arsénico (As) (Gülten et al. 2011).

A diferencia de las sustancias orgánicas, los metales pesados son no biodegradables por lo cual se acumulan en el medio ambiente, constituyendo un peligro ambiental persistente, La acumulación de metales pesados en los suelos y en el agua plantea un riesgo para la salud humana y medio ambiental (Margesin et al.2011; Hazrat et al. 2013).

3.2.1 Efectos de los metales pesados sobre los suelos.

Lo primero que se debe saber es que el suelo no solo es un depósito geoquímico para contaminantes, sino también una barrera natural para el transporte de materiales químicos y elementos a la atmósfera, hidrósfera y biomasa, por lo tanto es el componente más importante de la biosfera.

El contenido de metales en los suelos es la combinación de metales derivados de actividades antropogénicas y procesos naturales. La adición del metal antropogénico a los suelos puede llegar a ser mayor que la contribución de metales desde fuentes naturales. El mayor impacto importante de la contaminación de suelos en la salud medioambiental es que los contaminantes de los suelos pueden ser introducidos a las cadenas alimenticias ya que se pueden acumular en los sistemas biológicos y ser introducidos en la red vía diferentes mecanismos, como por medio de las plantas por uso directo o por animales alimentándose de ellas (Chien et al.2008).

La actividad industrial y agrícola puede afectar la salud de los seres vivos y el medio ambiente por medio de la toxicidad de estas sustancias, por ejemplo la acumulación de metales pesados en el crecimiento de las plantas en la capa superficial del suelo. De hecho; vegetales y frutas pueden contener elevados niveles de metales pesados, siendo consumida directamente por animales y seres humanos (Puyen et al.2012; Gülten et al. 2011, Qihong et al.2014).

Se debe tener en cuenta en especial los metales pesados como el cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn) contaminan suelos agrícolas y sus cultivos (frutas, granos y vegetales). El cadmio en particular constituye un mayor problema en las naciones industrializadas, dado que su presencia en el medio ambiente causa un mayor daño a la salud pública. Estos elementos se acumulan en los tejidos de organismos vivos (bioacumulación) y su concentración incrementa mientras pasan desde niveles tróficos bajos a niveles tróficos altos (biomagnificación). En los suelos, los metales pesados causan efectos toxicológicos en los microorganismos, lo cual puede llevar a una disminución en su número y actividades. (Hazrat et al. 2013; Nithya et al. 2011)

La toxicidad de los metales pesados sobre la comunidad microbiana de suelos también ha reportado la inhibición de la biodegradación de contaminantes orgánicos en sitios

contaminados. El efecto agudo de los metales pesados en la comunidad microbiana parece liderar a un subsecuente cambio en los microorganismos hacia una población con mayor tolerancia a metales o resistente a metales. En sitios crónicamente contaminados, por selección natural, el resultado debería ser una comunidad predominantemente tolerante a metales, al causar considerables modificaciones en los microorganismos y sus actividades ya que pueden llegar a utilizarlos para su crecimiento (Harichová et al.2012; Nithya et al.2011).

Un alto CEC (cation exchange capacity ó capacidad de intercambio catiónico) fomenta a los metales a enlazarse con agregados del suelo, dependiendo de los contenidos de la materia orgánica y arcilla. Un alto pH mejora la disociación de los ácidos orgánicos y así también la formación de complejos con metales, alterando la especiación de metales y reduciendo su biodisponibilidad como la de Cu, Zn y Fe debido a la precipitación, y previniendo que las plantas y organismo en el medio no lo consuman. En el caso del cobre; un bajo pH, bajo CEC y poca materia orgánica, puede hacerlo móvil y potencialmente biodisponible (Mackie et al.2012; Andreatza et al.2010).

Y si bien la biodisponibilidad permite que estas bacterias resistentes a metales puedan usar el metal, también contribuye a una mayor contaminación en el ambiente.

El fenómeno de difusión de contaminantes a través de las capas de suelo y el cambio en la movilidad de los metales pesados en acuíferos con la introducción de contaminantes orgánicos están siendo profundamente investigados en los últimos años. (Hashim et al. 2011)

3.2.2 Cobre

El cobre (Cu), es un elemento traza esencial para los organismos, por su rol en un gran número de procesos biológicos, sirviendo como co-factor para numerosas enzimas. Puede ser tóxico, ya que en altas concentraciones citoplasmáticas puede competir con otros metales para sus sitios de unión en las proteínas, dando lugar a proteínas disfuncionales (Altimira et al 2012; Besaury et al.2013; Andreatza et al.2010; Seeley et al. 2012).

Elevados niveles de cobre en fuentes naturales e industriales han sido reportados en varios países productores de cobre como Chile, China, Rusia, Zambia y Australia. La acumulación de cobre puede producir efectos dañinos en el suelo bacteriano dañando los procesos biológicos y la calidad del suelo (Altimira et al.2012).

Un bajo pH es considerado con regularidad el factor de influencia más crítico en la solubilidad del cobre en solución de suelo. El cobre inmovilizado no está biodisponible y puede ser absorbido o precipitado en la matriz del suelo, el cual es predominantemente catiónico, naturalmente atraído por cargas negativas de minerales de arcillas, sales aniónicas, materia orgánica, hidróxidos, fósforos, y sulfatos así también formando complejos. (Mackie et al.2012)

Se ha visto que el cobre total ha inducido un efecto tóxico en organismos con una cantidad mínima de 55mg/Kg (55ppm). Las altas concentraciones de cobre decrecen la población normal de microorganismos en los suelos y promueve la resistencia microbiana al cobre en ambientes contaminados. (Andreazza et al. 2010; Mackie et al. 2012).

3.2.3 Arsénico

En el caso del arsénico (As), es un elemento inocuo generalizado en el medio ambiente, su presencia en los suelos puede estar relacionada con el sustrato geológico, lo que implica que se puede encontrar en una amplia gama de concentraciones en suelos no contaminados. Antecedentes de concentraciones en suelos de arsénico son típicamente por debajo de 15 mgkg⁻¹, pero pueden exceder 2000 mgkg⁻¹ en algunas zonas contaminadas (Jackson et al. 2009; Larios et al. 2012).

En las últimas décadas, arsénico se convirtió en un grave problema ambiental debido a su alta toxicidad, movilidad y bioacumulación. El arsénico inorgánico (As) se encuentra altamente disponible a causa de procesos mineros, agrícolas e industriales, considerados como las principales fuentes de contaminación de arsénico y metales pesados en el suelo. En el pasado el arsénico se utilizaba ampliamente para la preparación de insecticidas y pesticidas. En 1955, la producción mundial de arsénico blanco fue 37.000 toneladas. Sabiendo esto, se dice que el arsénico es uno de los contaminantes más abundantes en el mundo, clasificado como cancerígeno según la Organización Mundial de

la Salud (OMS). (Marabottini et al.2013; Mandal et al. 2012; Ramirez-Andreotta et al. 2013; Drewniaka et al. 2013; Hartley et al.2013).

Las formas de arsénico presente en los suelos dependen del tipo y las cantidades de adsorción de componentes del suelo, el pH y el potencial redox. Es frecuentemente encontrado en la naturaleza como un trivalente As(III) y un pentavalente As(V), aunque ambos son tóxicos, As(III) es relativamente hasta 10 veces más tóxico que As(V) (Mandal et al. 2012; Larios et al. 2012; Majumber et al. 2013).

En condiciones reductoras, As (III) es el compuesto de arsénico predominante, mientras que As (V) es la forma predominante de arsénico en suelos oxidados. Pero tanto As (V) como As (III) son muy tóxicos para la vida (Mandal et al. 2002; Valverde et al. 2011; Van Lis et al. 2013).

La extensión de la variación de toxicidad, es porque As(III) tiene la habilidad de unir varios grupos sulfónicos y grupos ditiólicos de proteínas, mientras que As(V) actúa como un químico análogo de fosfato y puede inhibir la fosforilación oxidativa, además es poco soluble en agua y menos biodisponible. La transformación microbiana de As(III) a As(V) puede representar una forma ecoamigable, de bajo costo y alternativo a los procesos de remediación convencionales (Majumber et al. 2013).

Varias técnicas de remediación para la remoción de arsénico han sido aplicadas como intercambio iónico, adsorción con alúmina activada, carbón activo, ultrafiltración, osmosis reversa y complejos de iones metálicos seguidos por coagulación, los cuales requieren un largo contenido de agentes químicos. (Aksornchu et al. 2008)

Históricamente, la diversidad de bacterias resistentes al arsénico aumenta, a medida que la contaminación de los suelos ocurre, donde las comunidades microbianas residentes se adaptan al estrés de metales y metaloides. Aunque la resistencia microbiana al arsénico es bastante común en ambientes naturales. Cepas bacterianas que exhiben resistencia a As(V) están generalmente en un número mayor de población que aquellos que exhiben resistencia a As(III), lo cual debe ser por el incremento de toxicidad del último en la matriz del suelo (Aksornchu et al. 2008; Majumber et al. 2013).

Se pueden encontrar bacterias conocidas por su resistencia al Arsénico como *Bacillus arsenoxydans*, *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp*, *Hydrogenophaga sp*, *Thiomonas sp*, y *Stenotrophomonas sp MM-7* (Majumber et al. 2013).

3.2.4 Bacterias resistentes a metales pesados

Las bacterias del suelo son responsables de diversos procesos ecológicos, como los ciclos biogeo-químicos de los elementos, crecimiento de las plantas, descomposición de la materia orgánica, mantención de la estructura del suelo, desintoxicación y control de plagas. Cambios en la comunidad bacteriana de los suelos expuestos a los metales pesados puede variar dependiendo de las propiedades del suelo, biodisponibilidad y los grupos bacterianos nativos del suelo. Estudios en diversidad bacteriana de sitios contaminados con metales pesados aún demuestran una alta diversidad de microorganismos, existiendo microorganismos nativos que no sólo se han adaptado al nuevo medioambiente, sino que también se han desarrollado en ellos (Altimira et al 2012; Chien et al 2008).

Sin embargo hay bacterias de los suelos que son particularmente sensibles al estrés por metales y al impacto de cobre en las estructuras comunitarias bacterianas, como es el caso de *Pseudomonas* cuya toxicidad de cobre es de preocupación ya que este grupo es responsable de importantes servicios al ecosistema (Thorsen et al. 2013).

La exposición a metales pesados de por sí, suele llevar a establecer una población microbiana tolerante, que están representadas por bacterias Gram positivas como *Bacillus*, *Arthrobacter* y *Corynebacterium*, así como también bacteria Gram negativas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia* y *Burkholderia*. Estos microorganismos poseen una gran variedad de mecanismos para lidiar con altas concentraciones de metales pesados (Piotrowska et al 2005; Chien et al 2008).

Los mecanismos de resistencia empleados usualmente por estos microorganismos para tolerar el estrés incluyen barreras de permeabilidad, retención intracelular y extracelular, bombas de eflujo, desintoxicación enzimática y reducción. Así como también en la mayoría de las cepas resistentes, la resistencia es mediada a través de plásmidos, elementos genéticos extra cromosomales. El nivel de resistencia varía con respecto a las cepas bacterianas y la toxicidad de los metales pesados, si una cepa bacteriana exhibe

un alto nivel de resistencia frente a un metal particular, puede ser utilizada para remediación de los medioambientes contaminados antropogenicamente. (Harichová et al. 2012; Nithya et al. 2011)

La habilidad de algunos microorganismos de enlazar metales y convertir algunos de ellos en especies menos tóxicas ha sido demostrado como un método alternativo para los métodos actuales de remediación como la precipitación, filtración, intercambio iónico, tratamientos electroquímicos y tecnología de membranas. También estos microorganismos resistentes a metales pesados pueden ser indicadores útiles para la potencial toxicidad de otras formas de vida, por lo tanto, actuar como agentes selectivos importantes para explicar la evolución de las comunidades microbianas (Puyen et al. 2012).

3.2.5 Características genéticas de bacterias resistentes a metales pesados.

Las bacterias han adoptado una variedad de mecanismos de tolerancia a metales pesados, tanto a nivel cromosomal y extra-cromosomal, como plásmidos, los cuales pueden ser difundidos a través de la comunidad bacteriana por transferencia lateral de genes.

