

**UNIVERSIDAD METROPOLITANA  
ESCUELA GRADUADA DE ASUNTOS AMBIENTALES  
SAN JUAN, PUERTO RICO**

**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL PERFIL BACTERIANO DE  
SEDIMENTO DE MANGLE EN LA CIÉNAGA CUCHARILLAS Y BAHÍA DE  
JOBOS POR MEDIO DE LA TÉCNICA “TERMINAL RESTRICTION  
FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM” (T-RFLP)**

Requisito parcial para la obtención del  
Grado de Maestría en Ciencias en Gerencia Ambiental  
En Evaluación y Manejo de Riesgo Ambiental

Por  
Ibis Melissa Román Guzmán

02/12/2010

## **DEDICATORIA**

*A lo más que amo en el mundo, mi hijita,  
A mí esposo por su apoyo y comprensión,  
A mis padres por ser mi guía, mi inspiración,  
Y a mi hermana gracias por quererme tanto,  
Con amor les dedico este logro alcanzado.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mi Dios por los retos que me ofrece en la vida y por darme salud para poder culminar mis estudios graduados. Agradezco a la Dra. Adriana D. Grativol por permitirme investigar junto con ella, a mi mentor Karlo Malavé Llamas, a mis lectores la Dra. Beatriz Zayas y Christian Vélez. A todos los profesores de la Escuela de Asuntos Ambientales por brindarme los conocimientos que me ayudaron en la formación académica y profesional y a mis compañeros de clase. Agradezco a la Universidad Metropolitana por brindarme los fondos para los materiales, equipos y prestarme los laboratorios durante la investigación. Agradezco a Carlos Morales por siempre estar disponible y brindar la transportación para hacer los muestreos en los terrenos de la UMET en la Ciénaga las Cucharillas y ser nuestro contacto con Bacardí. Agradezco al Coordinador de Investigaciones Ángel Dieppa de JBNERR-DNER-NOAA por su desinteresada cooperación con este proyecto de investigación. Agradezco a los profesores de la Universidad del Turabo la Dra. Sharon A. Cantrell por su ayuda con el Secuenciador Automático y al Dr. José R. Pérez Jiménez, por su ayuda en el análisis de los datos del secuenciador y el programa MiCA. Agradezco a Julita M. Rivera, a Christian Vélez y a Alex J. Ríos por la ayuda en el laboratorio y a mi compañera de investigación Nilsa Marrero. Por último, agradezco a mi madre Ibis, por su ayuda financiera para poder sufragar mis estudios graduados, a mi padre Eugenio por su apoyo, a mi hermana Eugibimar, a mi amado esposo Gabriel y a mi hijita Ibis Gabriela. A todos GRACIAS sin ustedes esto no sería posible.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE APÉNDICES.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS O ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
Trasfondo del problema.....	1
Problema de estudio.....	3
Justificación del estudio.....	4
Hipótesis.....	5
Meta.....	5
Objetivos.....	6
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
Trasfondo histórico.....	7
Marco teórico.....	10
Manglares.....	10
Humedales.....	12
Estuario.....	15
Bacterias, Suelo y Sedimento.....	17
Bacterias.....	19
Metagenómica y ecología genética.....	20
Método “Fingerprint” T-RFLP.....	23
Estudio de casos.....	24
Marco legal.....	26
Leyes estatales.....	26
Reglamentos estatales.....	29
Leyes federales.....	32
Agencias Privadas.....	35
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	36
Área de estudio.....	36
Descripción de la muestra.....	38
Periodo de estudio.....	38
Diseño metodológico.....	39
Recolección de muestras de suelo.....	39
Por ciento de Humedad y Análisis de pH.....	40
Extracción de DNA.....	41
PCR -“Polimerase Chain Reaction”.....	42
Precipitación de DNA.....	43

Visualización de los fragmentos digeridos mediante el uso de un secuenciador automático.....	44
Análisis de datos .....	45
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
Perfil de la comunidad bacteriana de la Ciénaga las Cucharillas con el perfil de la comunidad bacteriana del Estuario Bahía de Jobos durante dos estaciones (seca y lluviosa).....	47
Diversidad y abundancia de las comunidades bacterianas en la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos mediante la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).....	52
Diversidad .....	52
Abundancia .....	54
Potencial de biorremediación de contaminantes clorinados o volátiles que poseen los microorganismos encontrados mediante la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). .....	57
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>62</b>
Recomendaciones .....	64
Limitaciones.....	65
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: <i>Resultados del muestreo 1 en Ciénaga las Cucharillas y Bahía de Jobos</i> .....	79
Tabla 2: <i>Resultados del muestreo 2 en Ciénaga las Cucharillas y Bahía de Jobos</i> .....	82
Tabla 3: <i>Pares de bases por muestreo con sus respectivas bacterias</i> .....	85
Tabla 4: <i>Abundancia</i> .....	102

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Mapa de las estaciones de muestreo en Cucharillas .....	107
<i>Figura 2:</i> Mapa de las estaciones de muestreo en Bahía de Jobs .....	108
<i>Figura 3:</i> Metodología.....	109
<i>Figura 4:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 1 Cucharillas 1.....	110
<i>Figura 5:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 1 Cucharillas 2.....	111
<i>Figura 6:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 1 Cucharillas 3.....	112
<i>Figura 7:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 1 Cucharillas 4.....	113
<i>Figura 8:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 1 Jobs 1.....	114
<i>Figura 9:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 1 Jobs 2.....	115
<i>Figura 10:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 1 Jobs 3.....	116
<i>Figura 11:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 1 Jobs 4.....	117
<i>Figura 12:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 2 Cucharillas 1.....	118
<i>Figura 13:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 2 Cucharillas 2.....	119
<i>Figura 14:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 2 Cucharillas 3.....	120
<i>Figura 15:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 2 Cucharillas 4.....	121
<i>Figura 16:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 2 Jobs 1.....	122
<i>Figura 17:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 2 Jobs 2.....	123
<i>Figura 18:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 2 Jobs 3.....	124
<i>Figura 19:</i> Picos de T-RFLP del muestreo 2 Jobs 4.....	125
<i>Figura 20:</i> Grafica de diversidad entre los muestreos 1 y 2 en la Ciénaga las Cucharillas vs. Bahía de Jobs.....	126
<i>Figura 21:</i> Grafica de abundancia entre los muestreos 1 y 2 en la Ciénaga las Cucharillas vs. Bahía de Jobs.....	127

## LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1: Fotos.....	129
Apéndice 2: Fotos de Cucharillas estaciones 1 y 2- Terrenos de la UMET .....	130
Apéndice 3: Fotos de Cucharillas estaciones 3 y 4 - Barrio Palmas .....	131
Apéndice 4: Fotos de Jobos estaciones 1 y 2 – JBNERR.....	132
Apéndice 5: Fotos de Jobos estaciones 3 y 4.....	133
Apéndice 6: Tres Dominios de CARL WOESE .....	134



## LISTA DE SÍMBOLOS O ABREVIATURAS

<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>
AEE	Autoridad de Energía Eléctrica
ARDRA	Análisis de Restricción de DNA Ribosomal
CAPECO	Caribbean Petroleum Company
DGGE	Denaturalize Gel Gradient Electrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EPA	Environmental Protection Agency
JBNERR	Jobs Bay National Estuarine Research Reserve
MiCA	<i>Microbial Community Analysis III</i>
PCBs	Bifenilos Policlorados
PCR	Polimerase Chain Reaction
RISA	Ribosomal Intergenetic Spaces Analysis
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

## RESUMEN

Los humedales son ecosistemas productivos donde se acumulan elementos esenciales para la vida de los organismos que los habitan o los visitan. El suelo, los sedimentos y el agua de los mangles cuentan con una extensa microflora, la cual ayuda en la degradación de contaminantes y material orgánico e inorgánico. Con esta investigación comparamos el perfil de la comunidad bacteriana de la Ciénaga las Cucharillas con el perfil del Estuario Bahía de Jobos durante dos épocas del año; determinamos su diversidad y abundancia usando la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP); y por último, determinamos el potencial de biorremediación de las bacterias encontradas. Recolectamos muestras en sedimento aledañas a ejemplares de mangle negro o blanco durante los meses de junio y agosto de 2008. Luego extraímos el DNA de esas muestras y realizamos T-RFLP. Determinamos la presencia de bacterias de varios géneros cultivables y no cultivables. El mes de junio (época seca) presentó mayor diversidad y abundancia bacteriana en comparación con el mes de agosto (época lluviosa). Las muestras revelaron la presencia de bacterias con el potencial de biorremediación de contaminantes clorinados o volátiles. Entre éstas encontramos los géneros *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Bacillus sp.* entre otras. Mediante este estudio pudimos reconocer qué bacterias están presentes en los manglares y encontramos gran diversidad de bacterias en ambos muestreos. Futuras investigaciones pueden aprovechar los hallazgos de este trabajo como herramientas de remediación y mitigación de problemas ambientales en ambientes similares.

## ABSTRACT

Wetlands are productive ecosystems which essential life elements accumulate. Soil, sediment and water of the mangroves have an extensive microflora, which helps in the degradation of pollutants and organic and inorganic material. This research aims to: compare the profile of the bacterial community in Ciénaga las Cucharillas with the profile of the Jobos Bay Estuary during two different time periods of the year; determine the diversity and abundance using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP); and finally to determine the potential of bioremediation of bacteria found in each of the samples. Nearby, sediment samples were collected in black or white mangrove trees during the months of June and August. DNA extractions were collected from the environmental samples previously collected, and then process using T-RFLP. We determine the presence of several genus of cultivable and none-cultivable bacteria. A greater diversity and abundance of microbes was observed on the month of June sampling in comparison with the month of August. Samples revealed the presence of bacteria with the potential for bioremediation of chlorinated or volatile pollutants. Among them we find gender *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Bacillus sp.* among others. Through this study we recognize that bacteria are present in the mangroves and we find a great diversity of bacteria in both sampling. Future research can benefit from the findings of this work as tools of remediation and mitigation of environmental problems in similar environments.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### **Trasfondo del problema**

Actualmente, pertenecemos a una sociedad consumerista, con un interés de desarrollo económico e industria muy marcado, de alto crecimiento poblacional y padeciendo de un desparrame urbano, en una extensión de terreno limitada (en comparación con otros países). Esto trae como consecuencia que se generen grandes cantidades de desperdicios no peligrosos y peligrosos, que se deforesten grandes extensiones de terreno que se contamine el agua el suelo y el sedimento y se altere la hidrología de Puerto Rico cambiando el curso de los cuerpos de agua o utilizando aguas subterráneas para la irrigación. A raíz de este problema se deterioran nuestros cuerpos de agua, nuestro suelo así como, otros recursos naturales con los que contamos, además de áreas protegidas o de gran valor ecológico como lo son los humedales, ciénagas, mangles y bahías.

Los humedales son ecosistemas productivos donde se acumulan elementos esenciales para la vida de los organismos que los habitan o los visitan. Hay variedades de humedales, entre ellos, los pantanos o ciénagas y los manglares. La Ciénaga las Cucharillas se encuentra entre los pantanos más grandes de agua dulce de Puerto Rico (Adams & Hefner, 1992). Las ciénagas, a su vez, proporcionan habitáculo para variedades de especies. Ésta es suplida con agua de varios ríos y arroyos que en ocasiones traen consigo materiales peligrosos, basura y contaminantes que persisten en los sedimentos y en el suelo. Los factores que más impactan la Ciénaga las Cucharillas

son: las industrias cercanas, hogares que carecen de sistema de alcantarillado y derrames ocurridos en años anteriores, entre otros factores.

Los estuarios son áreas costeras donde el agua dulce proveniente de los cuerpos de aguas de la tierra se une con el agua de mar (Ríos, 1985). Estas áreas son muy fértiles y productivas debido a la mezcla de nutrientes de la tierra con los del mar. En los estuarios se pueden encontrar comunidades de plantas asociadas al lugar como bosques pantanosos, pantanos, manglares y plantas flotantes. El Estuario Bahía de Jobos posee gran cantidad de vegetación de mangle, la cual, se ve afectada por actividades antropogénicas, como por ejemplo, plaguicidas y herbicidas de áreas agrícolas cercanas.

