

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A COBRE EN ALTAS
CONCENTRACIONES SOBRE LA DIVERSIDAD DE LAS
COMUNIDADES BACTERIANAS DE LOS SUELOS AGRÍCOLAS
DE LA REGIÓN DE VALPARAÍSO”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica
área de especialización en Bioquímica Ambiental y
Memoria para optar al título profesional de Bioquímico**

Por:

FABIOLA ALEJANDRA ALTIMIRA PASSALACQUA

Director de Tesis

Dr. Michael Seeger Pfeiffer

Co-Directora de Tesis

Dra. Carolina Yáñez Prieto

SANTIAGO- CHILE

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

FABIOLA ALEJANDRA ALTIMIRA PASSALACQUA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización Bioquímica Ambiental y al título de Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 11 de Enero de 2011.

Director de Tesis:

Dr. Michael Seeger Pfeiffer.

Co-Directora de Tesis:

Dra. Carolina Yáñez Prieto

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez (Presidente)

Dr. Davor Cotoras

Dr. Francisco Chávez

ÍNDICE DE MATERIAS

	página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Metales pesados.....	1
1.2. Contaminación de los suelos agrícolas con los metales pesado.....	1
1.3. Los suelos agrícolas de Chile que presentan altas concentraciones de metales pesados.....	2
1.4. Las comunidades bacterianas y su importancia en los suelos agrícolas.....	3
1.5. El estudio y análisis de la diversidad de las comunidades bacterianas.....	5
1.6. Los efectos de los metales pesados sobre las comunidades bacterianas presentes en los suelos agrícolas.....	7
1.7. Los mecanismos de homeostasis y de resistencia a metales pesados en bacterias.....	8
1.7.1. Los mecanismo de homeostasis y de resistencia al cobre en bacterias.....	9
1.7.2. Los sistemas de resistencias al mercurio y a los compuestos organomercuriales.....	12
1.7.3. Los sistema de resistencia a níquel, cobalto y cadmio.....	13
1.7.4. Los sistema de resistencia a cromato.....	15
1.8. Planteamiento del Problema.....	17
1.9. HIPÓTESIS.....	17
1.10. OBJETIVOS.....	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. Reactivos.....	19
2.2. Cepas bacterianas.....	19
2.3. Medios de cultivo.....	19
2.4. Área de estudio y toma de muestra.....	20
2.5. Caracterización de los suelos agrícolas.....	20
2.6. Recuento de las bacterias heterótrofas y aislamiento de las cepas tolerantes a cobre.....	22

2.7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los metales pesados de las cepas aisladas.....	22
2.8. Preparación de templado para PCR.....	22
2.9. Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA).....	23
2.10. Secuencias y análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas.....	23
2.11. Amplificación de los genes que codifican para los sistemas de resistencia a metales pesados.....	23
2.12. Aislamiento de plásmidos.....	25
2.13. Crecimiento de la cepa O12 bajo la presión selectiva del cobre.....	25
2.14. PCR-DGGE de comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.....	25
2.15. Análisis estadístico de DGGE.....	27
2.16. Determinación de la diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas.....	28
2.17. Detección del gen <i>copA</i> en el ADN metagenómico de los suelos agrícolas.....	28
2.18. Análisis estadístico.....	28
3. RESULTADOS.....	29
3.1. Caracterización fisicoquímica de los suelos agrícolas.....	29
3.2. Concentración de los metales pesados en los suelos.....	29
3.3. Aislamiento de las bacterias heterótrofas tolerantes a cobre.....	30
3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a los metales pesados.....	31
3.5. Análisis de ARDRA de las cepas tolerantes a cobre aisladas del valle de Aconcagua.....	32
3.6. Secuencias y análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas.....	33
3.7. Detección de los genes de resistencia a metales pesados por PCR en las cepas tolerantes a metales pesados del valle de Aconcagua.....	34
3.8. Detección de plásmidos en las cepas tolerantes a metales pesados aisladas del valle de Aconcagua.....	36
3.9. Crecimiento de la cepa O12 en medio mínimo Tris suplementado con cobre.....	36
3.10. Análisis de las comunidades bacterianas mediante DGGE del gen ARNr 16S.....	38
3.11. Determinación de la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.....	43
3.12. Detección del gen <i>copA</i> en el ADN metagenómico de los suelos agrícolas.....	43

4. DISCUSIÓN	45
4.1. Determinación de la concentración de cobre en los suelos agrícolas del valle de Aconcagua.....	45
4.2. Estudio de la concentración de cobre intercambiable y su relación con la tolerancia de las bacterias a este metal.....	46
4.3. Aislamiento y caracterización de cepas tolerantes a metales pesados.....	47
4.4. Secuencias y análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas.....	48
4.5. Detección de genes de resistencia a metales pesados en las cepas aisladas.....	50
4.6. Detección de plásmidos en las cepas tolerantes a metales pesados.....	51
4.7. Efectos del cobre sobre el crecimiento de la cepa bacteriana O12.....	53
4.8. Efectos del cobre la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.....	54
4.9. Detección del gen <i>copA</i> en el ADN metagenómico de los suelos agrícolas.....	54
4.10. Adaptación de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas del valle de Aconcagua a las altas concentraciones de cobre.....	55
5. CONCLUSIONES	57
6. PROYECCIONES	59
7. BIBLIOGRAFÍA	60
8. ANEXO	69
8.1. Secuencia del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas tolerantes a metales pesados.....	69
8.2. Presentaciones en Congresos.....	72

INDÍCE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Dos modelos hipotéticos de los efectos del estrés por metales pesados sobre la diversidad y sobre la función de una comunidad bacteriana.....	8
Figura 2. Sistemas de homeostasis de cobre en <i>E. coli</i> y <i>E. hirae</i>	11
Figura 3. Sistema de resistencia a mercurio en bacterias.....	13
Figura 4. Sistema de resistencia a níquel, cobalto y cadmio en <i>C. metallidurans</i> 31A....	14
Figura 5. Sistema de resistencia a cromato en <i>C metallidurans</i> CH34.....	16
Figura 6. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de los suelos agrícolas de la región de Valparaíso.....	21
Figura 7. Sitios de muestreo de los suelos agrícolas de la región de Valparaíso.....	21
Figura 8. Estrategia de amplificación de la región V6 del gen ARNr 16S del ADN de comunidades bacterianas en los suelos agrícolas.....	26
Figura 9. Esquema de análisis estadístico realizado a partir de los perfiles de DGGE de los genes ARNr 16S de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.....	27
Figura 10. Determinación de la CMI de cepas aisladas desde los suelos del valle de Aconcagua.....	31
Figura 11. Perfiles de ARDRA de cepas bacterianas aisladas del valle de Aconcagua...	33
Figura 12. Relación filogenética entre las cepas C21, O4, O12, A32 y A55.....	34
Figura 13. Detección de genes de resistencia a metales pesados en cepas bacterianas aisladas desde el valle de Aconcagua.....	35
Figura 14. Detección de plásmidos en cepas bacterianas aisladas de los suelos del valle de Aconcagua.....	36
Figura 15. Efectos del cobre sobre el crecimiento de la cepa O12.....	37
Figura 16. Detección de la región variable V6 del gen ARNr 16S de ADN bacteriano de suelo.....	39

Figura 17. Perfil de DGGE de gen ARNr 16S de ADN bacteriano de suelos agrícolas...	40
Figura 18. Análisis de componentes principales obtenido desde el perfil de bandeo de DGGE del gen ARNr 16S de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.....	41
Figura 19. Dendograma de UPGMA de perfiles DGGE del gen ARNr 16S de las comunidades bacterianas de los suelo agrícolas.....	42
Figura 20. Detección del gen <i>copA</i> desde ADN metagenómico de los suelos agrícolas...	44

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Valores de concentraciones máximas de metales pesados en los suelos permitidas por la Unión Europea.....	2
Tabla 2. Contenidos totales promedio de cobre, plomo, zinc, y arsénico (mg/kg), en los estratos superficiales de suelos del país.....	3
Tabla 3. Cepas bacterianas empleadas en esta tesis.....	19
Tabla 4. Partidores utilizados para la amplificación por PCR de los genes <i>copA</i> , <i>nccA</i> , <i>czcD</i> , <i>chrB</i> , <i>merA</i> y <i>merB</i>	24
Tabla 5. Características fisicoquímica de los suelos agrícolas.....	29
Tabla 6. Concentración de metales de los suelos agrícolas.....	30
Tabla 7. Recuento de bacterias heterótrofas totales y tolerantes a cobre de los suelos agrícolas.....	30
Tabla 8. Número de cepas tolerantes a cobre aisladas desde suelos agrícolas del valle de Aconcagua.....	31
Tabla 9. Determinación de la CMI a metales pesados de las cepas bacterianas aisladas desde el valle de Aconcagua.....	32
Tabla 10. Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de las cepas C21, O4, O12,A32 y A55 comparadas con las depositadas en bases de datos públicas.....	33
Tabla 11. Valores de los índices de diversidad de Shanon y riqueza de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.....	43
Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria de metales pesados para las cepas Bacterianas aisladas de los suelos agrícolas con alto contenido de metales.....	49
Tabla 13. Plásmidos que poseen genes de resistencia a metales pesados.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ARNr.....	Ácido ribonucleico ribosomal
BSA.....	Sueroalbumina de bovino
DGGE.....	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
EDTA.....	Etilendiaminotetraacetato
Kb.....	Mil pares de bases
LB.....	Medio Luria-Bertani
NCBI.....	Centro Nacional (EEUU) de información biotecnológica
pb.....	Pares de base
PCR.....	Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa
TAE.....	Tampón tris acetato EDTA
TEMED.....	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tm.....	Temperatura de alineamiento
Tris.....	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TSB.....	Caldo de tripton de soja

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A COBRE EN ALTAS CONCENTRACIONES
SOBRE LA DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE SUELOS
AGRÍCOLAS DE LA REGIÓN DE VALPARAÍSO**

RESUMEN

El valle de Aconcagua es una de las principales zonas agrícolas ubicada en la región de Valparaíso, Chile. La minería del cobre y el empleo de agroquímicos que contienen cobre, ha provocado un incremento en la concentración de este metal en este sector. La presencia de cobre en los suelos disminuye la biomasa y la actividad metabólica bacteriana provocando un menor rendimiento de los procesos biogeoquímicos en los que las bacterias participan. Esto conlleva a una pérdida de la fertilidad de los suelos agrícolas y daños en el ecosistema. En esta tesis se postula que la presencia de cobre en altas concentraciones en los suelos agrícolas de la región de Valparaíso provoca una disminución en la diversidad de las comunidades bacterianas y un incremento de bacterias tolerantes al metal. Para esto se analizaron suelos del valle de Aconcagua que presentaron altas concentraciones de cobre (379, 520 y 784 mg/kg) y un suelo sin contaminación con cobre (control) correspondiente al valle de Casablanca (20 mg/kg). Se determinó el número de bacterias heterótrofas y bacterias tolerantes a cobre (0,8 mM) mediante técnicas de cultivo. Se caracterizaron las cepas bacterianas más tolerantes a este metal. Se determinó la diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas de los suelos del valle de Aconcagua y Casablanca mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Los resultados obtenidos indican que el número de bacterias heterótrofas fue similar en los suelos analizados. Sin embargo, el número de bacterias heterótrofas tolerantes a cobre fue significativamente mayor en los suelos contaminados que en el suelo control. De las 92 cepas aisladas cinco presentaron alta tolerancia a cobre (CMI entre 3,1 - 4,7 mM). Las cinco cepas seleccionadas, C21, O4, O12, A32 y A55 presentaron el gen *copA* que codifica la enzima oxidasa multicobre que confiere resistencia a cobre. O12, A32 y A55 exhibieron resistencia a 17 mM de níquel y presentaron el gen *nccA* que codifica una de las proteínas que forma parte de la bomba de eflujo que otorga resistencia a níquel. Los aislados C21 y O4 presentaron tolerancia a cromato (4,3 mM). Las cepas O12 y A32 presentaron plásmidos que podrían estar involucrados en la resistencia a metales pesados. La velocidad de crecimiento de la cepa O12 por la presencia de cobre (0,8 y 2,4 mM) no fue afectada. Por otra parte, la riqueza y el índice de diversidad (H) no mostraron diferencias significativas entre las comunidades de los suelos contaminados y el control ($p > 0,05$).

La tolerancia a altas concentraciones de metales pesados de las cepas aisladas de los suelos con alto contenido de cobre indica que la presencia de este metal en los suelos ejerce una presión selectiva en las comunidades bacterianas. Esta presión selectiva tiene como consecuencia un aumento en la tolerancia a cobre en las comunidades bacterianas.

EFFECT OF HIGH COPPER CONCENTRATIONS ON THE BACTERIAL COMMUNITY DIVERSITY FROM AGRICULTURAL SOILS OF VALPARAISO

ABSTRACT

The Aconcagua valley, located in the Valparaiso region, is one of the main agricultural areas of Chile. Copper mining and the massive use of copper agrochemicals has led to an increase of copper concentration in soils. Copper reduces biomass and bacterial metabolic activity in soils. Therefore, copper reduces agricultural soils fertility and causes ecosystem damage. This thesis postulates that copper at high concentrations in agricultural soils decreases the bacterial community diversity and increases copper-tolerant bacteria. Soils from the Aconcagua valley with high concentrations of copper (379, 520 y 784 mg/kg) and a soil from the Casablanca valley (20 mg/kg) were analyzed. Heterotrophic bacteria and copper-tolerant bacteria from soils were determined by culture-dependent techniques. Copper resistant bacteria were isolated. Strains with high copper-tolerance were further characterized. The diversity and abundance of bacterial communities in Aconcagua and Casablanca valleys soils were determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The number of heterotrophic bacteria was similar in all soils. The number of copper-tolerant heterotrophic bacteria was significantly higher in copper-contaminated soils than in control soils. 92 bacterial strains were isolated. Five strains, C21, O4, O12, A32, and A55, showed high resistance to copper (MIC 3.1 - 4.7 mM). These 5 strains possess the *copA* gene that encodes CopA, a protein related to copper resistance. The strains O12, A32 and A55 showed tolerance to nickel (17 mM) and possessed the *nccA* gene that encodes the protein NccA conferring resistance to this metal. Strains C21 and O4 were tolerant to chromate (4.3 Mm). Plasmids were detected in isolates O12 and A32, which may encode heavy metal resistance genes. The growth rate of strain O12 was not affected by the presence of copper (0,8 mM and 2,4 mM). The richness and diversity index (H) indicated no significant differences between communities from copper-contaminated soils and control soil (<0,05).

The copper tolerant strains isolated from contaminated soils suggest selective pressure of copper to bacterial communities. The selective pressure of copper increased copper tolerance of bacterial communities.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Metales pesados

Los metales pesados son elementos químicos que se caracterizan por poseer una densidad específica mayor a 5 g/cm^3 (Parker, 1989; Lozet y Mathieu, 1991; Morris, 1992). Estos se clasifican en base a su actividad biológica en:

1. Oligoelementos o micronutrientes debido a que cumplen un rol importante como elemento traza en reacciones bioquímicas celulares. Los elementos que integran este grupo son: cobalto (Co), cobre (Cu), níquel (Ni) y zinc (Zn) (Trajanovska *et al.*, 1997).
2. Metales pesados sin función biológica conocida, altamente tóxicos y que se acumulan en los seres vivos. La toxicidad se atribuye a la capacidad de interaccionar con grupos sulfhidrilos de las moléculas orgánicas de la célula, provocando la inhibición de enzimas y la formación de radicales libres, los cuales provocan estrés oxidativo en la célula (Nies, 1999; Hall *et al.*, 2002). Algunos de los elementos que pertenecen a este grupo son: cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), plata (Ag) y cromo (Cr) (Trajanovska *et al.*, 1997).

Las principales fuentes emisoras de metales pesados son la actividad industrial y minera por la generación de material particulado, emisiones gaseosas y aguas residuales. La actividad agrícola también participa en la contaminación del medio ambiente con metales pesados mediante el empleo de fertilizantes, plaguicidas, compost y lodos de aguas residuales que contienen metales pesados (Cu, Cd, Cr, Pb, Ni y Zn) (Kabata-Pedias y Mukherjee, 2007).

1.2. Contaminación de los suelos agrícolas con los metales pesados

Los suelos agrícolas constituyen un recurso natural de gran importancia. La superficie terrestre funciona como reactor natural y hábitat de organismos, así como soporte de infraestructura y fuente de materiales no renovables. Los suelos agrícolas son vulnerables a la contaminación por metales pesados, debido a que están expuestos a las aguas residuales y a la contaminación aérea que generan la actividad minera e industrial y al empleo de agroquímicos que contienen metales pesados (Tom-Petersen *et al.*, 2003; Dell'Amico *et al.*, 2008). En suelos agrícolas los metales pesados pueden encontrarse en solución como iones de metales libres y complejos metálicos solubles, adsorbidos en los sitios de intercambio de los constituyentes

inorgánicos del suelo, ligados a la materia orgánica, precipitados como óxidos, hidróxidos y carbonatos y formando parte de minerales silicatados (Tessier *et al.*, 1979).

La biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo corresponde a la concentración de metal que está disponible para los microorganismos y las plantas. La concentración de metales pesados biodisponible corresponde a la sumatoria de la fracción de cobre intercambiable, adsorbida y unida a la materia orgánica. La biodisponibilidad de los metales depende de las propiedades físicas y químicas del suelo como pH, contenido de materia orgánica, arcilla, óxidos de hierro, potencial redox e interacciones de equilibrio químico (Giller *et al.*, 1998; Niklinska *et al.*, 2005). El factor más importante es el pH del suelo, debido a que influye fuertemente en la solubilidad y en la especiación de los metales en el suelo. La disminución del pH en una unidad provoca un aumento de hasta dos veces en la concentración de Zn^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} biodisponible (Babich *et al.*, 1980; Giller *et al.*, 1998). En la Tabla 1 se indica los valores límites de concentración de metales pesados en suelos de un rango de pH de 6 a 7 fijados por la Unión Europea (Commision of the European Communities, 1986).

Tabla 1. Valores de concentraciones máximas de metales pesados en los suelos permitidas por la Unión Europea.

Metal pesado	Valores límites (mg/kg) ¹
Cd	1 a 3
Cu	50 a 140
Ni	30 a 75
Pb	50 a 300
Zn	150 a 300
Hg	1 a 1,5

¹ Concentraciones válidas para muestras de suelo seco en un rango de pH de 6 a 7.

1.3. Los suelos agrícolas de Chile que presentan altas concentraciones de metales pesados

En la zona centro sur del país se desarrolla la mayor parte de las actividades agrícolas de Chile. Los suelos agrícolas de esta zona presentan altos contenidos de metales pesados en los sectores de los valles del Elqui, La Ligua, Aconcagua, Mapocho, Maipo, Cachapoal y Puchuncaví (Santibáñez *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las altas concentraciones de los metales en los suelos de los valles de Elqui, Mapocho y Cachapoal es de origen natural, los altos niveles de metales de algunos suelos de los valles de La Ligua y Aconcagua es de origen antropogénico (Santivañez *et al.*, 2006).

La actividad industrial y minera generan emisiones fumígenas que afectan alrededor de 60.000 Há de la superficie nacional. Las localidades mayormente afectadas por estas emisiones son Puchuncaví y Quintero (región de Valparaíso), en donde las emisiones de anhídrido sulfuroso, cobre, arsénico, plomo, zinc, molibdeno y material particulado abarcan una superficie de 11.000 Há. Las localidades de Codegua, parte de Machalí y la precordillera andina (región del Libertador B. O'Higgins), están expuestas a emisiones de anhídrido sulfuroso, cobre, cadmio, plomo, molibdeno y material particulado que afectan aproximadamente 30.000 Há. La Tabla 2, indica el contenido de los metales pesados en los estratos superficiales de los suelos del país, desde la región de Atacama (III) hasta la región de Aisén del General Carlos Ibañez del Campo (XI). (Santibáñez *et al.*, 2006).

Tabla 2. Contenidos totales de Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, y As²⁺ (mg/kg), en los estratos superficiales de los suelos del país, desde la región de Atacama hasta la región de Aisén. (Santibáñez *et al.*, 2006)

Valle (Región)	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	As ²⁺
Huasco(III)	31	15	81	< 2,5	
Elqui (IV)	87	31	179	< 2,5	
Limarí (IV)	65	33	92	< 2,5	
Ligua (V)	72	8	81	0,19	8,2
Aconcagua (V)	128	56	29	0,3	
Puchuncaví (V)	543	53	95	0,91	43,3
Mapocho (RM)	197	29	150	1,02	
Maipo (RM)	72	24	107	0,45	
Cachapoal (VI)	427	26	136	< 5	
Tinguirica (VI)	54	20	95	< 3	
Mataquito (VII)	38	18	82	< 1	
Maule (VII)	28	21	65	< 1	
Biobio (VIII)	31	16	67	< 1	
IX Región	50	23	67	< 1	
X Región	35	20	46	< 1	
Simpson (XI)	13	15	50	< 1	

1.4. Las comunidades bacterianas y su importancia en los suelos agrícolas

Las poblaciones relacionadas metabólicamente constituyen agrupaciones llamadas gremios. Los conjuntos de gremios interaccionan y realizan procesos complementarios conformando comunidades bacterianas (Madigan *et al.*, 2003). Las comunidades bacterianas cumplen un rol fundamental en los procesos del suelo, tales como el reciclaje de nutrientes, la degradación de la materia orgánica, la degradación de los contaminantes, la interacción con las

raíces de las plantas, el control de plagas, la humificación y la estructuración de los suelos (Giller *et al.*, 1998 Niklinska *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2009).

En los suelos agrícolas existe una gran diversidad bacteriana. Un gramo de suelo puede contener 10 billones de bacterias de 1000 especies diferentes (Torsvik y Øvreås, 2002). La gran diversidad bacteriana presente en los suelos otorga estabilidad, productividad y resistencia al estrés (Torsvik y Øvreås, 2002). El estudio del metagenoma de los suelos agrícolas reveló que las comunidades bacterianas están conformadas principalmente por ocho grupos bacterianos. Estos grupos bacterianos son α -Proteobacteria, γ -Proteobacterias, Actinobacterias (bacterias gram positivas con alto porcentaje de G+C en su genoma), Cytophagales, Acidobacteria, Plantomycetes y Verrucomicrobia (Buckley y Schmidt, 2003). Algunos de los factores que inciden en la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos se mencionan a continuación:

1. La estructura de los suelos: Estudios de la distribución espacial de las bacterias en el suelo indican que el 80% de las bacterias se localizan en microporos de 2-20 μm . Tales microambientes ofrecen condiciones favorables de crecimiento bacteriano debido a la disponibilidad de agua, sustrato, difusión de gases y protección en contra de depredadores. El tamaño de la partícula del suelo tiene un alto impacto sobre la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas. Los suelos con partículas de pequeño tamaño presentan una mayor diversidad bacteriana que los suelos con mayor tamaño de partícula (Ranjard y Richaume, 2001; Sessitsch *et al.*, 2001).
2. El tipo y la cantidad de materia orgánica: Suelos con alto contenido de nutrientes seleccionan las bacterias con un alto potencial de crecimiento. Los suelos con bajo contenido de nutrientes o suelos con alto contenido de sustancias recalcitrantes seleccionan bacterias con menor potencial de crecimiento pero alta capacidad de competencia por sustrato (De Fede *et al.*, 2001; Torsvik y Øvreås, 2002).
3. Las estaciones del año: La composición de las comunidades bacterianas cambia significativamente con las estaciones del año. Mediante técnicas dependientes de cultivo se observó que la proporción de bacterias de crecimiento rápido fue menor en invierno y mayor en verano. La riqueza de especies aumentó en primavera y en otoño. Esto se correlaciona con el aumento de la temperatura, la incorporación de nutrientes, los fertilizantes en primavera y los escombros generados por plantas en el otoño (Smit *et al.*, 2001).

