

EFFECTOS DEL ARSÉNICO SOBRE LA MICROBIOTA BACTERIANA ACUÁTICA DEL RÍO GUAYLLABAMBA EN LA COMUNIDAD CORAZÓN DEL CHONTAL-INTAG

Santiago Xavier Mafla Andrade^{1*}, Jean Carlos Andrade Tobar¹, Ana María Navarrete Ortega¹, Diego Javier Jauregui Sierra¹,
Diego Leopoldo Mejía Romo¹, Moraima Cristina Mera Aguas¹

¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, Ibarra, Ecuador

*Autor para correspondencia: e-mail: sxmafla@pucesi.edu.ec

Recibido: 2018/03/26

Aprobado: 2018/12/11

DOI: <https://doi.org/10.26621/XV19.2018.12.A03.PUCESI.2550.6684>

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivos evaluar la transformación que sufren las comunidades microbianas acuáticas del río Guayllabamba a causa de Arsénico (As) producto de los desechos de la producción minera, además de identificar las especies bacterianas y analizar su estado ecológico mediante índices de diversidad. Se establecieron tres puntos de muestreo en el río Guayllabamba. El primero en el punto de contaminación de desemboque del agua de minera (M1), el segundo 1.5km aguas abajo del lugar de contaminación (M2) y un tercero 1.5km aguas arriba del punto de contaminación (M3). Para la cuantificación de metales pesados se utilizaron técnicas de lectura de absorción atómica. También se realizó la identificación molecular a través del análisis DGGE del ADNr 16s. Los resultados demostraron que las co-munidades bacterianas disminuyeron y se especializaron a causa de las diferentes concentraciones del arsénico en los puntos mencionados anteriormente. Encontrándose en la muestra M1 concentraciones de: As (0.009 mg/l), en la muestra M2 concentraciones de: As (0.005 mg/l) y finalmente, la muestra M3 concentraciones de: As (0.004 mg/l). En el escalamiento multidimensional del patrón de bandedo se observó que M1 y M2 poseen un 60% de similitud entre sí y un 5% de similitud con M3. Los géneros más representativos obtenidos en el análisis DGGE fueron: Firmicutes (29.41%), Proteobacteria (23.52%), Bacteroidetes (17.64%), Actinobacteria (11.76%), Cyanobacteria (17.67%).

Palabras clave: Microbiota, DGGE Arsénico, ADNr 16s.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the transformation suffered by the aquatic microbial communities of the Guayllabamba River due to Arsenic (As) as a product of mining production waste, as well as to identify bacterial species and analyze their ecological status through diversity indexes. Three sampling points were established in the Guayllabamba River. The first one can be found at the mine water contamination point (M1), the second one is 1.5 km downstream from the pollution site (M2) and the third one, 1.5 km upstream from the contamination point (M3). For the quantification of heavy metals, atomic absorption reading techniques are used. Molecular identification was also carried out through the DGGE analysis of the 16s rDNA. The results showed that the bacterial communities were reduced and specialized in the cause of the different types of animals in the previous points. Thus, concentrations of As (0.009 mg/l) were found in sample M1, concentrations of As (0.005 mg/l) in sample M2 and finally, the

sample M3 showed concentrations of As (0.004 mg/l). In the multidimensional scaling of the banding pattern, it was observed that M1 and M2 have a 60% of similarity to each other and 5% similarity to M3. The most representative genera in the DGGE analysis were: Firmicutes (29.41%), Proteobacteria (23.52%), Bacteroidetes (17, 64%), Actinobacteria (11.76%), Cyanobacteria (17.67%).

Keywords: microbiota, DGGE arsenic, 16s rDNA.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad actividades industriales como la minería generan una gran contaminación con metales pesados, en el caso de las aguas superficiales y acuíferos, pueden llegar a comprometer seriamente la utilización del recurso hídrico como fuente de agua para el abastecimiento del consumo humano ya que la exposición prolongada a altas concentraciones del metaloide puede causar daños crónicos a la salud (UNEP, 2012). Por lo tanto, se ha vuelto indispensable la utilización de nuevas estrategias para la remoción de este metaloide, entre las cuales la utilización de microorganismos para remediar un ambiente contaminado o el proceso denominado como biorremediación.

Investigaciones realizadas recientemente muestran a bacterias como *P. aeruginosa* capaces de ofrecer un porcentaje de remoción de As del 60%, disminuyendo la concentración de As de 1.0 a 0.4 mg/L (Cervantes, 2006).