El suelo, los sedimentos y el agua cuentan con una extensa micro flora, la cual, ayuda en la degradación de contaminantes tóxicos, no tóxicos y material orgánico e inorgánico. En esta investigación realizamos un perfil bacteriano (determinación de las bacterias presentes en la muestra de suelo) por medio de la técnica de “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism” (T-RFLP) en sedimentos de mangle negro y blanco de la Ciénaga las Cucharillas y lo comparamos con el perfil bacteriano del Estuario Bahía de Jobos. La técnica de T-RFLP se aprovecha de los conocimientos de metagenómica, estudiando comunidades de microorganismos recolectadas de una muestra de suelo creando un perfil (una lista) de las bacterias presentes en la Ciénaga las Cucharillas y en el Estuario Bahía de Jobos. Además, determinaremos la diversidad y la abundancia de las bacterias presentes en la ciénaga y en el estuario y determinaremos el potencial de biorremediación de éstas ante contaminantes clorinados y volátiles.

## **Problema de estudio**

Por siglos, el suelo y los cuerpos de agua han sido repositorios de contaminantes naturales y de origen antropogénicos, como por ejemplo, las sustancias tóxicas entre ellas, contaminantes clorinados y volátiles, los cuales, en las últimas décadas, han contaminado nuestros recursos naturales. Ésto, a su vez, acarrea efectos y riesgos para el medio ambiente y la salud pública. La represa de ríos que suplen humedales, el relleno de humedales, los dragados, las construcciones, la industrialización, la demanda de energía y la explotación de los recursos naturales durante las últimas décadas han sido los principales responsables de los problemas de contaminación y deterioro ambiental que estamos enfrentando, hoy día (Lugo, 2006). Se han estado deteriorando los ecosistemas, así como, ha ido afectándose la biodiversidad. La presencia de agentes tóxicos y contaminantes es un problema ambiental que puede ser mitigada mediante el uso de microorganismos. Las ciénagas y estuarios, por ejemplo, se componen de una gran riqueza en biodiversidad de microorganismos.

A través de esta investigación realizamos un perfil bacteriano utilizando la técnica “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism” (T-RFLP). El propósito de esta investigación es estudiar el perfil de las comunidades bacterianas que residen en la Ciénaga las Cucharillas y compararlas con las comunidades bacterianas de la Bahía de Jobos. Analizamos el DNA extraído de muestras de sedimentos de mangle de la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos y estudiamos las comunidades bacterianas que residen en estos ecosistemas con el fin de determinar su abundancia, su diversidad y el potencial de biorremediación ante contaminates clorinados y volátiles.

## **Justificación del estudio**

La Ciénaga las Cucharillas ha sido impactada por el mal uso de sus terrenos. Se ha utilizado como vertedero clandestino, se han rellenado sus terrenos para construcción de edificios, se han canalizado los ríos que la suplen. La termoeléctrica descarga aguas termales a ella, recibe las aguas usadas de las plantas de tratamiento. Recibe el impacto del tránsito vehicular, de la refinería de petróleo GULF, la Compañía Bacardí y las descargas de aguas no tratadas a la ciénaga afectan su calidad (Sotomayor, 2007). El Estuario Bahía de Jobos, por otro lado, ha sufrido el impacto de la termoeléctrica Aguirre, la petroquímica Phillips en Guayama, el vertedero BFI de Salinas, áreas agrícolas y el uso de plaguicidas y herbicidas, de la planta procesadora de pollos (PAPRI), mareas y corrientes y la construcción no planificada de viviendas (Reserva Nacional de Investigación Estuarina Bahía de Jobos (JBNERR), 1995). Se bombean pozos de agua dulce, para la irrigación, uso industrial y uso domésticos. El uso de agua de pozos han causando intrusión de agua salada al acuífero que en conjunto con los cambios en los patrones de lluvia se afecta al Estuario Bahía de Jobos, al punto que ha secado acres de terreno que poseen manglares (Field, Laboy, Capella, Robles, González & Dieppa, 2008). La pobre calidad de la Ciénaga y de la Bahía puede ser resuelta utilizando bacterias (biorremediación). Las bacterias se encargan de degradar mitigar y limpiar eficientemente gran variedad y cantidad de contaminantes entre ellos los clorinados y volátiles.

Un estudio de la microflora del lugar bajo estudio es necesario para identificar las bacterias necesarias para llevar a cabo el proceso de biorremediación. Para ésto, utilizamos la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) a

partir de una muestra de suelo ambiental, para determinar que genes y bacterias se encuentran en el área estudiada y son propicios para la biorremediación en futuras investigaciones o en casos de accidentes ambientales. A través de este estudio conoceremos el perfil bacteriano de la Ciénaga las Cucharillas y el de Bahía de Jobos y que bacterias son potenciales a biorremediar sedimentos de mangle contaminados con compuestos clorinados y volátiles. La técnica para realizar T-RFLP se explica en la metodología.

### **Hipótesis**

Las comunidades bacterianas recolectadas de los sedimentos de mangle la Ciénaga las Cucharillas tienen cualidades y características genéticas distintas a las bacterias colectadas de sedimentos de mangle de la Bahía de Jobos. Así mismo estas características son influenciadas por las estaciones lluviosas o secas. No obstante las diferencias, ambos grupos bacterianos tienen potencial genético para biorremediar compuestos clorinados y volátiles orgánicos.

### **Meta**

La meta de este estudio es obtener un perfil bacteriano a partir del DNA extraído de muestras de sedimentos recolectadas de áreas de la Ciénaga las Cucharillas, para compararlas con el perfil bacteriano a partir del DNA extraído de muestras de sedimento recolectadas de Bahía de Jobos para determinar la diversidad y abundancia de las comunidades bacterianas y determinar el potencial de biorremediación que tienen las bacterias encontradas ante la posible presencia de contaminantes clorinados y/o volátiles.