1.5. El estudio y análisis de la diversidad de comunidades bacterianas.

La diversidad de las comunidades bacterianas promueven la estabilidad, productividad y sustentabilidad de los ecosistemas (Girvan *et al.*, 2005). El estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas en los ambientes contaminados puede ser empleado como un marcador biológico para determinar los efectos de los contaminantes sobre el ecosistema. Las metodologías que se han empleado para el estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas se pueden clasificar en técnicas dependientes de cultivo e independientes de cultivo. Las técnicas dependientes de cultivo consisten en el desarrollo de métodos y procedimientos que permitan el aislamiento y cultivo de los microorganismos de interés (Madigan *et al.*, 2003; Ranjard *et al.*, 2000). Esta metodología está limitada por la capacidad de cultivar bacterias desde muestras medioambientales. Solamente el 1% de las bacterias presentes en los suelos pueden ser cultivadas actualmente en el laboratorio (Torsvik y Øvreås, 2002; Malik *et al.*, 2008). Los métodos basados en los constituyentes moleculares tales como los ácidos nucleicos, las proteínas y los ácidos grasos pueden ser empleados para elucidar la diversidad y la estructura de las comunidades bacterianas sin necesidad del cultivo de bacterias (Kozdrój y Van Elsas, 2001; Spielganman *et al.*, 2005).

El estudio de la diversidad y la estructura de las comunidades bacterianas presentes en muestras de suelo experimentó un gran avance debido al empleo de la información que proporcionan el gen que codifica el ARNr 16S. Hay varias razones explícitas y una serie de ventajas que justifican el empleo de este marcador molecular (ARNr):

1. Está presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos.
2. El gen ARNr 16S es una molécula ancestral, muy conservada en su estructura global.
3. Presenta restricciones estructurales. Diferentes regiones de la molécula tienen distintos grados de variabilidad en las secuencias, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución.
4. Su transmisión es principalmente vertical ya que se considera que no está sujeto a transferencia genética horizontal entre microorganismos. Por lo tanto, las relaciones establecidas por las comparaciones de secuencia del gen ARNr 16S representan verdaderas relaciones evolutivas.
5. La longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado como para proporcionar suficiente información y comparaciones estadísticamente significativas.

6. El análisis de la secuencia nos permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos.

Las técnicas moleculares basadas en el análisis del gen ARNr 16S que se emplean ampliamente para el estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas son: electroforesis en gel con gradiente denaturalizante (DGGE), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), polimorfismo en el tamaño de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP) (FISH), hibridación *in situ* fluorescente (Head *et al.*, 1998; Spielgeman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008).

La técnica de DGGE permite separar los fragmentos del mismo tamaño (< 500 pb) pero de diferente secuencia nucleotídica. La separación de las bandas de ADN mediante DGGE se debe a la desnaturalización de dominios de los fragmento de ADN (ricos en adenina (A) y timina (T)) que disminuyen la movilidad de las moléculas de ADN de doble hebra, lo que permite la separación de las bandas de ADN según su secuencia. Las bandas que tienen dominios ricos en adenina y timina presentan una menor movilidad electroforética en el gel que bandas que tienen dominios ricos en citocina (C) y guanina (G). Las bandas separadas se cortan, purifican y amplifican nuevamente para su posterior secuenciación y comparación con bases de secuencias del gen ARNr 16S (Muyzer y Smalla, 1998; Ercolini, 2004).

La técnica de DGGE ha sido ampliamente empleada para evaluar la estructura y diversidad de los suelos contaminados. Esta técnica permite monitorear los cambios espaciales y temporales de la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas. Además, permite determinar cuáles son las especies o géneros predominantes dentro de una muestra. Las limitaciones que tiene esta técnica en el estudio de las comunidades bacterianas son (Ranjard *et al.*, 2000; Spielgeman *et al.*, 2005):

1. El tamaño de la secuencia de ADN no debe ser mayor a los 500 pb. Esto puede provocar la falta de especificidad de la secuencia de ADN para la identificación filogenética de algunos organismos.
2. Sobreestimación de la diversidad debido a la presencia de múltiples bandas provocada por un organismo que posee múltiples copias del gen ARNr 16S.
3. Secuencias diferentes pueden tener una misma movilidad provocando una subestimación de la diversidad.

1.6. Los efectos de los metales pesados sobre las comunidades bacterianas presentes en los suelos agrícolas

El efecto adverso de los metales pesados sobre las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas se ve reflejado en los siguientes parámetros:

1. Biomasa bacteriana. Los suelos expuestos a altos niveles de metales pesados presentan una disminución de la biomasa bacteriana debido a la baja tolerancia a los metales por parte de algunas bacterias (Giller *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2009).
2. Razón metabólica (qCO_2). Este parámetro corresponde a la actividad respiratoria de los microorganismos por unidad de biomasa. La razón metabólica de las comunidades bacterianas de los suelos se incrementa en presencia de metales (Khan *et al.*, 2000). Esto se debe a que es necesario un mayor gasto energético por parte de las bacterias para el mantenimiento celular en condiciones de estrés. Por lo tanto, un aumento del qCO_2 no está acompañado con un incremento de la biomasa (Khan *et al.*, 2000).
3. Procesos metabólicos y actividad enzimática. Altas concentraciones de metales pesados provocan la disminución de la actividad de algunas enzimas como la fosfatasa alcalina (Wang *et al.*, 2007), la nitrito oxidasa (Smolder *et al.*, 2004) y la nitrogenasa (Brookes, 1995). También se ha descrito un menor rendimiento de los procesos de mineralización de la materia orgánica, nitrificación, fijación de nitrógeno y oxidación de metano por la presencia de altas concentraciones de metales pesados (Giller *et al.*, 1998; Dumestre *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2000).
4. Diversidad bacteriana. Se han postulado dos modelos hipotéticos sobre los efectos de estrés provocado por metales pesados tóxicos sobre la diversidad de comunidades bacterianas de los suelos agrícolas. El primer modelo describe una relación inversamente proporcional entre el aumento de estrés y la diversidad de las comunidades bacterianas (Fig. 1). El segundo modelo asume una relación no lineal, donde bajo condiciones de estrés leve las especies predominan en base a sus ventajas competitivas. Esto provoca una disminución en la diversidad. Un aumento moderado del estrés, anulan las ventajas competitivas de las especies predominantes, lo que permite la proliferación de otras especies bacterianas produciendo un aumento en la diversidad. Altos niveles de estrés provocan una muerte progresiva de microorganismos, y por ende, una pérdida de diversidad tal como sucede en el primer modelo (Giller *et al.*, 1998).

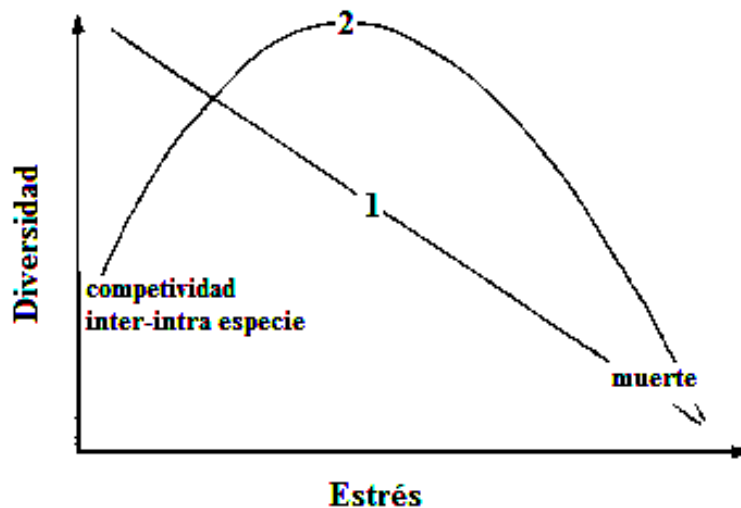


Figura 1. Dos modelos hipotéticos de los efectos del estrés por metales pesados sobre la diversidad y sobre la función de una comunidad bacteriana (Giller *et al.*, 1998).

Estudios han demostrado que la muerte de especies que carecen de suficiente resistencia al estrés impuesto por la contaminación por metales con cobre provoca el enriquecimiento de especies particulares más tolerante provocando una disminución en la diversidad bacteriana (Giller *et al.*, 1998). Dell'Amico *et al.* (2008) describieron que el aumento de especies cultivables del género *Sphigomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Arthrobacter* en suelo contaminado con cobre en una concentración de 215 mg/kg. También detectaron un mayor predominio de bacterias cultivables Gram negativas que Gram positivas en suelos con alto contenido de cobre (372 mg/kg).

1.7. Los mecanismos de tolerancia y de resistencia a los metales pesados en las bacterias

La tolerancia a metales pesados está dada por mecanismos inespecíficos tales como unión de metales a proteínas, a los polímeros extracelulares o a la pared celular bacteriana (Guiller *et al.*, 1998). Un ejemplo es la acción del ácido poligalaturónico que es un constituyente de la membrana celular externa que compleja Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} (Gadd y Griffiths, 1978). También la tolerancia a metales pesados es conferida por sistemas de homeostasis celulares como bombas de eflujo que están codificados en genes cromosomales. Estos sistemas de homeostasis son para regular las concentraciones de metales pesados que son micronutrientes. Ejemplos de esto, son el transportadores ZntA de zinc y el transportador de cobre CopA en *Escherichia coli* y el transportador CopB en *Enterococcus hirae*.

El término de resistencia corresponde a mecanismos específicos de detoxificación que le permiten a la bacteria sobrevivir en condiciones de estrés por la presencia de altas concentraciones de metales pesados. Estos sistemas están codificados en genes de resistencia que provienen generalmente de elementos genéticos móviles (EGM) tales como plásmidos, fagos, transposones, cassette de genes (Silver, 1992; Silver y Phung, 2005). Los plásmidos son probablemente los más importantes reservorios para la captura y transferencia de genes entre bacterias (Smalla *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2005). Los plásmidos contienen determinantes de resistencia para un amplio rango de metales: Ag^{+1} , AsO_2^{-1} , AsO_4^{3-} , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{1+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , TeO_3^{2-} , Tl^{+1} , Pb^{2+} y Zn^{2+} (Silver, 1992).

La resistencia a mercurio de comunidades bacterianas se debería a la presencia de plásmidos del grupo IncP-1 β que portan el gen *merA* (De Liphay *et al.*, 2008). Se ha descrito un incremento del intercambio horizontal de genes entre las poblaciones bacterianas expuestas a mercurio (Smit *et al.*, 1998; Smalla *et al.*, 2006). Se han estudiado extensamente mecanismos que participan en la homeostasis y en la resistencia al cobre en dos bacterias en particular, *Escherichia coli* y *Enterococcus hirae* (Resing *et al.*, 2003; Solioz y Stoyanov, 2003). Sin embargo, existen escasos estudios sobre los elementos móviles y determinantes genéticos de resistencia a cobre presentes en las comunidades bacterianas resistentes a este metal.

1.7.1. Los mecanismos de homeostasis y de resistencia al cobre en las bacterias

El cobre es un micronutriente esencial tanto para eucariontes como para bacterias (Rensing y Grass, 2003). El cobre es requerido por algunas enzimas tales como la citocromo oxidasa, la superóxido dismutasa y la lisina oxidasa (Rensing y Grass, 2003). Sin embargo, el cobre en altas concentraciones intracelulares genera estrés oxidativo, lo que provoca la lipoperoxidación de la membrana aumentando la permeabilidad de ésta y la muerte celular. Algunas bacterias han desarrollado de resistencia a concentraciones tóxicas de cobre (Rensing y Grass, 2003; Magnani y Solioz, 2007). Estos sistemas de resistencia están codificados en plásmidos.

La homeostasis del cobre se regula a nivel de la incorporación, distribución intracelular y eflujo desde la célula bacteriana (Fig. 2). En *E. hirae*, la homeostasis del cobre está regulada por el operón *copABYZ*. Este operón consiste en 4 genes que codifican un represor, CopY, una chaperona de cobre, CopZ y dos ATPasas tipo CPx, CopA y CopB. La bomba CopA participa en la captación de cobre en condiciones limitantes de este metal. CopB, participa en la expulsión de

cobre intracelular. Se ha descrito que a concentraciones de $1\mu\text{M}$ de cobre en el medio de crecimiento de *E. hirae* provoca la inducción de los genes del operón *cop* (Solioz y Stoyanov, 2003; Solioz *et al.* 2010). La chaperona CopZ capta el cobre citoplasmático y se lo dona a CopY. El represor CopY experimenta un cambio conformacional al interactuar con el cobre y deja de reprimir al operón *cop*.

E. coli posee múltiples sistemas para la regulación del cobre intracelular (Rensing y Grass, 2003). El primer sistema está constituido por la ATPasa tipo P codificada en el gen *copA* que permite el eflujo del Cu^{+1} desde el citoplasma hacia el espacio periplasmático. Un segundo sistema de detoxificación de cobre es el de la oxidasa multicobre CueO que oxida el cobre de Cu^{+1} a Cu^{+2} . El tercer sistema corresponde al sistema de eflujo codificado por el operón *cusCFAB*, que expulsa el Cu^{+1} desde el citoplasma al extracelular, mediante un mecanismo de expulsión quimiosmótico (Rensing y Grass, 2003; Pontel y Soncini, 2009) (Fig. 2A y 2C). Este operón está regulado por los genes *cusRS* que codifica un sistema de dos componentes (Pontel y Soncini, 2009). Además de estos sistemas de homeostasis del cobre existen sistemas de resistencia codificados en operones. Estos operones se encuentran en plásmidos aislados desde bacterias que habitan en ambientes ricos en cobre. Los operones *copABCD* (plásmido pPT23D) en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y el operón *pcoABCD* (plásmido pRJ1004) en *E. coli* (Magnani y Solioz, 2007), codifican un sistema de resistencia a cobre que permite la oxidación de este metal a su estado menos tóxico, Cu^{2+} , además las enzimas *pcoA/copA* oxidan sideróforos de catecol generando pigmentos que son capaces de quelar el cobre que se encuentra en el periplasma.

Diversas cepas bacterianas tales como *Cupriavidus metallidurans* CH34, *Ralstonia solanacearum*, *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas veronii* bv. *sobria* y *Caulobacter crescentus* han mostrado resistencia a cobre (Cooksey, 1994; Rensing y Grass, 2003, Lejon *et al.*, 2007). La resistencia de estas cepas a cobre está asociada a la presencia de genes plasmidiales homólogos a *copA*. Por lo tanto, este determinante genético puede representar un relevante marcador para estudiar la diversidad de comunidades bacterianas que presentan resistencia a cobre (Lejon *et al.*, 2007).

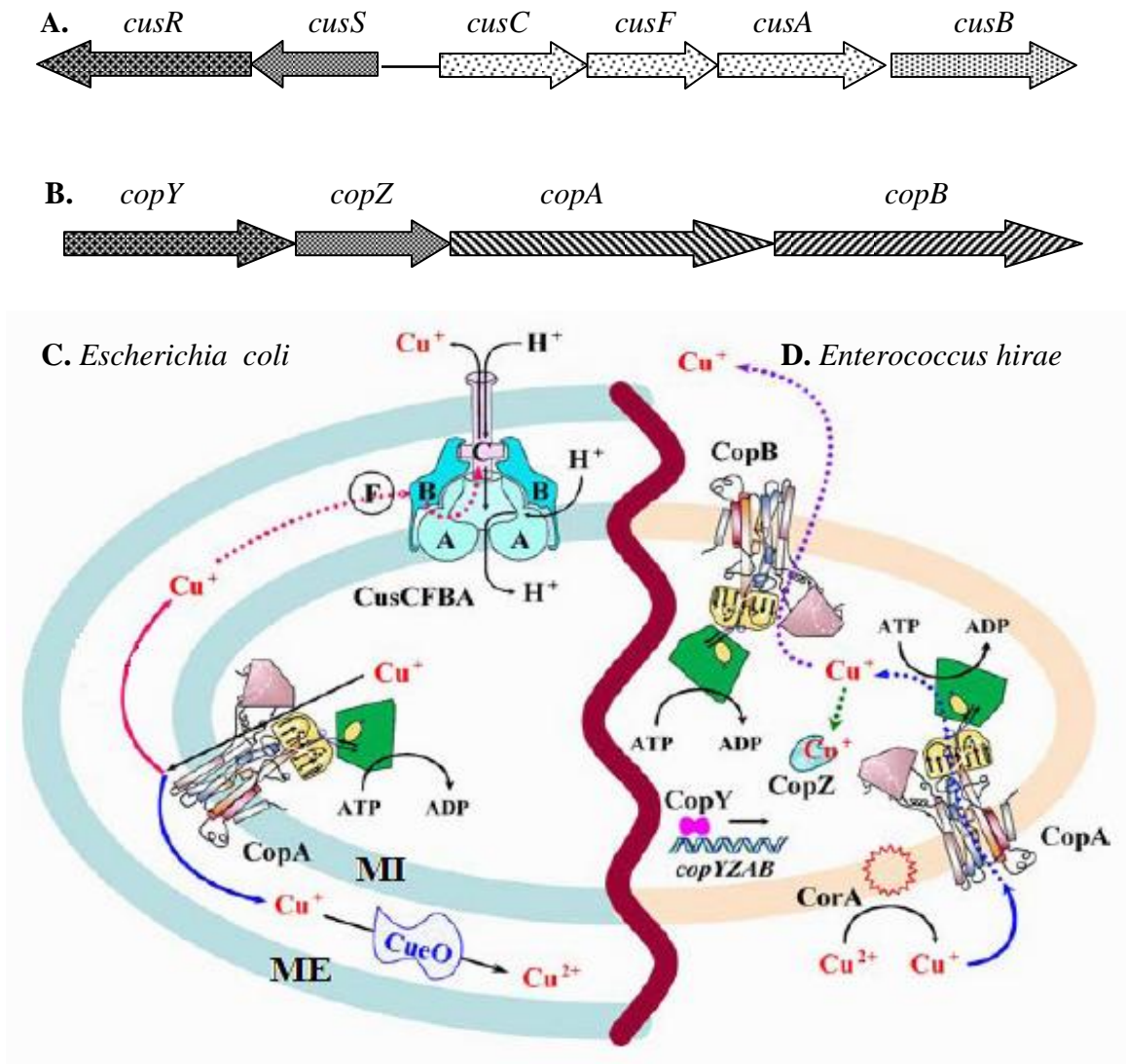


Figura 2. Sistemas de homeostasis de cobre en *E. coli* y *E. hirae*. A. Organización del operón *cusCFBA* y de los genes reguladores *cusRS* que codifican una bomba de eflujo de cobre y el sistema regulador de dos componentes respectivamente en *E. coli*. (Pontel y Soncini, 2009). B. Organización del operón *copABYZ* que codifica un sistema de homeostasis de cobre en *E. hirae* (Pontel y Soncini, 2009). C. Sistemas de homeostasis de cobre en *E. coli*. Bomba quimiosmótica de eflujo, CopA; bomba de eflujo tipo P, CusCFAB; oxidasa multicobre, CueO. D. Sistema de homeostasis del cobre en *E. hirae*. Represor CopY, chaperona CopZ, bombas tipo PCx CopA y CopB (Silver y Phung, 2005, Solioz *et al.* 2010).

1.7.2. Los sistemas de resistencias al mercurio y a los compuestos organomercuriales en las bacterias

Los microorganismos han desarrollado sistemas de resistencia al mercurio en respuestas a las concentraciones tóxicas de mercurio proporcionado por las actividades geológicas y antropogénicas. Los determinante genéticos de resistencia al mercurio se encuentran distribuidos ampliamente en las bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas desde diferentes medioambientes (Nacimiento *et al.*, 2003; Silver y Phung, 2005). Los genes de resistencia están organizados en operones y se encuentran localizados en plásmidos y en cromosomas, formando parte de transposones e integrones (Silver y Phung, 2005). Se han descrito dos operones que codifican sistemas de resistencia a mercurio. El operón *merRTPADE* que confiere resistencia a especies de mercurio inorgánico y el operón *merRTPAGBDE* que otorga resistencia a los compuestos organomercuriales y al mercurio inorgánico.

El operón *mer RTPADE* (Fig. 3A) está constituido por los genes *merR* que reprimen la transcripción del operón en ausencia del Hg^{2+} y activa la transcripción en presencia del Hg^{2+} ; *merD* que codifica una proteína correpresora de la transcripción; los genes *merT*, *merP*, *merC*, *merE* y *merF* que codifican proteínas de transporte de Hg^{2+} y por el gen *merA* que codifica una reductasa de mercurio, que reduce el Hg^{2+} a Hg^0 (Silver *et al.*, 1992; Nacimiento *et al.*, 2003; Silver y Phung, 2005) (Fig. 3B). Algunas bacterias poseen el gen *mer G* y genes *merB* que codifican para un transpostador de compuestos organomercuriales y una liasa respectivamente. La liasa organomercurial denominada MerB, es una enzima monomérica que corta el enlace covalente entre el mercurio y el carbono (Hg-C) liberando el Hg^{2+} (el sustrato de MerA) y reduce el compuesto orgánico tales como metano desde metilmercurio o benceno desde fenilmercurio. De este modo el sistema codificado por el operón *merRTPAGBDE* confiere resistencia a compuestos organomercuriales, tales como metilmercurio y fenilmercurio (Fig. 3B) (Silver *et al.*, 1992; Kiyono *et al.*, 1999; Nacimiento *et al.*, 2003).

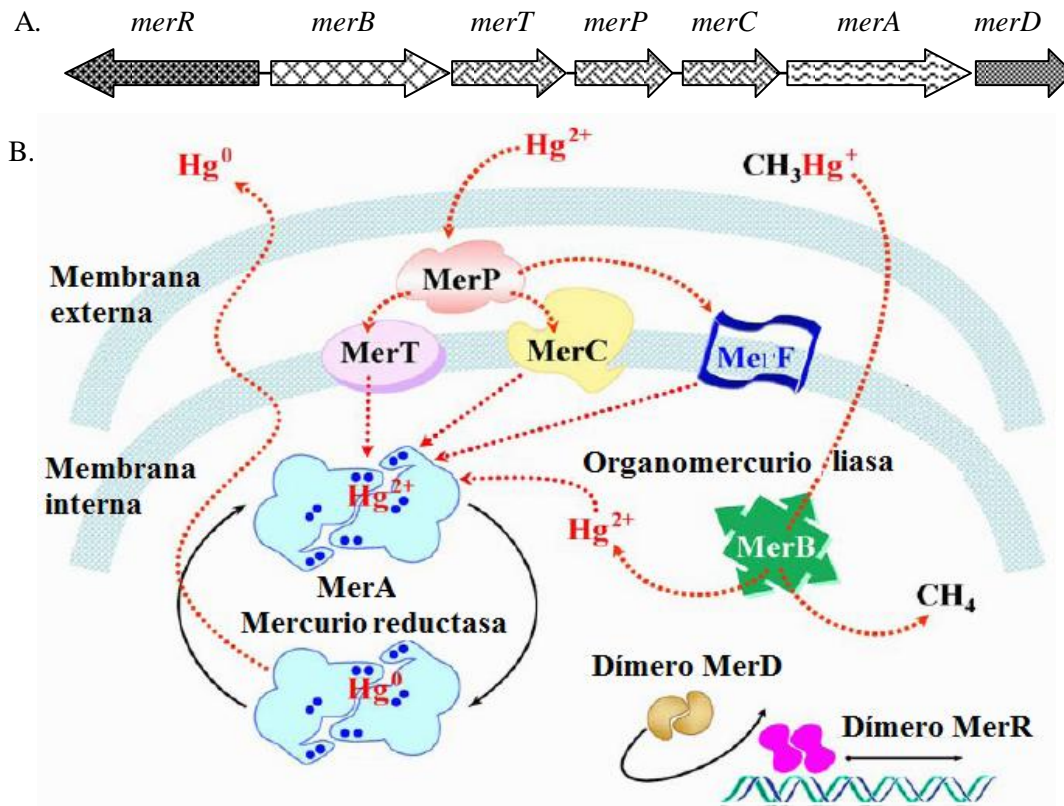


Figura 3. Sistema de resistencia a mercurio en bacterias. A. Organización del operón *mer* en la cepa *Pseudomonas stutzeri* (pPB). B. Mecanismo de resistencia a mercurio. Productos del operon *mer*. Mer R, regulador transcripcional; MerA, enzima mercurio reductasa, MerC, MerP MerT y MerF proteínas transportadoras de mercurio, MerG, proteína involucrada en la permeabilidad de fenilmercurio. y MerD, es un correpressor o chaperona involucrada en la regulación transcripcional (Silver and Phung, 2005).

1.7.3. Los sistemas de resistencia a níquel, cobalto y cadmio en las bacterias

Cupriavidus metallidurans 31A presenta alta resistencia a níquel, cobalto y cadmio (Schmidt y Schlegel, 1994; Taghavi *et al.*, 2001; Nies *et al.*, 2004). El plásmido pTOM9 de esta bacteria posee el operón *ncc* (Mergeay *et al.* 2003). El operón *ncc* comprende siete genes designados *nccY*, *nccX*, *nccH*, *nccC*, *nccB*, *nccA* y *nccN* (Fig. 4A), que tienen una significativa similitud con los genes de los operones *cnr* y *czc* (Schmidt y Schlegel, 1994; Nies *et al.*, 2004).