Uno de los mecanismo más conocidos, las bombas de eflujo en particular, recogen los metales dentro de la membrana celular y los remueven de la célula, así protegiendo las estructuras internas de los efectos de los metales tóxicos., Unas de estas bombas de eflujo son CzcA, proveniente del operón *czc* de *Cupriavidus metallidurans* y *nccA* provenientes del sistema *ncc* de *Achromobacter xylosoxidans* 31A, así como también una bomba de eflujo proveniente del operón *cad* metaloregulador de *Bacillus* y *Staphylococcus* y el operón *ars* de *Escherichia coli* y *Staphylococcus* con una proteína con alta afinidad a As(III). En el caso de las bacterias desnitrificantes, las cuales poseen una inhabilidad de usar bombas de metales, pueden poseer enzimas resistentes a metales. (Harichová et al.2012; Karellová et al.2011; Singh et al.2011)

Los genes que confieren resistencia a cobre en las bacterias son necesarios en estas situaciones y están regularmente presentes en plásmidos y organizados en un operón. En el caso del cobre, se puede conferir resistencia por medio de los genes *cop* (*copA*, *copB*, *copC*, y *copD*) de *Cupriavidus metallidurans*. Donde *copA*, codifica una multi-oxidasa de

cobre, siendo uno de los principales determinantes genéticos en la resistencia a cobre en bacterias Gram negativas, también ha sido encontrada en bacterias Gram positiva, se estipula que por medio de la transferencia lateral de genes en las comunidades bacterianas. En el caso de los genes *pco* (*pcoA*, *pcoB*, *pcoC* y *pcoD*) de *Escherichia coli*, codifica una ATPasa tipo p envuelta en la homeostasis del cobre. Alternadamente se conoce que la expresión de los genes *cus*, reguladores de cobre por medio de la proteína *cusA* y su mecanismo quimi-osmótico de cobre.

Se sabe que *cusA* y *copA* disminuyen a medida que las concentraciones de cobre aumentan (Altimira et al.2011; Besaury et al.2013)

En cuanto al arsénico, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia que pueden ser divididos en dos categorías básicas consistiendo en reacciones redox que conservan la energía para el crecimiento celular o reacciones de detoxificación por medio de los genes del operon *ars* (Cavalca et al.2011; Halter et al.2011).

Un típico operón *ars* contiene los tres o cinco genes *arsRBC* o *arsRDABC*. *ArsR* es un represor que une la región del promotor y regula el operón *ars* y posee una alta afinidad a $As(III)$, *ArsB* es una proteína de transporte localizada en la membrana plasmática que puede bombear $As(III)$ fuera de la celular, *ArsC* ha sido demostrada de ser una reductasa citoplasmática de $As(V)$ (Convierte $As(V)$ en $As(III)$), *ArsA* es una ATP-asa de $As(III)$ -activado y *ArsD* regula el operon *ars* como un débil represor secundario. *ArsA* y *ArsB* forman un complejo *ArsA/ArsB* que funciona como una bomba de detoxificación y aumenta la habilidad de $As(III)$. También se conoce la existencia del gen *arsM* de *Rhodospirillum rubrum* la cual metila As a trimetilarsina (TMA) (Cavalca et al.2010; Singh et al.2011).

También es de importancia decir que los genes de resistencia a metales pesados y antibióticos son a menudo encontrados en el mismo elemento genético móvil, la polución de metales a menudo promueve la resistencia a antibióticos en los organismos expuestos, un hecho que está preocupando tanto clínica como medioambientalmente (Máthé et al. 2012).

3.3 Biorremediación

La biorremediación es una herramienta importante para la descontaminación donde la presencia de actividad de comunidades microbianas autóctonas es un prerrequisito para los tratamientos. Hay que tener en cuenta que existe una importante diferencia entre la biorremediación de metales y compuestos orgánicos xenobióticos, ya que en el primer caso, los metales pesados existen bajo distintos estados elementales, siendo posibles pasar del suelo a la atmósfera, mientras que en el caso de los xenobióticos resulta en la completa mineralización de la sustancia tóxica. Los esfuerzos de remediación para metales pesados pueden ser logrados de cinco formas: inmovilización por medio de la alteración del pH o por medio de la adición de la materia orgánica, remoción, secuestro, mezcla activa y absorción por medio de plantas llamado fitoextracción (Andreazza et al. 2010; Mackie et al. 2012; Margesin et al. 2011; Singh et al. 2011).

La fitoextracción consiste en tomar los metales pesados del suelo por medio de las plantas, existiendo tres tipos de fitoextracción: sin adición, adición de agentes quelantes y con adición de microorganismos; en este último principalmente bacterias que producen sideróforos, dado su habilidad de movilizar metales, específicamente hierro (Fe) pero también cobre (Cu), haciendo los metales más móviles para la absorción de las plantas.

La Biorremediación de metales pesados ha recibido gran atención actualmente, no solo como una novedad científica, sino también por su potencial aplicación en las industrias, ya que primariamente usa microorganismos o procesos microbianos para degradar y transformar contaminantes ambientales en formas inocuas. Siendo los procesos de remediación como la bioestimulación y bioaugmentación *in-situ* los más económicos (Akinci et al. 2011; Máthé et al. 2012).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación de los suelos con metales pesados por causa de la actividad humana (agrícola, industrial, minera, etc.), tiene la potencialidad de causar daño a la salud de la población expuestos a ellos, tanto directamente, por medio exposición a la piel, como indirectamente por medio de los alimentos cultivados en estos suelos, como frutas, verduras y granos. Por lo que se ha dirigido la mirada a los microorganismos de estos suelos contaminados, dado la posibilidad de encontrar microorganismos resistentes a metales pesados capaces de ayudar en un futuro a la biorremediación de los suelos, por medio de los genes de resistencia que podrían poseer. En este contexto se propone la siguiente hipótesis y objetivos.

5. HIPÓTESIS

Si los suelos de Puchuncaví están contaminados con metales pesados, se podrán identificar algunas especies anteriormente no descritas que sean altamente resistentes a cobre y arsénico del total de bacterias autóctonas aisladas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Identificar molecularmente cepas bacterianas aisladas desde suelos contaminados con metales pesados de la zona de Puchuncaví, y su correspondiente caracterización bioquímica.

6.2 Objetivos Específicos

- Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas bacterianas.
- Determinar la resistencia a los metales mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria (C.M.I) a Cu(II) y As(V).
- Identificación molecular de las cepas bacterianas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Re-aislamiento de Cepas.

De 44 cepas aisladas en estudios anteriores, desde suelos contaminados de Puchuncaví, región de Valparaíso, se seleccionaron y se re-aislaron 14 cepas mantenidas a 4°C, todas tolerantes al cobre a concentraciones mayor o igual a 125 ppm, cuya nomenclatura es la siguiente: 1A1, 1A4, 2A2, 2A4, 1B2, C1, C4, D1, D3, D5, D7, 2E3, 2E4 y E1.

Las cepas se cultivaron en Agar nutritivo (AN) (en 1L, Peptona 5.0g, Extracto de carne 3.0g, Agar-Agar 15g.) y caldo nutritivo (CN) (en 1L Peptona 5.0g, Extracto de carne 3.0g.) a una temperatura de 25°C, y fueron nuevamente conservadas en agar semisólido (AS) (en 1L Peptona 5.0g, Extracto de carne 3.0g, Agar-Agar 8.0g.) a 4°C.

7.2 Caracterización Macroscópica y Microscópica

La caracterización macroscópica se llevó a cabo por medio de la observación y descripción de las colonias de las cepas previamente mencionadas, utilizando los siguientes parámetros: forma, borde, elevación, opacidad, cromogénesis, superficie y consistencias.

Mediante tinción Gram, se identificó microscópicamente la morfología celular utilizando el microscopio Primo Star Zeiss®. (Díaz et al.1999)

7.3 Caracterización Bioquímica.

7.3.1 Api® 20 NE Biomérieux®

Para la caracterización bioquímica se utilizó el Kit API® 20 NE de Biomérieux® (Anexo 1) especial para bacilos o cocobacilos Gram negativo no enterobacterianos.

Se sembraron las cepas 2A2, C1, C4, D1, D3, D7, 2E4 y E1. con estas características en agar nutritivo durante 24 horas a 25°C. Posteriormente, se tomó una colonia de la cepa correspondiente y se suspendió en solución salina al 0.8% con una turbidez estándar al Reactivo de McFarland 0.5 que corresponde a 1.5×10^8 células/mL³. Además se sembraron las cepas 1A1 y 1B2 que eran Gram variables.

Se dejaron incubar por 24 a 48 horas a 25°C y los resultados positivos o negativos se vieron según como fue indicado en la “tabla de lectura de resultados” proveído en el kit.

7.3.2 Biolog®

Biolog® GN2 MicroPlate™ consta de 95 pruebas bioquímicas creadas para poder obtener un perfil metabólico especial para bacterias Gram Negativas, en nuestro caso las cepas analizadas con esta prueba fueron, 2A2, C1, C4, D1, D3, D7 y E1.

Las cepas fueron cultivadas en agar nutritivo de forma pura, desde los cuales se agregó colonias en medio líquido de inoculación GN/GP con la asa de loop, homogenizado y llevado hasta una turbidez determinada estándar de McFarland 0.5.

Se agregaron 150µL de la solución GN/GP en cada uno de los pocillos, y fueron cultivados a 30°C por 24 horas para su lectura. De ser negativo se observó igual que en A1 que es agua, de ser positivo fue morado y de ser inconcluso tendrá poco color.

Se realizó de la misma forma para GP2 MicroPlate™ que consta de 95 pruebas bioquímicas para bacterias Gram Positivas, en nuestro caso las bacterias 1A1, 1A4, 2A4, 1B2, D5 y 2E3.

7.4 Identificación Molecular.

7.4.1 Extracción de DNA por Shock Térmico.

La extracción de DNA para su eventual utilización en PCR se hizo por medio del protocolo de shock térmico, donde se suspendió una colonia en un microtubo con 1mL de NaCl 0.85%, se agitó en un vortex por medio minuto y posteriormente se centrifugó a 11.000rpm por cinco minutos.

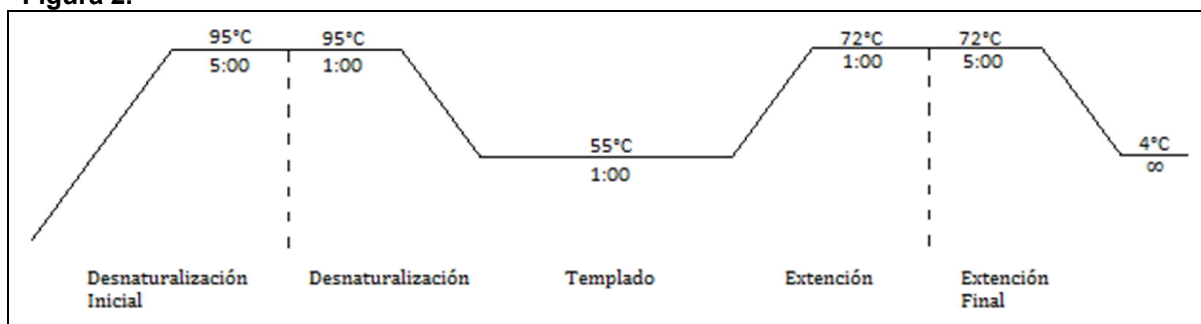
Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se re suspendió en 500µL de buffer TE (EDTA 1mM; Tris-HCl 10mM; pH 8). Se incubó a -20°C por diez minutos, e inmediatamente después se incubó a 98°C por veinte minutos. Finalmente una vez retirado se centrifugó a 11.000rpm por cinco minutos.

7.4.2 Amplificación mediante PCR del gen 16S rRNA.

Para la identificación se utilizó la técnica de PCR con el gen 16S rRNA para ello se siguió el protocolo que se muestra a continuación.

El gen 16S rRNA desde el DNA extraído es amplificado usando los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). La mezcla de reacción está compuesta por 2.5µL 10X PCR buffer, 0.4 µL dNTPs (0.4mM), 1.0 µL MgCl₂ (3mM), 1.5µL de cada primer (0.6mM), 0.25µL DNA template, 1.25 unidades DreamTaq DNA polimerasa y agua estéril desionizada hasta un volumen de 23µL. El programa de amplificación de PCR será el siguiente: desnaturalización inicial (95°C, 5min), desnaturalización (95°C, 1min), templado (55°C, 1min), extensión (72°C, 1min) y una extensión final a 72°C por 5 minutos. En 25 ciclos (Fig.2)

Figura 2.