## **Objetivos**

1. Comparar el perfil de la comunidad bacteriana de la Ciénaga las Cucharillas con el perfil de la comunidad bacteriana del Estuario Bahía de Jobos durante dos estaciones (seca y lluviosa).
2. Determinar la diversidad y la abundancia de las comunidades bacterianas en la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos mediante la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).
3. Determinar el potencial de biorremediación de contaminantes clorinados o volátiles que poseen los microorganismos encontrados mediante la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **Trasfondo histórico**

Puerto Rico es una isla de aproximadamente 9,000 kilómetros cuadrados donde 75% son montañas. Su localización, clima y geografía permite que se formen de sistemas de arrecifes de coral, bosques de mangle humedales y estuarios (Field et al., 2008). A lo largo de su historia, Puerto Rico ha sido víctima de cambios económicos, sociales y culturales que afectan el ambiente y los recursos ecológicos, entre ellos humedales y bahías.

Los humedales de Puerto Rico son ecosistemas sensitivos y dinámicos. La Agencia Federal de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) ha descubierto actividades ilegales que se llevan a cabo en los humedales de Puerto Rico. Los humedales filtran contaminantes y químicos que provienen de la isla y de las costas. También, ayudan en el control de la erosión, sobre todo, en tormentas o huracanes, controlan inundaciones y suplen los acuíferos (Negrón, 2005).

La Ciénaga las Cucharillas es un ecosistema de alto valor ecológico, el cual, ha sido degradado con el paso de los años por causas antropogénicas. Han ocurrido una serie de eventos que han perjudicado la ciénaga en el transcurso de su existencia. La Ciénaga las Cucharillas protege de las inundaciones a comunidades cercanas como: Las Cucharillas, Juana Matos, Puente Blanco y Reparto Paraíso. Estas comunidades descargan aguas no tratadas en quebradas que nutren la ciénaga (Ruiz, 1999). Además, la ciénaga recibe escorrentías de industrias cercanas, de las plantas generadoras

de la Autoridad de Energía Eléctrica (AEE) Palo Seco y Puerto Nuevo y de Caribbean Petroleum Corporation (CAPECO) mejor conocida como la Refinería GULF. Por ejemplo, Bacardí en 1994 descargó aguas usadas en la ciénaga (USEPA, 2004). Otro ejemplo más reciente, es el accidente ocurrido el 23 de octubre de 2009 donde se incendiaron tanques vacíos y con combustible de la Refinería CAPECO que con el incidente se afectó la flora y fauna así como la diversidad de microorganismos presentes en el área. También, se afectó la calidad del aire donde la quema del petróleo y gases generados son absorbidos por la ciénaga. Las emisiones liberadas por los automóviles, también, producen este efecto en la ciénaga. Cucharillas recibe basura de ciudadanos inconscientes y sus terrenos se han rellenado, urbanizado desmedidamente, canalizado y utilizado para pastoreo. La Ciénaga las Cucharillas ha sido impactada negativamente en el transcurso de los años.

Los estuarios se caracterizan por la mezcla de agua proveniente de los ríos con el agua del mar. Estos sistemas son únicos de alta productividad que son degradados por actividades antropogénicas como la industrialización, el aumento poblacional, la deforestación de las zonas estuarinas, la contaminación de las aguas por descargas de efluentes domésticos, aguas calientes y derrames de petróleo (Ríos, 1985). El sistema puede afectarse por exceso en sedimentación, represas o sistemas de bombeo.

El Estuario Bahía de Jobos es un área de gran importancia ecológica y valor natural, por ésto es de suma importancia protegerlo. Además del valor natural, antes mencionado, el estuario tiene un inmenso valor histórico, evidenciado por los hallazgos arqueológicos de culturas pre-colombinas como lo son los elaborados cemíes Taínos. (Field et al., 2008). Los terrenos de la Bahía de Jobos desde los tiempos de la Colonia

Española hasta el 1970 fueron utilizados mayormente para la agricultura. Se sembraba caña de azúcar hasta 1960 que se cierra la Central Aguirre. Ésta pasa de los españoles a ser propiedad de una compañía norteamericana en 1898, la cual, modernizó la tecnología de producción. La Corporación Aguirre eran los dueños de los terrenos hasta 1980 y en 1981 la Bahía de Jobos se declara reserva.

A pesar de que es declarada una reserva nacional, la Bahía de Jobos se ve afectada por el desarrollo y el cambio de un área de agricultura a una zona industrial. Ésta ha sufrido cambios hidrológicos debido a la reducción de agua potable de la superficie y subterránea, lo cual, afecta grandemente las áreas de mangle causándole la muerte debido a la alta salinidad de la zona a causa de las intrusiones salinas (Field et al., 2008).

Los microorganismos en el suelo son de suma importancia debido a que ellos se encargan de la descomposición de las hojas, ramas, plantas y otros organismos muertos (Presscott, Harley & Klein, 2002). Las bacterias en el suelo pueden fijar nitrógeno, bióxido de carbono así como oxidar o reducir fosforo, azufre, nitrógeno, hierro metano, manganeso y metales pesados (Presscott et al., 2002). Muchas veces la cantidad de metales pesados en el suelo es mayor a la actividad microbiológica y se necesitan alternativas para estudiar la degradación de estos metales o compuestos para evitar que se degrade un recurso. El problema principal estriba en que no todas las bacterias son cultivables (Wexler, Bond, Richardson & Johnston, 2005). Es por esta razón que se recurre a la metagenómica. Con la ayuda de la técnica podemos estudiar los genomas de todos los organismos que se encuentran en una muestra ambiental. El desarrollo de la tecnología de la metagenómica en los pasados años ha provisto el acceso necesario, a la información genética de los procariotas disponibles en el medio ambiente (Cowan,

Meyer, Stafford, Muyanga, Cameron & Wittwer, 2005), permitiendo así la identificación de nuevos organismos y nuevos genes a través de la secuencia de genes 16 rRNA (Wexler et al., 2005). De tal forma, estudiamos los potenciales microorganismos a ser utilizados para remediar las áreas contaminada de la Ciénaga las Cucharillas y degradadas del Estuario Bahía de Jobos.