Las bacterias que respiran As (V) pueden ser capaces de llegar a liberar As (III) de minerales (D. K. Newman, 1997), sedimentos, u óxidos de aluminio o ferhidrita (Castañé, Topalián, Cordero, y Salibián, 2003). (Mellado, Campos, y Mondaca, 2011) De igual manera se dio un caso interesante en el que la cepa *Alcalilimnicola ehrlichei* MLHE-1 es descrita como una bacteria con la capacidad de reducir nitrato y arseniato acoplado a arsenito (Valles y Alarcón, 2008). (Escalante, 2006) Wang, (1997) encontró cinco bacterias ambientales aisladas que tenían la capacidad de transformar el arseniato en metilarsinas volátiles y arsenito. Estas cepas bacterianas correspondían a los géneros *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Flavo-bacterium*, y *Proteus*.

Intag es una región remota y montañosa de los Andes ubicada en la provincia de Imbabura, al norte de Ecuador. Forma parte de dos de las zonas biológicas más importantes en el mundo: los Andes Tropicales y también la zona conocida como Tumbes-Chocó-Magdalena, siendo ésta una de los 3 "hotspots" (zonas de alta densidad endémica) que existen en el Ecuador (Vergara, 2011). Aproximadamente 17.000 personas viven en Intag en comunidades dedicadas a la agricultura y actividad agropecuaria. En esta región también existe una problemática socio-ambiental, debido a las exploraciones mineras que buscan explotar minerales como el cobre y en menor medida oro y plata; en tres de las siete parroquias que conforman Intag (Kocian, Batker, y Harrison, 2011).

Tomando en cuenta estos antecedentes el presente trabajo se orienta describir química y molecularmente el mecanismo de resistencia de cepas bacterianas tolerantes a As para su posible uso en la biorremediación de ambientes contaminados.

Este estudio se enfocó en analizar el efecto del As sobre la microbiota acuática bacteriana en el río Guayllabamba en el Sector de la comunidad "Corazón del Chontal-Intag"; mediante técnicas de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron recogidas en Julio de 2015 a partir de las 11:20, en días diferentes con un espacio de 3 días entre cada toma de muestra, en coordenadas geográficas de la tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas geográficas y metros sobre el nivel del mar de cada punto de muestreo.

PUNTO DE MUESTREO	COORDENADAS	ALTITUD (m.s.n.m.)
M3 (Aguas arriba)	743846 N; 10028298 O	930
M2 (Aguas abajo)	740500 N; 10026696 O	569
M1 (Descarga minera)	743492 N; 10026490 O	667

Todos los puntos de muestreo corresponden a la Zona 17S del sistema de proyección de coordenadas geográficas UTM (Universal Transverse Mercator) WGS1984 (World Geodetic System). El mapa fue diseñado usando el sistema de información geográfica ArcGis® V10.1. El área de estudio está comprendida dentro del cantón Santa Ana de Cotacachi, al valle San Antonio de los Mandariacus-Intag; donde se hallan las comunidades “Corazón” y “Chontal” (Figura 1).



Figura 1. Área de estudio y puntos de georeferencia de las muestras tomadas

Se designó dichas coordenadas por la presencia de un foco altamente contaminante M1 (efluente de minería a pequeña escala), el cual, vierte los desechos químicos a un ecosistema lótico, mismo que tiene utilidad de riego en las comunidades aguas abajo.

Se tomaron de agua se en 3 puntos por triplicados (9 muestras total), a una profundidad de 30 cm en envases herméticos de PVC de 1000 ml previamente desinfectados.

Las muestras se transportaron en oscuridad a 4°C al laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica Sede Ibarra.

La distancia D1 y D2 (Figura 1) fueron establecidas tomando en cuenta una pluma de contaminación estimada donde $D1=(D2)^2$, siendo considerada inicialmente D1 con un valor de 1.5 km.

Análisis de arsénico por metodología de EAA (Espectroscopia de Absorción Atómica)

El As se determinó utilizando espectrofotometría de absorción atómica acoplada a horno de grafito (GFAAS) en un equipo SensAA© de GBC Scientific Equipement Sistema 5000 Horno de Grafito GBS.

Estándares de calibración para horno de grafito (GFAAS)

El método empleado para la lectura de concentración y absorbancia de As además del tipo de gases utilizados se detalla a continuación:

Para la calibración de la curva y el blanco se utilizó un estándar de 100 ug/l, a partir del cual el equipo preparó 4 estándares; el primero con una concentración de 10 ug/l y una absorbancia de 0.192, el segundo con una concentración de 20 ug/l y una absorbancia de 0.257, el tercero con una concentración de 40 ug/l y una absorbancia de 0.341 y el cuarto con una concentración de 80 ug/l y una absorbancia de 0.530 (Figura 2).