El gen *nccY* codifica una proteína de 95 aminoácidos (10.5 kDa), que reprime la expresión de los genes estructurales de este operón. El gen *nccX*, codifica una proteína de 148 aminoácidos (16.5 kDa), que contiene varios residuos de histidina que podrían ser posibles sitios de unión a metales (Schmidt y Schlegel, 1994). El gen *nccH* codifica una proteína de 187

aminoácidos (21 kDa) que induce la expresión de los genes estructurales *nccC*, *nccB* y *nccA* (Fig. 4B). La secuencia aminoacídica de la proteína NccH presenta similitud con la secuencia del factor sigma CnrH que controla la expresión del operón *cnrCBA*. Este operón codifica una bomba de eflujo de Co^{2+} y Ni^{2+} en *C. metallidurans* CH34 (Schmidt y Schlegel, 1994; Nies *et al.*, 2004; Silver y Phung, 2005). Los genes *nccC*, *nccB* y *nccA* codifican la bomba quimiosmótica de eflujo de níquel-cobalto-cadmio (Figura 4B). El último gen de este operón corresponde al gen *nccN*, que codifica una proteína hidrofóbica de 213 aminoácidos (23,5 kDa) que está involucrada en el transporte específico de Ni^{2+} (Schmidt y Schlegel, 1994). El operón *ncc* se ha descrito en *Proteobacterias* del género *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Comamonas* y *Sphingobacterium* (Taghavi *et al.*, 2001).

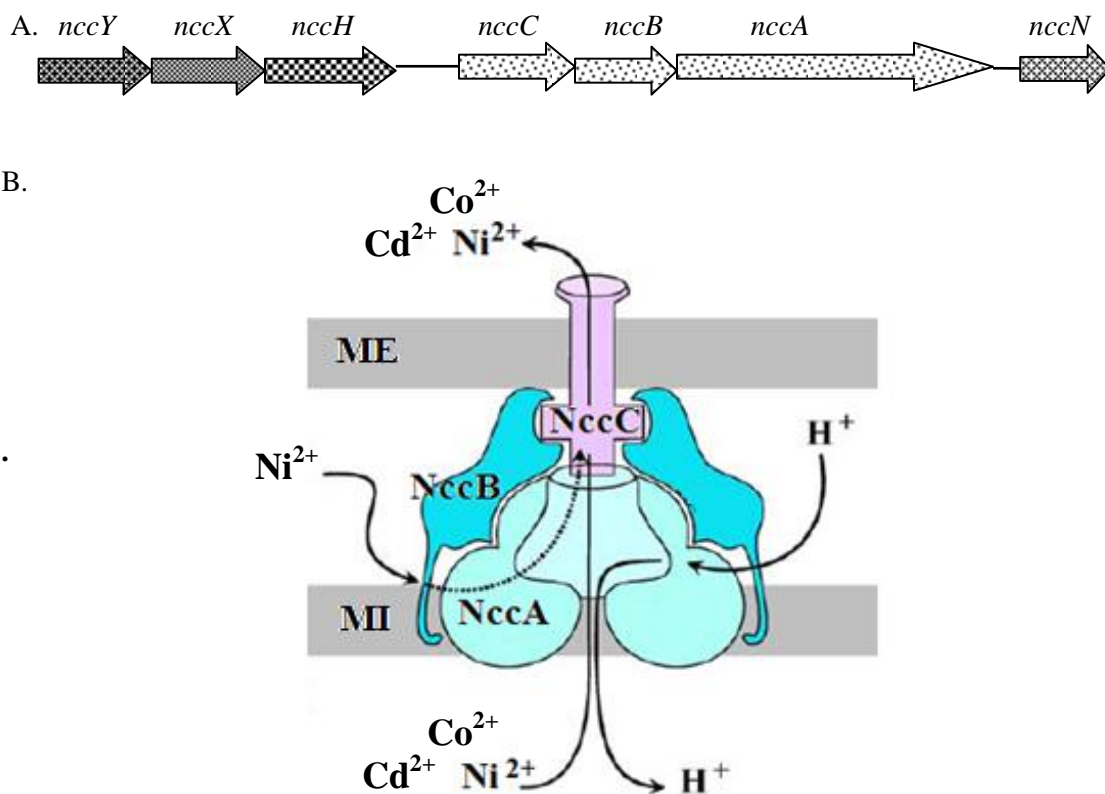


Figura 4. Sistema de resistencia a níquel, cobalto y cadmio en *C. metallidurans* 31A.

A. Organización del operón *ncc*. Genes regulatorios *nccR*, *nccY* y *nccH*, genes estructurales *nccA*, *nccB* y *nccC* que codifican el sistema de eflujo de níquel, cobalto y cadmio y gen *nccN* que codifica un transportador de níquel. B. Modelo del sistema de eflujo Ncc.

1.7.4. Los sistemas de resistencia a cromato en las bacterias

El cromo se encuentra principalmente como Cr^{3+} y Cr^{6+} formando parte del oxianión CrO_4^{2-} . Reacciones de reducción/oxidación entre ambas formas son termodinámicamente posibles en condiciones fisiológicas. El CrO_4^{2-} es más tóxico que el Cr^{+3} . Los mecanismos de resistencia a CrO_4^{2-} pueden estar codificados en genes plasmidiales o cromosomales (Nies *et al.*, 1990; Cervantes y Campos-García, 2007; Ramírez-Díaz *et al.*, 2008, Henne *et al.*, 2009). Generalmente, los genes localizados en plásmidos codifican transportadores de membrana, los cuales median el eflujo de cromato desde el citoplasma hacia el medio extracelular (Fig. 5). Los sistemas de resistencia a cromato codificados por los genes cromosomales generalmente corresponden a estrategias de reducción, mecanismos de detoxificación de radicales libres, de reparación de ADN dañado y procesos asociados con la homeostasis del azufre y del hierro (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008). En *Cupriavidus metallidurans* CH34 se han descrito 6 genes involucrados en la resistencia a cromato (*chrI*, *chrB₁*, *chrA₁*, *chrC*, *chrE* y *chrF₁*) en el plásmido pMOL28 y 3 genes (*chrA₂*, *chrB₂* y *chrF₂*) en el cromosoma (Juhnke *et al.*, 2002) (Figura 5) El gen *chrC* codifica un producto de 197 aminoácidos que presenta homología con superóxidos dismutasas de manganeso y hierro. Los genes *chrI*, *chrB₁*, *chrB₂*, *chrF₁* y *chrF₂* codifican a posibles reguladores del sistema de resistencia a cromato. Los genes *chrA₁* y *chrA₂* codifican bombas de eflujo de cromato que confieren resistencia hasta 0,3 mM de cromato (Juhnke *et al.*, 2002). *Pseudomonas auriginosa* también presenta la bomba de eflujo ChrA que confiere resistencia hasta 4 mM de cromato. Esta proteína está codificada en el plásmido pUM505. Se ha descrito alta de identidad (93%) entre el gen *chrA* codificado en el plásmido pUM505 y el plásmido pB4 de cepas *Pseudomonas sp* (Tauch *et al.*, 2003). Análisis de secuencia indican que el gen *chrA* forma parte del transposón Tn5719. Además los análisis de secuencia revelaron que regiones homólogas al gen *chrA* en pUM505 corresponden a secuencias del transposón Tn5719. Esto sugiere que este transposón fue un ancestro del determinante de resistencia a cromato de pUM505 (Tauch *et al.*, 2003; Ramírez-Díaz *et al.*, 2008). Se han descrito 135 proteínas ortólogas de ChrA (Henne *et al.*, 2009). Estos antecedentes sugieren que el sistema de eflujo de cromato, ChrA, es un eficiente y generalizado mecanismo de resistencia de cromato, que previene la acumulación de este ion dentro de la célula (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008).

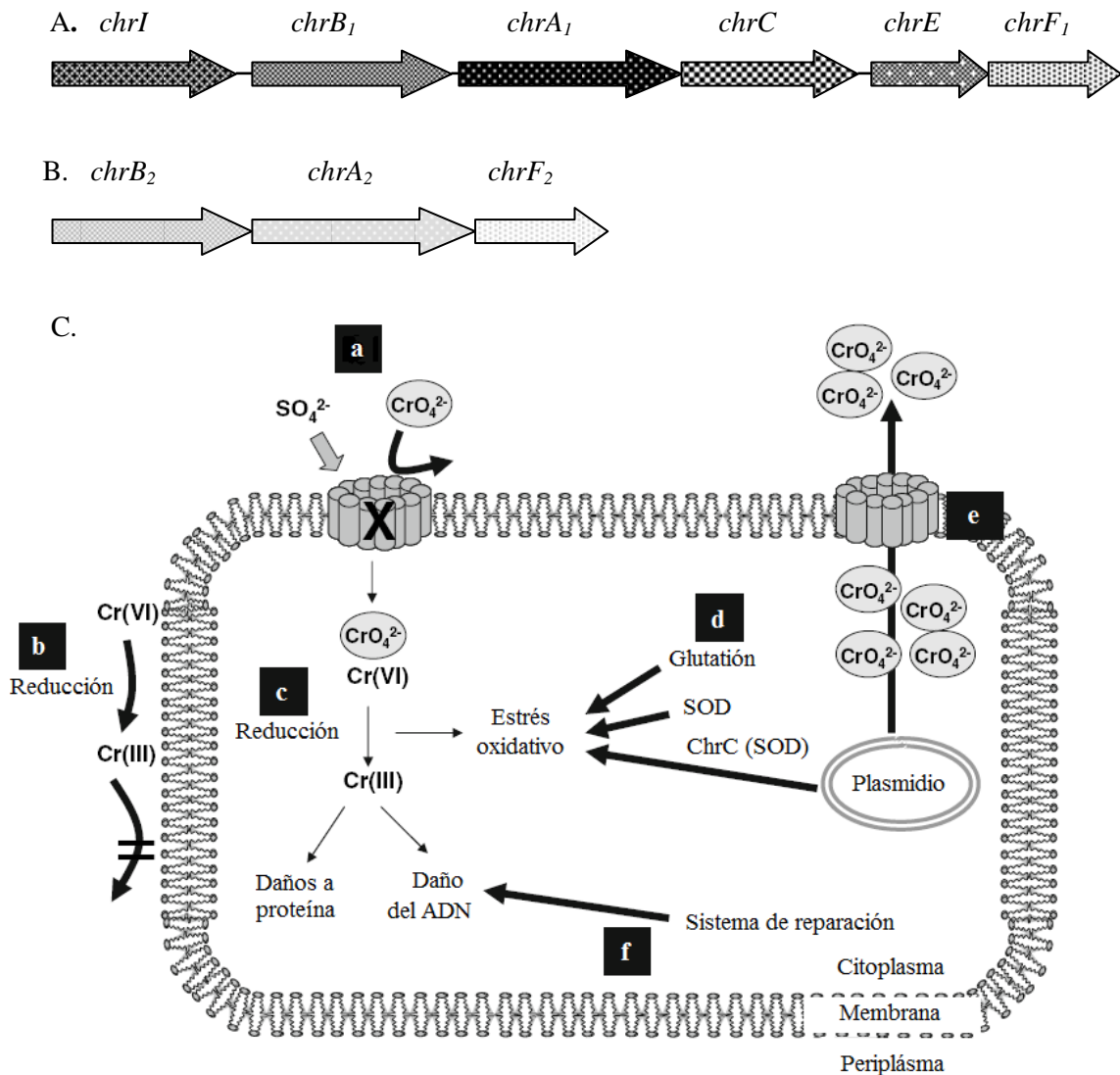


Figura 5. Sistemas de resistencia a cromato en bacterias. A. Organización de los genes de resistencia a cromato en el plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* CH34. B. Organización de los genes de resistencia a cromato en el cromosoma de *C. metallidurans* CH34 (Juhnke *et al.*, 2002). C. Mecanismos de regulación de las concentraciones de CrO_4^{2-} en bacterias; a, Transportador de sulfato utilizado por el CrO_4^{2-} para entrar a la célula; b, reducción del Cr^{6+} a Cr^{3+} , el cual no cruza la membrana; c, reducción del Cr^{6+} a Cr^{3+} que puede generar estrés oxidativo, oxidación de proteínas y ADN; d, enzimas disminuyen el estrés oxidativo; e, transportadores de CrO_4^{2-} codificados por plasmidios; f, sistemas de reparación del ADN por daños provocados por el CrO_4^{2-} (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008).

1.8. Planteamiento del problema

El valle del río de Aconcagua localizado en la región de Valparaíso es una de las principales zonas agrícolas del país (ODEPA-CIREN, 2002; ODEPA 2004). Esta zona posee un clima, disponibilidad de agua y calidad de suelos, que determinan excelentes condiciones para el desarrollo de la agricultura, la industria y para el asentamiento humano. Sin embargo, la actividad antropogénica, ha ido en desmedro de las privilegiadas condiciones medioambientales que presenta el valle. Las aguas del río Aconcagua han sido contaminadas con los residuos industriales líquidos (RILES) son vertidos por empresas del sector y por las descargas domiciliarias. Emisiones fumígenas de SO₂, material particulado, Cu, Zn, Mo, Cd, Pb y As liberadas por la actividad minera han provocado un incremento de metales pesados, en particular de cobre, en los suelos agrícolas de la zona, afectando alrededor de 20.000 Há (Santibáñez *et al.*, 2006). La concentración promedio y máxima de cobre en los suelos del valle del Aconcagua es de 275 y 1275 mg/kg, respectivamente (Santibáñez *et al.*, 2006).

Dado que los suelos agrícolas y su ecosistema son vulnerables a la exposición a metales pesados se postula la siguiente hipótesis.

1.9. HIPÓTESIS

La presencia del cobre en altas concentraciones en los suelos agrícolas de la región de Valparaíso provoca una disminución en la diversidad de las comunidades bacterianas y un incremento en la proporción de las bacterias tolerantes al cobre.

1.10. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del cobre en altas concentraciones sobre las comunidades bacterianas de suelos agrícolas de la región de Valparaíso y caracterizar las cepas bacterianas tolerantes a cobre aisladas del valle de Aconcagua.

Objetivos específicos

1. Aislar cepas bacterianas tolerantes a cobre de los suelos agrícolas contaminados con cobre del valle de Aconcagua.
2. Caracterizar cepas bacterianas tolerantes al cobre aisladas de los suelos agrícolas contaminados con cobre del valle de Aconcagua.
3. Evaluar el efecto del cobre sobre la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas de la región de Valparaíso.
4. Detectar el gen de resistencia al cobre *copA* en el ADN metagenómico de los suelos agrícolas de la región de Valparaíso.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

Se prepararon las siguientes soluciones. Solución madre de CuSO₄ (800 mM), solución madre K₂CrO₄ (800 mM), HgCl₂ (150 mM), solución madre de CoCl₂ (800 mM) solución madre de ZnCl₂ (800 mM), solución madre de NiSO₄ (700 mM).

Tampón fosfato de sodio: 8 g/L de NaCl; 0,2 g/L de KCl₂; 1,44 g/L de Na₂HPO₄; 0,21 g/L de KH₂PO₄ a pH 7,4 (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas empleadas en este estudio se describen en la Tabla 3. Estas cepas fueron crecidas en TSB diluido 1:10 con cobre (0,8 mM) y se conservaron en glicerol (16%) a -20°C.

Tabla 3. Cepas bacterianas empleadas en esta tesis

Cepa	Determinantes genéticos	Referencia
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	<i>cnr, chr, mer, czc, pbr, mer, sil y cop</i>	Monchy <i>et al.</i> , 2007
<i>C. metallidurans</i> MRS33	<i>cnr, chr, mer, czc, pbr, mer, sil y cop</i>	Rojas <i>et al.</i> , 2010
C21	<i>copA</i>	Esta tesis
O4	<i>copA</i>	Esta tesis
O12	<i>copA, nccA</i>	Esta tesis
A32	<i>copA, nccA</i>	Esta tesis
A55	<i>copA, nccA</i>	Esta tesis

2.3. Medios de cultivo

El medio Luria-Bertani (LB) contiene triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L (Sambrook *et al.*, 1989). El medio TSB (digerido de caseína de soja) contiene peptona de caseína 15 g/L, peptona de harina de soja 5 g/L y cloruro de sodio 5 g/L. El medio mínimo Tris contiene 6,06 g/L de Tris; 4,68 g/L de NaCl; 1,49 g/L de KCl; 1,07 g/L de NH₄Cl; 0,43 g/L de Na₂SO₄; 0,2 g/L de MgCl₂ · 6H₂O; 0,03 g/L de CaCl₂ · 2H₂O; 0,23 g/L de Na₂HPO₄ · 12H₂O; 0,005 g/L de citrato de Fe(III)(NH₄); 0,1% v/v de solución de elemento traza SL 7 de Biebl y Pfennig y como fuente de carbono contiene 2 g/L de succinato de sodio y 1 g/L de extracto de levadura (Mergeay *et al.*, 1985; Nies *et al.*, 1999). El agar R2A contiene 0,5 g/L de extracto de

levadura; 0,5 g/L de peptona; 0,5 g/L de almidón soluble; 0,5 g/L de glucosa; 0,3 g/L de K_2HPO_4 ; 0,05 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,3 g/L de piruvato de sodio y 15 g/L de agar (Reasoner and Geldreich, 1985).

2.4. Área de estudio y toma de la muestra

Se analizaron suelos agrícolas con y sin contaminación con cobre. Se muestrearon suelos contaminados con cobre de predios agrícolas ubicados en el valle de Aconcagua, comuna de Catemu, provincia de San Felipe, región de Valparaíso en agosto del año 2009 (Fig. 6 y 7). La comuna de Catemu presenta una actividad fuertemente agrícola, minera, e industrial. La Fundición de cobre Chagres es la empresa de mayor envergadura ubicada en este territorio (Fig. 7D). En los alrededores de esta fundición se muestrearon suelos de tres sitios. La denominación y ubicación exacta de cada sitio registrada por GPS es la siguiente: Chagres sur, latitud $32^{\circ}48'30,254''$ y longitud $70^{\circ}57'57,169''$; Ñilhue, latitud $32^{\circ}41'44,577''$, longitud $70^{\circ}54'40,628''$; Chagres norte, latitud $32^{\circ}46'37,42''$ y longitud $70^{\circ}57'29,95''$. También se muestreó un suelo no contaminado con cobre de un predio del valle de Casablanca, región de Valparaíso, en septiembre del año 2010. La ubicación de este sitio registrada por GPS fue: latitud $32^{\circ}19'30,254''$ y longitud $71^{\circ}24'36''$. Se tomaron cuatro muestras compuestas de la superficie de los suelos (10 cm de profundidad) por sitio en cuadruplicado. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h y se tamizaron con una malla de diámetro de abertura de 2 mm. Todas las muestras de suelos se mantuvieron a $4^{\circ}C$, para su análisis dentro de los 15 a 30 d.

2.5. Caracterización de los suelos agrícolas

La determinación de las propiedades fisicoquímicas de los suelos muestreados se realizó en el Laboratorio de Suelos y Análisis Foliar de la Facultad de Agronomía (PUCV) en Quillota. Se determinó el pH empleando una mezcla de suelo/agua desionizada en una proporción 1:2,5 (p/v). La concentración de carbono orgánico se determinó mediante el método de oxidación de dicromato (Sparks *et al.*, 1996). La concentración total de cobre, zinc, cadmio, cobalto, níquel, cromo y plomo en el suelo se determinó por digestión ácida de la muestra seguida por espectroscopía de absorción atómica. La concentración de cobre intercambiable se determinó por extracción con $MgCl_2$ 1 M (Sadzawka *et al.*, 2006).

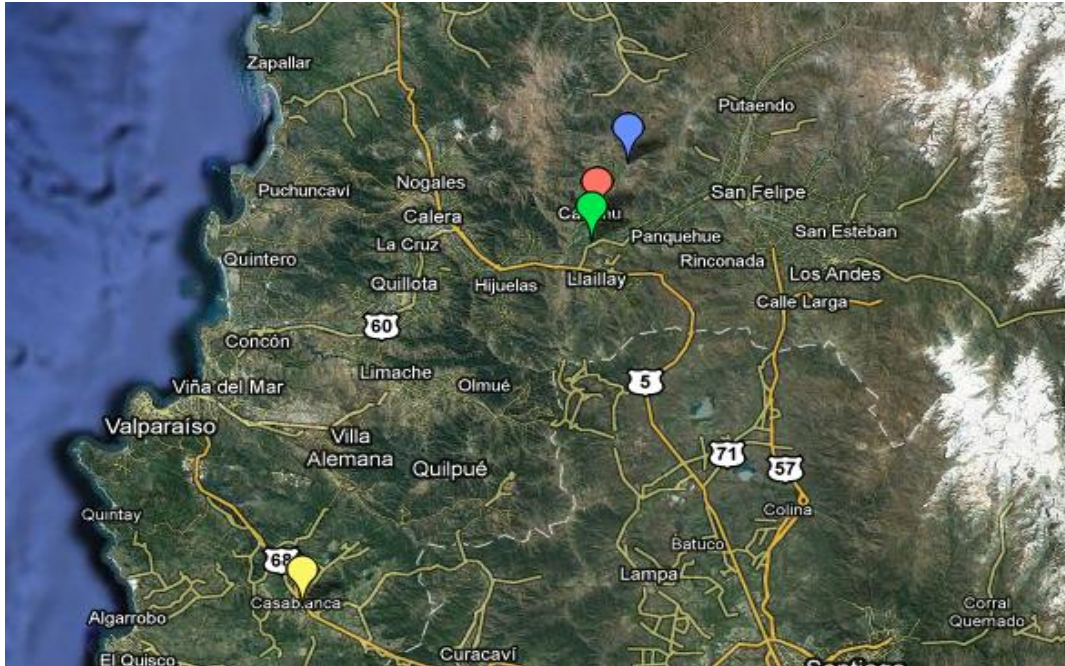


Figura 6. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de suelos agrícolas de la región de Valparaíso. Casablanca, amarillo; Chagres sur, verde; Ñihue, azul; Chagres norte, rojo.



Figura 7. Sitios de muestreo de suelos agrícolas de la región de Valparaíso. A, valle de Casablanca; B, Chagres sur; C, Chagres norte, D, Fundición Chagres.

2.6. Recuento de las bacterias heterótrofas y aislamiento de las cepas tolerantes al cobre

Una muestra de 1 g de suelo se diluyó en 9 ml de tampón PBS (tampón fosfato salino). Cada dilución se mezcló vigorosamente y se sometió a una agitación orbital de 200 rpm por 30 min. Diluciones seriadas de las suspensiones se sembraron en agar R2A con y sin suplemento de Cu^{2+} (0,8 mM) (Konstantidinis *et al.*, 2003). Para evitar el crecimiento de hongos se le adicionó al medio de cultivo cicloheximida (100 mg/L) (Dell' Amico *et al.*, 2008). Las placas se incubaron a 30°C. Los recuentos de las bacterias heterótrofas totales y de las bacterias heterótrofas tolerantes a cobre se realizaron después de 72 h. Las colonias bacterianas crecidas en agar R2A con cobre se caracterizaron fenotípicamente (pigmentación, forma y tamaño). Se aislaron cepas bacterianas a partir de las colonias que presentaban distintas características fenotípicas.

2.7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los metales pesados en las cepas aisladas

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para cobre se determinó en las cepas que crecieron en agar R2A suplementado con Cu^{2+} 0,8 mM. Las cepas que presentaron tolerancia a Cu^{2+} 2,8 mM se les determinó adicionalmente la CMI en medio mínimo Tris a CrO_4^{2-} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} (Mergeay *et al.*, 1985). Se prepararon soluciones madres de CuSO_4 , CdCl_2 , K_2CrO_4 , HgCl_2 , CoCl_2 , ZnCl_2 y NiSO_4 . Cada solución se filtró y se adicionó al agar Tris para obtener un rango de concentración final de cada metal 0,8 a 5,1 mM, exceptuando el Hg^{+2} que se utilizó en un rango de concentración de 0,05 a 0,2 mM. Las cepas seleccionadas fueron crecidas en medio TSB diluido 1:10 durante 12 a 18 h y un volumen de 10 μL de cada cultivo se sembró en placas con agar Tris con las concentraciones de metales pesados. Las placas de medio Tris inoculadas se incubaron a 30°C por 72 h. La determinación de la CMI se realizó en duplicado. Se utilizó como control de viabilidad una placa de medio Tris sin metal (Nieto *et al.*; 1987; Abou Shanab *et al.*, 2007). La menor concentración de metal donde no se observó crecimiento se consideró como la CMI.