## **Marco teórico**

### Manglares

Los manglares se establecen bajo condiciones que son el resultado de la interacción de factores como geomorfología, inundación, textura y temperatura del sustrato, pH, salinidad, nutrientes, producción y dispersión de propágulos, competencia, herbivoría, respuesta fisiológica de las especies a los gradientes e interacciones simbióticas (Ramírez-Ochoa, 2005). Estos cubren un 60% a un 75% de las costas tropicales y subtropicales del mundo (Liang, Chen, Lan, Tam, Zan & Huang, 2007). Son sistemas altamente productivos, descomponen desechos y liberan los nutrientes necesarios para la vida en la costa. Ellos sostienen una compleja cadena trófica y proveen hábitat a diversas formas de vida marina y terrestre. El reciclaje de nutrientes mantiene la productividad del manglar así como la de ecosistemas adyacentes y disminuye el efecto de efluentes contaminantes, como combustibles fósiles y aguas residuales, vertidos directamente en el manglar o cerca de la costa (Ramírez-Ochoa, 2005).

La vegetación más común de los manglares son plantas hidrófitas, las cuales, se adaptan a condiciones salinas, anaeróbicas y a suelos hídricos; se conocen como manglares (Cowardin, Carter, Golet & La Roe, 1979). Los manglares para adaptarse a

estas condiciones han desarrollado raíces aéreas, semillas flotantes y estructuras especializadas que permiten la entrada de oxígeno a las raíces que están sumergidas. En Puerto Rico, hay cuatro especies: mangle rojo, mangle blanco, mangle negro y mangle botón (DRNA, 2006). El mangle rojo o *Rhizophora mangle* es usualmente el pionero en la formación de un pantano o manglar. Es una especie adaptada a vivir en aguas salinas, resiste temperaturas calientes y sus semillas toleran sal. Éste habita usualmente en la parte exterior de la franja del manglar y en los bordes de los canales. Al crecer forma canales con sus raíces aéreas que salen de su tronco o ramas hasta el suelo, las cuales, disminuyen el flujo del agua permitiendo que se precipite material húmico (Field et al., 2008). Este mangle es siempre verde, puede llegar a medir de 4 a 10 metros. Las hojas de este mangle son simples, opuestas y pecioladas de 8 a 10 cm de largo y 4 a 5 cm ancho, poseen flores pequeñas de cuatro pétalos blanco- amarillento (DRNA, 2002). El mangle negro o *Avicennia germinans*, se encuentra en terrenos más elevados que permanecen parcialmente secos con salinidad de 0 a 100 ppm (Field et al., 2008). Usualmente, crecen en la parte posterior a la franja donde crece el mangle rojo. *Avicennia germinans* desarrolla neumatóforos pronunciados que llegan a alcanzar 20 cm o más desde el suelo para el intercambio de gases. Los neumatóforos surgen de un sistema de raíces superficiales (DRNA, 2002). Estos árboles pueden alcanzar una altura de 15 metros y de 30 a 50 ó más de diámetro. Es la especie de mangle que mejor se adapta a las condiciones climáticas y a la salinidad. Sus hojas poseen glándulas que excretan la sal del árbol. El mangle blanco, *Laguncularia racemosa* crece mayormente en suelos elevados donde la inundación tidal es menos frecuente. Esta especie posee un sistema de raíces poco profundas y neumatóforos no muy desarrollados que salen de la

raíz y luego se bifurcan en la superficie. Es un árbol de estatura mediana de 4 a 6 metros y puede alcanzar hasta 20 metros de alto (DRNA, 2002). Sus hojas son simples enterizas y oblongadas con un ápice redondo. El mangle botón o *Conocarpus erectus* puede crecer en lagunas de baja salinidad, puede formar bosques en litorales rocosos y pueden alcanzar de 5 a 7 metros de alto (DRNA, 2002). En la investigación recolectamos muestras de sedimento de mangle blanco y mangle negro.

## Humedales

Los humedales se encuentran entre los ecosistemas más ricos y productivos. Son sistemas sedimentarios o detríticos en los que se acumulan elementos esenciales como el carbono, el hidrógeno, el nitrógeno, el fósforo y otros materiales orgánicos e inorgánicos que se intercambian en el ambiente. Son áreas de terreno donde predomina la saturación con agua; son aguas profundas que pueden tener o no vegetación. Además, son tierras de transición entre sistemas terrestres y acuáticos (Cowardin et al., 1979). Su nivel freático se encuentra en la superficie terrestre o cerca de ésta. No obstante, a todas estas características que engloban lo que es un humedal, existen varios tipos de humedales y se clasifican según el flujo de agua. Entre estos podemos enfatizar: (1) humedales de áreas interiores de agua dulce, (2) de áreas costeras de agua dulce, (3) de áreas interiores de agua salina y (4) de áreas costeras de agua salobre (Smith & Smith, 2000). La mayoría de los humedales comparten suelo o sustratos al estar saturados. Para que un terreno sea considerado un humedal debe poseer uno de estos tres (3) atributos: pueden mantener plantas hidrófilas, las cuales, se adaptan a crecer en suelos periódicamente anaeróbicos a

causa del exceso de agua (Smith et al., 2000), el sustrato es un suelo hídrico que no drena o el sustrato no es suelo y está saturado con agua o cubierto por aguas profundas.