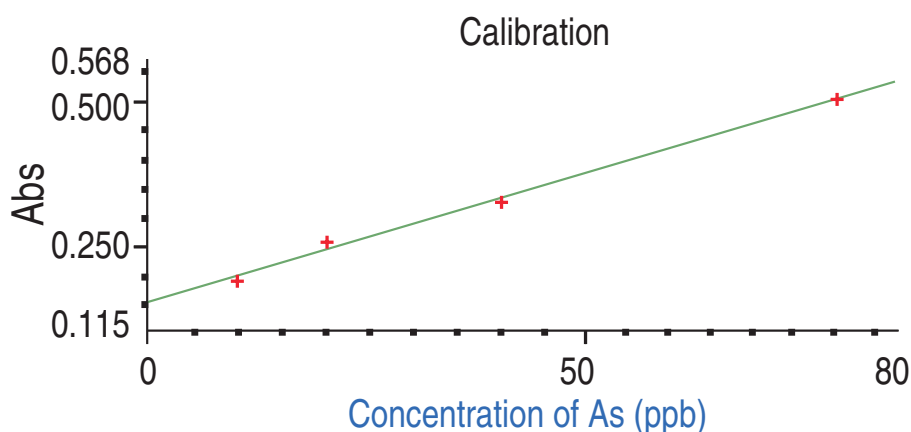


Figura 2. Curva de calibración de blanco para lectura de trazas de As del espectrofotómetro de Absorción Atómica SensAA© de GBC Scientific Equipement

Figura 2 Curva de calibración de blanco para lectura de trazas de As del espectrofotómetro de Absorción Atómica SensAA© de GBC Scientific Equipement

El modo de calibración fue “Linear LS (Least Squares) Through Zero” con un máximo error de 20.9569. Este valor se obtiene del valor entre R y R^2 donde R es el valor de la concentración y R^2 es el valor de absorbancia del blanco en el instante de la calibración. Siendo R: 0.9987 y R^2 : 0.9975.

El ajuste de la lámpara de arsénico (As) fue el siguiente:

- Corriente de la lámpara (mA): 8.00
- Longitud de onda (nm): 193.70
- Amplitud de la abertura (nm): 1.00
- Elevación de la abertura: Normal

Aislamiento de bacterias

Se sembró 1 ml a partir de la 6°, 7° y 8° dilución en cajas Petri con Agar Nutritivo MERCK © de la siguiente composición (g/L): Peptona de carne de 5.0; extracto de carne 3.0; Agar 12.0.

Las cepas más representativas fueron separadas fenotípicamente por tamaño, forma y elongación de la 6°, 7° y 8° dilución de las cajas Petri con Agar Nutritivo MERCK ©.

Se trabajó cerca del mechero en un ambiente estéril para posteriormente colocar las cepas separadas de cada muestra en tubos de ensayo cubiertos de algodón, con 5ml de caldo de cultivo (Nutrient Broth) de formulación estandarizada FDA/BAM (Foods and Drugs Administration/Bacteriological Analytical Manual) y anteriormente esterilizados por autoclave (121°C y 1.5 atm por 15 min).

Las cepas fueron incubadas a 35°C por 24 horas para su posterior utilidad en la caracterización molecular y en el proceso de extracción de ADN.

Para el proceso de extracción de ADN se utilizaron las cepas cultivadas en caldo nutritivo (Sigma). Para posteriormente extraer el ADN por medio del kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) el cual provee 7 reactivos (Genomic Lysis/Binding Buffer, Genomic Digestion Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Genomic Elution Buffer, RNase A y Proteinase K), siguiendo las instrucciones del fabricante (MO Bio Labs, 2014).

Amplificación del gen ADNr 16s

Por medio de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó la amplificación del gen ADNr 16s. Para lo cual se utilizó los partidores universales P3 (341f) y 907r (926r) para el dominio de bacterias (Daza, 2015).

Para cada reacción de PCR el volumen total utilizado fue de 25 µl, para obtener así una concentración ideal de ADN de 10nmolar/µl, los 25 µl se repartieron como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la PCR

REACTIVOS	VOLUMEN
Taq Polimerasa	12,5 µl
Partidores 907r (926r a una concentración de 0,10µM)	1 µl
P3 (341f a una concentración de 0,10µM)	1 µl
ADN	5 µl
Agua libre de nucleasas (DNase, RNase)	5,5 µl
VOLUMEN TOTAL	25 µl

La amplificación del ADN fue realizada en el termociclador Multigene Optimax de Labnet. El protocolo base de amplificación en el termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; luego 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30s, seguido de esto un alineamiento a 55.6 °C por 45s y una elongación a 72°C por 90s. Posteriormente se realizó otro proceso de desnaturalización a 94°C durante 30s seguido de un alineamiento a 55.6°C por 45s. Como último paso se realizó una extensión final a 72°C por 90s.