Perfil PCR

Fuente Propia

Para verificar la amplificación del DNA, se hizo una electroforesis en gel de garosa, en este caso se utilizó un gel de agarosa de 1en buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA).

A continuación en cada pocillo en orden se cargó 2µL de la amplificación por PCR de cada cepa, y se dejó por 45 minutos a 80volt. Finalmente se visualizó el producto de 1500pb en un transluminador de luz ultravioleta.

El producto final del PCR fue enviado a secuenciar en MacroGen.Inc (Seul, Corea). Las secuencias obtenidas de las 10 cepas fueron analizadas con los programas Bioedit® versión 7.2.5 y Unipro UGENE® versión 1.13 para su edición.

Posteriormente utilizando el formato FASTA fueron analizadas en la base de datos GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

7.5 Concentración Mínima Inhibitoria

7.5.1 Cepas Control

Cupriavidus metallidurans CH34 en conjunto con *Escherichia coli* ATCC 1628 fueron utilizadas como controles para determinar la concentración mínima inhibitoria. Siendo *Cupriavidus metallidurans* CH34 el control positivo debido a su resistencia conocida a cobre y *Escherichia coli* ATCC 1628 el control negativo debido a su sensibilidad a este.

E. coli ATCC 1628 fue mantenida en agar nutritivo y luego cultivada por tres días en caldo nutritivo diluido al 10% (en 1L Peptona 0.5g, Extracto de carne 0.3g), mientras que *C. metallidurans* CH34 fue mantenida en medio Agar Luria Bertani (Tryptona 10g, Extracto de Levadura 5.0g, NaCl 10g, Agar-Agar 15g.) y luego cultivada en caldo nutritivo por tres días, ambas a una temperatura de 25°C.

En el caso de C.M.I de arsénico, no se contó con controles positivos y negativos.

7.5.2 Determinación de C.M.I para Cobre (II) y Arsénico (V)

Previo a determinar el C.M.I de cada bacteria en particular, las 14 cepas re-aisladas se cultivaron en caldo nutritivo al 10% por tres días.

El medio de cultivo utilizado para la determinación de la C.M.I fue el Medio Mínimo Tris bajo en fosfatos, con sus siglas en inglés (LPTMS) el cual consiste (g/L) de 6.06 Tris, 4.68 NaCl, 1.49 KCl, 1.07 NH₄Cl, 0.43 Na₂SO₄, 0.20 MgCl₂ · 6H₂O, 0.03 CaCl₂, 0.04 Na₂HPO₄, 0.005 citrato Fe(III)NH₄, 2% succinato de sodio y 1g/L de Extracto de levadura y 1ml de la solución SL7 con un pH de 7.0.

La solución SL7 consiste (mg/L) de 70 ZnCl₂, 100 MnCl₂ · 4H₂O, 60 H₃BO₃, 200 CoCl₂ · 6H₂O, 20 CuCl₂ · 2H₂O, 20 NiCl₂ · 6H₂O, 40 NaMoO₄ · 2H₂O y 1ml de HCl al 25%. (Rathnayake et al. 2013; Rojas et al. 2011)

El C.M.I, la concentración más baja en la cual no hay crecimiento bacteriano, fue determinada utilizando el medio LPTMS ajustado a pH 7.

Para ello, en el caso de cobre, se utilizó una solución stock de 50.000ppm para Cu^{2+} , utilizando $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ desde la cual se realizó una serie de soluciones patrones desde 2000 a 16000ppm (A.2).

En el caso del arsénico se utilizó una solución stock de 50.000ppm de $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$, y no se realizaron soluciones patrones, por las altas concentraciones necesarias (A.3).

Utilizando 48 tubos de ensayo tanto para Cobre como Arsénico, se agregó a cada tubo 18mL de medio de cultivo LPTMS y se autoclavó. Posteriormente se agregó 2mL de Succinato de sodio y se homogenizó en un vortex, en el caso de cobre se agregó 0.5mL de la concentración patrón correspondiente de forma estéril, para así obtener en la placa las concentraciones correspondientes como observan en la tabla.1. Se hicieron tres placas por concentración.

En el caso del arsénico, se agregaron los mililitros correspondientes desde la solución stock como se muestra en la tabla.2.

Tabla.1. Solución Final cobre

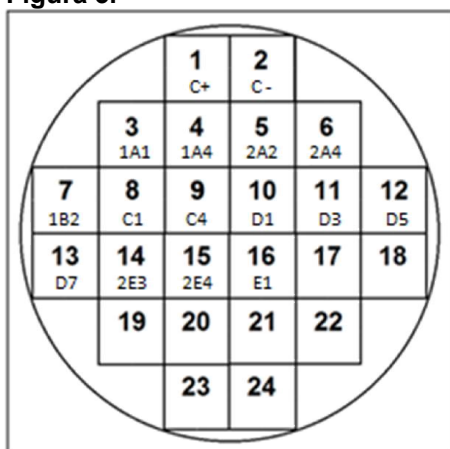
	Solución Patrón (ppm)	Solución Patrón (mM)	Solución Final en la placa (ppm)	Solución final en la placa (mM)
P1	2000	31.80	50	0.795
P2	3000	74.70	75	1.193
P3	4000	63.60	100	1.590
P4	5000	79.50	125	1.988
P5	6000	95.40	150	2.385
P6	6400	101.76	160	2.544
P7	7000	111.30	175	2.783
P8	8000	127.20	200	3.180
P9	9000	143.10	225	3.578
P10	10.000	159.00	250	3.975
P11	11.000	174.90	275	4.373
P12	12.000	190.80	300	4.770
P13	13.000	216.64	325	5.416
P14	14.000	222.60	350	5.565
P15	16.000	254.40	400	6.360

Tabla. 2. Solución final Arsénico

	Solución Final en la placa (ppm)	Solución final en la placa (mM)
P1	10	0.133
P2	100	1.334
P3	500	6.670
P4	1000	13.34
P5	1250	16.68
P6	1500	20.00
P7	1750	23.35
P8	2000	26.28
P9	2250	30.02
P10	2500	33.35
P11	2750	36.69
P12	3000	40.02
P13	3500	46.69

Se utilizó una plantilla en las placas de cultivo como se muestra en la Fig.3, y se cultivaron las 14 cepas más 2 controles. Cada placa con diferentes concentraciones de cobre y arsénico.

Figura 3.



Posición de cepas en placa para determinación CMI Fuente propia

Se sembró 10uL de cada cepa por placa, en la posición correspondiente en la gradilla a 25°C y se observó el crecimiento de cada bacteria a los cuatro días, en donde se determinó su CMI correspondiente. Los experimentos se hicieron por triplicado, donde fue considerado como resistente en el caso de cobre con un C.M.I de 175 ppm, y en el caso de arsénico sobre los 100mM (Morales.2012; Majumder et al.2013; Romero.2013)

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización Morfológica.

8.1.1 Caracterización Macroscópica y Microscópica

Se caracterizaron las catorce bacterias utilizadas en este estudio según su morfología mediante tinción Gram y forma de colonia entre otros, otorgando los siguientes resultados mostrados en las tablas 3 y 4.

Tabla.3 Morfología Bacteriana.

Nº	Cepa	Tinción Gram	Morfología
01	1A1	+ (variable)	Cocobacilo
02	1A4	+	Bacilo
03	2A2	-	Bacilo corto
04	2A4	+ (variable)	Cocobacilo
05	1B2	+ (variable)	Bacilo corto
06	C1	-	Bacilo corto
07	C4	-	Bacilo
08	D1	-	Bacilo corto
09	D3	-	Cocobacilo
10	D5	+	Cocos
11	D7	-	Bacilo
12	2E3	+	Cocobacilo
13	2E4	-	Cocobacilo
14	E1	-	Bacilo Corto

Como se puede observar en la tabla.3 de las catorce cepas, ocho son Gram Negativo bacilo o cocobacilo, mientras que seis cepas son Gram Positivas cocobacilo y bacilo en su mayoría, siendo tres de ellas Gram variable. Con los datos obtenidos se procedió posteriormente a realizar la caracterización bioquímica.

En cuanto a las colonias, se puede observar en la tabla.4 variabilidad entre todas las cepas, indicándonos que son diferentes tipos de bacterias y no repeticiones de una misma, aunque microscópicamente posean características similares.

Tabla.4 Caracterización de colonias

N°	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Opacidad	Cromogénesis	Superficie	Consistencia
01	1A1	Circular	Liso	Elevada	Brillante	Blanca	Suave	Granular
02	1A4	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Naranja	Suave	Granular
03	2A2	Circular	Liso	Elevada	Brillante	Amarillo	Suave	Granular
04	2A4	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Blanca	Suave	Granular
05	1B2	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Blanca	Suave	Granular
06	C1	Circular	Liso	Cóncava	Translúcida	Crema	Suave	Mucosa
07	C4	Circular	Liso	Umbilicada	translúcida	Rosa	Rugosa	Mucosa
08	D1	Circular	Liso	Elevada	Translúcida	Crema Claro	Suave	Granular
09	D3	Circular	Liso	Convexa	Translúcida	Crema	Suave	Granular
10	D5	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Amarillo	Suave	Mucosa
11	D7	Circular	Liso	Convexa	Opaca	Crema	Suave	Granular
12	2E3	Circular	Liso	Elevada	Translúcida	Amarillo Claro	Suave	Granular
13	2E4	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Amarillo Oscuro	Suave	Granular
14	E1	Circular	Liso	Elevada	Translúcida	Crema	Suave	Mucosa

8.1.2 Caracterización bioquímica de las cepas

Para poder obtener un perfil bioquímico completo de las cepas se realizaron las pruebas API® 20 NE de Biomérieux® y Biolog®

8.1.2.1 API® 20 NE

Los resultados de las pruebas observadas en la Tabla.5 corresponden a las 24 horas en el caso de NO₃, TRP y GLU, ADH y URE; mientras que el resto de las pruebas corresponden a las 48 horas de incubación.

Tabla.5 Pruebas bioquímicas Api 20 NE

Test	Componente Activo	Reacciones Enzimáticas	1A1	2A2	1B2
NO₃	Nitrato Potásico	Reducción NO ₃ a NO ₂	-	+	+
		Reducción NO ₃ a N	-		
TRP	L-Triptófano	Formación Indol	-	-	-
GLU	D-Glucosa	Fermentación Glucosa	-	-	-
ADH	L-Arginina	Arginina Dehidrolasa	-	-	-
URE	Urea	Ureasa	-	-	-
ESC	Esculina Citrato férrico	Hidrólisis Esculina	-	+	+
GEL	Gelatina	Hidrolisis Proteasa	-	-	-
PNG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidasa	+	+	+
GLU	D-glucosa	Asimilación Glucosa	+	+	+
ARA	L-arabinosa	Asimilación Arabinosa	+	-	+
MNE	D-manosa	Asimilación Manosa	+	-	+
MAN	D-manitol	Asimilación Manitol	+	+	+
NAG	n-acetil-glucosamina	Asimilación n-acetilglucoisamina	+	-	-
MAL	D-maltosa	Asimilación Maltosa	+	-	+
GNT	Gluconato potásico	Asimilación gluconato potásico	+	+	+
CAP	Ácido Cáprico	Asimilación Ácido cáprico	-	-	-
ADI	Ácido Adípico	Asimilación Ácido adipico	-	-	-
MLT	Ácido Málico	Asimilación Ácido málico	+	+	+
CIT	Citrato Trisódico	Asimilación Citrato trisódico	+	+	+
PAC	Ácido Fenilacético	Asimilación Ácido fenilacético	+	+	-
OX	Oxidasa	Citocromo oxidasa	-	-	-

Test	C1	C4	D1	D3	D7	2E4	E1
NO ₃	-	+	-	-	+	+	+
	-		-	-			
TRP	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	-	-	-	-	-	-
ADH	+	-	-	+	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-
ESC	-	+	+	-	-	-	+
GEL	-	-	+	-	-	-	+
PNG	-	+	+	-	+	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	-	-	-	+	-
MNE	+	+	+	+	-	+	+
MAN	+	-	-	-	-	+	-
NAG	+	+	+	+	+	-	+
MAL	-	+	+	+	+	+	+
GNT	+	-	-	+	+	+	-
CAP	+	-	-	+	+	-	-
ADI	-	-	-	-	-	-	-
MLT	+	-	+	+	+	+	+
CIT	+	-	+	+	+	+	+
PAC	-	-	-	+	+	+	-
OX	+	+	+	+	+	-	-

Esta prueba está hecha para bacilos Gram negativo, si bien las cepas 1A1 y 1B2, son cepas Gram positivo, se realizaron las pruebas en forma de prueba general.