Existe una variedad de nombres por los que se conocen los humedales entre ellos: pantanos, prados, praderas, ciénagas y mangles. Según, Cowardin et al. (1979), los humedales se agrupan por sistemas ecológicos y los tipos de humedales son: marino, estuarino, riverino, lacustrino y palustrino o pantano. El humedal marino consiste de océano abierto, el cual, cubre la placa continental; está asociado a las costas y se expone a: vientos, olas y corrientes de agua. Los humedales estuarinos son hábitats de aguas profundas tidales (en la costa) con humedales adyacentes que se encuentran semi-encerrados por tierra y tienen una apertura con acceso esporádico al océano. Ocasionalmente, llega agua dulce por escorrentías desde la tierra a este humedal. El estuarino puede tener en su vegetación mangle rojo (*Rhizophora mangle*) en su mayoría. El humedal conocido como riverino son aquellos que contienen un canal, donde dominan los árboles, arbustos, musgos, líquenes y contienen agua salada proveniente de océanos. Sus aguas están en continuo movimiento y pueden conectarse a dos (2) cuerpos de agua estancadas. El lacustrino se encuentra en depresiones topográficas o en embalses, carece de árboles, arbustos, musgos o líquenes. Este sistema incluye lagos y reservas inundadas permanente y ocasionalmente. Un humedal que incluye humedales no tidales (en tierra) es el que conocemos como el humedal palustrino. El mismo está dominado por árboles, arbustos, musgos y líquenes. Este humedal puede estar unido a cualquiera de los otros cuatro humedales. Al estar compuesto de plantas se conoce como: manglar, estanque, pantano o ciénaga. A este grupo es al que pertenece la Ciénaga las Cucharillas. Los



humedales riverinos, lacustrino y palustrino están sumergidos la mayoría del tiempo o todo el tiempo.

La Ciénaga las Cucharillas se localiza en el municipio de Cataño y forma parte del Estuario Bahía de San Juan. Es un cuerpo de agua de aproximadamente 500 hectáreas (1,236 acres) de áreas abiertas (Ruiz, 1999). Se compone de humedales herbáceos mayormente, mangles, bosques y áreas de agua abierta (USEPA, 2004). El humedal herbáceo y el manglar bordea: la carretera PR-165 en el noreste, la urbanización Marina Bahía al noroeste, la barriada Las Cucharillas y la comunidad de Puente Blanco al suroeste y Juana Matos y Coquí al sureste. El sur colinda con el caño La Malaria y el expreso De Diego. La ciénaga recibe aguas de las quebradas Santa Catalina, Lajas y Diego, que conectan al caño La Malaria. Además, drenan aguas de Aguas Frías, el Río Bayamón y el canal San Fernando.

Los humedales tienen gran importancia económica y ecológica, controlan la erosión en la costa y previenen inundaciones pues, actúan como esponjas que retienen el agua de lluvia. A su vez, ayudan en la recarga y descarga de aguas subterráneas, reducen la erosión del suelo disminuyendo la velocidad de las corrientes de agua y filtran las aguas y los metales antes de que lleguen a los estuarios. Además, amortiguan ruidos urbanos e industriales, absorbe contaminantes atmosféricos y remueven sedimentos que llegan por escorrentías de ríos, arroyos y quebradas (Ruiz, 1999; Chiras, 2001). Los humedales poseen gran variedad de microorganismos que controlan y absorben los nutrientes en exceso y contaminantes presentes manteniendo un balance. Estos ecosistemas contribuyen positivamente a la economía de los seres humanos debido a que proporcionan lugares de recreo y turismo. Son ecosistemas altamente productivos, ésto

se debe a la retención de sedimentos y nutrientes así como la gran cantidad de material orgánico. Los humedales sirven de vivero para peces y hábitat para gran variedad de aves migratorias y nativas.

Los humedales son considerados como espacios de terrenos perdidos utilizados para la construcción de edificios, urbanizaciones, tierras de cultivo, vertederos, industrias o carreteras y se secan provocando la pérdida de hábitáculos para especies e inundaciones. Los humedales tienen gran valor debido a que ellos son los puntos de recarga y descarga de aguas subterráneas, pues, retienen el agua de lluvia o de escorrentías. Además, funcionan como filtro de contaminantes en el agua. La vegetación de los humedales extrae el exceso de nitrógeno, fósforo, sulfatos, cobre, hierro y metales pesados y los incorpora a la biomasa del humedal depositándolos en el fango anaerobio del fondo (Smith et al., 2000).

## Estuario

El agua de la mayoría de los arroyos y ríos desembocan en el mar donde el agua dulce se une con el agua salada a esto se le conoce como un estuario. A la interacción entre el agua dulce y la salada influye en la salinidad del estuario y la mezcla depende de la marea y del viento (Smith et al., 2000). En los estuarios, los sedimentos se depositan en las aguas calmadas cuando el río llega hasta el mar. La temperatura de los estuarios varía dependiendo de la luz solar, las corrientes y la estación del año. La mezcla de la salinidad y la temperatura del estuario funcionan como una trampa para los nutrientes. Los nutrientes se pueden depositar en los manglares bombeando los nutrientes de los sedimentos del fondo a las aguas superficiales.

La Reserva Nacional Estuarina Bahía de Jobos se localiza en la costa sur este de Puerto Rico entre las coordenadas 18° 15'N y 66° 30'O. Esta bahía es el segundo estuario más largo de Puerto Rico y cubre aproximadamente 8 kilómetros cuadrados. Toda la reserva cubre 2,800 acres (11 kilómetros cuadrados) y alcanza una profundidad de 8 a 10 metros. Es una bahía semi- cerrada que se encuentra entre los municipios de Guayama y Salinas (Field et al., 2008). Esta área estuarina está asociada a flujos de la costa de sistemas riverinos. El ecosistema de la Reserva incluye bosques de mangle, lagunas, llanos salinos, bosques secos, algas marinas y arrecifes de coral. Se provee hábitat para gran variedad de especies de flora y fauna. La Reserva se compone de tres sectores: Mar Negro Aguirre y Cayos Caribe. Mar Negro y Aguirre se compone de un complejo de bosques de mangle-humedales y lagunas salitrales; Cayos Caribe es una formación linear de cayos que posee las cuatro especies de manglar, hierbas marinas y arrecifes de coral (Field et al., 2008). El Estuario Bahía de Jobos es suplido por el Río Seco y por aguas subterráneas mayormente (Demopoulos, 2004).