Finalmente, las muestras se caracterizaron por medio de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) con un equipo Cipher para cassette dual de GBS Scientific Equipment®.

Para la caracterización se llevó a cabo una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la región V3 de la secuencia del ADNr 16s. La DGGE se ejecutó en un gradiente de desnaturalización del 10 al 60% para la extracción de bandas, purificación, amplificación y posterior secuenciación e identificación de las cepas presentes en las muestras (Escalante, 2006).

Análisis informático de las OTU's (Unidades Operacionales Taxonómicas)

Las fotografías tomadas del gel fueron retocadas con software Photoshop CS6.v13.0 (Adobe®). Las bandas se analizaron empleando el software Gel-Compro II® V.6.0. (Applied Maths®) definiendo las bandas como aquellas que poseían al menos 5% de intensidad de la banda más intensa, anotándose como presencia o ausencia de las bandas en cada posición del gel. Para la comparación se realizó una matriz basada en la presencia (1) o ausencia (0) individualmente de cada banda y línea.

En la comparación de perfiles de banda, se construyó una matriz binaria para representar los patrones de bandas y con ellos una matriz de distancia.

La matriz de distancia fue usada para la construcción de un diagrama de escalamiento multi-dimensional (MDS) el cual es un mapa bidimensional con ejes artificiales X y el eje Y donde cada fingerprint de DGGE se coloca como un punto de forma que las muestras similares son representadas juntas. Clustering analysis y MDS se llevaron a cabo con el PRIMER V7® software package (Galindo y Carmona, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de concentración de arsénico

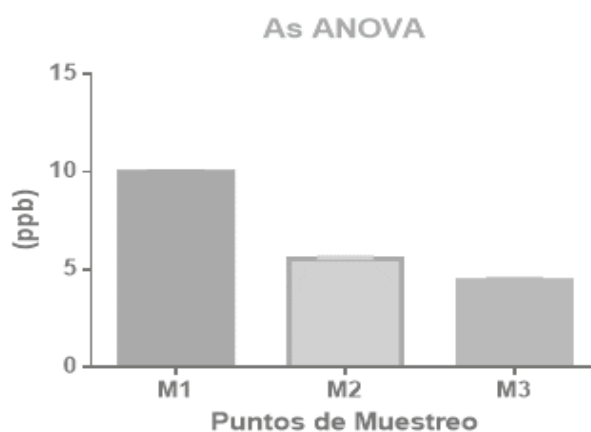


Figura 3. Análisis de Arsénico en los diferentes puntos de muestreo

Para As el análisis estadístico ANOVA (Tabla 3) muestra una concentración en M1 de 10.021 ug/l, en M2 de 5.568 ug/l y en M3 de 4.423 ug/l con diferencias altamente significativas entre los puntos de muestreo. Se observa entonces igualmente que $M1 > M2 > M3$.

Tabla 3. Recopilación de valores del análisis estadístico paramétrico ANOVA de Arsénico.

ANOVA	
Valor (P)	< 0,0001
Significancia	*** altamente significativa entre los datos
¿Son las diferencias entre las medias estadísticamente diferentes? (P < 0.05)	Si
R cuadrado	0,9998

Se puede notar una alteración en la concentración de As. Todas las variaciones de concentración (Figura 3) de M2 a M1 pueden estar sujetas a la dilución por el cauce del río, así como por la sedimentación. No obstante, existen sistemas de eflujo bacteriano que describen (Llvisaca, Vargas, y Burgos, 2011) los cuales utilizan, por ejemplo, el sistema de eflujo de antiportadores quimiosmóticos divalentes (catión/protón) Czc (Cadmio, Zinc y Cobre) como proteína básica de transporte interno de la membrana celular. Por otro lado, los niveles de As representan una carga tóxica al ambiente, el ligero aumento presente en M2 se debe a posibles fugas que tenga el sistema de contención de la minera, más aún, no representan ningún peligro ambiental en esas concentraciones.