Se infieren con estos resultados que las cepas morfológicamente parecidas no corresponden a la misma especie, ya que ninguna manifestó el mismo patrón metabólico.

8.1.2.2 Biolog® GP2/GN2 MicroPlate™

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para las cepas Gram positivas utilizando GP2 MicroPlate™ pueden ser observadas en la tabla.6.

Tabla.6 GP2 MicroPlate™

Test	1A1	1A4	2A4	1B2	D5	2E3
Agua	-	-	-	-	-	-
α-ciclodextrina	-	-	-	-	-	-
β-ciclodextrina	-	-	/	-	-	-
Dextrina	-	+	/	/	+	/
Glucógeno	-	-	/	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-
Manano	-	-	-	-	-	-
Tween40	-	+	+	-	+	+
Tween80	-	+	+	-	-	-
N-acetil-d-glucosamina	-	-	/	-	-	-
N-acetil-d-manosamina	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-
L-arabinosa	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-
Arbutina	-	-	-	-	-	/
D-celobiosa	-	+	/	-	+	/
D-fructosa	-	+	+	+	/	-
L-fucosa	-	-	-	-	-	-
D-galactosa	-	-	-	-	-	-
Ácido D-galacturónico	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa	-	-	-	-	-	/
Ácido D-glucónico	-	+	/	-	-	-
α-d-glucosa	-	+	+	-	+	-
M-inositol	-	-	/	-	-	-

Test	1A1	1A4	2A4	1B2	D5	2E3
α -d-lactosa	-	-	-	-	-	-
Lactulosa	-	-	/	-	-	-
Maltosa	-	/	+	/	/	+
Maltotriosa	-	+	+	-	/	+
d-Manitol	+	+	+	+	-	/
d-Manosa	-	+	+	/	+	+
d-Melecitosa	-	/	+	-	-	-
d-Melibiosa	-	-	-	/	-	-
α -metil-d-galactoside	-	-	/	-	-	-
β -metil-d-galactoside	+	-	-	-	-	-
Metil glucosa	-	-	/	-	-	-
α -metil-d-glucósido	-	-	/	-	-	-
β -metil-d-glucósido	-	/	/	/	-	-
α -metil-d-manósido	-	-	/	-	-	-
Palatinosa	-	/	+	-	-	-
D-psicosa	-	+	+	/	-	-
D-rafinosa	-	/	-	-	-	-
L-ramnosa	-	/	-	-	-	-
D-ribosa	-	/	/	+	-	/
Salicina	-	-	+	-	-	+
Sedoheptulosano	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	/	+	-	-	/
Estaquiosa	-	/	-	-	-	-
Sacarosa	-	+	+	-	+	+
D-tagatosa	-	-	/	-	-	-
D-trehalosa	-	/	/	/	-	+
Turanosa	-	/	+	/	/	+
Xilitol	-	/	/	-	-	-
D-xilosa	-	/	-	-	-	-

Test	1A1	1A4	2A4	1B2	D5	2E3
Ácido acético	-	+	-	-	-	-
Ácido α-hidroxibutírico	-	+	/	-	-	-
Ácido β-hidroxibutírico	-	+	/	/	-	-
Ácido γ-hidroxibutírico	-	/	-	-	-	-
Ácido p-hidroxifenilacético	-	-	/	-	-	-
Ácido α-cetoglutarico	-	/	/	+	-	-
Ácido α-cetovalérico	-	+	+	-	-	-
Lactamida	-	-	-	/	-	-
Ácido d-lacticometiléster	-	-	-	-	-	-
Ácido l-láctico	-	-	/	-	-	/
Ácido d-málico	-	-	-	-	-	-
Ácido l-málico	-	+	/	-	-	-
Metil piruvato	-	+	+	+	+	+
Mono-metil succinato	-	+	/	-	-	-
Ácido propiónico	-	+	-	-	-	-
Ácido pirúvico	-	+	/	+	/	-
Ácido succinámico	-	-	-	-	-	-
Ácido succínico	-	/	/	-	-	-
Ácido n-acetil-l-glutámico	-	+	-	-	-	-
L-alaninamida	-	+	/	-	-	/
D-alanina	-	-	-	+	-	-
L-alanina	+	/	/	+	/	/
L-alanil-glicina	+	-	-	+	-	/
L-asparagina	+	+	/	+	-	-
Ácido l-glutámico	-	/	+	+	/	/
Ácido glicil-l-glutámico	-	/	+	/	/	-
Ácido l-piroglutámico	-	+	-	-	-	-
L-serina	+	+	/	+	/	-

Test	1A1	1A4	2A4	1B2	D5	2E3
Putrescina	-	+	-	-	+	-
2,3-butanodiol	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	+	+	+	+	+
Adenosina	-	/	/	-	+	+
2'-deoxiadenosina	-	/	-	-	-	-
Inosina	-	-	-	-	+	/
Timidina	-	+	-	-	/	/
Uridina	-	/	/	-	+	/
Adenosina-5'-monofosfato	-	-	-	-	/	/
Timidina-5'-monofosfato	-	-	-	-	-	-
Uridina-5'-monofosfato	-	/	-	-	/	-
Fructosa-6-fosfato	-	-	/	-	-	-
Glucosa-1-fosfato	-	-	-	-	-	-
Glucosa-6-fosfato	-	-	/	-	-	-
D-l- α -glicerol fosfato	-	/	/	-	-	-

Donde (+) corresponde a un resultado positivo, (-) a un resultado negativo y (/) no es concluyente.

Los resultados para las pruebas bioquímicas realizados para las cepas Gram negativos utilizando GN2 MicroPlate™ pueden ser observadas en la tabla.7

Tabla.7 GN2 MicroPlate™

Test	2A2	C1	C4	D1	D3	D7	E1
Agua	-	-	-	-	-	-	-
α-ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-
Dextrina	-	-	/	/	/	+	+
Glucógeno	-	-	-	-	/	-	-
Tween40	+	/	-	/	+	+	/
Tween80	+	/	-	/	+	+	/
N-acetil-d-lactosamina	-	-	-	/	-	+	-
N-acetil-d-glucosamina	-	/	+	/	-	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	/	/
L-arabinosa	+	+	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	/	-	-	-	-	-
D-celobiosa	-	-	+	/	-	+	/
l-eritritol	-	-	-	-	-	-	-
D-fructosa	-	/	+	/	/	/	/
L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-
D-galactosa	-	+	+	/	-	-	-
Gentiobiosa	-	-	+	/	-	+	+
α-d-glucosa	-	/	+	/	+	+	+
M-inositol	-	-	-	-	-	-	-
α-d-lactosa	-	-	+	-	-	/	/
Lactulosa	-	-	-	-	-	/	-
Maltosa	-	-	+	/	-	+	+
D-manitol	-	+	-	-	-	-	-
D- manosa	-	/	+	/	-	+	-
D- Melibiosa	-	-	-	-	-	/	/
β-metil-d-glucósido	-	-	-	-	-	/	/

Test	2A2	C1	C4	D1	D3	D7	E1
D-psicosa	-	-	-	-	-	-	-
D-rafinosa	-	-	-	-	-	/	-
L-ramnosa	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	/	-	-	/	-
D-trehalosa	-	-	-	/	-	/	/
Turanosa	-	-	-	-	-	/	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-
Metil piruvato	-	+	-	/	+	+	+
Mono-metil succinato	-	-	-	-	+	+	/
Ácido acético	-	/	-	/	+	+	+
Ácido cis-aconítico	-	+	-	-	+	-	-
Ácido cítrico	-	+	-	/	-	+	+
Ácido fórmico	-	-	-	-	+	-	-
Ácido d-galactónico lactona	-	+	-	-	-	-	/
Ácido d-galacturónico	-	+	-	-	+	-	-
Ácido d-glucónico	-	+	-	-	+	-	-
Ácido d-glucosamínico	-	+	-	-	-	-	-
Ácido d-glucurónico	-	+	-	-	+	+	-
Ácido α-hidroxibutírico	-	-	-	/	/	+	/
Ácido β-hidroxibutírico	-	+	-	-	+	/	/
Ácido γ-hidroxibutírico	-	-	-	-	+	/	-
Ácido p-hidroxifenilacético	-	-	-	-	+	-	-
Ácido itacónico	-	-	-	-	-	-	-

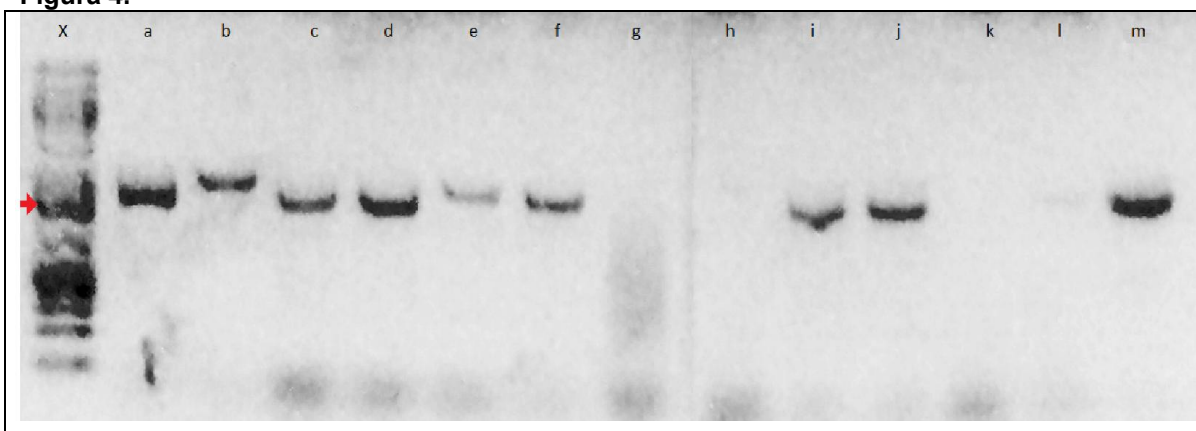
Test	2A2	C1	C4	D1	D3	D7	E1
Ácido α-cetobutírico	-	-	-	-	/	/	+
Ácido α-cetoglutarico	-	+	-	-	+	+	+
Ácido α-cetovalérico	-	-	-	-	/	-	-
Ácido d-l-láctico	-	+	-	/	/	+	+
Ácido malónico	-	+	-	/	/	/	/
Ácido propiónico	-	+	-	/	+	+	+
Ácido quínico	-	+	-	-	+	+	-
Ácido d-sacárico	-	+	-	-	+	+	-
Ácido sebáccico	-	-	-	-	-	-	-
Ácido succínico	-	/	-	+	+	+	+
Ácido bromosuccínico	-	/	-	/	+	/	+
Ácido succinámico	-	-	-	-	/	-	-
Glucoranamida	-	-	-	-	-	-	-
L-alaninamida	-	-	-	/	+	+	+
D-alanina	-	+	-	-	+	+	+
L-alanina	-	+	-	/	+	+	+
L-alanil-glicina	-	+	-	/	-	+	+
L-asparagina	-	+	/	-	+	/	/
Ácido l-aspártico	-	+	-	-	+	+	-
Ácido l-glutámico	-	+	/	-	+	+	/
Ácido glicil-l-aspártico	-	-	-	-	-	+	/
Ácido glicil-l-glutámico	-	/	-	/	-	+	+
L-histidina	-	/	-	-	+	-	-
Hidroxi-l-prolina	-	/	-	-	+	-	-
L-leucina	-	/	-	-	-	-	-
L-ornitina	-	-	-	-	/	-	-

Test	2A2	C1	C4	D1	D3	D7	E1
L-fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-
L-prolina	-	/	-	/	+	+	+
Ácido l-pirolutámico	-	+	-	-	+	-	-
D-serina	-	-	-	-	+	-	-
L-serina	-	+	-	-	+	+	+
L-treonina	-	-	-	-	+	+	+
D,L-carnitina	-	/	-	-	+	/	-
Ácido α -aminobutírico	-	+	-	-	+	/	-
Ácido urocánico	-	+	-	-	-	-	-
Inosina	-	/	-	-	-	-	-
Uridina	-	/	-	-	-	/	-
Timidina	-	-	-	-	-	-	-
feniletilamina	-	-	-	-	+	-	-
Putrescina	-	/	-	-	+	-	-
2-aminoetanol	-	+	-	-	+	-	-
2,3-butanodiol	-	-	-	-	/	/	-
Glicerol	-	+	-	-	/	/	-
D-l- α -glicerol fosfato	-	/	-	-	-	-	-
Glucosa-1-fosfato	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa-6-fosfato	-	-	-	-	-	-	-

8.1.3 Identificación Molecular de las cepas.

La identificación molecular fue realizada para 13 cepas (Fig.4), de las cuales solo 10 fueron posibles de ser analizadas y editadas con los programas UGENE versión 1.13.0 y Bioedit versión 7.2.5, cuyas secuencias pueden ser observadas en el Anexo (A.4).