2.8. Preparación de templados para PCR

La extracción de ADN genómico de las cepas bacterianas se realizó mediante shock térmico. Una colonia bacteriana de cada cepa se resuspendió en 100 μL de tampón TE (Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM). La solución se incubó a -20°C por 10 min y luego a 95°C por 10

min. Posteriormente, se centrifugó a 18.000 x g por 5 min. El sobrenadante se utilizó como templado para la detección de genes de sistemas de resistencia a metales pesados mediante PCR.

2.9 Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA)

Para comparar los perfiles de las cepas aisladas se realizó un análisis de ARDRA. Para esto, se amplificó el gen ARNr 16S utilizando los partidores universales, 27F y 1492R (Invitrogen, EEUU, Ca). Cada reacción (25 μ L) contenía tampón PCR (Fermentas), $MgCl_2$ 3 mM (Fermentas); desoxinucleótidos trifosfato (0,4 mM) (Fermentas); partidores (0,6 μ M) (Invitrogen), albúmina de suero de bovino (0,1 mg/mL) y 1,25 U de Dream *Taq* ADN polimerasa (Fermentas, California, EEUU). El gen 16S ARNr amplificado se dirigió con las endonucleasas de restricción *MspI* y *BsuRI*, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para detectar diferencias entre las bacterias, se analizaron los patrones de restricción del gen ARNr 16S mediante electroforesis en gel de acrilamida a 130 V y con la tinción SYBR Green I.

2.10 Secuenciación y análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas

Los productos de la amplificación del gen ARNr 16S fueron cuantificados mediante el empleo del fluorómetro QubitTM (Invitrogen, California, EEUU) según las especificaciones del fabricante. Los productos con una concentración ≥ 50 ng/ μ L se enviaron a secuenciar a Macrogen SA (Korea). Los resultados obtenidos de la secuenciación se compararon con las bases de datos de Genbank NCBI para determinar la especie o género de las cepas estudiadas. Las secuencias de las cepas en estudios y de las cepas tipos con las que presentaron alta identidad se alinearon utilizando el programa Mega 4.0, para finalmente realizar un análisis filogenético empleando este mismo programa (Tamura *et al*, 2007). Las distancias evolutivas fueron calculadas de acuerdo al método de kimura-2p (Kimura 1980). El árbol filogenético se elaboró mediante el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987). La confiabilidad de la predicción fue evaluada mediante 2000 réplicas al azar de los alineamientos (bootstrap).

2.11 Amplificación de los genes que codifican para los sistemas de resistencia a los metales pesados

Para las reacciones de amplificación de los genes *copA*, *nccA*, *czcD*, *chrB*, *merA* y *merB* se utilizaron los partidores descritos en la Tabla 4. Cada reacción (25 μ L) contenía tampón PCR,

MgCl₂ 3 mM (Fermentas), desoxirribonucleótidos trifosfato 0,4 mM (Fermentas), partidor 0,6 μM (Invitrogen), albúmina de suero de bovino 0,1 mg/mL (Fermentas) y 1,25 U de Dream *Taq* ADN polimerasa (Fermentas) y 1 μL de extracto de ADN 1:10. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Mastercycler Thermcycler (Eppendorf, Eppendorf, Alemania). La amplificación del gen *copA* consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 58 °C por 1 min y una extensión a 72 °C por 1 min) y una extensión final a 72 °C por 5 min (Lejon *et al.*, 2007). La amplificación de los genes *nccA*, *czcD*, *chrB* y *merB* se realizó con una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 57°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1,5 min) y una extensión final a 72°C por 5 min (Nies *et al.*, 1990; Liebert *et al.*, 1997; Abou Shanab *et al.*, 2007). Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados mediante tinción con SYBR Green I. En la tabla 4 se indican los tamaños esperados de los productos de PCR.

Tabla 4. Partidores utilizados para la amplificación por PCR de los genes *copA*, *nccA*, *czcD*, *chrB*, *merA* y *merB*

Gen	Secuencia en sentido 5' a 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>copA</i>	GGGCAGCGCTTACTGGTAGGCTCAC TGAGCTGACTCATCATGCGTAGTCAGTT	1200	Lejon <i>et al.</i> , 2007
<i>nccA</i>	ACGCCGGACATCACGAACAAG CCAGCGCACCGAGACTCATCA	1150	Abou-Shanab <i>et al.</i> , 2007
<i>chrB</i>	GTCGTTAGCTTGCCAACATC GCGAAAGCAAGATGTCGATCG	450	Nies <i>et al.</i> , 1990
<i>merA</i>	ACCATCGGCGGCACCTGCGT ACCATCGTCAGGTAGGGGAACAA	1238	Liebert <i>et al.</i> , 1997
<i>merB</i>	TCGCCCCATATATTTTAGAAC GTCGGGACAGATGCAAAGAAA	460	Liebert <i>et al.</i> , 1997

El control positivo utilizado en todas las reacciones fue la cepa transconjugante *C. metallidurans* CH34 (pTP6) denominada *C. metallidurans* MRS33 (Rojas *et al.*, 2010). Esta

cepa presenta siete determinantes de resistencia a metales pesados incluyendo el operón *czc*, el locus *cop*, el locus de resistencia a talio *tllB*, el operón *cnr*, el operón *chr*, el locus *pbr*, el transposon *Tn4380* que le confiere resistencia a Hg^{+2} además del gen *merB* del plásmido pTP6.

2.12. Aislamiento de los plásmidos

Las cepas en estudio se cultivaron durante 12 horas en caldo LB suplementado con Cu^{+2} 0,8 mM para llevar a cabo la extracción plasmidial. La cepa control MRS33 fue crecida en LB en presencia de Hg^{+2} 0,05 mM. Se realizó el aislamiento de plásmidos mediante la metodología descrita por Kado y Liu (1981). La extracción del ADN plasmidial se efectuó mediante lisis alcalina (pH 12,6) y altas temperaturas (60 °C). En este método, el ADN cromosomal forma un complejo con dodecilsulfato de sodio, el que precipita por la adición de sales, quedando el ADN plasmidial en suspensión.

2.13 Crecimiento de la cepa O12 en presencia del cobre

Se estudió el crecimiento de la cepa O12, se llevó a cabo una curva de crecimiento en ausencia y presencia de Cu^{2+} . Se realizó un preinóculo en medio mínimo Tris por 12 h. Posteriormente, se inoculó al 1% en 25 mL de medio mínimo Tris sin Cu^{2+} y suplementados con 0,8 mM y 2,4 mM de Cu^{+2} . Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación de 180 rpm. A intervalos de 4 h se tomaron alícuotas de 100 μ L de cada cultivo. Se realizaron diluciones seriadas en tampón fosfato y se sembraron en medio R2A. Se evaluó el crecimiento mediante medición de turbidez a una longitud de onda de 600 nm y por recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) por mL en medio R2A (Agulló *et al.*, 2007). La velocidad específica de crecimiento se determinó con los datos obtenidos en la fase exponencial de la curva de UFC/mL v/s tiempo

2.14 PCR-DGGE de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas

En una primera etapa se realizó una extracción de ADN desde las muestras de los suelos. Posteriormente se realizó una purificación y cuantificación del ADN extraído. En una segunda etapa se realizó un PCR anidado de la región variable V6 del gen ARNr 16S a las muestras de ADN de suelo (Fig. 8).

La extracción de ADN se realizó directamente desde los suelos (1 g) utilizando el kit FastDNA Spint en combinación con FastPrep bead beating system (MP Biomedicals, Ohio,

EEUU). Los extractos de ADN se purificaron utilizando el protocolo del kit GeneClean Spin (MP Biomedicals, Ohio, EEUU). La cuantificación del ADN se realizó mediante el empleo del fluorómetro Qubit™ según las especificaciones del fabricante.

Para la reacción de amplificación del gen ARNr 16S a partir del ADN extraído de los cuatros suelos muestreados se utilizaron los partidores universales F27 y R1492. Cada reacción (25 µL) contenía tampón PCR; MgCl₂ (3 mM); desoxinucleótidos trifosfato (0,4 mM); partidor (0,6 µM); seroalbúmina de bovino (0,1 mg/mL) y 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa y 1 µL de extracto de ADN de suelo. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Mastercycler Thermocycler (Eppendorf, Eppendorf, Alemania). La amplificación del gen ARNr 16S consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min) y una extensión final a 72°C por 7 min.

Para la reacción de amplificación del gen V6 se utilizaron los partidores F984GC y R1378 (Heuer *et al.*, 1997). Cada reacción (25 µL) contenía tampón PCR Stoffel Fragment (Applied Biosystems); MgCl₂ (3 mM), desoxinucleótidos trifosatos (0,2 mM); partidor (0,6 µM); seroalbúmina de bovino (0,4 mg/mL), 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa Stoffel Fragment (Applied Biosystems); y 1 µL del producto de la amplificación del gen ARNr 16S 1:10. La amplificación de la región variable V6 consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 20 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min) y una extensión final a 72°C por 10 min.



Figura 8. Estrategia de amplificación de la región V6 del gen ARNr 16S del ADN de comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.

Los productos de PCR de la región V6 del gen ARN 16S se separaron en un gel al 8% poliacrilamida (solución al 30% de acrilamida-N, N'-metilbisacrilamida, 37:1), con un gradiente de solución desnaturalizante de 30–60% (solución 100% desnaturalizante contiene 7 mM urea y 40% v/v de formamida desionizada). La electroforesis se realizó por 14 h a 70 V en tampón TAE 1X (Tris (40 mM), acetato de sodio (20 mM), EDTA (1 mM), pH 7,4) a 58°C en el instrumento DCode System de BioRad (California, EEUU). Los geles de DGGE se tiñeron con SYBR Green I.

2.15 Análisis estadístico de DGGE

El análisis del patrón de bandas de DGGE se realizó mediante el empleo del software de análisis de imagen Phoretix 1D Pro, versión 10.0.3660 (Fig. 9). Se seleccionaron las bandas de mayor intensidad correspondientes a bandas definidas dentro del gel. A partir del patrón de bandeo se realizó una matriz sitios x bandas en Microsoft Excel 2007. La matriz construida fue completada con 0 y 1, donde 0 representa la ausencia de la banda en un determinado sitio y 1 la presencia de esta banda (Wang *et al.*, 2007). La matriz se analizó mediante un análisis estadístico multivariado de componentes principales (ACP) (Rayard *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Dell' Amico *et al.*, 2008), donde las variables a analizar fueron bandas y el criterio de clasificación fue el sitio. El software estadístico empleado para tal análisis fue Infostat versión 2009e. El programa Phoretix 1D Pro también se empleó para la generación de un dendrograma UPGMA.

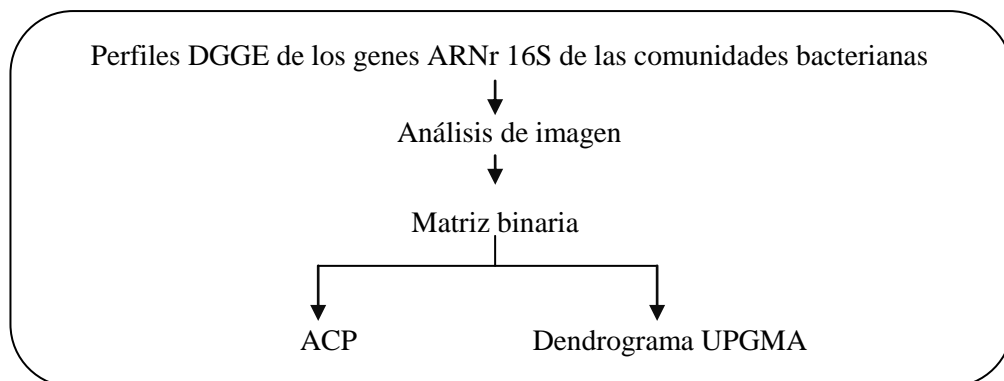


Figura 9. Esquema de análisis estadístico realizado a partir de los perfiles de DGGE de los genes ARNr 16S de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.

2.16. Determinación de la diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas

Se analizó la diversidad en base a los índices de diversidad de Shannon (H') y riqueza (D) de las comunidades bacterianas de suelos agrícolas. En el perfil de DGGE de los genes ARNr 16S de las comunidades bacterianas se consideró cada banda como una unidad taxonómica (OTU) (Dell' Amico *et al*, 2008). El cálculo del índice de diversidad (Shannon, 1997) se hizo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 1} \quad H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log p_i$$

Donde H' corresponde al índice de diversidad de Shannon y p_i es la proporción de una la unidad taxonómica dentro de la población analizada. Para calcular p_i se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 2} \quad p_i = \frac{N_i}{N}$$

Donde N_i es el número de OTU dentro de una población y N , es el número de OTUs totales. Por tanto, el índice contempla la cantidad de OTUs presentes dentro de una población (riqueza) y la cantidad de OTUs relativa (abundancia).

Se agradece a Guillermo Bravo Cortés por su apoyo y colaboración en el análisis de los resultados obtenidos en los perfiles de DGGE de las comunidades bacterianas de los suelos.

2.17. Detección de gen *copA* en el ADN metagenómico de los suelos agrícolas

Se detectó el gen *copA* en las comunidades bacterianas de los suelos analizados. Se amplificó el gen *copA* desde el ADN extraído de los suelos analizados. Para ello se utilizaron los partidores para la amplificación del gen *copA* (Tabla 4) en las condiciones de amplificación anteriormente descritas (Lejon *et al*, 2007).

2.18. Análisis estadístico

El análisis estadístico de resultados obtenidos en los ensayos de recuento de heterótrofas totales y tolerantes, análisis de crecimiento bacteriano, diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas de suelos, fueron analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de un 5%.

Se consideró significativa el efecto de una variable si p valor $< 0,05$.

Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico InfoStat v2010e.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización fisicoquímica de los suelos agrícolas

Las características fisicoquímicas de los suelos agrícolas como pH, humedad, contenido de materia orgánica, conductividad eléctrica y textura tienen un efecto importante en la fertilidad, en el desarrollo de los seres vivos y en la biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo. La Tabla 5, resume las propiedades fisicoquímicas y el historial agrícola de los suelos analizados del valle de Casablanca (suelo control) y del valle de Aconcagua (Chagres sur, Ñilhue y Chagres norte). Los cuatro suelos agrícolas analizados presentan un pH neutro y una textura franca. Este tipo de textura es la que posee las mejores condiciones fisicoquímicas para el cultivo. Los suelos cultivados (Ñilhue y Chagres norte) presentan un mayor contenido de materia orgánica. El suelo de Chagres sur presenta una conductividad eléctrica mayor que los otros suelos analizados. Las características fisicoquímicas del suelo control y de los suelos contaminados no presentaron otras diferencias.

Tabla 5. Características fisicoquímica de los suelos agrícolas

	Casablanca	Chagres sur	Ñilhue	Chagres norte
Ubicación (valle)	Casablanca	Aconcagua	Aconcagua	Aconcagua
pH a 25°C	7,1	7,7	7,5	7,8
CE (dS/m) a 25°C	0,2	2,9	0,2	0,6
Materia orgánica (%)	2,5	2,2	4,6	4,5
Textura	Franca	Franca	Franca	Franca
Arena (%)	72	49	48	32
Arcilla (%)	8	9	18	23
Limo (%)	20	42	34	45
Cultivo	Barbecho	Barbecho	Olivos	Alcachofas

3.2. Concentración de los metales pesados en los suelos

Se determinó la concentración de los metales pesados en los suelos agrícolas mediante digestión ácida de las muestras de suelos seguida por espectroscopía de absorción atómica. El suelo del valle de Casablanca, presentó niveles de cobre bajo la normativa fijada por la Unión Europea (50-140 mg/kg). La concentración de cobre intercambiable estuvo bajo el límite de detección (< 0,1 mg/kg). Sin embargo, los suelos analizados del valle de Aconcagua presentaron una concentración de cobre en el rango de 379-784 mg/kg que está sobre el rango de

concentración máxima permitida de cobre (Tabla 6). Los suelos del valle de Aconcagua presentaron una concentración de cobre intercambiable que corresponde al 0,2-0,4% de la concentración total de este metal. La concentración de los otros metales pesados (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+}) en los suelos agrícolas está bajo la normativa fijada por la Unión Europea (Commission of the European Communities, 1986).

Tabla 6. Concentración de metales de los suelos agrícolas

Metal (mg/kg)	Casablanca	Chagres sur	Ñilhue	Chagres norte	Normativa
Cu^{2+} intercambiable	ND	2	1,2	1,9	----
Cu^{2+}	21	520	379	784	140
Zn^{2+}	36	97	197	205	300
Pb^{2+}	9	33	54	73	300
Ni^{2+}	6	6	7	8	75
Cr^{6+}	6,5	13	19	19	----

ND: No detectado, concentración de cobre menor a 0,1 mg/kg.

3.3. Aislamiento de las bacterias heterótrofas tolerantes al cobre

El número de las bacterias aerobias heterótrofas totales y tolerantes a cobre (0,8 mM) de los suelos agrícolas se determinó mediante la técnica de recuento bacteriano por dilución en placa. Con esta técnica se puede evaluar el nivel de tolerancia a cobre de las comunidades bacterianas de suelo. El número de bacterias heterótrofas totales de los suelos con alto contenido de cobre y del suelo control no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Tabla 7). Sin embargo, el número de bacterias heterótrofas tolerantes a cobre fue significativo ($p < 0,05$) en los suelos contaminados con respecto control (Tabla 7). Se aislaron 92 cepas tolerantes a 0,8 mM de cobre desde los suelos con alto contenido de cobre del valle de Aconcagua.

Tabla 7. Recuento de las bacterias heterótrofas totales y tolerantes al cobre de los suelos agrícolas

Bacterias heterótrofas	Casablanca	Chagres norte	Ñilhue	Chagres sur
Totales (\pm DS)	$1,4 \cdot 10^7$ ($9,2 \cdot 10^5$)	$2,2 \cdot 10^7$ ($1,5 \cdot 10^6$)	$1,7 \cdot 10^7$ ($3,1 \cdot 10^5$)	$1,2 \cdot 10^7$ ($9,2 \cdot 10^5$)
Tolerantes (\pm DS)	$5,9 \cdot 10^4$ ($4,8 \cdot 10^3$)	$7,4 \cdot 10^5$ ($4,8 \cdot 10^4$)	$2,3 \cdot 10^6$ ($7,2 \cdot 10^5$)	$2,8 \cdot 10^6$ ($6,8 \cdot 10^5$)
% tolerantes	0,4	3,4	14	23
N° cepas aisladas	0	26	25	41

DS: Desviación estándar.

3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a los metales pesados

Para determinar la CMI de las 92 cepas aisladas tolerantes a cobre (0,8 mM), se inocularon las 92 cepas en medio mínimo Tris en presencia de distintas concentraciones de cobre (Tabla 8). En la Figura 10, se ilustra un ejemplo de la determinación de la CMI a cobre de las cepas aisladas. Un aumento progresivo de la susceptibilidad de las cepas aisladas se observó en el rango de concentración de 2,0 a 2,4 mM. Solamente 11 cepas de las 92 aisladas fueron tolerantes a cobre (2,8 mM). Las colonias de las cepas aisladas sometidas a altas concentraciones de cobre presentaron cambios en su coloración, primando los colores verdes, azules y café por la acumulación de cobre intracelular o periplasmática.

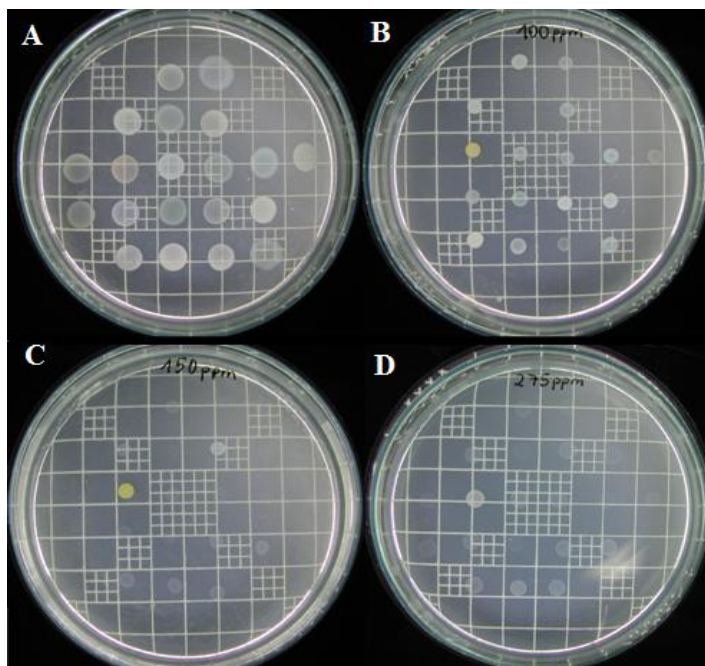


Figura 10. Determinación de la CMI de cepas aisladas desde los suelos del Valle de Aconcagua. Cepas inoculadas en medio Tris: A, sin cobre; B, en presencia de Cu^{2+} (1,6 mM); C, en presencia de Cu^{2+} (2,4 mM); D, en presencia de Cu^{2+} (2,8 mM).

Tabla 8. Número de cepas tolerantes a cobre aisladas desde suelos agrícolas del valle de Aconcagua

Sitio	concentración de cobre (mM)										
	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,1	3,5	3,9	4,3	4,7
Chagres sur	26	26	22	21	10	6	0	0	0	0	0
Ñilhue	25	25	20	10	2	2	2	1	1	1	0
Chagres norte	41	39	35	18	9	3	3	3	0	0	0

Se seleccionaron las 11 cepas que toleraron cobre (2,8 mM). Se estudió la tolerancia de estas cepas bacterianas a Hg^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . De las 11 cepas tolerantes a Cu^{+2} (2,8 mM) solo 5 son tolerantes a altas concentraciones de Hg^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Ni^{2+} y Zn^{2+} (Tabla 9). Estas 5 cepas fueron denominadas C21, O4, O12, A32 y A55.

La CMI de las cepas aisladas a metales pesados se ilustra en la Tabla 9. Las cepas O12, A32, A55 exhiben una alta tolerancia a Cu^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . Las cepas C21 y O4 presentaron alta tolerancia a Cu^{2+} y CrO_4^{2-} . La CMI de las cepas aisladas se compararon con la CMI de la cepa *C. metallidurans* CH34. Esta bacteria ha sido extensamente estudiada por su resistencia a una amplia gama de metales pesados. Fue aislada en 1970 desde lodos de un estanque de decantación de metales pesados de una fábrica de Bélgica. Las cepas O12, A32 y A55 presentan mayor tolerancia a Ni^{2+} y Zn^{2+} que *C. metallidurans* CH34. Las cepas O4 y C21 presentan la mayor tolerancia a CrO_4^{2-} que *C. metallidurans* CH34.

Tabla 9. Determinación de la CMI a los metales pesados de las cepas bacterianas aisladas desde el valle de Aconcagua

Cepas	CMI (mM)						
	Cd^{2+}	Hg^{2+}	Co^{2+}	CrO_4^{2-}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Ni^{2+}
C21	< 0,4	0,1	< 0,8	4,3	3,1	< 0,8	< 0,9
O4	< 0,4	0,1	2,5	4,3	3,9	< 0,8	8,5
O12	< 0,4	0,4	2,5	< 0,4	4,7	8,5	17
A32	< 0,4	0,4	2,5	< 0,4	3,9	8,5	17
A55	< 0,4	0,4	2,5	< 0,4	3,9	8,5	17
<i>C.m.</i> CH34	0,6	0,05	20	0,7	3,8	2,5	12

3.5 Análisis de ARDRA de las cepas tolerantes a metales pesados aisladas del valle de Aconcagua

El ribotipo de las cepas C21, O4, O12, A32 y A55 se analizó mediante la técnica de ARDRA (Fig.11). Tres de las cinco cepas (O12, A32 y A55) presentaron el mismo ribotipo, lo que sugiere que estas cepas son filogenéticamente cercanas. Las cepas C21 y O4 presentaron un ribotipo único, indicando que son a lo menos especies diferentes.