Por otra parte, el As se encontró dentro del límite máximo permisible por el TULSMA, LI-BRO VI – ANEXO1, que es de 0.006 mg/l, con 0.005, 0.009 y 0.004 mg/l en M1, M2 y M3 respectivamente. En los estudios realizados por Silver y Phung, (2010) se muestra que los microorganismos tienen mayor facilidad para transformar el Arsénico en comparación a otros metales pesados, debido a que, su facilidad de oxidación de arsenito ($[\text{AsO}_4]^-$) a arseniato ($[\text{AsO}_4]^{3-}$) vuelve la movilización de este metal más rápida, Mafla, (2013) también afirma que microcosmos con bacterias de suelo tienen la misma capacidad de transformación de estas especies arsenicales.

Caracterización genética

La presencia de las 17 bandas más representativas del gel de DGGE con un gradiente de des-naturalización del 10%-60% (Figura 4) fueron extraídas, purificadas, amplificadas y secuenciadas para ser analizadas. Los géneros más representativos obtenidos en el análisis DGGE fueron: Firmicutes (29.41%), Proteobacteria (23.52%), Bacteroidetes (17.64%), Actinobacteria (11.76%), Cyanobacteria (17.67%).

El transporte de los iones tóxicos se asocia con un proceso quimiosmótico que involucra el intercambio con protones en el cual participan residuos de histidina, aspartato y glutamato. El prototipo de este grupo de transportadores es la proteína CzcD, identificada en un plásmido de la β -proteobacteria hipertolerante a metales (Cervantes, E; Espino, A; Acevedo, F; León, I; Rivera, M; Avila, M; Wróbel, K; Zasada, K; Gutiérrez, J; Rodríguez, J; Moreno, R, 2006). Proteobacteria y Firmicutes se consideran como organismos potenciales para procesos de bio-remediación de sitios industriales contaminados debido a su capacidad para formar biopelículas microbianas (Hernández, 2006).

Las aplicaciones que muestran Amoroso, Benimeli y Cuozzo, (2013) en su investigación sobre el género Actinobacteria, demuestran que son excelentes bioremediadores de ambientes contaminados. Por otra parte, Arroyo y Ansola, (2005) afirman también que la capacidad del género Bacteroidetes para recuperar ambientes contaminados por metales pesados es sumamente eficiente y debería emplearse en conjunto con microorganismos de características similares en la restauración ecológica de los ecosistemas acuáticos. Sugiere entonces el cambio por las especies bacterianas encontradas poseen tolerancia a iones tóxicos como metales pesados y que, debido a la reducción de la diversidad microbiana, han quedado como células bacterianas activas, aquellas que se han especializado para un ambiente contaminado.

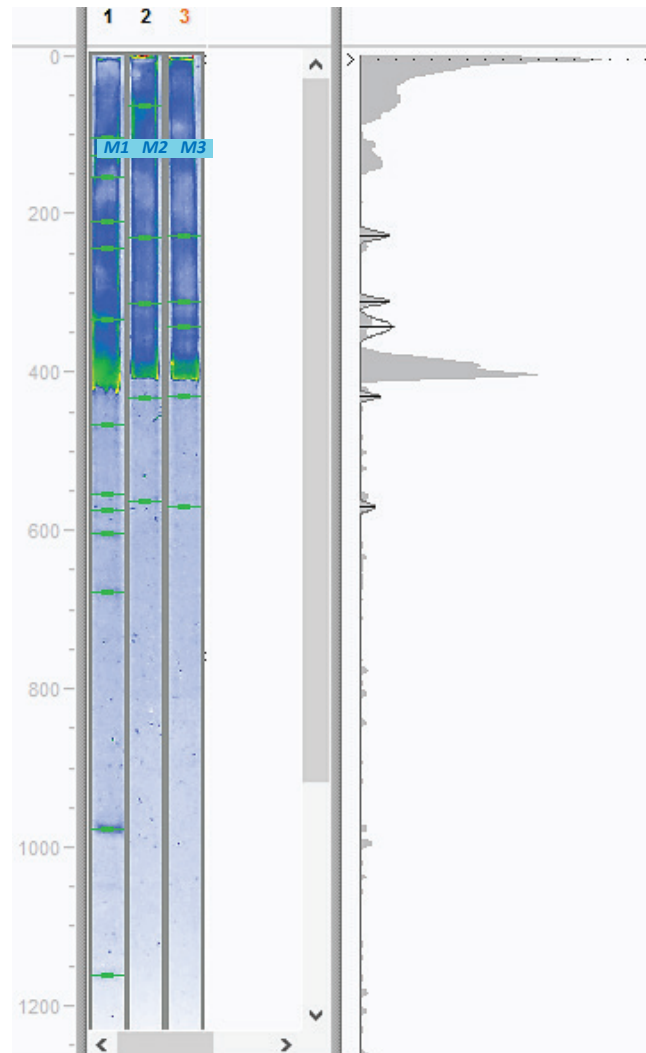


Figura 4. Perfil de bandas de gradiente de desnaturalización (DGGE) 10%-60% de las muestras. M3 (aguas arriba), M2 (aguas abajo) y M1 (descarga de la minera).