Figura 4.



Gel Agarosa. La flecha roja en X indica 1500pb, tamaño del fragmento buscado en la amplificación del gen 16S ribosomal de cada cepa estudiada; donde a es 1A1, b es 1A4, c es 2A2, d es 2A4, e es 1B2, f es C1, g es C4, h es D1, i es D3, j es D7, k es 2E3, l es 2E4 y m es E1. En el caso de g, h y k se volvió a repetir la técnica de PCR por la falta total de producto.

Si bien como se pudo observar las cepas D7 y E1, obtuvieron la misma identificación molecular, hubo una diferencia, ya que D7 tuvo una identificación del 100% y E1 del 99%.

Tabla.8 Identificación molecular.

8.2 Análisis Microbiológico

8.2.1 Determinación de resistencia a Cobre por medio de C.M.I

Una vez determinadas las características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas, se procedió a la realización de la determinación de resistencia a los metales pesados por parte de las bacterias estudiadas, por medio de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. En este estudio, fue realizado para cobre (II) y arsénico (V).

En el caso del Cu(II) los resultados que pueden ser observados en la tabla.9 fueron medidos a los 4 días, siendo incubados a 25°C. En su totalidad, pueden ser observados en el anexo (A.5)

Tabla.9 C.M.I Cobre

Cepas	<i>C. metallidurans</i>	<i>E. coli</i>	1A1	1A4	2A2	2A4	1B2	C1
CMI ppm	300	50	160	150	160	250	150	150

Cepas	C4	D1	D3	D5	D7	2E3	2E4	E1
CMI ppm	275	150	150	200	150	150	150	150

Al tener un C.M.I superior o igual a 175ppm, se pueden considerar a las cepas resistentes, por lo tanto se puede observar una resistencia significativa en las cepas C4 correspondiente a *Pedobacter* y 2A4 correspondiente a *Arthrobacter* con un C.M.I de 275 y 250ppm respectivamente, pero también se muestra resistencia en la cepa D5 con un C.M.I de 200ppm. 1A1 y 2A2 no se pueden considerar resistentes a cobre con un C.M.I de 160ppm, pero pueden ser utilizadas para estudios posteriores de interés genético.

8.2.2 Determinación de Resistencia a Arsénico por medio de C.M.I

Se prosiguió a determinar la resistencia a Arsénico (V) por medio de la Concentración Mínima Inhibitoria, utilizando el protocolo apropiado, dando los resultados observados en la Tabla.10, a los 4 días de incubación a 25°C. En su totalidad pueden ser observados en el Anexo (A.6)

Tabla.10 C.M.I Arsénico

Cepas	<i>C. metallidurans</i>	<i>E. coli</i>	1A1	1A4	2A2	2A4	1B2	C1
CMI ppm	>3500	3000	1000	2000	2500	>3500	>3500	>3500
CMI mM	>46.69	40.02	13.34	26.28	33.35	>46.69	>46.69	>46.69

Cepas	C4	D1	D3	D5	D7	2E3	2E4	E1
CMI ppm	3500	>3500	>3500	>3500	>3500	>3500	1250	>3500
CMI mM	46.69	>46.69	>46.69	>46.69	>46.69	>46.69	16.68	>46.69

En esta ocasión no se contaba con una bacteria resistente a arsénico conocida, sin embargo se probó con las dos bacterias controles de la determinación C.M.I de cobre para observar su comportamiento, siendo *Cupriavidus metallidurans* no conocida por ser resistente a arsénico, pero si a múltiples metales pesados, mientras que se sabe de cepas de *E. coli* que muestran resistencia a arsénico.

9. DISCUSIÓN

Para los microorganismos, los metales pesados pueden ser esenciales para su existencia, como lo es el cobre, pero en altas y bajas concentraciones produce efectos negativos (Andreazza et al.2010). También existen metaloides como el arsénico que no son necesarios para ninguna función metabólica en los microorganismos, pudiendo ser considerado un importante contaminante hoy en día, debido a su alta utilización en tiempos pasados cuando no se sabía los efectos de estos metales, en la salud humana y medio ambiental.

En la zona de estudio de Puchuncaví, según Morales (2012), en su informe de suelo, se pudo observar que las concentraciones en el suelo de cobre variaron desde 219 a 6231 mg/kg, mientras que para arsénico variaron desde 15.9 a 57.8 mg/kg. El servicio agrícola y ganadero de Chile (S.A.G), en su informe de criterios de calidad de suelo agrícola los límites de contaminación los estándares otorgados por la ley Federal de Alemania, para cobre varían entre 30 y 100mg/Kg, mientras que en Japón en la ley de prevención de contaminación de suelos agrícolas el límite máximo de cobre es de 125mg/Kg. De acuerdo a Mackie et al.2012 y Piotrowska-Seget et al.2005; mientras que para arsénico la variación de un máximo en suelos va de 10 a 20mg/Kg. Majumber et al.2013 encontraron concentraciones menores, desde 7.3mg/Kg, indicándonos que los suelos de la zona de Puchuncaví en el caso del metal cobre, se encuentra en extrema contaminación, con un máximo de 6231mg/Kg. En el caso del arsénico es posible ser considerado medianamente contaminado, ya que se han encontrados lugares con concentraciones de hasta 2000mg/Kg (Nithya et al.2011).

Teniendo en consideración lo visto anteriormente, es plausible el hecho de que se hayan encontrado bacterias resistentes a cobre, como lo fueron 2A4, C4 y D5 superando los 175ppm de resistencia con 250, 275 y 200ppm correspondientemente. 1A1 y 2A2 se acercaron a la tolerancia con 160ppm ambas.

En el caso de arsénico, no se logró una concentración determinante, por lo que se deberían continuar los estudios aumentando las concentraciones, ya que 10 de las 14 cepas estudiadas llegaron a la concentración límite de 46.69mM. Se sabe que las bacterias son consideradas resistentes a Arsénico a concentraciones mayores de 100mM en el caso de As(V), y se han encontrado bacterias resistentes a concentraciones de 167

a 400mM de As(V), provenientes desde suelos cuya concentración total de arsénico variaron de 7.4 a 13.4mg/kg y 3.8 a 8.1 mg/Kg (Majumder et al.2013; Nithya et al.2011; Pepi et al.2011)

Bacterias conocidas resistentes a metales pertenecen a los generos, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* (Chien et al.2008), *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Burkholderia* (Altimira et al.2012; Harichova et al.2012; Piotrowska-seget.2005), *Achromobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (α , β , γ y δ), *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Bacterioidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Fibrobacteres*, *Polyangium*, *Vaiovorax*, *Hafina*, *Clostridia*, *Plantomycetes*, *Firmicutes*, *Pedobacter* y no cultivables. (Harichova et al.2012; Karelová et al.2011). Como se puede observar en la tabla.8, se corresponde con bacterias resistentes a metales, como lo son 2A4 y C4 correspondientes al género *Arthrobacter* y *Pedobacter*, este último menos conocido en este aspecto.

De las bacterias identificadas, y sus pruebas bioquímicas, se analizó en énfasis de las dos bacterias más resistentes a cobre encontradas, las cuales fueron 2A4 y C4. En el caso de D5 no se pudo hacer una Identificación molecular y en el caso de las cepas 1A1 y 2A2 no se observaron pruebas bioquímicas concluyentes.

En el caso de 2A4 según Winn.2006 y Wauters et al.2000, el género *Arthrobacter*, .Si posee las características de utilizar como fuente de carbono Tween80, n-acetil glucosamina- manitol, maltosa, ácido gluconico pero no utilizan N-acetil-glucosaminidasa, como lo hace esta cepa. Según Whitman et al.2012, con respecto a la cepa *Arthrobacter chlorophenolicus*, con un 99% de Identificación según BLAST (tabla.8), la cual al igual que en lo visto experimentalmente es aeróbica obligada posee una ciclo bacilo-coco, con un color perlado como se puede ver en la tabla.4. 24 de las 32 pruebas bioquímicas que se pudieron comparar coinciden con la cepa 2A4 como lo fueron los polioles o también llamados polialcoholes como Dextrina y glucógeno; alcoholes como glicerol; monosacáridos como D-fructosa; disacáridos como maltosa y lactulosa; oligosacáridos como maltotriosa; ácidos orgánicos como ácido-D-glucomico; aminoácidos como L-alanina y L-asparaguina, nucleosidos como adenosina y fosfatos, sin embargo un numero de 13 pruebas que es dicho no son utilizadas por la cepa *Arthrobacter chlorophenolicus*, si son usadas por la cepa 2A4 como lo fue en el caso de los polímeros Tween40 y 80.

La cepa *Arthrobacter phenanthrenivorans* en el cual se tuvo un 99% de identificación (Ver tabla.8). según Whitman et al.2012 se sabe que esta cepa no utiliza glucosa, lactosa o sacarosa, y solo utiliza como fuente de carbón fenantreno y antraceno sin embargo nuestros resultados vistos en la tabla.6, nos dice que la cepa 2A4, si utiliza sacarosa y derivados de lactosa y glucosa. Esto nos indica, que la cepa 2A4, tiene una alta posibilidad de no ser *Arthrobacter phenanthrenivorans*, pero si se encuentra muy cercana a *Arthrobacter chlorophenolicus*.

Para C4 identificada con el género *Pedobacter* se tiene una gran variedad de identificaciones, como se puede observar en la tabla.8; pero nos enfocamos en *Pedobacter roseus* con un 98% de identificación ya que según lo visto en Chung et al.2006, comparte características morfológicas como colonias rosadas y bacilos cortos Gram negativo (tabla.3). En C4 se vio una menor utilización de fuentes de carbono que en la cepa 2A4; en esta solo se pudo ver la utilización de polioles como dextrina, monosacáridos como D-fructosa y D-galactosa, disacáridos como α -D-glucosa y α -D-lactosa, y aminoácidos como L-asparaguina. Con respecto a las características metabólicas vistas en Chung et al.2006 en el caso de *Pedobacter roseus* de las pruebas bioquímicas comparables, 5 de 10 fueron acertadas. En el caso de Whitman et al.2012 solo se pudieron comparar 13 pruebas bioquímicas, de las cuales 9 correspondieron de manera positiva.

En cuanto a *Pedobacter terrae*, con un 98% de identificación (tabla.8), según lo mostrado en Yoon et al.2007, solo se pudieron comparar seis pruebas bioquímicas, de las cuales solo tres concordaron de manera positiva, teniendo en cuenta que las colonias fueron identificadas con un color naranja, lo cual no concuerda con lo descrito en la tabla.4.

Para el caso de *Pedobacter borealis*, con un 98% de identificación, según Gordon et al.2009, de las 16 pruebas bioquímicas comparables, solo once tuvieron una correlación, destacando el hecho de que en D-manitol, hubo concordancia en Api 20NE, pero no así en GN2 MicroPlate™, mientras que L-arabinosa coincidió en ambos. Para *Pedobacter alluviinus*, según Gordon et al.2009, se obtuvo los mismo resultados que para *Pedobacter borealis*, teniendo en cuenta que en las pruebas que no fueron posibles de comparar existe variabilidad entre estas dos.

Es posible que la cepa C4 se encuentre altamente relacionada con esas cepas, muy probable con *Pedobacter roseus* por sus características morfológicas, pero la variabilidad en las pruebas bioquímicas, aunque fueron acotadas, podría indicar solo una cercanía entre las especies.