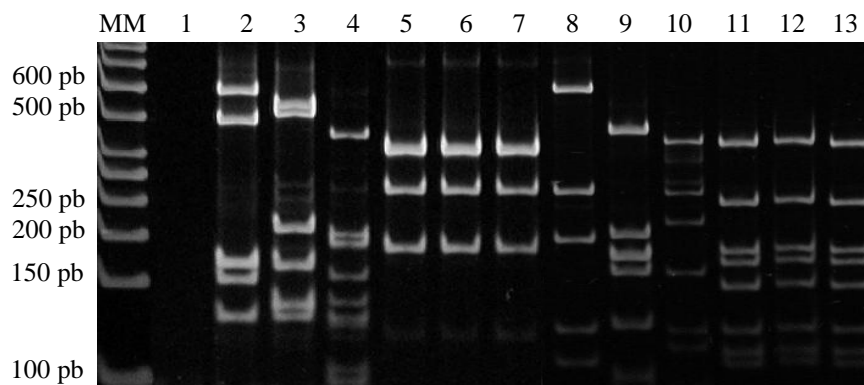


Figura 11. Perfiles de ARDRA de cepas bacterianas aisladas del valle de Aconcagua. Digestión del gen ARNr 16S de las cepas aisladas con la enzima *MspI* (C'CGG). Carriles: 1, control negativo; 2, *C. metallidurans* MSR33; 3, cepa C21; 4, cepa O4; 5, cepa O12; 6, cepa A32; 7, cepa A55. Digestión del gen ARNr 16S de las cepas aisladas con la enzima *BsuRI* (GG'CC). Carriles: 8, *C. metallidurans* MSR33; 9, cepa C21; 10, cepa O4; 11, cepa O12; 12, cepa A32; 13, cepa A55.

3.6. Secuenciación y análisis filogenético del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas tolerantes a metales pesados aisladas del valle de Aconcagua

Las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas C21, O4, O12, A32 y A55 (Anexo 8.1) fueron comparadas con las depositadas en las bases de datos públicas de GenBank NCBI. En la Tabla 10, se presentan los porcentajes de identidad obtenidos entre el gen ARNr 16S de las cepas seleccionadas y de las cepas tipos más próximas. Las cepas O12, A32 y A55 pertenecen al mismo género, *Sphingomonas*. La cepa C21 presenta una alta identidad con los géneros *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*. La cepa O4 probablemente pertenece a la familia de las Micrococcaceae y presenta una identidad de 93% con el género *Arthrobacter*.

En base a la distancia filogenética de las cepas caracterizadas se realizó un árbol filogenético que se ilustra en la Figura 12.

Tabla 10. Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de las cepas C21, O4, O12, A32 y A55 comparadas con las depositadas en bases de datos públicas.

Cepa	Organismo relacionado con la base de datos	Identidad
C21	<i>Stenotrophomonas sp.</i> BBTR57/ <i>Xanthomonas retroflexus</i>	99%
O4	<i>Arthrobacter sp.</i> MTR-44	93%
O12	<i>Sphingomonas sp.</i> SKJH-30	98%
A32	<i>Sphingomonas sp.</i> SKJH-30	99%
A55	<i>Sphingomonas sp.</i> SKJH-30	99%

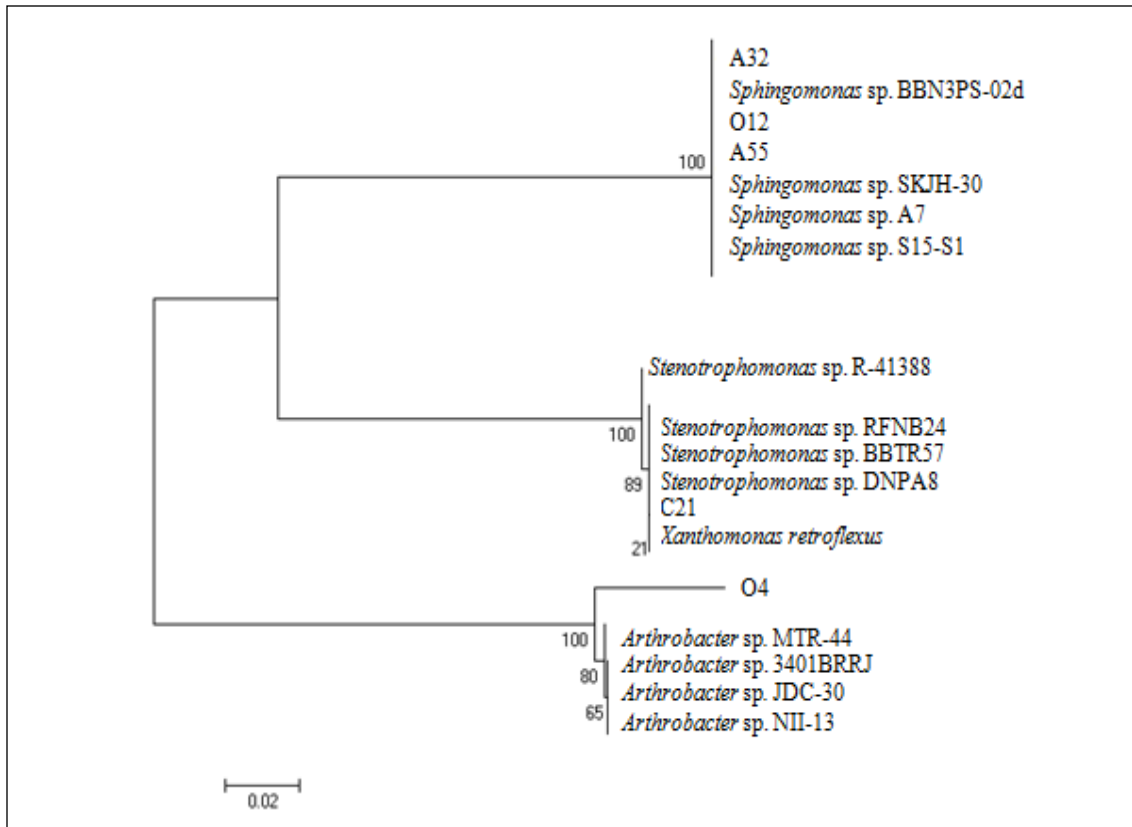


Figura 12. Relación filogenética entre las cepas C21, O4, O12, A32 y A55. El árbol filogenético fue construido usando el algoritmo neighbor-joining y el método de estimación de distancia kimura-2P. Los valores de bootstrap generados de 2000 replicas.

3.7. Detección de los genes de resistencia a los metales pesados por PCR en las tolerantes a metales pesados aisladas del valle de Aconcagua

Se determinó la presencia de determinantes genéticos de resistencia a metales pesados en las cepas tolerantes a metales pesados aisladas del valle de Aconcagua. Las cepas C21, O4, O12, A32 y A55 presentaron el gen de resistencia a cobre *copA* (Fig. 13A). El gen *copA* codifica para una oxidasa que convierte al Cu^{+1} a su estado de oxidación menos tóxico, Cu^{+2} . El tamaño de los amplicones del gen *copA* está dentro del rango de los 1067 a 1277 bp. Las cepas O12, A32 y A55 presentaron el gen estructural *nccA* (Fig. 13B). El gen *nccA* forma parte del operón que codifica el sistema de eflujo quimiosmótico Ncc, que confiere resistencia a Ni^{2+} , Cd^{2+} y Co^{+2} . El tamaño del amplicón de los productos de PCR del gen *nccA* es ~1150 pb. En las cepas C21 y O4 tolerantes a altas concentraciones de CrO_4^{2+} no se detectó el gen regulador *chrB* del operón *chr* que codifica el sistema de resistencia a CrO_4^{2+} (Peitzsch *et al.*, 1998, Mergeay *et al.*, 2003) (Fig.

13C). El tamaño del amplicón del gen *chrB* es de ~410 pb. La no detección de *chrB* se puede deber a que el gen *chrB* es altamente divergente o a la ausencia de este determinante genético en estas cepas y la presencia de otro gen regulador del sistema de resistencia de CrO_4^{2-} . En ninguna de las cepas se detectó el gen *merA* que codifica una enzima que reduce el Hg^{+2} a su estado elemental permitiendo su volatilización hacia el exterior de la célula (Fig. 13D). El producto de la amplificación del gen *merA* tiene un tamaño de ~1238 pb. Tampoco se detectó el gen *merB* que codifica la liasa MerB, que confiere resistencia a organomercuriados (Fig. 13E). El tamaño del producto de amplificación del gen *merB* es de ~460 bp.

A pesar de que se detectó el gen *copA* en todas la cepas y el gen *nccA* en los aislados O12, A32 y A55 no se puede concluir que estas cepas presentan resistencia a cobre y a níquel por la presencia de estos genes debido a que falta comprobar la funcionalidad de estos.

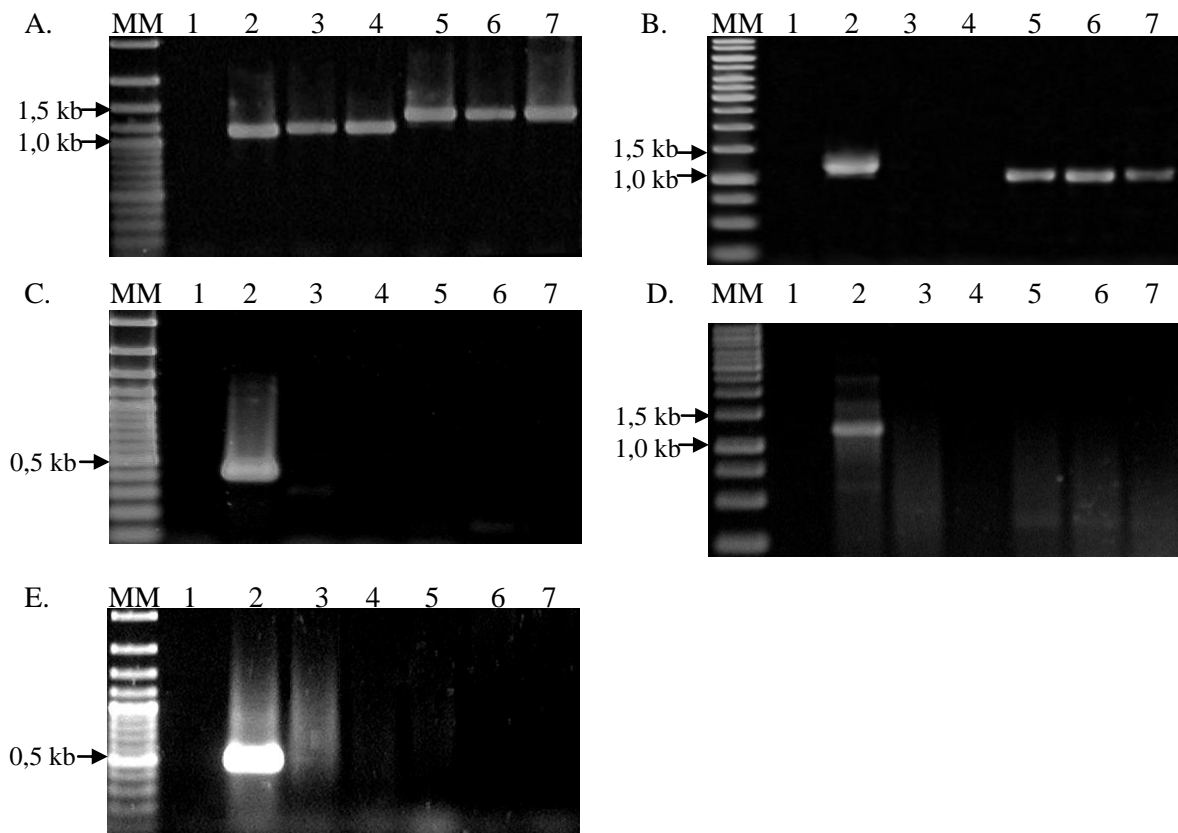


Figura 13. Detección de genes de resistencia a metales pesados en cepas bacterianas tolerantes a metales pesados aisladas desde el valle de Aconcagua. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos de PCR: A, gen *copA*; B, *nccA*; C, gen *chrB*; D, gen *merA*; E, gen *merB*. Carriles: MM, Marcador de masa molecular (GeneRuler™ 1 Kb o 100 bp plus); 1, control

negativo; 2, cepa *C. metallidurans* MRS33 (cepa de referencia); 3, cepa C21; 4, cepa O4; 5, cepa O12; 6, cepa A32; 7, cepa A55.

3.8. Detección de plásmidos en las cepas tolerantes a metales pesados aisladas del valle de Aconcagua

Se determinó la presencia de plásmido en las cepas C21, O4, O12, A32 y A55 utilizando la metodología de aislamiento de plásmidos de Kado y Liu. La bacteria *C. metallidurans* MRS33 se utilizó como control positivo. Esta bacteria presenta los plásmidos pMOL 30 (250 Kb), pMOL 28 (180 Kb) y pTP6 (54 Kb). Con el protocolo de Kado y Liu se aislaron los plásmidos de las cepas O12 y A32 y el plásmido pTP6 de la bacteria control (Fig. 14). Las condiciones de electroforesis realizadas en este experimento no permitieron la visualización de los plásmidos pMOL28 y pMOL30. Para visualizar estos plásmidos de gran tamaño se debe llevar a cabo una electroforesis por 12 a 24 h con cámara electroforética de enfriamiento.



Figura 14. Detección de los plásmidos en las cepas bacterianas aisladas de los suelos del valle de Aconcagua. Para el aislamiento de plásmido se utilizó la metodología de Kado y Liu. Carriles: 1, *Cuapriavidus metallidurans* MRS33 (plásmido pTP6). El plásmido pTP6 se observa en sus tres formas, desenrollado, linealizado y superenrollado; 2, cepa C21; 3, cepa O4; 4, cepa O12; 5, cepa A32; 6, cepa A55.

3.9. Crecimiento de la cepa O12 en medio mínimo suplementado con cobre

La cepa O12 presenta la mayor tolerancia a Cu^{2+} de las 92 cepas aisladas. Se estudió el crecimiento de esta cepa en medio mínimo Tris sin cobre y suplementado con Cu^{2+} (0,8 y 2,4 mM). El crecimiento se realizó a 30 °C con agitación de 180 rpm (Fig.15).

La cepa O12 fue crecida en medio Tris en ausencia y presencia de Cu^{2+} (0,8 mM y 2,4 mM). Se evaluó el crecimiento mediante turbidez ($\lambda = 600 \text{ nm}$) y UFC/mL. La cepa O12 alcanzó su fase estacionaria a las 15 h con una densidad celular de aproximadamente $1,6 \cdot 10^8$. La evaluación del crecimiento obtenido por turbidez indica que la cepa O12 crece más en presencia de concentraciones de cobre altas (0,8 mM-2,4 mM) (Fig. 15A). Sin embargo, al evaluar el crecimiento de la cepa mediante UFC/mL no se observó diferencias en el crecimiento de la cepa O12 en ausencia y presencia de cobre (Fig. 15B). La velocidad específica de crecimiento (μ) de la bacteria en medio Tris fue de $0,29 \text{ h}^{-1}$, en medio Tris suplementado con 0,8 mM de cobre fue

de $0,24 \text{ h}^{-1}$ y en medio Tris suplementado con $2,4 \text{ mM}$ de cobre fue de $0,26 \text{ h}^{-1}$. No existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las velocidades de crecimiento de la cepa O12 en ausencia y presencia de cobre a las concentraciones de $0,8$ y $2,4 \text{ mM}$. Por lo tanto, el crecimiento de la cepa O12 en medio Tris no se afectó por la presencia de cobre en concentraciones inferiores o iguales a $2,4 \text{ mM}$ de cobre.

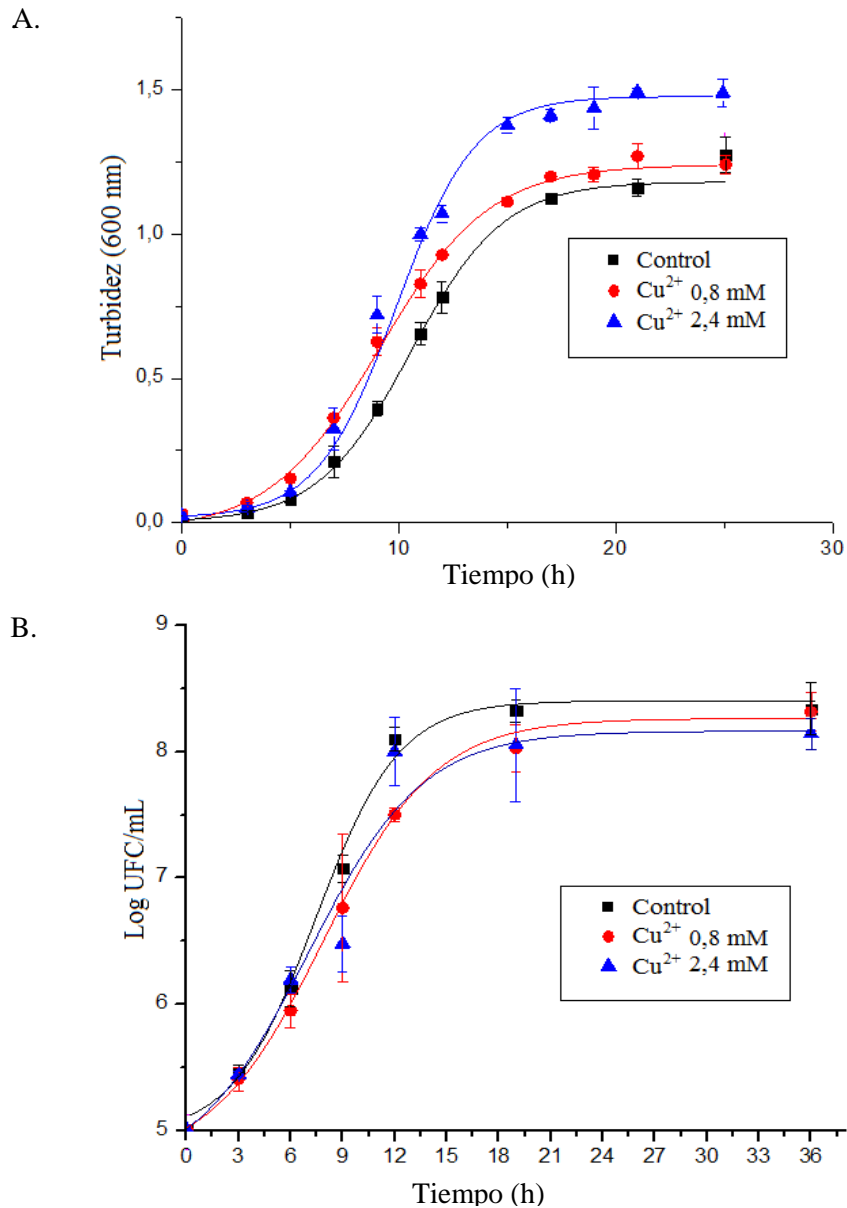


Figura 15. Efectos del cobre sobre el crecimiento de la cepa O12. Las células fueron crecidas en medio Tris y se incubaron en ausencia y presencia de Cu^{2+} ($0,8 \text{ mM}$ y $2,4 \text{ mM}$). A. Crecimiento evaluado por turbidez. B. Crecimiento evaluado por UFC/ml. Cada punto es el promedio de tres experimentos independientes.

3.10 Análisis de comunidades bacterianas mediante DGGE del gen ARNr 16S

Se realizó una extracción y purificación del ADN metagenómico de los suelos de los valles de Casablanca y Aconcagua. Posteriormente, se amplificó el gen ARNr 16S para estudiar las comunidades bacterianas de los suelos. Los productos de la amplificación de este gen se presentan en la Figura 16A. Estos productos de PCR se utilizaron como templado para la amplificación de la región variable V6 del gen ARNr 16S, el tamaño de los amplicones fue de 473 pb (Fig. 16B). Para determinar la diversidad de las comunidades de los suelos agrícolas se realizó un DGGE de los productos de la amplificación de la región variable V6 del gen ARNr 16S. Los perfiles de DGGE de las comunidades bacterianas de los suelos del valle de Casablanca y Aconcagua se muestran en la Figura 17. Los perfiles de DGGE del gen ARNr 16S de las comunidades bacterianas de los cuatro suelos analizados presentan un gran número de OTUs. Los perfiles de DGGE se analizaron mediante un análisis estadístico multivariado de componentes principales (ACP) (Fig. 18). El ACP muestra la existencia de asociaciones de OTUs compartidos entre los sitios y OTUs exclusivos para cada sitio analizado. Los OTUs 4, 20, 24, 27, 36, 47, 55 y 57 se visualizan en todos los sitios analizados por lo que se encuentran concentrados en la parte central de la gráfica del ACP. Los OTUs 1, 10, 21, 23, 52, 53 y 56 se encuentran asociados al sitio de Casablanca, los OTUs 8, 14, 34 y 63 se hallan solo en el sitio de Chagres sur. Los OTUs 22, 29, 46 58 y 61 se encuentran ligados a Ñilhue. Los OTUs 9, 19, 38 y 42 se encuentran en el sitio de Chagres norte. Para visualizar la similitud entre los perfiles de DGGE de los sitios analizados se realizó un dendrograma UPGMA (Fig. 19). Tanto el análisis obtenido por ACP como el dendrograma de UPGMA muestran que los suelos de los sitios Chagres sur y Chagres norte son los que presentan una mayor similitud en la estructura de las comunidades bacterianas.

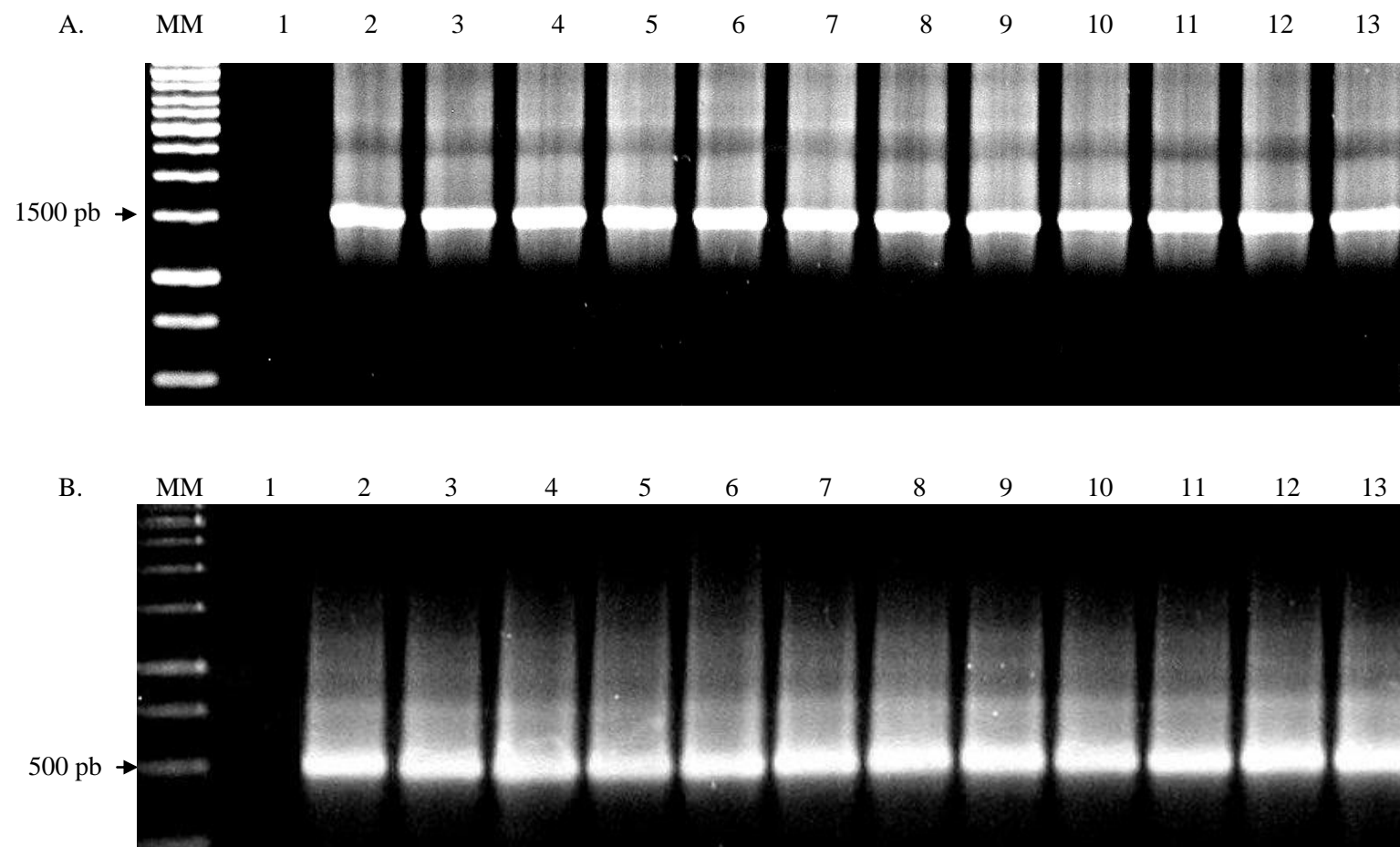


Figura 16. Detección de la región variable V6 del gen ARNr 16S del ADN bacteriano de los suelos agrícolas. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos de PCR de: A, gen ARNr 16S; B, región V6. Carril: MM, marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100bp plus); 1, control negativo; 2-4, sitio de Casablanca; 5-7, sitio de Chagres sur; 8-10, sitio de Ñilhue; 11-13, sitio de Chagres norte.