El escalamiento espacial de relación Bray-Curtis (Figura 5) en base a la matriz binaria de pre-sencia/ausencia de las OTU's encontradas en la Figura 4 ayudo al análisis de similitud por medio de la metodología de escalamiento multidimensional MDS (Figura 6) utilizando una matriz de distancia, la cual, posee la relación Bray-Curtis anteriormente mencionada.

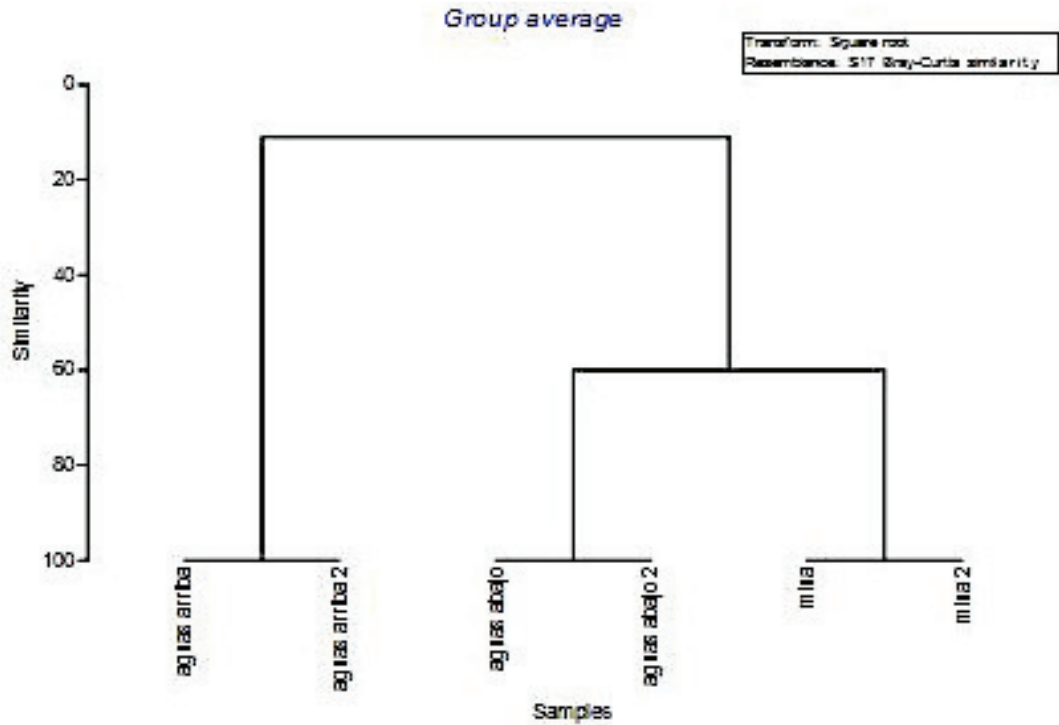


Figura 5. Análisis de similitud (Bray-Curtis) del patrón de bandas obtenidas mediante análisis del gen ARNr 16s por DGGE.