Actualmente, los terrenos adyacentes son utilizados como una planta de procesamiento de carne, áreas agrícolas, un vertedero y una pista de carrera de autos a lo largo de la Bahía de Jobos. Al noreste de encuentra la termoeléctrica de Aguirre (PREPA Aguirre Power Generation Complex, Aguirre, Salinas), una planta de reciclaje de gomas y el antiguo Molino de la Central Aguirre. Al oeste se encuentra el mayor complejo de desarrollo químico y farmacéutico de Puerto Rico. Al este de la Bahía se localiza la Refinería de Petróleo Phillips. Además de esto, se descargan aguas usadas de alcantarillados (afluentes) y de la Termoeléctrica Aguirre a la Bahía de Jobos. Estos

usos de terreno y descargas afectan la el flujo de agua, sedimentos y nutrientes en el manglar.

En los años 1990, se reportó una mortalidad masiva de Mangle Negro (*Avicennia germinans*) en el sector el Mar Negro (área de estudio) (Apéndice 1), el cual, se ha relacionado con el cambio en la hidrología y el aumento en la salinidad en el área (Ramírez-Ochoa, 2005). Los cambios hidrológicos pueden deberse al aumento en la extracción de agua de los acuíferos para sustentar: la irrigación en la agricultura (Demopoulos, 2004), a más de 500 viviendas recién construidas y las industrias (Field et al., 2008). Se estima que se extraen 1.5 Mega galones de aguas subterráneas por día (Field et al., 2008). Al extraerse más agua del área del nivel freático (water table) de los acuíferos promueve las intrusiones salinas reduciendo el agua fresca que llega al estuario. Efectos antropogenicos como la reducción del agua dulce del acuífero que junto a disturbios naturales como cambios en patrones de lluvia se han asociado con los cambios en los mangles y la muerte de acres de arboles de mangle negro (Field et al., 2008) (Apéndice 1). Además de las intrusiones de agua salada, el reducir significativamente la cantidad de agua del acuífero causa un aumento en la cantidad de sólidos disueltos y detrimento en el agua debido a contaminación por aguas usadas de pozos sépticos de origen industrial o doméstico (JP, 2006).

#### Bacterias, Suelo y Sedimento

A pesar de que la década de los '70 produjo el término ecología microbiana desde hace un poco más de 10 años ha aumentado el interés en la microbiología del suelo y la ecología (Ghosh, Maity, Chakrabarti & Chattopadhyay, 2007). Ésto es a causa de que las

comunidades microbianas tienen un rol importante en el mantenimiento y sustento de la biosfera (Ghosh et al., 2007).

El suelo es uno de los recursos naturales más importantes. Está compuesto de materia orgánica, materia mineral o inorgánica, agua y aire y organismos vivos (Reible & Lanczos, 2005). Todas estas características hacen que el suelo sea uno de los lugares con mayor actividad microbiana, esto por la riqueza de compuestos que constituyen el suelo, así como, por la diversidad biológica que es parte de este recurso. La materia inorgánica incluye fragmentos de rocas (grava, arena, arcilla y limo) y minerales. El suelo es clasificado según su composición, estructura, color. En los suelos la vegetación es esencial, los árboles, por ejemplo, sus raíces penetran en el suelo y rompen pedazos de rocas formando partículas más finas y sus hojas aumentan la riqueza de los suelos cuando los microorganismos la descomponen. El suelo provee el ambiente necesario para que los microorganismos puedan residir y provee una superficie para recoger el agua. Mientras el agua se va moviendo va cargando partículas, sustancias químicas (nutrientes y contaminantes) y microorganismos.

El suelo saturado de agua no obtiene oxígeno de la atmósfera y se vuelve anaeróbico o anóxico, como en el caso de los pantanos y mangles. A las bacterias que proliferan y toman ventaja de estas condiciones, se conocen como bacterias anaerobias o facultativas (Presscott et al., 2002). Al suelo saturado de los cuerpos de agua se le conoce como sedimento. El sedimento es una parte esencial, integral y dinámica de los sistemas hidrológicos y provienen de la erosión, del clima (ej. mucha lluvia) y escorrentías. El sedimento un sólido suspendido o depositado que actúa como el componente principal de una matriz, la cual, es susceptible a la transportación por el agua

(Reible & Lanczos, 2005). Los sedimentos son reservas de contaminantes químicos y biológicos que puedan provenir de un efluente de origen urbano, de la agricultura, industria, sedimentos contaminados de ríos, riachuelos, lagos, bahías y estuarios. El sedimento en los mangles es esencial para entender la importancia del ecosistema. En los sedimentos se recogen gran variedad de contaminantes que pueden ser degradados por las bacterias.

## Bacterias

La mayoría de los microorganismos de la Tierra se localizan en océanos y el suelo así como en sus superficies. Estudios realizados durante las últimas dos décadas han revelado una increíble variedad de microorganismos en ambientes naturales de las cuales se estima 10,000 especies de bacterias presentes en el suelo o sedimento (Gentry, Wickham, Schadt, He & Zhou, 2006). Las bacterias son células procariotas que poseen una membrana lipídica, mayormente, de diacil glicerol diester (Woese, Kandler & Wheelis, 1990). Las bacterias están compuestas de una sola célula que puede tener tamaños de 0.2µm a 500µm y formas de bacilos, cocos, espiroquetas y espirilos (Presscott et al., 2002). La célula posee pared celular, ribosomas, membrana plasmática, cuerpos de inclusión, citoplasma y nucleoide. Algunas bacterias pueden tener flagelo o cilios para movimiento; cápsula para protección; o plásmidos. Las células procariotas contrario a las eucariotas muestran características estructurales similares entre las células (Woese et al., 1990).

En el nucleoide se encuentra el material genético. Las células poseen DNA (ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés) circular o de doble hélice como material

genético (Presscott et al., 2002). Cuando la célula se divide el material genético se duplica. Es el material genético o DNA de sedimentos de mangle el que se extraerá para realizar esta investigación.