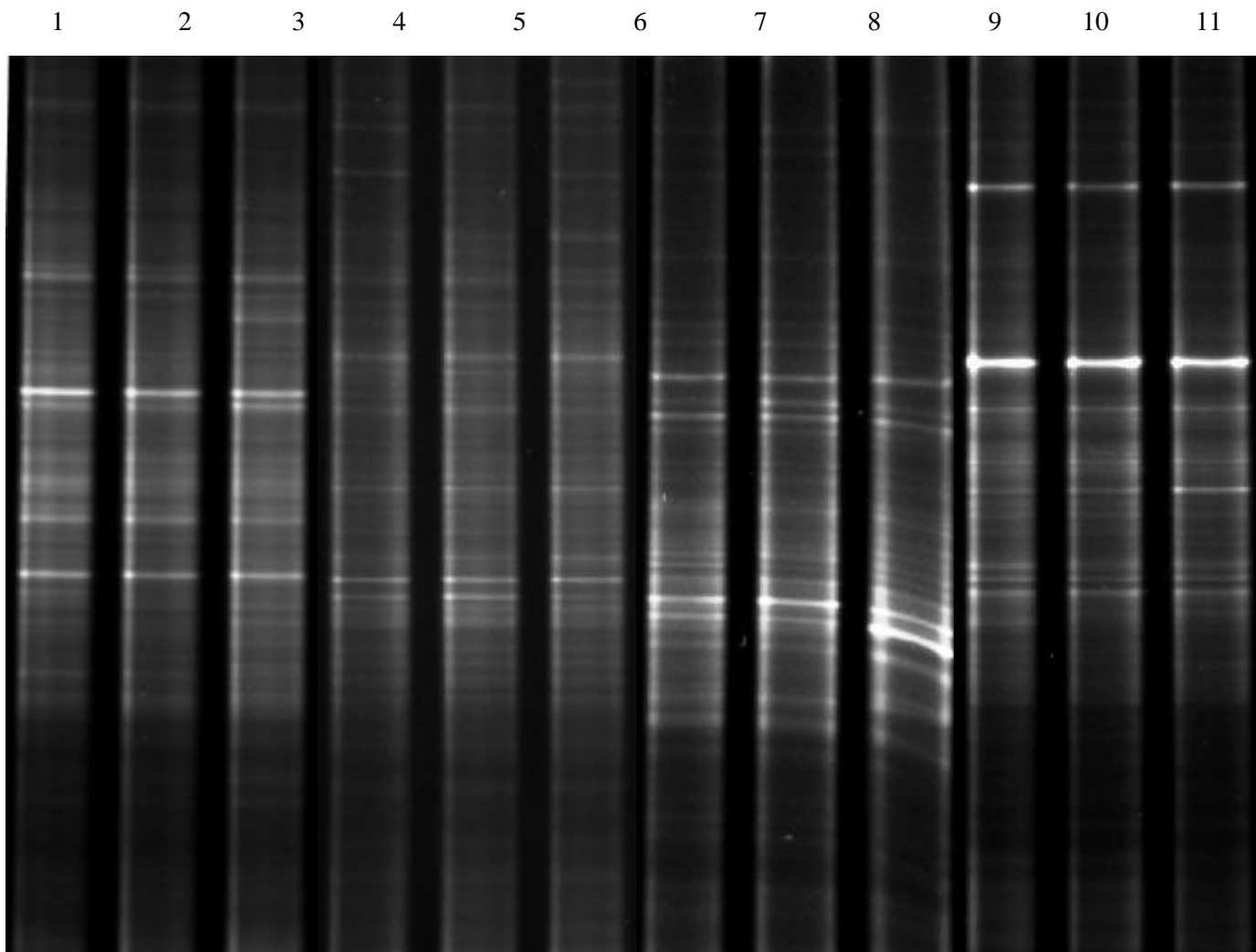


Figura 17. Perfil de DGGE del gen ARNr 16S del ADN bacteriano de los suelos agrícolas. DGGE con gradiente desnaturizante de 30-60% a 70 V por 14h. Carril: 1-3, sitio de Casablanca; 4-6, sitio de Chagres sur; 7-9, sitio de Ñilhue; 10-12, sitio de Chagres norte.

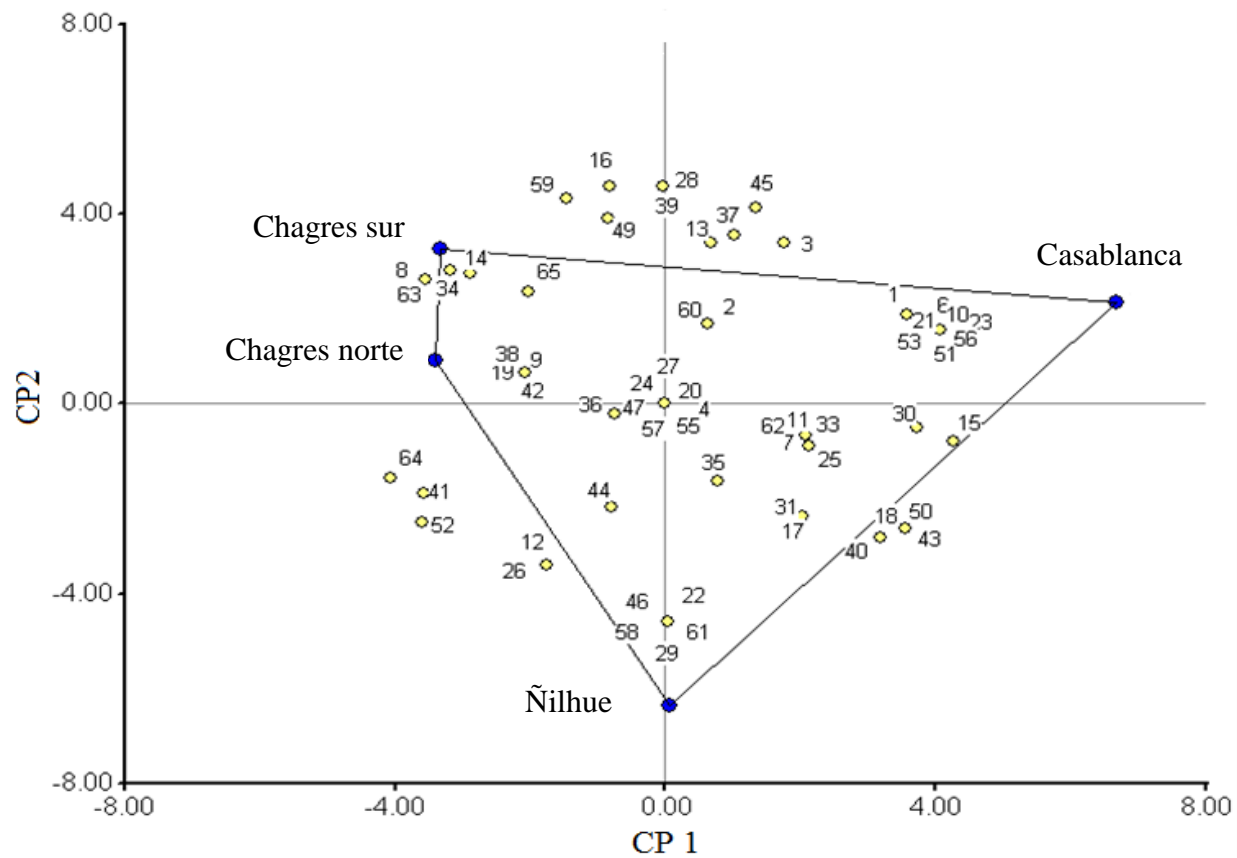


Figura 18. Análisis de componentes principales obtenido del perfil de bandeado de DGGE del gen ARNr 16S de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas. Sitio del valle de Casablanca (Cu^{2+} 21 mg/kg); sitio de Chagres sur (Cu^{2+} 520 mg/kg); sitio de Ñilhue (Cu^{2+} 379 mg/kg), sitio de Chagres norte (Cu^{2+} 784 mg/kg).

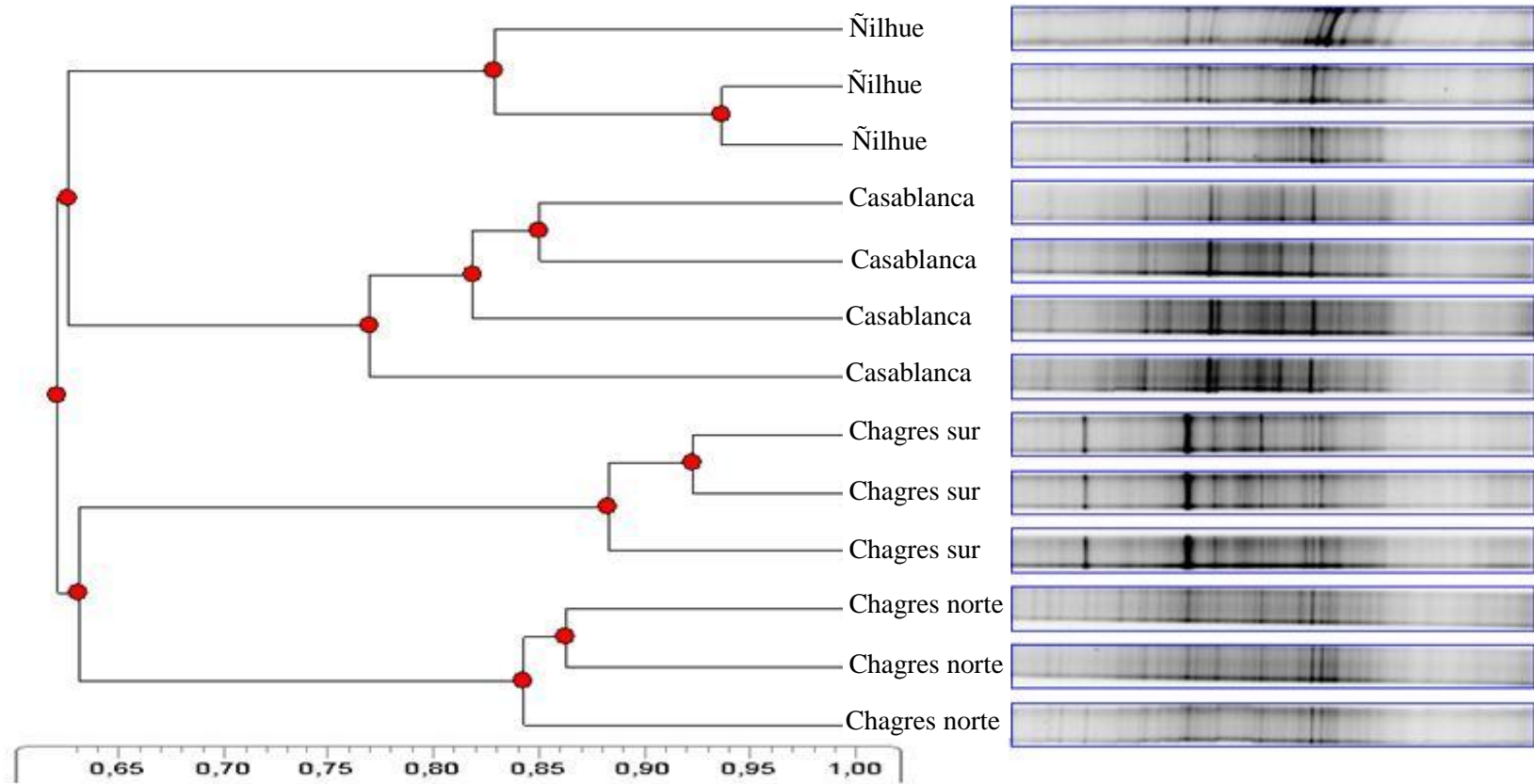


Figura 19. Dendrograma de UPGMA de perfiles DGGE del gen ARNr 16S de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas. En la gráfica se ilustra la similitud de los perfiles de DGGE de los suelos analizados de los valles de Casablanca y Aconcagua; Chagres sur, Ñilhue y Chagres norte.

3.11. Determinación de la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas.

Se analizó la diversidad en base a los índices de diversidad de Shannon (H') y riqueza (D) de las comunidades bacterianas de suelos agrícolas. Se determinó la riqueza y el índice de Shannon en base al análisis de los perfiles de DGGE de los genes ARNr 16S de las comunidades bacterianas (Tabla 11). Los valores obtenidos en los cálculos de los índices de riqueza y de diversidad no mostraron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de los suelos control y con alto contenido de cobre ($p > 0,05$).

Tabla 11. Valores de los índices de diversidad de Shannon y riqueza de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas. Los valores de diversidad y riqueza no mostraron diferencias significativas entre los suelos ($p > 0,05$).

Sitio	Cu total (mg/kg)	Cu intercambiable (mg/kg)	Diversidad (H)	Riqueza (D)
Casablanca	21	ND	3,53	35
Chagres sur	520	2,0	3,49	33
Ñilhue	379	1,2	3,62	33
Chagres norte	784	1,9	3,50	35

ND: No detectado, concentración de cobre menor a 0,1 mg/kg.

3.12. Detección de gen *copA* en el ADN metagenómico de los suelo agrícolas

Se realizó la detección del gen *copA* en el ADN metagenómico de los suelos del valle de Aconcagua y de valle de Casablanca mediante técnicas independientes de cultivo. En los suelos del valle de Aconcagua se detectó el gen *copA* mientras que en el suelo del valle de Casablanca no se detectó (Fig. 20). La detección del gen *copA* en los suelos del valle de Aconcagua (Fig. 20) concuerda con los resultados obtenidos en la detección de este gen en las cepas aisladas de estos suelos (ver Fig. 13A). La presencia del gen *copA* en el ADN metagenómico del suelo sugiere que las altas concentraciones de cobre en los suelos del valle de Aconcagua ejercen una presión selectiva en las comunidades bacterianas.

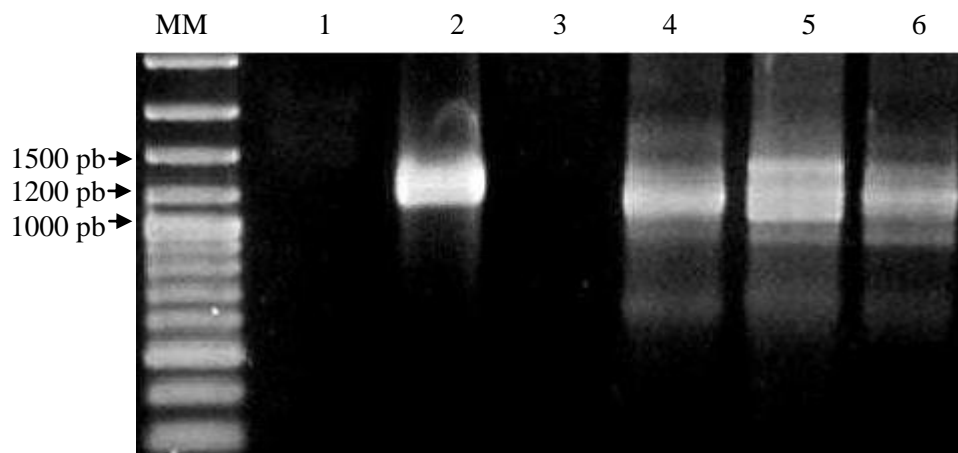


Figura 20. Detección del gen *copA* desde el ADN metagenómico de los suelos agrícolas. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos PCR del gen *copA*. Carril: MM, marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100 bp plus); 1, control negativo, 2, *Cupriavidus metallidurans* MSR33; 3, sitio de Casablanca; 4, sitio de Chagres sur; 5, sitio de Ñilhue; 6, sitio de Chagres norte.

4. DISCUSIÓN

Una de las principales zonas agrícolas de Chile es el valle del río Aconcagua ubicado en la región de Valparaíso. La minería del cobre y el empleo de agroquímicos que contienen cobre, ha provocado un incremento en la concentración de este metal en este sector. Se ha descrito que la presencia de cobre en los suelos disminuye la biomasa y la actividad metabólica bacteriana provocando un menor rendimiento de los procesos biogeoquímicos en los que las bacterias participan. Esto provoca una pérdida de la fertilidad de los suelos agrícolas y daños en el ecosistema (Smit *et al.*, 1997; Kahn *et al.*, 2000; Niklinska *et al.*, 2005, Dell' Amico *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2009). En este estudio se evaluó el efecto del cobre en altas concentraciones sobre las comunidades bacterianas de suelos agrícolas de la región de Valparaíso y se caracterizaron cepas bacterianas tolerantes a cobre aisladas desde el valle del Aconcagua.

4.1 Determinación de la concentración de cobre en los suelos agrícolas

Para determinar los efectos del cobre sobre las comunidades bacterianas de suelos agrícolas se analizaron los suelos de los valle de Aconcagua y Casablanca. Los suelos del valle de Aconcagua, analizados en este estudio presentaron niveles de cobre de 379, 520 y 784 mg/kg. Se ha descrito que los suelos de este valle presentan una concentración promedio de cobre (275 mg/kg) superior a la establecida por la Unión Europea (50-140 mg/kg) (Santibañez *et al.*, 2006). La concentración máxima de cobre detectada en esta zona es de 1275 mg/kg. El suelo del valle de Casablanca presentó una concentración de cobre de 20 mg/kg, que es inferior a lo establecido por la normativa la Unión Europea (Commission of the European Communities, 1986). El suelo del valle de Casablanca y los suelos del valle de Aconcagua presentaron características fisicoquímicas similares. Por lo tanto, el suelo del valle de Casablanca se seleccionó como el suelo control.

El cobre intercambiable de los suelos del valle de Aconcagua es de aproximadamente un 0,3% con respecto a la concentración de cobre total. La baja concentración de cobre intercambiable se podría deber a: i) las interacciones del cobre con los grupos funcionales (CO₂, OH, COOH, SH, CO₂H) de los compuestos húmicos del suelo (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas) (Kingery *et al.*, 2001), ii) la formación de hidróxidos de cobre insolubles debido al pH de los suelos analizados (pH 7-8). A este pH se incrementaría la afinidad de los grupos carboxilatos (COO⁻) de la materia orgánica por los metales (Kabata-Pedias y Mukhejee, 2007), y

iii) la arcilla de los suelos podría estar participando en la retención de los metales pesados en los suelos, impidiendo la solubilidad del cobre (Spark *et al.*, 1996).

Estas interacciones disminuyen la biodisponibilidad del cobre en los suelos. En forma concordante a estos antecedentes, el suelo del valle de Aconcagua, que presenta menor contenido de materia orgánica y arcilla es el que tiene mayor concentración de cobre intercambiable.

4.2. Estudio de la concentración de cobre intercambiable y su relación con la tolerancia de las bacterias a este metal

La toxicidad del cobre sobre las comunidades bacterianas está dada por la concentración de cobre biodisponible. La concentración de cobre biodisponible corresponde a la sumatoria de la fracción de cobre intercambiable, adsorbida y unida a la materia orgánica. De estas fracciones la que tiene mayor efecto tóxico sobre las comunidades bacterianas es la intercambiable (Kunito *et al.*, 1999). Uno de los indicadores más frecuentes para determinar la sensibilidad de las comunidades bacterianas de suelos a metales pesados es la determinación de la tolerancia de las comunidades bacterianas a los metales pesados (Dumestre *et al.*, 1999). En este estudio, se comparó la tolerancia a cobre de las comunidades bacterianas de los suelos con alto contenido de este metal con respecto al suelo control. Para ello, se determinó el número de heterótrofas tolerantes a cobre (0,8 mM) de los suelos. El número de bacterias heterótrofas tolerantes a cobre fue mayor en los suelos contaminados que en el suelo control. Esto se debe a que en los suelos contaminados con metales pesados, las bacterias sensibles disminuyen y las bacterias tolerantes a metales pesados incrementan (Huysman *et al.*, 1994; Diaz-Ravina y Baath, 1996; Smit *et al.*, 1997; Kunito *et al.*, 1998). De este modo, las comunidades bacterianas se adaptan a la presión selectiva del cobre manteniendo el número de bacterias heterótrofas totales constante. Por tanto, el incremento en la proporción de bacterias tolerantes a cobre refleja cambios en la estructura y la adaptación de la comunidad bacteriana (Berg *et al.*, 2005).

La proporción de bacterias heterótrofas tolerantes a cobre (0,8 mM) del valle de Aconcagua es baja (3 a 10%). Se esperaba un mayor número de bacterias tolerantes a cobre, debido a las altas concentraciones de este metal en los suelos analizados de este valle (379, 520 y 784 mg/kg). Esto podría deberse a: i) la distribución desigual de cobre en el suelo, ii) a la disminución de la toxicidad de cobre debido a la presencia de arcilla, materia orgánica del suelo,

etc., y iii) al poblamiento de bacterias en microambientes en que la concentración de cobre es baja debido a la inmovilización de cobre por otros organismos (Yamamoto *et al.*, 1985).

Los suelos del valle de Aconcagua presentan un mayor contenido de cobre total (379, 520 y 784 mg/kg) que los suelos estudiados por Dell' Amico *et al.* (2008) (372 y 215 mg/Kg). No obstante, las concentraciones de cobre intercambiable de los suelos del estudio de Dell Amico (9 y 30 mg/kg) son superiores a los suelos del valle de Aconcagua (1,2; 1,9 y 2 mg/kg).

Las bacterias tolerantes a cobre (0,8 mM) corresponden al 60-70% del número de bacterias heterótrofas totales en los suelos estudiados por Dell' Amico. La comparación de los resultados obtenidos en esta tesis y en el estudio de Dell' Amico sugieren que la fracción de cobre intercambiable es la que ejerce mayoritariamente la presión selectiva sobre las comunidades bacterianas de los suelos y es la que determina el nivel de tolerancia de las bacterias al cobre.

4.3. Aislamiento y caracterización de las cepas bacterianas tolerantes al cobre.

A las 92 cepas aisladas del valle de Aconcagua se les determinó la CMI a Cu^{2+} en medio mínimo Tris suplementado con concentraciones crecientes de Cu^{2+} . La gran mayoría de los aislados fueron altamente susceptibles a este metal en el rango de concentración de 2,0 a 2,5 mM. De igual modo, en el estudio de Abou-Shanab *et al.* (2007) se observó un aumento progresivo de la susceptibilidad de bacterias ambientales a Cu^{2+} en este mismo rango de concentración. Esto sugiere que sistemas de resistencias a Cu^{2+} eficaces deberían presentar las bacterias que resisten concentraciones superiores a los 2 mM de este metal.

Se ha descrito que en general las bacterias son tolerantes a un rango de metales pesados y no a un metal específico (Mergeay *et al.*, 1985; Dressler *et al.*, 1991). Las cepas bacterianas caracterizadas en este estudio fueron aisladas desde suelos con altos contenidos de cobre. Estos aislados además de exhibir alta tolerancia a cobre presentaron alta tolerancia a otros metales pesados. Las cepas O4 y C21 presentaron alta tolerancia a cobre y a cromato. Las cepas O12, A32 y A55 presentaron alta tolerancia a cobre, níquel y zinc. El alto nivel de tolerancia de estas cepas probablemente se atribuye al alto contenido de cobre presentes en los suelos del valle de Aconcagua. La exposición a cobre probablemente provocó la selección de bacterias tolerantes a metales pesados en las comunidades bacterianas de suelos agrícolas del valle de Aconcagua.