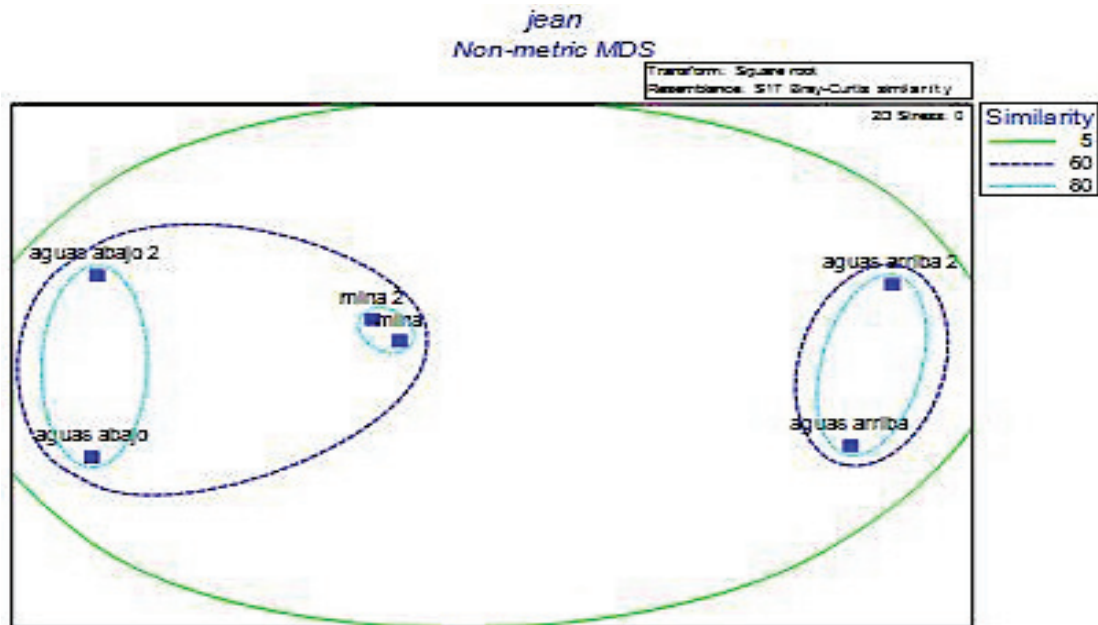


Figura 6. Escalamiento multidimensional del patrón de bandas obtenidas mediante DGGE.

El análisis de similitud y relación Bray-Curtis efectuado entre las comunidades bacterianas estudiadas en los 3 diferentes puntos, indica que existe un 60% de similitud entre la muestra tomada en la descarga de la minera y la muestra tomada aguas abajo, así mismo; existe un 80% de similitud entre los triplicados de todas las muestras. El estudio de relación también enseña que existe un 5% de similitud entre la muestra tomada aguas arriba y las muestras tomadas aguas abajo y en la minera, lo que indica la presencia de una alteración altamente significativa que modifica la similitud drásticamente.

La riqueza (S) de microorganismos (Tabla 4) es superior en M3 (13), principalmente porque el estrés metabólico al que están sometidos es mucho menor que en los puntos M2 (5) y M1 (5). Como se puede observar en M1 se tiene valores muy similares a M2, posiblemente por la especialización de bacterias que sintetizan con mayor eficiencia metalotioneínas y activan sus sistemas de resistencia a iones tóxicos antes que otros microorganismos en M3.

Tabla 4. Índices de diversidad ecológica

Muestra	S	H'(loge)
M3: aguas arriba	13	2,565
M2: aguas abajo	5	1,609
M1: mina	5	1,609

El índice de Shannon (H') muestra una diversidad en M3 de 2.565, en M2 y en M1 de 1.609; indicando así, que la diversidad en M3 es superior a los restantes puntos de muestreo. Lo mismo sucede con la dominancia en M3 sobre M2 y M1. Los índices (d) y (H') sugieren la presencia de un factor de alteración presente en M2 y M1 que reduce la diversidad ecológica en estos puntos, así como la reducción de las especies bacterianas. Por ello es necesario tomar medidas de mitigación a la contaminación que se está dando en el lugar siendo estas un proceso de depuración de aguas y una bioestimulación a las comunidades bacterianas del lugar.

CONCLUSIONES

Los análisis de As en las muestras de agua indicaron que la microbiota del lugar sufrió una alteración en los puntos de contaminación y aguas abajo del punto de contaminación, siendo esta proporcional a la concentración del As. El As se encontró por debajo de 0.006 mg/l, límite máximo permisible dado por el TULSMA, LIBRO VI – ANEXO1, con 0.005, 0.009 y 0.004 mg/l en M1, M2 y M3 respectivamente.

El escalamiento multidimensional del patrón de bandeo (MDS) reveló que existe un 60% de similitud entre M2 y M1, mientras que estos dos puntos en conjunto, poseen tan solo un 5% de similitud con respecto a M3, lo cual, indica una especialización bacteriana a partir de M1 y que sucede también en M2.

Los índices de diversidad y dominancia demostraron que la diversidad en M3 (2.565) es mayor comparada a M2 y en M1 (1.609); y que la riqueza de microorganismos bacterianos se ve alterada en M2 y M1 debido a la alteración provocada por los metales pesados.

Quedó demostrado tras realizar el análisis filo genético que los 2 principales grupos bacterianos encontrados en un ambiente lótico con presencia de metales pesados (As, Pb, Cd, Cu) fueron: Firmicutes (29.41%), Proteobacteria (23.52%).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amoroso, M., Benimeli, C., y Cuozzo, S. (2013). ACTINOBACTERIA Application in Bioremediation and Production of Industrial Enzymes. Boca Raton: CRC Press (Taylor y Francis Group).