Para 1A1 que al igual que 2A4 fue identificada con el género *Arthrobacter*, tuvo una identificación del 99% con *Arthrobacter nicotinovorans*, la cual es una bacteria aeróbica, movable con flagelos laterales y con un ciclo bacilo-coco Whitman et al.2012. Con la cepa 2A4, tuvo coincidencia con D-manitol, L-alanina, L-asparraguina y L-Serina. Al haberse realizado la prueba API 20Ne, como es esperado en *Arthrobacter nicotinovorans*, puede reducir nitrato, utiliza Arabinosa, glucosa, asparraguina y no utiliza ácido adipico. Debido a la falta de pruebas bioquímicas, tras dos GP2 MicroPlate™ y GN2 MicroPlate™ fallidos, no se puede discutir de mayor manera.

En el caso de 2A2 donde no se realizó identificación molecular, solo hubo tres resultados positivos en la prueba GN2 MicroPlate™, para los polímeros Tween40 y 80, así como L-arabinosa, un monosacárido, el cual tuvo un resultado negativo en Api 20NE.

Para las cepas D7 y E1, las cuales no demostraron resistencia a cobre con un C.M.I de 150ppm cada una, pero llegando a la mayor concentración disponible de arsénico 46.69mM. Como se puede observar en la tabla.8 obtuvieron la misma identificación molecular para el género *Stenotrophomonas*, las cuales son bacterias móviles, Gram negativas y aeróbicas. En el caso de D7 con un 100% de identificación para *Stenotrophomonas rhizophila* y E1 con un 99% para *Stenotrophomonas rhizophila*, pero a pesar de esto se debe tener en cuenta, que como es posible apreciar en las tablas 5 y 7, ambas poseen diferentes caracterizaciones bioquímicas, si bien ambas pueden utilizar trehalosa y reducir NO₃, solo E1 puede hidrolizar esculina, tres características de *S. rhizophila* (Wolf et al.2002) por tanto corresponden a especies distintas, pero pueden estar muy relacionadas. Por otro lado D1 quien presento tolerancia a arsénico tuvo un 99% de identificación para el género *Stenotrophomonas*, para *Stenotrophomonas rhizophila* y *Stenotrophomonas maltophilia*, en el caso de *S.rhizophila*, coincidió en la hidrólisis de esculina, pero no en la reducción de NO₃; con *S. maltophilia*, coincidió en las pruebas de gelatina, arabinosa, celobiosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol y sorbitol, pero no es manosa, galactosa, sacarosa y oxidasa (Nangia et al.2009)

En cuanto a la cepa D5 donde no se realizó una identificación molecular, pero podemos decir que utiliza, polímeros como dextrina y tween40, monosacáridos como D-fructosa y manosa, disacáridos como turanosa y maltosa, oligosacáridos como maltotriosa, aminoácidos como L-serina, aminas como putrescina, alcohol como glicerol, nucleosidos como Adenosin e Inosina, y monofosfatos. Siendo estos últimos los más destacables en comparación con las dos primeras cepas anteriores estudiadas.

En el caso de las diez cepas que demostraron tolerancia a arsénico, a una concentración de 46.69mM, siete obtuvieron un gran crecimiento a esta concentración, siendo estas las cepas C1, D1, D3, D5, D7, 2E3 y E1, como se puede observar en A.6.

C1 y D3 corresponden al género *Pseudomonas*, bacterias Gram negativas, móviles, con flagelos polares. C1 tuvo una identificación del 99% con *Pseudomonas baetica* y *Pseudomonas jessenii*, en este último caso comparte similitudes bioquímicas, ya que es oxidasa positiva y puede hidrolizar proteasa, sin embargo la diferencia es que no reduce NO₃. D3 tuvo un 100% de identificación con *Pseudomonas putida*; de las pruebas bioquímicas comparables, coincidió en todas las pruebas, siendo estas, negativo para gelatina L-triptofano, D-galactosa, manitol, inositol, D-manosa, L-ramnosa, sorbitol, sacarosa y trehalosa. (Whitman et al.2007).

Para la cepa 2E3 con un 100% de identificación para el género *Microbacterium*, específicamente la especie *Microbacterium oxydans*, las cuales son bacterias móviles y aeróbicas. Coincidió en el uso de D-ribosa como fuente de carbono, así como el uso de maltosa, manitol, glicerol, salicina y dextrina y el no uso de inositol, no coincidió en el uso de galactosa ya que dio negativo, arabinosa y ramnosa dieron negativos, mientras que lactosa y sorbitol positivos, siendo estos cuatro parámetros variables en la especie (Whitman et al.2012)

Debido a las características vistas, se puede esperar que a futuro se hagan análisis más profundos sobre la identificación molecular de las tres cepas principales en resistencia a cobre; para así poder proponer estudios sobre los genes posibles que proveen resistencia a metales como las bombas de eflujo provenientes del operón *czc* y *nss* y a cobre como los genes *cop* y *cus*, así como también poder profundizar en la resistencia a arsénico.

10. CONCLUSIONES

Las conclusiones principales permitidas por el estudio realizado son las siguientes.

- Se obtuvo un perfil bioquímico de cada cepa estudiada, demostrando que todas las bacterias corresponden a diferentes especies, respaldado por las diferencias morfológicas observadas.
- De las catorce cepas autóctonas encontradas en suelos contaminados de la zona de Puchuncaví, tres cepas mostraron resistencia al metal cobre.
- Utilizando el método de Concentración Mínima Inhibitoria, las bacterias resistentes a cobre fueron C4 con un C.M.I de 275ppm, 2A4 con un C.M.I de 250ppm y D5 con un C.M.I de 200ppm. Las dos primeras corresponden a los géneros *Pedobacter* y *Arthrobacter* correspondientemente
- En relación al arsénico diez de las catorce cepas fueron tolerantes a la concentración máxima estudiada de 46.69 mM.
- Se pudo identificar molecularmente diez cepas estudiadas, las cuales corresponden a los géneros *Arthrobacter*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium* y *Stenotrophomona*, los cuales son géneros conocidos por poseer especies resistentes a metales. Teniendo esto en cuenta, podemos decir que no se cumplió la hipótesis.

11. PROYECCIONES FUTURAS

Dada las características de resistencia de las bacterias para cobre y potencialmente para arsénico, se podría realizar un estudio genético para aislar los genes de resistencia de las distintas cepas.

También se podría dar un uso en biorremediación, para ello se debería estudiar cuales de las bacterias podrían ser utilizadas en consorcios con plantas para fitoextracción, una de las formas eficaces que utilizan bacterias resistentes a metales. Además es una técnica posible de utilizar en sitios contaminados como en la zona de Puchuncaví.

12. REFERENCIAS

- Akinci. G, Guven. D. E. Bioleaching of Heavy Metals Contaminated Sediment by Pure and Mixed Cultures of *Acidithiobacillus spp.* (2011) *Desalination*. 268. p221-226.
- Aksornchu. P, Prasertan.P, Sobhon.V. Isolation of Arsenic-Tolerant Bacteria from Arsenic-Contaminated Soil. (2008) *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*. p95-102.
- Altimira. F, Yáñez. C, Bravo. G, González. M, Rojas. L.A, Seeger. M. Characterization of Copper-Resistant Bacteria and Bacterial Communities from Copper-Polluted Agricultural Soils of Central Chile. (2012). *BMC Microbiology* 12. p1-12.
- Andreazza. R, Pieniz. S, Wolf. L, Lee. MK, Carmago. F.A.O, Okeke, B.C. Characterization of Cooper Bioreduction and Biosorption by a Highly Cooper Resistant Bacterium Isolated from Copper-Contaminated Vineyard Soil. (2010). *Science of the Total Environment*. 408. p1501-1507.
- Besaury. L, Bodilis. J, Delgas. F, Andrade. S, De la Iglesia. R, Ouddane. O, Quillet. L. Abundance and Diversity of Cooper Resistance Genes *cusA* and *copA* in Microbial Communities in Relation to the Impact of Copper on Chilean Marine Sediments. (2013) *Marine Pollution Bulletin*. V67. p16-25.
- Cavalca. L, Zanchi. R, Corsini. A, Colombo. M, Romagnoli. C, Canzi. E, Andreoni. V. Arsenic-Resistant Bacteria with Roots of the Wild *Cirsium arvense* (L.) Plant from an Arsenic Polluted Soil, and Screening of Potential Plant Growth-promoting Characteristics. (2010). *Systematic and Applied Microbiology*. 33. p154-164.
- Chien. C, Kuo. Y, Chen. C, Hung. C, Yeh. C, Yeh. W. Microbial Diversity of Soil Bacteria in Agricultural Field Contaminated With Heavy Metals. (2008). *Journal of Environmental Science* 20. p359-363.
- Chung. Y. H, Dong. H. C, Byung C. C. *Pedobacter roseus* sp. nov, Isolated from a Hypertrophic Pond, and Emended Description of the Genus *Pedobacter*. (2006). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56. p1831-1836
- Díaz. R, Gamazo. C, López-Goñi. I. *Manual Práctico de Microbiología*. (1999). Editorial Masson 2da edición.

Drewniaka. L, Dziewitb. L, Ciezkowska. M, Gaworc. J, Gromadkac. R, Sklodowska. A. Structural and functional genomics of plasmid pSinA of *Sinorhizobium* sp. M14 encoding genes for the arsenite oxidation and arsenic resistance. (2013) Journal of Biotechnology . V164. p 479-488.

Gordon. N.S, Valenzuela. A, Adams. S.M, Ramsey. P. W, Pollock. J.L, Holben.W.E and Gannon. J. E. *Pedobacter nyackensis* sp. nov., *Pedobacter alluvionis* sp. nov. and *Pedobacter borealis* sp. nov Isolated from Montana flood-plain Sediment and Forest soil. (2009). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59. p1720-1726

Gülten. Y-A. Heavy Metal Contamination of Surface Soil Around Gebze Industrial Area, Turkey. (2011). Microchemical Journal 99. p82-92.

Halter. D, Cordi. A, Gribaldo. S, Gallien. S, Goulhen-Chollet. F, Heinrich-Salmeron. A, Carapito. C, Pagnout. C, Montaut. D, Seby. F, Van Dorsselaer. A, Schaeffer. C, Bertin. P. N, Bauda. P, Arsène-Ploetze. F. Taxonomic and Functional Prokaryote Diversity in Mildy Arsenic-contaminated Sediments. (2011). Research in Microbiology. 162. p877-887

Harichová. J, Karellová. E, Pangallo. D, Ferienc. P. Structure Analysis of Bacterial Community and Their Heavy-Metal Resistance Determinants in the Heavy-Metal-Contaminated Soil Sample. (2012) Biologia. Section Cellular and molecular Biology. 67. p1038-1048.

Hartley. T.N, Macdonald. A.J, McGrath. S.P, Zhao. F-J. Historical Arsenic Contamination of Soil Due to long-term Phosphate Fertilizer Applications. (2013). Environmental Pollutions 180. p259-264.

Hashim. M.A, Mukhopadhyay. S, Sahu. J.N, Sengupta. B. Remediation Technologies for Heavy Metal Contaminated Groundwater. (2011). Journal of Environmental Management 92. p2355-2388.

Hazrat.A, Ezzat.K, Muhammad. A.S. Phytoremediation of Heavy Metals-Concepts and Applications. (2013). Chemosphere 91. p869-881.

Jackson. C. R, Dugas. S. L, Harrison. K. G. Enumeration and characterization of arsenate-resistant bacteria in arsenic free soils. (2005) *Soil Biology & Biochemistry*. 37. p2319–2322.

Karelová. E, Harichová. J, Stojnev. T, Pangallo. D. The Isolation og Heavy-Metal Resistant Culturable Bacteria and Resistance Determinants from a Heavy-Metal-Contaminated Site. (2011). *Versita Biology* 66. p18-26.

Larios. R, Fernández-Martínez. R, Álvarez. R, Rucandio. I. Arsenic pollution and fractionation in sediments and mine waste samples from different mine sites. (2012) *Science of the Total Environment* . V431. p426–435.

Mackie. K.A, Müller. T, Kandeler. E. Remediation of Cooper in Vineyards – A Mini Review. (2012) *Environmental Pollution*. 167. p16-26

Majumber. A, Bhattacharyya. K, Bhattacharyya. S, Kole. S.C. Arsenic-Tolerant, Arsenite-Oxidizing Bacterial Strain in the Contaminated Soils of West Bengal, India. (2013). *Science of the Total Environment* 463-464. p1006-1014.