En el estudio de Abou-Shanab *et al.* (2007) se caracterizaron 46 cepas bacterianas aisladas desde la rizósfera de plantas hiperacumuladoras de metales pesados (*Alyssum murale*) y

desde suelos con alto contenido de níquel. La CMI a cobre de algunas de estas cepas fue bastante alta entre 10 a 15 mM en comparación a la CMI de cobre detectada en las cepas caracterizadas en esta tesis (3,1-4,7 mM). En la Tabla 12 se compararon la CMI a metales pesados de las bacterias caracterizadas en esta tesis con la CMI de bacterias medioambientales descritas en otros estudios. Cabe mencionar que la comparación de los resultados obtenidos por este estudio con otras investigaciones ha sido restringida por la falta de normalización del medio de cultivo utilizado en la determinación de la CMI (Trajanovska *et al.*, 1997; Konstantidinis *et al.*, 2003).

4.4. Secuenciación y análisis filogenético del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas tolerantes a metales pesados

La comparación de las secuencias del gen ARNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre los organismos, ya que contienen varias regiones altamente conservadas que resultan útiles para obtener alineamientos de secuencia y al mismo tiempo una variabilidad suficiente en otras regiones de la molécula para servir como cronometro evolutivos (Woese, 1987). Los resultados de la secuenciación del gen ARNr 16S de las cepas seleccionadas y la comparación de las secuencias de este gen con las bases de datos de Genbank NCBI indicó que las cepas O12, A32, A55 y C21 pertenecen al grupo de la Gram negativas. Las cepas O12, A32 y A55 pertenecen al género *Sphingomonas*. La cepa C21 presentó una alta identidad con bacterias de los géneros *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*. La cepa O4 correspondió a una bacteria Gram positiva que presentó mayor identidad con bacterias del género *Arthrobacter* que con otros géneros. Se han descrito cepas bacterianas de los géneros *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* y *Arthrobacter* tolerantes a metales pesados aisladas desde suelos contaminados con metales y desde la rizósfera de plantas hiperacumuladoras de metales pesados (Trajanovska *et al.*, 1997; Nazaret *et al.*, 2003; Idris *et al.*, 2004; Abou-Shanab *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2010). En la tabla 12 se describen algunas cepas bacterianas de los géneros *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* y *Arthrobacter* tolerantes a metales pesados que han sido aisladas desde suelos con alto contenido de metales.

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria de metales pesados para las cepas bacterianas aisladas de los suelos con alto contenido de metales pesados.

Cepa	CMI (mM)							Fuente	Estudio
	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	CrO ₄ ²⁻	Co ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺		
<i>C21</i>	3,1	< 0,9	< 0,8	4,3	< 0,4	< 0,4	0,10	Suelos del valle de Aconcagua, Chile.	Esta tesis
<i>O4</i>	3,9	8,5	< 0,8	4,3	< 0,4	< 0,4	0,10		
<i>O12</i>	4,7	17	8,50	< 0,4	2,8	< 0,4	0,40		
<i>A32</i>	3,9	17	8,50	< 0,4	2,5	< 0,4	0,40		
<i>A55</i>	3,9	17	8,50	< 0,4	2,5	< 0,4	0,40		
<i>Arthrobacter ramosus</i> AY509238	2,5	15	5,0	5,0	2,5	2,5	0,05		
<i>Arthrobacter rhombi</i> AY509239	10	15	10	5,0	5,0	5,0	0,50		
<i>Sphingomonas alaskesis</i> AY509242	5	15	5,0	0,1	1,0	0,1	0,50		
<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> AY5059241	1	10	0,5	0,1	1,0	0,1	0,01		
<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> AY5059243	5	15	5,0	0,5	5,0	0,5	0,50		
<i>Stenothrophomonas minatitlanesis</i> AY512829	1	10	5,0	0,1	1,0	0,5	0,50		
<i>Ralstonia</i> sp. E-50	2,0	0,5	0,50	ND	ND	< 0,5	ND	Suelos agrícolas con altos niveles de cobre (372 y 215 mg/kg) debido al empleo permanente de CuSO ₄ , Italia.	Dell Amico <i>et al.</i> , 2008
<i>Ralstonia taiwanensis</i> 181	3,0	0,5	0,50	ND	ND	0,5	ND		
<i>Ralstonia</i> sp. 13-100	4,0	0,5	0,50	ND	ND	< 0,5	ND		
<i>Ralstonia</i> sp. 14-100	4,0	0,5	0,50	ND	ND	< 0,5	ND		
<i>Ralstonia</i> sp.15-100	4,0	0,5	0,50	ND	ND	< 0,5	ND		
<i>Ralstonia</i> sp.16-100	4,0	0,5	0,50	ND	ND	< 0,5	ND		
<i>Corynebacterium</i> sp. AS019	3,5	ND	0,50	ND	1,00	< 0,4	0,04	Suelos de los alrededores de una exfábrica de baterías, Australia.	Trajanovska <i>et al.</i> , 1997
<i>Corynebacterium</i> sp. 13032	3,5	ND	0,50	ND	1,50	< 0,4	0,01		
<i>Escherichia coli</i> PA87	6,3	ND	1,25	ND	1,80	< 0,4	0,02		
<i>Arthrobacter</i> sp. E9	5,8	ND	3,00	ND	2,50	< 0,4	0,06		
<i>Arthrobacter</i> sp. E11	5,5	ND	3,10	ND	2,50	< 0,4	0,06		
<i>Corynebacterium</i> sp. AB12	5,8	ND	2,20	ND	2,40	< 0,4	0,045		
<i>Corynebacterium</i> sp. AB18	7,8	ND	2,50	ND	2,60	< 0,4	0,07		
<i>Corynebacterium</i> sp. AO5	2,5	ND	1,75	ND	1,25	< 0,4	0,02		
<i>Alcaligenes</i> sp. AO17	3,8	ND	2,80	ND	1,50	< 0,4	0,01		
<i>Corynebacterium</i> sp. AO21	2,2	ND	2,50	ND	1,20	< 0,4	0,10		
<i>Alcaligenes</i> sp. AO11	5,2	ND	3,50	ND	2,20	< 0,4	0,10		

ND: No determinado

4.5. Detección de genes de resistencia a metales pesados en las cepas tolerantes a metales pesados

La resistencia de las bacterias a metales pesados se debe a la presencia de determinantes genéticos que codifican reductasas, oxidasas, bombas de eflujo y reguladores de la expresión génica que constituyen sistemas de resistencia a metales pesados (Silver, 1992; Silver y Phung, 2005). En las cepas tolerantes a metales pesados, C21, O4, O12, A32 y A55 se detectaron determinantes genéticos de resistencia a metales. Uno de los principales mecanismos que media la resistencia a cobre corresponde a la oxido-reductasa muticobre CopA que oxida al cobre (Cu^{1+}) a su estado menos tóxico (Cu^{2+}). Además esta enzima oxida sideróforos de catecol generando pigmentos que pueden secuestrar al cobre en el periplasma (Magnani y Solioz, 2007). Las 5 cepas aisladas más tolerantes a cobre presentan el gen *copA*. A pesar de que se detectó el gen *copA* en las cepas 5 no se puede concluir que estas cepas presentan resistencia a cobre por la presencia de este gen debido a que falta comprobar su funcionalidad.

El gen *copA* se han detectado en bacterianas resistentes a cobre, aisladas desde medios ambientes con concentraciones de cobre alta. Estas cepas son: *Cupriavidus metallidurans* CH34, *Ralstonia solanacearum*; *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Aeromonas veronii* bv. *sobria* y *Caulobacter crescentus*. Todas estas cepas poseen parte o todo el operón que codifica al sistema Cop en plásmidos (Lejon *et al.*; 2007).

Las cepas O12, A32 y A55 poseen el gen estructural *nccA* que codifica la proteína NccA que forma parte de la familia de transportadores RND. Esta proteína se encuentra en la membrana interna asociada con una pareja de polipéptidos auxiliares: una proteína pequeña de la membrana externa y una proteína periplasmática que une a las membranas interna y externa (Fig.4) (Cervantes *et al.*, 2006). La proteína NccA permite el eflujo de Ni^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} a través de la membrana interna de bacterias Gram negativas, participando de este modo en la destoxicación intracelular de metales pesados (Schmidt y Schlegel, 1994, Nies *et al.*, 2004, Silver y Phung, 2005). El operón *ncc* se ha detectado en Proteobacterias del género *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Comamonas* y *Sphingobacterium* (Taghavi *et al.*, 2001). Se ha descrito que el sistema Ncc confiere alta resistencia a Ni^{2+} (40 mM), Co^{2+} (20 mM) y Cd^{2+} (10 mM) en *Cupriavidus xylosoxidans* 31A, sin embargo en *C. metallidurans* CH34 el operón *ncc* no codifica un sistema de resistencia funcional, el operón *cnr*, es el que participa en la resistencia a Ni^{2+} y Co^{2+} en esta bacteria.

También se evaluó la presencia del gen *chrB* en los aislados. El gen *chrB* codifica para un regulador de la expresión del gen *chrA* (Peitzsch *et al.*, 1998; Aguilar-Barajas *et al.*, 2008). Ninguna de las cepas presentó el gen *chrB*, a pesar de que las cepas C21 y O4 presentaron alta tolerancia a CrO_4^{2-} . El número y organización de los genes *chr* difieren en las dos cepas bacterianas donde se ha caracterizado este sistema de resistencia, *C. metallidurans* CH34 y *Pseudomonas auriginosa* (Díaz-Pérez *et al.*, 2007). La proteína ChrA de *C. metallidurans* CH34 posee sólo un 29% de identidad con *Pseudomonas auriginosa* (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008). Por lo tanto, el empleo de partidores específicos para la detección del gen *chrB* basados solamente en la secuencia de este gen en *C. metallidurans* CH34 podría no haber reconocido los genes *chrB* de otros aislados. Por otra parte, un mejor candidato para determinar la presencia del sistema de resistencia a Chr, es la detección del gen estructural *chrA*, que codifica para el sistema de eflujo que otorga la resistencia a cromato. El diseño de partidores degenerados para la detección del gen *chrA* se basaría en las 135 secuencias de los genes ortólogos *chrA* descritas (Díaz-Pérez *et al.*, 2007; Henne *et al.*, 2009).

4.6. Detección de plásmidos en las cepas tolerante a metales pesados

Los plásmidos participan en la adaptación de las bacterias en respuesta a estrés medio ambiental. La función de los plásmidos está estrechamente ligada a las condiciones ambientales en que están expuestas las bacterias que los portan (Frost *et al.*, 2005). Se determinó la presencia de plásmidos en las cepas bacterianas tolerantes a metales pesados aisladas del suelos del valle de Aconcagua. La metodología que se empleo para el aislamiento de plásmidos fue la descrita por Kado y Liu (1981), que consiste en la extracción del ADN mediante lisis alcalina (pH 12.6) y altas temperaturas (55- 60 °C). En este método, el ADN cromosomal forma un complejo con dodecilsulfato de sodio, el que precipita por la adición de sales, quedando el ADN plasmidial en suspensión. Se utilizó esta metodología debido a su simplicidad y al corto tiempo en su ejecución en comparación con otras metodologías (Birnboim y Doly, 1979). Se detectó plásmidos en O12 y A32. No se puede descartar la posibilidad de que las cepas C21, O4 y A55 porten plásmidos. Los plásmidos de estas cepas podrían ser de gran tamaño (≥ 150 kb). Los plásmidos pMOL28 (-180 kb) y pMOL30 (-250 kb) que porta la cepa multiresistente a metales pesados, *C. metallidurans* MSR33 (Rojas *et al.*, 2010) no se pudieron visualizar en las condiciones de electroforesis realizadas en este experimento. Para visualizar estos plásmidos de

gran tamaño se debe llevar a cabo una electroforesis por 12 a 24 h con cámara electroforética de enfriamiento.

La cepa *C.metallidurans* CH34 mutiresistente a metales fue aislada en los sedimentos de decantación de un fábrica de zinc en Bélgica en 1970 (Mergeay *et al.*, 2003). La presencia de metales pesados induce en la cepa *C.metallidurans* CH34 genes de resistencia a metales (operones *mer*, *cop*, *czc*, *ncc*, *cnr*, *pbr*, *sil*, y *chr*) genes involucrados en conjugación (*trbN*, *trbI*, *trbG* y *trbJ*), en la transposición (Tn4378 y Tn4380) y genes de mantención e integridad de la membrana celular (agrupamiento de genes *gtr*). En la *C. metallidurans* CH34, estos determinantes genéticos están localizados en los plásmidos pMOL30 y pMOL28 (Monchy *et al.*, 2007) (Tabla 13). Los plásmidos pMOL30 y pMOL28 cumplen un rol fundamental en la adaptación de *C. metallidurans* CH34 en condiciones de estrés generados por metales pesados. *Cupriavidus metallidurans* 31A es otra bacteria multiresistentes a metales pesados. Esta bacteria fue aislada desde tanques de galvanización de cobre. Sus determinantes genéticos de resistencia a metales están localizados en los plásmido pTOM9 (200 kb) y pTOM8 (340 kb). Estos plasmidios pueden ser transferidos a otras cepas de *C. metallidurans* (Schmidt y Shlegel, 1994). *Pseudomonas syringae pathovar tomato* fue aislada desde suelos de plantaciones de cultivo de tomate tratados con altas concentraciones de sulfato de cobre en el sur de California (Mellano y Cooksey, 1988). Su resistencia a cobre está codificada en el operón *copABCDRS* del plásmido pPT23D (Magnani y Solioz, 2007). El operón *pco* que se localiza es en el plásmido pRJ1004 de *E. coli* es un homólogo del operón *cop* (Rensing y Grass, 2003; Magnani y Solioz, 2007). Esta cepa fue aislada desde la flora del intestino de chanchos alimentados con una dieta con alto contenido de cobre que promueve su crecimiento (Tetaz y Luke, 1983). Estos antecedentes (Tabla 13) sugieren que los plásmidos de las cepas O12 y A32 podrían portar los genes de resistencia a metales pesados, *copA* y *nccA*.

Tabla 13. Plásmidos que poseen genes de resistencia a metales.

Plásmido	Tamaño	Fuente	Resistencia a MP	Referencia
pPT23D	39 kb	<i>P. syringae</i> pathovar <i>tomato</i>	Cu ⁺ y Cu ²⁺	Bender y Cooksey, 1987 Magnani y Solioz, 2007
pTOM 8	340 kb	<i>C. metallidurans</i> 31 ^a	Ni ²⁺ , Co ²⁺ y Cd ²⁺	Schmidt y Schlegel, 1994
pTOM 9	200 kb	<i>C. metallidurans</i> 31 ^a	Ni ²⁺ , Co ²⁺ y Cd ²⁺	Schmidt y Schlegel, 1994
pGOE1	250 kb	<i>A. eutrophus</i> KT02	Ni ²⁺ , Cd ²⁺ y Zn ²⁺	Ralf-Dietmar <i>et al.</i> , 1995
pGOE3	210 kb	<i>A. eutrophus</i> KT02	Ni ²⁺ , Cd ²⁺ y Zn ²⁺	Ralf-Dietmar <i>et al.</i> , 1995
pRJ1004		<i>E. coli</i>	Cu ⁺ y Cu ²⁺	Rensing y Grass, 2003

4.7. Efectos del cobre sobre el crecimiento de la cepa O12

La cepa bacteriana O12 es la que presenta la mayor tolerancia a cobre (4,3 mM) entre los 92 aislados. Esta cepa presentó además alta tolerancia a níquel (17 mM) y a zinc (8,5 mM) en comparación con la cepa de referencia *C. metallidurans* CH34. Debido a las características fenotípicas y genotípicas que presentó esta cepa, se seleccionó para estudiar su crecimiento en medio mínimo Tris en presencia de Cu²⁺ (0,8 y 2,4 mM). Se seleccionó el medio de cultivo Tris (Mergeay *et al.* 1985) debido a que contiene bajo contenido de materia orgánica y baja concentración de fosfato en comparación a otros medios. De este modo la mayor parte del cobre se encuentra en solución y no unido a la materia orgánica o precipitada por la presencia de fosfato.

La presencia de cobre en concentraciones menores a 2,4 mM no afectó el crecimiento de la cepa O12. Se ha descrito que en general las bacterias aumentan su crecimiento a concentraciones de cobre mayores a 0,16 mM pero disminuyen su crecimiento a concentraciones superiores a 0,8 mM de cobre (Chaudri *et al.*, 2000; Carrasco *et al.*, 2005). Estos antecedentes difieren con la capacidad de crecimiento de la cepa O12 en presencia cobre en altas concentraciones.

El crecimiento de la cepa O12 se determinó midiendo turbidez y UFC/mL (Fig. 15). Al medir turbidez, la cepa O12 presentaba un mayor crecimiento en medio con 2,4 mM que en medio sin cobre (Fig. 15A). Sin embargo al medir por UFC/mL el crecimiento fue levemente menor en presencia de cobre (2,4 mM). Estos resultados se contraponen con los obtenidos mediante UFC/ml (Fig. 15B). Por lo tanto, la evaluación del crecimiento de una bacteria mediante turbidez puede llevar a un error, debido a que puede haber una sobreestimación del crecimiento bacteriano. En el estudio de Wei *et al.* (2009) evaluaron el crecimiento en cobre de la cepa bacteriana CCNWRS33-2 a 1 mM y a 2 mM de cobre. Esta cepa se aisló desde raíces de nódulos de leguminosas silvestres que crecieron en relaves de una mina de oro del noroeste de China. La cepa CCNWRS33-2 tuvo un crecimiento mayor en medio con 1 y 2 mM de cobre respecto a la condición control (medio sin cobre). Los resultados obtenidos en este trabajo son rebatibles debido a que no utilizaron medio mínimo para los ensayos de crecimiento, además la determinación de velocidad de crecimiento específico (μ) lo realizaron en base a turbidez y no UFC/mL.

4.8. Efectos del cobre sobre la diversidad de las comunidades bacterianas de suelos agrícolas

Para determinar los efectos del cobre sobre la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas se compararon suelos con alto contenido de cobre (valle de Aconcagua) con un suelo con una concentración de cobre bajo el límite de la normativa de la Unión Europea (valle de Casablanca). Se empleó la técnica independiente de cultivo DGGE. Se calculó el índice de Shannon para determinar la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos. La diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos con alto contenido de cobre y control no presentaron diferencia significativa ($p > 0,05$). La riqueza bacteriana de los suelos fue similar en los cuatro suelos analizados. Estos resultados rechazan la hipótesis que afirma que concentraciones altas de cobre provocan una disminución en la diversidad de las comunidades bacterianas.

4.9. Detección del gen *copA* en el ADN metagenómico de los suelos agrícolas

Se realizó la detección del gen *copA* en el ADN metagenómico de los suelos valle de Aconcagua y de valle de Casablanca mediante técnicas independientes de cultivo. En los suelos del valle de Aconcagua se detectó el gen *copA* mientras que en el suelo del valle de Casablanca

no se detectó. La detección del gen *copA* en los suelos del valle de Aconcagua concuerda con los resultados obtenidos en la detección de este gen en algunas cepas aisladas de estos suelos. La presencia del gen *copA* en el ADN metagenómico del suelo sugiere que las altas concentraciones de cobre en los suelos del valle de Aconcagua ejercen una presión selectiva en las comunidades bacterianas y que este gen participa en la adaptación de las comunidades bacterianas a concentraciones altas de cobre. En el estudio de Smalla *et al.* (2006) se determinó la presencia y abundancia de determinantes genéticos de resistencia a mercurio en comunidades bacterianas de sedimentos de ríos contaminados con mercurio. Un incremento en la presencia y abundancia de genes de resistencia a mercurio (genes *mer*) y de plásmidos de amplio rango de hospedero (IncP-1) fue detectado en los sedimentos que presentaban mayor contaminación con mercurio. Estos resultados también indican que la exposición a metales pesados en altas concentraciones ejerce una presión selectiva sobre las comunidades bacterianas. Provocando un incremento de determinantes genéticos que confieren resistencia a metales pesados.

4.10. Adaptación de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas del valle de Aconcagua a las altas concentraciones de cobre.

La nitrificación es uno de los procesos biogeoquímicos más sensible a altas concentraciones de metales pesados. Rusk *et al.*, (2004) observaron un aumento en la tolerancia a Zn en las comunidades bacterianas nitrificantes que habían sido sometidas en un evento anterior a metales pesados. Resultados similares fueron descritos por Merten *et al.* (2006). En este estudio se evaluó el promedio de nitrificación de un suelo contaminado previamente por un período prolongado con Zn y de suelo sin contaminación. Ambos suelos se expusieron a una concentración alta de Zn. Se obtuvo un promedio de nitrificación mayor en el suelo con historial de contaminación con respecto al suelo sin historial de contaminación. La adaptación de la comunidad bacteriana nitrificante podría haber ocurrido por cambios en su estructura (Macdonald *et al.*, 2008), donde los grupos bacterianos que presentaron mayor tolerancia fueron más competitivos y aumentaron su número (Baath, 1989). La adaptación de las comunidades bacterianas a metales pesados podría también estar mediada por el traspaso de elementos genéticos móviles de resistencia a metales, mediante conjugación entre las bacterias que componen la comunidad bacteriana (Silver, 1992; Silver y Ji., 1994; Smalla *et al.*, 2000; Smalla *et al.*, 2006)

La Fundición Chagres que es la principal responsable de la contaminación del valle de Aconcagua y está operando desde 1917, por tanto los suelos de este sector y su microbiota han sido expuestos en forma prolongada a altas concentraciones de cobre. La proporción de bacterias tolerantes a cobre es mayor en los suelos del valle de Aconcagua que en el valle de Casablanca. Se detectó el gen *copA* en el ADN metagenómico de los suelos del valle de Aconcagua y no se detectó en ADN metagenómico del valle de Casablanca. Se ha descrito que exposiciones prolongadas a contaminantes provoca una adaptación de las comunidades bacterianas (Ford, 1994; Mertens *et al*, 2006; Morgante *et al.*, 2010). Estos resultados y antecedentes indican que las comunidades bacterianas de los suelos del valle de Aconcagua se han adaptado a las altas concentraciones de cobre presentes en ese sector. Algunas de las estrategias utilizadas por las comunidades bacterianas de suelos para adaptarse al alto contenido de cobre se evaluaron en este trabajo mediante técnicas dependientes de cultivo. Los resultados obtenidos indican que cepas bacterianas aisladas de los suelos del valle de Aconcagua tienen determinantes genéticos de resistencia a metales pesados. En dos cepas aisladas se detectó plásmidos que podrían estar diseminando estos determinantes genéticos por conjugación, contribuyendo de este modo, en la adaptación de las comunidades bacterianas a los altos contenidos de cobre de los suelos del valle de Aconcagua.

5. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de cobre de los suelos del valle de Aconcagua (rango 300- 700 mg/kg) sobrepasan el límite máximo de cobre (50-140 mg/kg) fijado por la Unión Europea. El contenido de cobre de los suelos del valle de Aconcagua es significativamente mayor que la concentración de cobre de los suelos del valle de Casablanca ($p < 0,05$).
2. Los suelos del valle de Aconcagua y Casablanca no presentaron diferencias significativas en el número total de bacterias heterótrofas ($p > 0,05$). Sin embargo, los suelos del valle de Aconcagua presentaron una mayor proporción de bacterias heterótrofas tolerantes a cobre (0,8 mM) que los suelos del valle de Casablanca. Esto sugiere que las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas del valle de Aconcagua se han adaptado a las altas concentraciones de cobre.
3. Once cepas aisladas desde los suelos del valle de Aconcagua presentaron una alta tolerancia a cobre ($\geq 2,8$ mM). Sin embargo, la CMI determinada para estas cepas es inferior a la concentración de cobre detectada en los suelos. Esto se puede deber a que la concentración de cobre biodisponible, que ejerce mayoritariamente la presión selectiva sobre las comunidades bacterianas de los suelos, es bastante baja.
4. Cinco de las cepas tolerantes a altas concentraciones de cobre (3,1 - 4,7 mM) presentaron alta tolerancia a otros metales pesados (Ni^{2+} , Zn^{2+} y CrO_4^{2-}). Las cepas bacterianas O12, A32, A55 exhibieron una mayor tolerancia a cobre y a níquel que la cepa de referencia *C. metallidurans* CH34. Las cepas C21 y O4 presentan una mayor tolerancia a cromato que *C. metallidurans* CH34.
5. Las cepas bacterianas O12, A32 y A55 presentan el mismo ribotipo. Las cepas O4 y C21 presentaron ribotipos únicos. Esto sugiere que son especies diferentes.
6. La alta tolerancia a los metales pesados en las cepas aisladas de suelos contaminados con cobre, del valle de Aconcagua, indica que la presencia de cobre en los suelos ejerce una presión selectiva sobre algunos miembros de las comunidades bacterianas.