- Arroyo, P., y Ansola, E. (Julio de 2005). La biorremediación como medida correctora en los impactos ambientales de agua contaminada con metales pesados. Obtenido de <http://www.fundacionglobalnature.org/macrophytes/documentacion/Conferencias%20y%20P%F3sters/C-27%20Arroyo%20P.pdf>
- Castañé, P., Topalián, M., Cordero, R., y Salibián, A. (2003). Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. Obtenido de *Revista de Toxicología* 20, (1)
- Cervantes, E; Espino, A; Acevedo, F; León, I; Rivera, M; Avila, M; Wróbel, K; Zasada, K; Gutiérrez, J; Rodríguez, J; Moreno, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM*, 48 (2), 203-210. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/lamico/mi-2006/mi062v.pdf>
- D. K. Newman, T. J. (1997). Precipitation of Arsenic Trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl Environ Microbiol*, 63(5): 2022–2028. .
- Daza, C., Campos, V., Rojas, C., Rodríguez, S., Smith, C., y Mondaca M. (2016). Reducción de selenito a Selenio elemental por *Pantoea agglomerans*. *Gayana* 80(1), 67-74. Obtenido de <http://www.scielo.cl/pdf/gayana/v80n1/08.pdf>
- Escalante, G., Campos, V., Valenzuela, C., Yañez, J., y Mondaca, M. (2007). Rol de los microorganismos en la especiación química del arsénico: análisis de sedimentos del río camarones. *Revista AIDIS* 1(3).
- Galindo, V., y Carmona, T. (2013). La diversidad de los análisis de diversidad. *Biology Faculty Works*. 28(14), 20-28. Obtenido de https://digitalcommons.lmu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1025&context=bio_fac
- Garland, J. (1997). Analisis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 24(4), 289–300. Doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00446.x
- Hernández, I. (2006). Identificación y caracterización de microorganismos con resistencia a compuestos mercuriales (tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional, México. Obtenido de <http://www.xoch.info/uploads/7/7/9/2/7792995/tm.pdf>
- Kocian, M., Batker, D., y Harrison, C. (2011). Estudio ecológico de la región de Intag, Ecuador. Obtenido de *Earth Economics*. Recuperado de http://www.eartheconomics.org/FileLibrary/file/Reports/Latin%20America/Final%20Estudio%20de%20Intag_bajo_res.pdf
- Llavisaca, S., Vargas, J., y Burgos, F. (2011). Caracterización de Bacterias Metalofijadoras de Mercurio, A Través de la Subunidad 16srna, Mediante la Técnica de PCR-DGGE del Río Gala (Aguas Abajo en el Recinto San Rafael) en la Parroquia Tenguel. Obtenido de <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/15879/1/CARACT~1.PDF>
- Mafla, S. (2013). Biotransformación de lixiviado de suelo impactado con roxarsona por comunidades bacterianas de aguas subterráneas en condiciones anaeróbicas. (tesis de pregrado). Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Mellado, C., Campos, V., y Mondaca, M. (2011). Distribución de genes de resistencia a arsénico en bacterias aisladas de sedimentos con concentraciones variables del metaloide. *Gayana* 75 (2), 131-137. Doi: 10.4067/S0717-65382011000200001
- MO Bio Labs. (2014). UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit. Obtenido de MO Bio Laboratories Inc. Recuperado de <http://www.mobio.com/microbial-dna-isolation/ultraclean-microbial-dna-isolation-kit.html>
- Silver, S., y Phung, L. (1996). Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. *Annual Review of Microbiology* 50, 753-789. Doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.753
- UNEP. (2012). El uso del mercurio en la minería del oro artesanal y en pequeña escala. Recuperado de https://ige.org/archivos/IGE/mercurio_en_la_Mineria_de_Au.pdf
- Valles, C., y Alarcón, T. (2008). Estabilización química de suelos contaminados con metales pesados. I Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos. Recuperado de <http://www.redisa.net/doc/artSim2008/tratamiento/A30.pdf>
- Vergara, A. (2011). Hotspots del Ecuador. Recuperado de <http://www.conservation.org.pe/ci/hotspots/chocodarien.html>
- Wang, C; Michels, P; Dawson, C; Kitisakkul, S; Baross, J; Keasling, D y Clark, D. (1997). Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Appl Environ Microbiol* 63(10): 4075–4078. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168718/pdf/634075.pdf>