Mandal B. M, Suzuki. K.T. Arsenic Round the World: a review. (2002) *Talanta* . V58. p 201-235.

Marabottini. R, Stazi. S.R., Papp. R. Grego. S, Moscatelli, M.C. Mobility and distribution of arsenic in contaminated mine soils and its effects on the microbial pool. (2013.) *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 96. p147-153

Margesin. R, Plaza. G.A, Kasenbacher. S. Characterization of Bacterial Communities at Heavy-metal Contaminated Sites. (2011). *Chemosphere*. 82. p583-1588.

Máthé. I, Benedek. T, Táncsics. A, Palatinszky. M, Lányi. S. Diversity, Activity, Antibiotic and Heavy Metals Resistance of Bacteria from Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soils Located in Harghita County (Romania). (2012) *International Biodeterioration & Biodegradation*. 73. p41-49.

Morales. R. W. Aislamiento de bacterias resistentes a cobre desde el suelo de La Greda-Puchuncaví. (2012). Universidad de Valparaíso.

Muena. V, González. I, Neaman. A. Efectos del Encalado y la Fertilización Nitrogenada Sobre el Desarrollo de *Oenothera affinis* en Suelos Afectado por la Minería Del Cobre. (2010) Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal. 10. p102-114.

Nangia. Y, Wangoo. N, Goyal. N, Shekhawat. G, Suri. C. R. A novel Bacterial Isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as Living Factory for Synthesis of Gold Nanoparticles. (2009) Microbial Cell Factory. V8.

Nithya. C, Gnanalakshmi. B, Pandian. S.K. Assessment and Characterization of Heavy Metal Resistance in Palk Bay Sediment. (2011) Marine Environmental Research. 71. p283-294.

Pepi. M, Protano. G, Ruta. M, Nicolardi. V. Arsenic-resistant *Pseudomonas* spp. And *Bacillus* sp. Bacterial Strains Reducing As(V) to As(III), Isolated from Alps Soil, Italy.(2011). Folia Microbiologica. 56. p29-35.

Piotrowska-Seget. Z, Cycon.M, Kozdrój. J. Metal-Tolerant Bacteria Occurring in Heavily Polluted Soil and Mine Soil. (2005) Applied Soil Ecology 28. p237-246.

Puyen. Z, Villagrasa. E, Maldonado. J, Diestra. E, Esteve. I, Solé. A. Biosorption of Lead and Cooper by Heavy-Metal Tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. (2012) Bioresource Technology. 126. p233.237.

Qihong. Z, Ying. W, Ye. C, Anguo. C, Min. R, Yongsheng. G, Zongfan. Y, Shengyun. W, Anla. H, Qingli. B, Liang. R, Hang. C, Shuyang. Q, Wenjun. C, Chuanlai. H, Fangbiao. T, Dexiang. X, Jing. X, Longping. W, Li. L. Potential health risks of heavy metals in cultivated topsoil and grain, including correlations with human primary liver, lung and gastric cancer, in Anhui province, Eastern China. (2014). *Science of The Total Environment*. 470-471. p340-347

Ramirez-Andreotta. M. D, Brusseau. M. L. Artiola. J. F, Maier. R. M. A greenhouse and field-based study to determine the accumulation of arsenic in common homegrown vegetables grown in mining-affected soils. (2013) Science of the Total Environment. 443. p299–306.

Rathnayake. I.V.N, Megharaj. M, Kishnamurti. G.S.R, Bolan. N.S, Naidu. R. Heavy Metal Toxicity to Bacteria – Are the Existing Growth Media Accurate Enough to Determine Heavy Metal Toxicity?. (2013) Chemosphere. 90. p1195-1200.

Rojas. L.A, Yáñez. C, González. M, Lobos. S, Smalla. K, Seeger. M. Characterization of the Metabolically Modified Heavy Metal-Resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 Generated for Mercury Bioremediation. (2011) PLoS ONE. 6. 3.

Romero. J. I. Determinación de Resistencia a Cobre en Bacterias Aisladas desde el Tranque de Relaves Mineros Barahona Cero. (2013). Universidad de Valparaíso.

Seeley. M, Wells. C. S, Wannamaker. E. J, Mattuck. R. L, Ren. S, Beck. B. D. Determining soil remedial action criteria for acute effects: The challenge of copper. (2013) Regulatory Toxicology and Pharmacology. V 65. p47–59.

Singh. J.S, Abhilash. P.C, Singh. H. B. Singh. R. P, Singh. D. P. Genetically Engineered Bacteria: An Emerging Tool for Environmental Remediation and Future Research Perspectives. (2011). 480. p1-9.

Thorsen. M.K, Brandt. K.K, Nybroe. O. Abundance and Diversity of Culturable *Pseudomonas* Constitute Sensitive Indicators for Adverse long-term Copper Impacts in Soil. (2013). Soil Biology & Biochemistry 57. p933-935.

Valverde. A, González-Tirante. M, Medina-Sierra. M, Santa-Regina. I, García-Sánchez. A, José M. Diversity and community structure of culturable arsenic-resistant bacteria across a soil arsenic gradient at an abandoned tungsten–tin mining area. (2011) Chemosphere. 85. p129–134

Van Lis. R, Nitschke. W, Duval. S, Schoepp-Cothenet. B. Arsenic as bioenergetic substrates. (2013) Biochimica et Biophysica Acta 1827. p176–188.

Wauters. G, Charlier. J, Janssens. M, Delmée. M. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov. and *Arthrobacter albus* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens. (2000). Journal of Clinical Microbiology. 38. p2412-2415

Whitman. W. B, Parte. A, Goodfellow. M, Kämpfer. P, Busse. H-J, Trujillo. M. E, Ludwig. W, Suzuki. K. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The *Gammaproteobacteria*. (2007) (Google eBook).

Whitman. W. B, Parte. A, Goodfellow. M, Kämpfer. P, Busse. H-J, Trujillo. M. E, Ludwig. W, Suzuki. K. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The *Actinobacteria*. (2012) (Google eBook).

Winn. W. C, Allen. S. D, Janda. W. M, Koneman. E. W, Procop. G. W, Schrenckenberger. P. C, Woods. G. L. Koneman. Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color. (2006). Editorial Medica Panamericana 6ta edición. (Google ebook)

Wolf. A, Fritz. A, Hagemann. M, Berg. G. *Stenotrophomonas rizhophila* sp. nov, a Novel Plant-associated Bacteria With Antifungal Properties. (2002). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52. p1937-1944

Yoon. J-H, Kang S-J, Oh. T-K. *Pedobacter terrae* sp. nov., Isolated from Soil. (2007). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57. p2462-2466

13. ANEXOS

Anexo 1. API® 20 NE

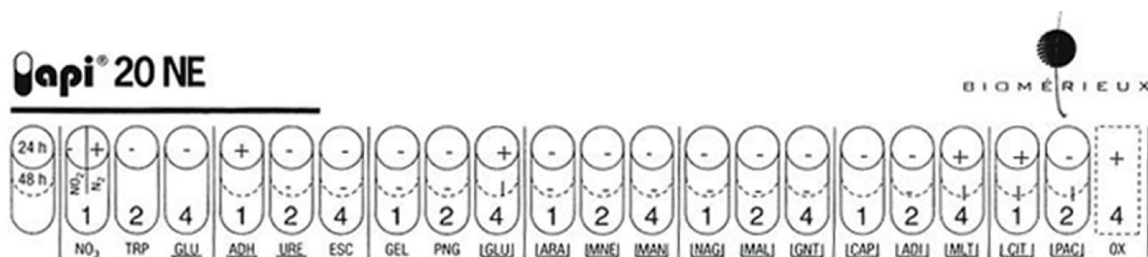


Figura 5. API® 20 NE

Fuente Biomérieux®, Francia.

Siguiendo las instrucciones otorgadas por Biomérieux® S.A, se inocularon los Test desde NO₃ hasta PNPG (solo los tubos) distribuyendo la suspensión bacteriana (NaCl 0.85%) usando la misma pipeta, evitando la formación de burbujas. Posteriormente se abrió una ampolla de API AUX MEDIUM® y se añadieron 200µL de la suspensión bacteriana y se homogenizaron, con esto se rellenaron tubos y cúpulas desde [GLU] hasta [PAC], dejando un menisco plano o convexo. Finalmente se añadió aceite mineral a GLU, ADH y URE. Se dejó incubar por 24 horas a 25°C (Fig.5).

A las 24 horas se realizaron los test NO₃ y TRP. En el test NO₃ se añadió una gota del reactivo NIT1® y una gota del reactivo NIT2® a la cúpula de NO₃; después de 5 minutos la aparición de color rojo indico reacción positiva, de no haber color podría ser por causa de la producción de nitrógeno, por lo tanto se agregó 2-3mg de reactivo Zn en la cúpula, después de 5 minutos de ser incoloro indicó una reacción positiva de ser rojo-rosa indicó reacción negativa.

Para el test TRP, se añadió una gota de reactivo de JAMES®, con resultados instantáneos, de ser rosado será positivo.

Para el test GLU, un color amarillo indicó reacción positiva, azul o verde negativo. Para ADH, de naranja a rojo indicó reacción positiva, amarillo negativo y URE de naranja a rojo indicó reacción positiva, amarillo negativo.

Para proseguir a las 48 horas, en el caso de NO₃ y TRP se sacaron los reactivos con una pipeta, y se sellaron con aceite mineral.

ESC indicó reacción positiva como un color de plomo a negro y negativa de color amarillo, GEL la difusión de color negro indicó reacción positiva y en el caso de PNPG amarillo indico reacción positiva e incoloro negativo.

Anexo 2. Soluciones Cobre

Tabla.11 Solución Stock Cobre

Solución Stock	50.000ppm 0.795M
Preparación a 25mL	4.9610g
Sal	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
MM	249.68g/mol
Pureza	99%

Tabla.12 Soluciones Patrones Cobre

	Solución Patrón (ppm)	Solución Patrón (mM)	Solución Patrón 50.000ppm (0.795M) (μL)	Agua Destilada Estéril (mL)
P1	2000	31.80	160	3.840
P2	3000	47.70	240	3.760
P3	4000	63.60	320	3.680
P4	5000	79.50	400	3.600
P5	6000	95.40	480	3.520
P6	6400	101.76	512	3.488
P7	7000	111.30	560	3.440
P8	8000	127.20	640	3.360
P9	9000	143.10	720	3.280
P10	10.000	159.00	800	3.200
P11	11.000	174.90	880	3.120
P12	12.000	190.80	960	3.040
P13	13.000	216.64	1090	2.960
P14	14.000	222.60	1120	2.880
P15	16.000	254.40	1280	2.720

Anexo 3. Soluciones Arsénico

Tabla.13 Solución Stock Arsénico

Solución Stock	50.000ppm 0.667M
Preparación a 25mL	5.206g
Sal	$Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$
MM	312.01g/mol
Pureza	99%

Tabla.14 Solución Final Arsénico

	Solución Final (ppm)	Solución Final (mM)	Solución Patrón 50.000ppm (0.795M) en 20mL Medio LPTMS (mL)
P1	10	0.133	0.004
P2	100	1.334	0.04
P3	500	6.670	0.2
P4	1000	13.34	0.3
P5	1250	16.68	0.4
P6	1500	20.00	0.5
P7	1750	23.35	0.6
P8	2000	26.28	0.7
P9	2250	30.02	0.8
P10	2500	33.35	0.9
P11	2750	36.69	1.0
P12	3000	40.02	1.1
P13	3500	46.69	1.3

Anexo.4 Secuencias

1A1

```
GGCAGTCTCCTATGAGTCCCCGCCATAACGCGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA  
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAACCGACCGCAAGCGGGGCACCTGTTTCCAGGTAT  
TACCGGTTTCATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTTCGCGCCGTAACCTCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGA  
AAACGTGGAATGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCC  
ATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTACAGTACAGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATT  
CACCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCTACTGCACTCTAGTCTGCCGTACCCACTGCAGAACCGGAGTTGAGCC  
CCGGTCTTTCACAGCAGACGCGACAAACCGCTACGAGCTCTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCGCCCTAC  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTTCGAGGTACCGTCACTTTTCGTTCTTCCCAACGAAA  
AAAGGTACACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCG  
CACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTACCCTCTCAGGCCGGCTACCCG  
TCGTCGCCCTGGTAGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGTCCATCCAAAACCACAAAAGCTTTCCACC  
CCCCACCATGCGATGAGGAGTCATATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAGAGTCAAGGGCAGGTTACT  
CACGTGTTACTCACCCGTTGCCACTAATCCCC
```