7. La diversidad (H') y riqueza de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas de Aconcagua que presentan alto contenido de cobre y del suelo control del valle de Casablanca no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Estos resultados rechazan la hipótesis.

8. La detección del gen *copA* en el ADN metagenómico del suelo sugiere que las altas concentraciones de cobre en los suelos del valle de Aconcagua ejercen una presión selectiva en las comunidades bacterianas.

6. PROYECCIONES

1. Los estudios de la diversidad de las comunidades bacterianas se podrían complementar con la identificación de los grupos bacterianos predominantes de los suelos agrícolas de los valles de Aconcagua y Casablanca. La secuenciación de las bandas obtenidas de los perfiles de DGGE permitiría identificar los grupos bacterianos predominantes en los suelos.
2. La caracterización de la cepa más resistente a cobre podría ser complementada con estudios de funcionalidad de los genes de resistencia a metales pesados mediante RT-PCR y proteómica. También se podría analizar el efecto del cobre sobre el proteoma de las bacterias y determinar otros mecanismos de resistencia de la bacteria frente a cobre.
3. Las cepas caracterizadas con alta resistencia a metales pesados podrían ser empleadas en futuras estrategias de biorremediación como bioaumentación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Shanab R, van Berkum P, Angle J. (2007).** Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. 68(2):360-367.
- Aguilar-Barajas E, Paluscio E, Cervantes C, Rensing C. (2008).** Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 285(1):97-100.
- Agulló L, Cámara B, Martínez P, Latorre-Reyes V, Seeger M. (2007).** Response to (chloro) biphenyls of the PCB-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins induced also by heat shock and oxidative stress. *FEMS Microbiol. Lett*. 267(2):167-175.
- Anderson J, Hooper M, Zak J, Cox S. (2009).** Molecular and functional assessment of bacterial community convergence in metal-amended soils. *Microb Ecol*. 58(1):10-22.
- Andreazza R, Okeke BC, Lambais MR, Bortolon L, de Melo GW, Camargo FA. (2010).** Bacterial stimulation of copper phytoaccumulation by bioaugmentation with rhizosphere bacteria. *Chemosphere*. 81(9):1149-1154.
- Baath E (1989).** Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations. *Water, Air Soil Pollut*. 47(3-4):335-379.
- Babich H, Stotzky G, Ehrlich H. (1980).** Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol*. 8(2):99-145.
- Bender C, Cooksey D. (1987).** Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J Bacteriol*. 169(2):470-474.
- Berg J, Tom-Petersen A, Nybroe, O. (2005).** Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett Appl Microbiol*. 40(2):146-151.
- Birnboim H, Doly J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7(6):1513-1523.
- Brookes P. (1995).** The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol Fertil Soils*. 19(4):269-279.
- Buckley H, Schmidt M. (2003).** Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ Microbiol*. 5(6):441-452.

- Carrasco J, Armario P, Pajuelo E, Burgos A. (2005).** Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the *Aznalcollar pyrite* mine. *Soil Biol Biochem.* 37(6):1131–1140.
- Cervantes C, Campos-García J. (2007).** Reduction and efflux of chromate by bacteria. In: D Nies, S Silver (eds), *Molecular microbiology of heavy metals.* (pp. 407–419). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Cervantes C, Espino-Saldaña A, Acevedo-Aguilar F, León-Rodríguez I, Rivera-Cano M, Avila-Rodríguez M, Wróbel-Kaczmarczyk K, Wróbel-Zasada K, Gutiérrez-Corona J, Rodríguez-Zavala J, Moreno-Sánchez R. (2006).** Microbial interactions with heavy metals. *Rev Latinoam Microbiol.* 48(2):203-210.
- Chaudri A, Celine M, Allain G, Barbosa-Jefferson V, Nicholson F, Chambers B, McGrath S. (2000).** A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. *Plant Soil.* 221(1):167–179.
- Commision of the European Communities. (1986).** Council directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Off. J. Eur. Commun.* No. L 181/6 (86/278/EEC).
- Cooksey D. (1994).** Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 14(4):381-386.
- De Fede K, Panaccione D, Sexstone A. (2001).** Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOGR community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes. *Soil Biol Biochem.* 33(11):1555-1562.
- De Liphay J, Rasmussen L, Oregaard G, Simonsen K, Bahl M, Kroer N, Sørensen S. (2008).** Acclimation of subsurface microbial communities to mercury. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 65(1):145-155.
- Dell'Amico E, Mazzocchi M, Cavalca L, Allievi L, Andreoni V. (2008).** Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiol Res.* 163(6):671-683.
- Díaz-Pérez C, Cervantes C, Campos-García J, Julián-Sánchez A, Riveros-Rosas H. (2007).** Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* 274(23):6215-6227.
- Díaz-Ravina M, Baath E. (1996).** Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl Environ Microbiol.* 62(8):2970-2977.

- Dumestre A, Sauvé S, McBride M, Baveye P, Berthelin J. (1999).** Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Arch Environ Contam. Toxicol.* 36(2):124-131.
- Ercolini D. (2004).** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods.* 56(3):297-314.
- Ford T. (1994).** Pollutant effects on the microbial ecosystem. *Environ Health Perspect.* 102(12):45-48.
- Frost L, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. (2005).** Mobile genetic element: The agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 3(9):722-732.
- Gadd G, Griffiths A. (1978).** Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbiol Ecol.* 4(4):303-317.
- Giller K, Witter E, McGrath S. (1998).** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem.* 30(10-11):1389-1414.
- Girvan M, Campbell C, Killham K, Prosser J, Glover L. (2005).** Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol.* 7(3):301-313.
- Hall J. (2002).** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 53(366):1-11.
- Head I, Saunders J, Pickup R. (1998).** Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35(1):1-21.
- Henne K, Nakatsu C, Thompson D, Konopka A. (2009).** High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. *BMC Microbiol.* 9(1):199-213.
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel W, Sessitsch A. (2004).** Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol.* 70(5):2667-2677.
- Juhnke S, Peitzsch N, Hübener N, Große C, Nies D. (2002).** New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch Microbiol.* 179(1):15-25.
- Kabata-Pendias A, Mukherjee A. (2007).** Trace Elements from Soil to Human. (1st ed). New York, USA: Springer Berlin Heidelberg.
- Kado C, Liu S. (1981).** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145(3):1365-1373.

- Kahn M, Scullion J. (2000).** Effect of soil on microbial responses to metal contamination. *Environ Pollut.* 110(1):115-125.
- Kingery W, Simpson A, Hayes M. (2001).** Chemical structures of soils organic matter and their interactions with heavy metals. In Selim M, Spark D (eds), *Heavy metals release in soils* (pp 237-243). Washington, USA: Lewis Publishers.
- Kimura M. (1980)** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16(2):111-120.
- Kiyono M, Pan-Hou H. (1999).** The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. *Bacteriol.* 181(3):726-730.
- Konstantinidis K, Isaacs N, Fett J, Simpson S, Long D, Marsh T. (2003).** Microbial diversity and resistance to copper in metal-contaminated lake sediment. *Microb Ecol.* 45(2):191-202.
- Kozdrój J, van Elsas J. (2001).** Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J Microbiol Methods.* 43(3):197-212.
- Kunito T, Saeki K, Oyaizu H, Matsumoto S. (1999).** Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. *Ecotoxicol Environ Saf.* 44(2):174-181.
- Lejon D, Nowak V, Bouko S, Pascault N, Mougel C, Martins J, Ranjard L. (2007).** Fingerprinting and diversity of bacterial *copA* genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination. *FEMS Microb. Ecol.* 61(3):424-437.
- Liebert C, Wireman J, Smith T, Summers A. (1997).** Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Appl Environ Microbiol.* 63(3):1066-1076.
- Lozet J, Mathieu C. (1991).** *Dictionary of Soil Science* (2th ed.). Rotterdam: A. A. Balkema.
- Macdonald C, Campbell C, Bacon J, Singh B. (2008).** Multiple profiling of soil microbial communities identifies potential genetic markers of metal-enriched sewage sludge. *FEMS Microbiol Ecol.* 65(3):555-564.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. (2003).** *Habitat microbianos, ciclos de nutrientes e interacciones con las plantas, Biología de los microorganismos* (pp. 624-632). Madrid, España: Prentice Hall Iberia.
- Magnani D, Solioz M. (2007).** How bacteria handle copper, In Nies D and Silver S (eds.), *Bacterial transition metal homeostasis* (pp. 259-285). Heidelberg, Germany: Springer.

- Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R. (2008).**The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ Int.* 34(2):265-276.
- Mellano M, Cooksey D. (1988).** Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol.* 170(9):4399-4401.
- Mergeay M, Monchy S, Vallaey T, Auquier V, Benotmane A, Bertin P, Taghavi S, Dunn J, van der Lelie D, Wattiez R. (2003).** *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev.* 27(2-3):385-410.
- Mergeay, M, Nies, D. H., Schlegel, H. G, Gerits, J, Charles P, Van Gijsegem, F. (1985).** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol.* 162(1):328-334.
- Mertens J, Springael D, De Troyer I, Cheyns K, Wattiau P, Smolders E. (2006).** Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environ Microbiol.* 8(12):2170-2178.
- Monchy S, Benotmane M, Jassen P, Vallaey T, Taghavi S, van der Lelie D, Mergeay M. (2007).** Plasmids pMol28 and pMol30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol.* 189(20):7417-7125.
- Morgante V, López-López A, Flores C, González M, González B, Vásquez M, Rosselló-Mora R, Seeger M. (2010).** Bioaugmentation with *Pseudomonas sp.* strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 71(1):114-126.
- Morris C. (Ed.). (1992).** Academic Press Dictionary of Science and Technology. San Diego, USA: Academic Press.
- Muyzer G, Smalla K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73(1):127-141.
- Muyzer G, Smalla K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73(1):127-141
- Nacimiento A, Chartone-Souza E. (2003).** Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potencial for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res.* 2(1):92-101.

- Nazaret S, Brothier E, Ranjard L. (2003).** Shifts in diversity and microscale distribution of the adapted bacterial phenotypes due to Hg(II) spiking in soil. *Microb Ecol.* 45(3):259-269.
- Nies A, Nies D, Silver S. (1990).** Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Biol Chem.* 265(10):5648-5653.
- Nies D. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51(6):730-750.
- Nies D. (2003).** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 27(2-3):313-39.
- Nies D (2004).** Incidence and functional of sigma factor in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. *Arch Microbil.* 181(4):255-268.
- Nieto J, Ventosa A, Ruiz-Berraquero F. (1987).** Susceptibility of halobacteria to heavy metals. *Appl Environ Microbiol.* 53(5):1199-1202.
- Niklinska M, Chodak M, Laskowski R. (2005).** Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area. *Soil Biol Biochem.* 37(12):2185-2194.
- ODEPA. (2004).** Estadística de la agricultura chilena. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias.
- ODEPA-CIREN. (2002).** Catastro frutícola V Región, principales resultados. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN), Santiago, Chile.
- Parker S (Ed.). (1989).** McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms (4th ed.). New York, USA: McGraw-Hill.
- Pontel L, Soncini F. (2009).** Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. *Mol Microbiol.* 73(2):212-225.
- Ramírez-Díaz M, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C. (2008).** Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals.* 21(3)321-332.
- Ranjard L, Echairi A, Nowak V, Lejon D, Nouaim R, Chaussod R. (2006).** Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microb Ecol.* 58(2):303-315.
- Ranjard L, Poly F, Nazaret S. (2000).** Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol.* 151(3):167-177.

- Ranjard L, Richaume A. (2001).** Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res Microbiol.* 152(8):707-716.
- Reasoner D, Geldreich E. (1985).** A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ Microbiol.* 49(1):1-7.
- Rensing C, Grass G. (2003).** *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev.* 27(2-3):197-213.
- Rojas L, Yañez C, Gonzalez M, Lobos S, Smalla K, Seeger M. (2010).** Construction and characterization of *Cupriavidus metallidurans* MSR33 for remediation of environmental mercury species. In preparation. .
- Rusk J, Hamon R, Stevens D, Laughlin M.(2004).** Adaptation of soil biological nitrification to heavy metals. *Environ Sci Technol.* 38(11):3092-3097.
- Saitou N, Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406-425.
- Sadzawka R, Carrasco M, Grez R, Mora M, Flores H, Neaman A. (2006).** Métodos de análisis de recomendados para los suelos de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, p 164. Serie Actas INIA N°34, Santiago, Chile.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis. (1989).** *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2^{sd} ed.). New York. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santibáñez F, Roa P, Santibáñez P, Fuentes C, Royo A. (2006).** Suelos. Informe País: Estado del medio ambiente en Chile 2005: GeoChile (pp. 171-204). Santiago, Chile: LOM ediciones.
- Sauvé S, Dumestre A, McBride M, Gillett J, Berthelin J, Hendershot W. (1999).** Nitrification potential in field collected soils contaminated with Pb or Cu. *Appl Soil Ecol.* 12(1):29-39.
- Schmidt T, Schlegel H. (1994).** Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol.* 176(22):7045-7054.
- Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M, Kirchmann H, Kandeler E. (2001).** Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl Environ Microbiol.* 67(9):4215-4224.
- Shannon C. (1997).** The mathematical theory of communication. *MD Comput.* 14(4):306-317.
- Silver S, Ji G. (1994).** Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environ Health Perspect.* 102(3):107-113.

- Silver S, Phung le T. (2005).** A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32(11-12):587-605.
- Silver S. (1992).** Plasmid-determined metal resistance mechanisms: range and overview. *Plasmid.* 27(1):1-3.
- Smalla K, Haines AS, Jones K, Krögerrecklenfort E, Heuer H, Schloter M, Thomas CM. (2006).** Increased abundance of IncP-1beta plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of IncP-1beta plasmids with a complex mer transposon as the sole accessory element. *Appl Environ Microbiol.* 72(11):7253-7259.
- Smalla K, Krögerrecklenfort E, Heuer H, Dejonghe W, Top E, Osborn M, Niewint J, Tebbe C, Barr M, Bailey M, Greated A, Thomas C, Turner S, Young P, Nikolakopoulou D, Karagouni A, Wolters A, van Elsas JD, Drønen K, Sandaa R, Borin S, Brabhu J, Grohmann E, Sobecky P. (2000).** PCR-based detection of mobile genetic elements in total community DNA. *Microbiology.* 146(6):1256-1257.
- Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K. (2001).** Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol.* 67(5):2284-2291.
- Smit E, Leeflang P, Wernars K. (1997).** Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 23(3):249-261.
- Smit E, Wolters A. and van Elsas J. (1998).** Self-transmissible mercury resistance plasmids with gene-mobilizing capacity in soil bacterial populations: influence of wheat roots and mercury addition. *Appl Environ Microbiol.* 64(4):1210–1219.
- Smolders E, Buekers J, Oliver I, Laughlin M. (2004).** Soil properties affecting toxicity of zinc to soil microbial properties in laboratory-spiked and field-contaminated soils. *Environ Toxicol* 23(11):2633-2640.
- Solioz M, Abicht HK, Mermoud M, Mancini S. (2010).** Response of gram-positive bacteria to copper stress. *J Biol Inorg Chem.* 15(1):3-14.
- Solioz M, Stoyanov J. (2003).** Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev.* 27(2-3):183-195.

- Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnson CT, Summer ME. (1996).** Methods of soil analysis. Part iii: Chemical methods. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA.
- Spiegelman D, Whissell G, Greer CW. (2005).** A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can J Microbiol.* 51(5):355-386.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8):1596-1599.
- Taghavi S, Delanghe H, Cindy L, Max M, Van der Lelie D. (2001).** Nickel-Resistance-Based Minitransposons: New Tools for Genetic Manipulation of Environmental Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 67(2):1015-1019.
- Tessier A, Campbel P, Bisson M. (1979).** Sequential extraction procedure for the especiation of particulate trace metals. *Anal Chem.* 51(7):844–851.
- Tetaz TJ, Luke RK. (1983).** Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 154(3):1263-1268.
- Tom-Petersen A, Leser TD, Marsh T, Nybroe O. (2003).** Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiol Ecol.* 46(1):53-62.
- Torsvik V, Øvreås L. (2002).** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 5(3):240-245.
- Trajanovska S, Britz M, Bhave M. (1997).** Detection of heavy metal ion resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation.* 8(2):113-124.
- Wang Y, Shi J, Wang H, Lin Q, Chen X, Chen Y. (2007).** The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicol Environ Saf.* 67(1):75-81.
- Wei G, Fan L, Zhu W, Fu Y, Yu J, Tang M. (2009).** Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *J Hazard Mater.* 162(1):50-56.
- Woese C. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51(2):221-271.
- Xie X, Fu J, Wang H, Liu J. (2010).** Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China. *AJB.* 9(26):4056-4066.

8. ANEXO

8.1. Secuencia del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas tolerantes a metales pesados

1. Cepa C21

NTNNNNNNNTTTTTNNATGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCA
CAGAGGAGCTTGCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTTTCGTGG
GGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATAACGACTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCT
TGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGT
AAAGCCCTTTTTGTTGGGAAAGAAATCCAGCCGGCTAATACCTGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAG
CACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGTGCGTAGGTGGTTGTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGAAA
CTGGACAAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCGGGTGTAGCAGTCAAATGCGTAGAGATCGGGAG
AACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAAGTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTAT
CGAAGCTAACCGGTTAAGTTCCGCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGT
CGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACAGT
CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATTGGTCCAGCACGTAATGG
TGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT
TACGGCCAGGGCTACACACGTAATAAATGGTGGGGACAGAGGGGTGCAAGNCCGGCGACGGTAAGNCCAA
TCNCCAGAACTNCCATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
ATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCCGCNCGTACACCATGGAGT
TTGTTGCANCAGANCAGTAGCTTANCTTCGGAGGCGCTTGCNACGTGTGNCGATGACTGGGTGAGTC

2. Cepa O4

NNTNTNNNNNNNGNCNNGGANAACANGTGNANGNNTCNCANNNANATACNCTACTNTTAATGCACTCAGA
CTATANNGNNTTTTTAACNGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA
NNNNNCTTGCNNNTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATA
AGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCGACTATCGCATGGTGGTTGGTGGAAAGCTTTTTGTGG
TTTTGGATGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCGCGTGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACC
TCTTTAGTAGGGAAGAAGCGANAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCG
GTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGG
AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGGTCT
CTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATG
CCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCC
CCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCA
TGCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGCATGAAACGGACNNGCCTGGAAACAG
GNCTTCCCCTTTGGGGCTGGTTTACNNGGGGGGCGAGGGTTGCCNTCNCNCTCNGGTGNGGAAATGTTGGGTT
AATTCNCNCAACAAGCGCAACCTTCGTCTTATGTTGCCNNAACNTGATGGGGGGGATTCNTAGAAAACCTGC
CGGNCCAAATCCGAAGGAAGGTGGGAACAACNTCAAATCATCNTGCCCTTATGNTTTTGGGCTTCACGCN
GGCTACAATGGCCGGANNAAGGGTTGCNATNTGGTGGGGGANTTAATCCNAAAAANCCGGTTTCANT
TNGANTTGGGGTTTTGCAATTCNCCCCNTGANNCGAATCTCGCTNNNAATTGCAAAATANCANCCCTTN
CGNGATATACTTTCCCGGNCCCTTTNNACANCCNCCNCCNNAANTCNNNAANNTGNGNAACCCCNAAAG
CNGGGNGGCCAAACCCTGGNNGNANGGGATCTTNTNNAGGG

3. Ceba O12

CNAGNAAGNAAAAACACTTCTTGAGANAGCACCCNCCCTCNCCACCNANGATAAAGTTGTNTNCCCTGNC
ATAAAATANAACCANTTTTTTCANATTTNANGGACACCCCAAAAAANNTNNGGTAATCANATGGGCAGG
CTTCCCCCTGGGGGAAATATTTAAAANAAAAANNTTANAAAACCTTTAATTNNTTTTTTTTTTCAGCNCAG
NTGNTTTTCNNGNNCAGGCCNAAAACNANNNNNNGGTAAAANGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTA
ACACATGCAAGTGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTT
AGGTTCGGAATAACAGCTGGAAACGGCTCTAATACCGGATGATATCGCGAGATCAAAGATTTATCGCCTGA
GGATGAGCCCGCTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTCT
GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTT
TTACCCGGGAAGATAATGACTGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGT
GAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAAGTGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAA
TTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGACTGGACTGG
TATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGATAACTAGCTGTCCGGGCACTTGGTGTCTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT
TCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACGACTTCCAGAGATGGATTTCTTCCCT
TCGGGGACCTACACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTAGTTACCATTATTTGGTTGGGTACTCTAAAGGAACCCCGGTGATAAGC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCATGCCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGC
AACTACAGTGGGCAGCGACCCTGCGAGGGCGAGCTAATCCCCAAAAGTTGTCTCAGTTCCGATTGTTCTCT
GCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCGNGGNGNGAANNCGTTCCCA
GGCCTTGTACACANCGCNCGTACACCATGGGAGTTGGATTCCANCCGAANCGTTGCGTNNNCTAGCATAGG
AGCAGCGACCACGGTGGGTTTCAGCGACTGGGTGA

4. Ceba A32

TCNAGTTTTNGNACNTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCAACGAAGGCTTC
GGCCTTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTAGGTTTCGGAATAACAGCTGGAAACGG
CTGCTAATACCGGATGATATCGCGAGATCAAAGATTTATCGCCTGAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGGTA
GTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC
AGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGAAGATAATGACTGTAC
CGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAA
CTGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGT
AGATATTCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGCACTT
GGTGTCTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA
AGGAATTTGACGGGGCCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACC
AGCGTTTGACATGGTAGGACGACTTCCAGAGATGGATTTCTTCCCTTCGGGGACTACACACAGGTGCTGC
ATGGCTGTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTAGT
TACCATCATTTGGTTGGGTACTCTAAAGGAACCCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAACTACAGTGGGCAGCGACCCTGCG
AGGGCGAGCTAATCCCCAAAAGTTGTCTCAGTTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACAC
CATGGGAGTTGGATTACCCGAAGGCGTTGCGNCAACCTAGCAATAGGAAGCANCGANACGGTGGGTTCA
CGGACTGGGG

5. Ceba A55

NNNNNTANNATNAANNCTCTACACAGNACTNTATATGCTCTGNTTNCNCTCTTTNNTNCNCGGANGACGT
CNNTACANNNGTTTTGNATNGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAG
GCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTAGGTTCGGAATAACAGCTGGA
AACGGCTGCTAATACCGGATGATATCGCGAGATCAAAGATTTATCGCCTGAGGATGAGCCCGCGTTGGATT
AGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCT
GATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGAAGATAATGAC
TGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGT
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTC
CAGAACTGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTCAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAA
TTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGG
CACTTGGTGCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACC
TTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACGACTTCCAGAGATGGATTTCTTCCCTTCGGGGACCTACACACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGCCT
TTAGTTACCATCATTGGTTGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAACTACAGTGGGCAGCGACC
CTGCGAGGGCGAGCTAATCCCCAAAAGTTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGG
CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTNGAATACGTTCCCAGGCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTTGGATTCANCCGAAGGCGTTGCGNCACCTAGCATAGGAAGCAGCGACCACGGTGGG
TTCAGCGACTGGGG

8.2. Presentación a Congresos

Altimira, F., Bravo, G., Yáñez C., González, M., Seeger, M. (2010). Determinantes genéticos de resistencia a metales pesados en bacterias aisladas del valle de Aconcagua. XIV Congreso Latinoamericano de Genética ALAG. Viña del Mar, Chile. 01 al 05 de octubre de 2010.

Altimira, F., Bravo, G., Yáñez C., González, M., Seeger, M. (2010). Efectos del cobre sobre las comunidades bacterianas de suelos agrícolas del valle de Aconcagua, Chile. VII Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria, REDBIO. Guadalajara, México. 01 al 05 de noviembre de 2010.

Altimira, F., Bravo, G., Yáñez C., González, M., Seeger, M. (2010). Caracterización de cepas bacterianas resistentes a cobre aisladas desde los suelos agrícolas del valle de Aconcagua. XXXII Congreso Chileno de Microbiología. Viña del Mar, Chile. 30 de noviembre al 03 de diciembre de 2010.

Altimira, F., Bravo, G., Yáñez C., González, M., Seeger, M. (2010). Efectos del cobre sobre la diversidad de las comunidades bacterianas de suelos agrícolas de la región de Valparaíso. XXXII Congreso Chile de Microbiología. Viña del Mar, Chile. 30 de noviembre al 03 de diciembre de 2010.

Se agradece a los proyectos USM 130948, CIT NT&SB y FONDECYT 3090071 por su financiamiento.