1B2

```
ACCTTCCTCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTCCCCACCATCACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCG  
CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAACCGACCGCAAGC  
GGGGGACCTGTTTCCAGGTCTTACCGGTTTCATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCAT  
GCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTTCGCGCCGTAACCTCCACACGCGGGCACTTA  
ATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAAACGTGGAATGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGG  
TATCTAATCCTGTTTCGCTCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAAGTAAATGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGT  
CCTCCTGATATCTGCGCATTTACCCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCTACATCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACC  
GCAGATCCGGAGTTGAGCCCCGACTTTACGGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTCAGCCCAATAATTCC  
GGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTTCGAGGTACCGTCAC  
TTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTGCATCAGGCTTGC  
GCCATTGTGCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTACC  
CTCTCAGGCCGGCT
```

2A4

```
GTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAA  
CTGAGACCGGCTTTTTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGC  
CCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGCTCCCACTTCTCCGAGTTGACCCCGCAGTCTCCTATGAGTCCC  
CACCATCACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG  
ACGACAACCATGCACCACCTGTAAACCGACCGCAAGCGGGGACCTGTTTCCAGGTCTTACCGGTTTCATGTCAAGCCTT  
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTTGAGTTT  
TAGCCTTTCGCGCCGTAACCTCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAAACGTGGAATGTCCCCACA  
CCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTC  
AGTTAATGCCAGAGACCTGCCTTCGCGATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCC  
AGTCTCCCTACATCACTCTAGTCTGCCGTACCCACCGAGATCCGGAGTTGAGCCCCGACTTTACGGCAGACGC  
GACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGGATAACGCTTTCGCCCCACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA  
CGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTTCGAGGTACCGTCACTTTTCGTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGC  
CGTCATCCCTCACGCGGCGTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG  
TCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTACCCTCTCAGGCCGGTACCCTGCTGCCTTGGTAGGCCATTA  
CCCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGTCCATCCAAAACCACAAAAGCTTTCCACCAACCACCATGCGATAGTCAGTC  
ATATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAGAGTCAAGGGCAGGTTACTCACGTGTTACTACCCGTTTCG  
CACT
```

C1

TATTCACGCGACATTCTGATTGCGGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACT
ACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCC
AGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCA
CCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
ACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCTATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGG
TAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAA
CCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAG
TTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAAGTATC
AGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATCCACCACC
CTCTACCATACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACATTCAACTTAACAAACC
ACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTA
GCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACTCAAAACAGCAAAGTATAATTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACA
ATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTGCCTTGGTG
AGCCATTACCTACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCC
GTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCCTTTCGAAACGTTGTCCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCA

C4

GGCCCGGAACGTATTCACCGCGTCATTGCTGATACGCGATTACTAGCGAATCCAACCTTCATGGGGTCGAGTTGCAGA
CCCCAATCCGAAGTGTGAATGGCTTTGTGAGATTGCGATCATATTGCTATGTAGCTGCCCTCTGTACCATCCATTGTAGC
ACGTGTGTAGCCCCGACGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCTCCTTCTCTCTGTTTGCACAGGCAGTCTG
TTTAGAGTCCCCACCATAACGTGCTGGCAACTAAACATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACACCTCACG
GCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTAGTTTCGTGTCCTTGCAGACTCATTATCTCTAAATGATTCATAACTTT
CAAGCCCCGGTAAGTTCTCGCGTATCATCGAATTAACACATGCTCCTCCGCTTGCGGGCCCCCGTCAATTCCT
TTGAGTTTCACTCTTGCGAGCGTACTCCCCAGGTGGAACACTTAACGCTTTCGCTTAGCCGCTGACTGTGTATCGCCAA
CAGCGAGTGTTCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTATCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGCG
TCAATAAGACCATAGTAAGCTGCCTTCGCAATCGGTGTTCTGAGACATATCTATGCATTTACCCGCTACTTGTCTCATTCC
GCCTACCTCTAGTCCATTCAAGCCCATCAGTATCAAGGGCACTGCGATAGTTGAGCTACCGTCTTTCACCCCTGACTTAA
CAGGCCGCCTACGCACCTTTAAACCAATAAATCCGGATAACGCTTGGATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG
GAGTTAGCCGATCCTTATTTCCGGTACATTCAGCTCTTACACGTAAAGAGGTTTATCCCGGATAAAAGCAGTTTACA
ACCCATAGGGCAGTCTTCTGCACGCGGCATGGCTGGTTTACAGAGTTGCCTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCCT
CCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGCCATCCTCTCAGATCCCCTAGTCATCGTGCCTTGG
TGGGCCGTTACCCCGCAACTAGCTAATGACACGCATGCCATCTCAATCCATAAATGTTTATGATCATTGTCAGGTTG
GGACTGTGATTTTATGCGGTATTAATCCGGATTTCTCCGGCTATCCCCCTGATTAAGGTAGGTTGCATACGCGTTACGG
ACCCGTGCGCCACTTTCTCATCCAGCAA

D1

CCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTC
CAATCCGGACTGAGATAGGGTTTTCTGGGATTGGCTTGCCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTAC
GTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTCACCGCGGTCTCCT
TAGAGTTCCCAACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCGACATG
TCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCC
TTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCA
CCCAACATCCAGTTTCGCATCGTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCT
CAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTTCTCCCGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCGG
GAATTCCTACTACCCTCTACCACACTCTAGTCGCCAGTATCCACTGCAATTCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACAAC
AGACTTAAACAACCACCTACGCACGCTTACGCCAGTAATTCGAGTAACGCTTGCACCTTCGTATTACCGCGGCTG
CTGGCAGGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGGTACCGTCAGAACAAACCGGGTATTAGCCGACTGCTTTTCTTTCCCA
ACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATAT
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTTTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGCTACG
GATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTACCCCGCCAAGTACTAATCCGACATCGGCTCATCTATCCGCGCAAGGCCCGAAG
GTCCCCTGCTTTCACCCGAAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTT

D3

GCCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTG
CGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCC
TTAGAGTGCCCAACCATTACGTGCTGGTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCAT
GTCAAGGCCTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
ATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTAAGGCGGCTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATT
CCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTC
AGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGA
AATTCACCAACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCC
AATTAACAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGATTAAACGCTTGCACCTCTGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAAACACTAACGTATTAGGTTAATGCCCTTCTCCCAACTT
AAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAATATTCCC
CACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATC
GTCGCCTTGGTGGCCATTACCTACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTC
CCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTTCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCTAG
GCATTACTACCCGTCCGCGC

D7

GCCCCGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACT
CCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTGCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTA
CGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCGGTCTC
CTTAGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAAGTTCTCGACA
TGTC AAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTG
CACCCAACATCCAGTTGCGATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGTGC
CTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCTCCCGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACC
GGGAATTCCTACTACCCTCTACCACACTCTAGTCGCCAGTATCCACTGCAATTCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACA
ACAGACTTAAACAACCACCTACGCACGCTTACGCCAGTAATTCGAGTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACCGCGGC
TGCTGGCAGGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGGTACCGTCAGAACAACCGAGTATTAATCGACTGCTTTTCTTTCCC
AACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATA
TTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGCTAC
GGATCGTCGCTTGGTGGCCCTTACCCGCGCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATCTATCCGCGCAAGGCCGAA
GGTCCCCTGCTTTCACCCGAAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCACGAAAAGGTAGATT
CCGATGATTCTCACCCGTCGCCACTCGCCACCATAAGAGCAAGT

2E3

GGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTATCCCATGAGTTCCCACCATTACGTG
CTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATG
CACCACCTGTTTACGAGTGTCAAAGAGTTGACCATTTCTGGCCCGTTCTCGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTT
GCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCC
GTACTCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCACAAGTTCCTCCAAAC
GTTTACGGGGTGGACTACCAGGGTATCTAAGCCTGTTTGTCTCCCAACCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAG
AGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCATCTCCCCTACC
GCACTCTAGTCTGCCGTACCCACTGCAGGCCGGAGGTTGAGCCTCCGATTTACAGCAGACGCGACAACCCGCTA
CGAGCTCTTACGCCAATAATTCCGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG
CGTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTGCTTCTTCCCTGCTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCGTCCCTCAC
GCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTC
TCAGTCCCAGTGTGGCCGGTACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGACGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCACAAG
CTGATAGGCCGCGAGCCATCCCCAACCAGAAATTCTTTCCAGACGCGACCATGCGGTACGTCACATATCCAGTATTA
GACGCCGTTTCCAGCGCTTATCCCAGAGTCAGGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTACCCG

E1

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCA
TGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTGCCTCGCGGGTTTGCAGCCCT
CTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCG
GTTTGTACCCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGG
ACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCA
TCTCTGAAAAGTTCTCGACATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATACTCCACCGCTT
GTGCGGGCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGACTCCCCAGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTC
GATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCCACGTTTCGTGCCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCCCTCCGATCTCTA
CGCATTTACTGCTACACCGGGAATTCACCTACCCTCTACCACACTCTAGTCGCCAGTATCCACTGCAATTCAGGTT
GAGCCCAGGGCTTTCACAACAGACTTAACAACCACCTACGCACGCTTACGCCAGTAATTCGAGTAACGCTTGCAC
CCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAAGTTAGCCGGTGTATTCTTTGGGTACCGTCAGAACAAACCGAGTAA
TCGACTGCTTTTCTTCCCAACAAAAGGGCTTACAACCCGAAGGCCTTCTCACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGC
TTGCGCCCATTTGCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTTAGGCTGATC
ACCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTACCCCGCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATCTA
TCCGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCACCCGAAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCC
CCACGAAAAGGTAGATTCCGATGTATTCTCACCCGTCCGCCACTCGCCACCCATAAGAGCAAGCTC

Anexo. 5

Tabla.15 Resistencia a cobre

	Cepa/ppm	C	50	75	100	125	150	160	175	200	225	250	275	300	325	350	400	C.M.I
1	CM	5	5	5	5	5	3	3	2	2	1	1	1	0	0	0	0	300
2	E. coli	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50
3	1A1	5	5	5	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	160
4	1A4	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
5	2A2	5	5	5	5	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	160
6	2A4	5	5	5	5	5	3	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	250
7	1B2	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
8	C1	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
9	C4	5	5	5	5	5	5	5	4	3	2	1	0	0	0	0	0	275
10	D1	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
11	D3	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
12	D5	5	5	5	5	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200
13	D7	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
14	2E3	5	5	5	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
15	2E4	5	5	5	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
16	E1	5	5	5	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150

5 a 0, 5 indicando un crecimiento normal, 0 sin crecimiento.

Anexo. 6

Tabla.16 Resistencia a arsénico (V)

	Cepa/ppm	C	10	100	500	1000	1250	1500	1750	2000	2250	2500	2750	3000	3500	C.M.I
1	CM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	>3500
2	E. coli	5	5	5	4	4	3	3	1	1	1	1	1	0	0	3000
3	1A1	5	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1000
4	1A4	3	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2000
5	2A2	5	5	4	4	2	3	3	2	1	0	0	0	0	0	2250
6	2A4	5	5	3	4	1	3	2	1	1	1	1	1	1	1	>3500
7	1B2	5	5	5	4	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	>3500
8	C1	5	5	5	4	4	3	2	4	3	5	4	4	3	3	>3500
9	C4	5	5	5	4	3	2	1	1	1	1	1	1	1	0	3500
10	D1	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	3	3	4	>3500
11	D3	5	5	5	5	5	5	4	4	4	5	5	5	4	3	>3500
12	D5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	5	5	5	5	4	>3500
13	D7	5	5	5	5	5	4	4	4	4	5	5	5	4	4	>3500
14	2E3	5	5	5	4	5	5	5	4	4	5	5	5	4	4	>3500
15	2E4	5	5	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1250
16	E1	5	5	5	5	5	4	4	4	4	5	4	4	4	4	>3500

5 a 0, 5 indicando un crecimiento normal, 0 sin crecimiento.