Las bacterias son un grupo de microorganismos muy importantes en el ambiente, debido a que convierten la materia biológica muerta en nutrientes haciéndolos disponibles a otros organismos (Presscott et al., 2002). Los microorganismos en su crecimiento y metabolismo interaccionan con diferentes elementos en el ciclo de los nutrientes o ciclos biogeoquímicos. Algunos de estos ciclos son: carbono, azufre, nitrógeno, hierro, manganeso, europio, telurio, selenio, rodio y fósforo. Por ejemplo, en los estuarios el ciclo de nitrógeno es esencial; la fijación de nitrógeno por microorganismos contribuye significativamente al nitrógeno presente en las costas (Bowen, 2005).

La descomposición y la mineralización de contaminantes, desechos y sedimentos por medio de microorganismos juega un papel importante los mangles (Liang et al., 2007). Los microorganismos, por ejemplo, tienen habilidad de degradar o biorremediar contaminantes orgánicos presentes en el ambiente.

#### Metagenómica y ecología genética

Desde que Robert Koch creció por primera vez células en cultivos puros e identificó *Bacillus anthracis* y *Mycobacterium tuberculosis*, el mundo de los microorganismos se dividió en dos grupos: aquellos que pueden ser cultivados y aquellos que quedan sin cultivar (Logue, Burgmann & Robinson, 2008). A raíz de esto se han desarrollado técnicas utilizando secuencias de genes a partir de rRNA o DNA para

obtener información de poblaciones de microorganismos sin tener que cultivarlos. Carl Woese utiliza el análisis de RNA mediante secuencias moleculares para clasificar todos los organismos en tres (3) dominios distintos: *Archea*, *Bacteria* (células procariotas) y *Eucarya* (células eucariotas ej. células vegetales, animales y hongos) (McKinney, 2004; Woese et al., 1990). (Apéndice Tres Dominios de Carl Woese). Estas divisiones Woese las realiza a raíz de no saber dónde clasificar los protistas formados de una sola célula, ya que, no eran ni plantas ni animales. Además, los cinco reinos (*Animalia*, *Plantae*, *Fungi*, *Protista* y *Monera*) no son filogenéticamente correctos y la estructura 16S rRNA de las *Arquaeobacterias* es única según su estudio (Woese, 1990).

Se estima que el 99% de los microorganismos presentes en el ambiente no pueden ser cultivados y por tanto no son accesibles a su uso en la biotecnología o en investigaciones (Amman, Ludwig & Schleifer, 1995; Riesenfeld Schloss & Handelsman, 2004). Es por esta razón, que se han tenido que desarrollar métodos y equipos para la replicación del RNA. Lo que ha hecho posible que se puedan crear bibliotecas de información donde se identifican especies de bacterias y organismos, productos, metabolismo y genes.

Los “omics” pueden ser aplicados a practicas de ensayos microbiológicos ambientales. El implementar tecnologías de microensayos nos permite tener acceso a la diversidad bacterial en diversos hábitats (Nelson, Methe & Kowalchuk, 2007). La genómica y la metagenómica (forman parte de los “omics”) son los campos más prominentes de microbiología ambiental (Logue et al., 2008). Por medio de la metagenómica, los genomas de una comunidad microbiológica son extraídos de una muestra ambiental y son clonados. Luego se procede a construir vectores que serán



subclonados, secuenciados o investigados para evaluar sus propiedades filogenéticas (Jurkowski & Reid, 2007). La metagenómica es el análisis genómico del DNA de un organismo, en este caso bacterias, el cual, se aplica a comunidades enteras de microorganismos sin tener que aislarlos y ni cultivarlos. La metagenómica les da a los científicos el acceso a millones de microorganismos que no han sido estudiados anteriormente. La metagenómica tiene 2 estrategias diferentes: el análisis funcional y la secuencia del genoma microbial colectivo que se encuentra en una muestra ambiental (Riesenfeld et al., 2004).

Se han estudiado diversos ambientes mediante la metagenómica entre ellos el suelo, las cavidades orales, las heces fecales, hábitat acuáticos y hospitales (Riesenfeld et al., 2004). La metagenómica ha traído avances en la salud humana, en las ciencias terrestres y cambios globales, en la agricultura, en la biorremediación y en la energía (Jurkowski et al., 2007). En la salud humana, se examinan las comunidades microbiales que habitan el cuerpo humano. Esto lleva a la creación de estrategias, diagnósticos y tratamientos para tratar enfermedades como la obesidad, el asma, cáncer y desórdenes inmunes (Jurkowski et al., 2007). En la biorremediación, se han desarrollado herramientas para el monitoreo de daños ambientales y estrategias para limpiar o restaurar ecosistemas (Jurkowski et al., 2007). Las bacterias han participado en la limpieza de desperdicios y sustancias peligrosas transformándolas en elementos más simples que ayudan al ambiente. Por ejemplo, pueden limpiar acuíferos, derrames de petróleo y derrames de aceite (Jurkowski et al., 2007; Prescott et al., 2002). La metagenómica en la agricultura, permite que se entiendan mejor los microorganismos que habitan y benefician las plantas y animales que contribuyen en la detección de

enfermedades. En la energía, la metagenómica se ha utilizado para el diseño de bioenergía, por ejemplo, en la producción de biocombustible a partir de etanol (Jurkowski et al., 2007). En cuanto a los cambios climáticos, se estudian los microorganismos en el suelo y océano para predecir y prevenir cambios ambientales. La metagenómica se puede aplicar a estos avances y muchos otros que están por venir.

#### Método “Fingerprint” T-RFLP

El método “fingerprint” es la estructura o el orden de los pares de bases que se encuentran en el DNA. Para cada organismo hay una secuencia distinta de DNA. Los científicos repiten patrones de DNA para determinar cuan relacionados se encuentran los organismos. Los métodos de “fingerprint” se han convertido en una herramienta indispensable para la ecología microbial y para investigaciones, debido a que ayudan a explicar características del comportamiento de una especie individual o de una comunidad (Nocker, Burr & Camper, 2007). Estos métodos, usualmente, emplean el PCR (polimerase chain reaction, por sus siglas en inglés) para amplificar secuencias de DNA o RNA de una gran variedad de microorganismos utilizando cebadores o “primers” (Presscott et al., 2002; Nocker et al., 2007).

Entre los métodos más utilizados de “fingerprint” se encuentran: el análisis de espacios ribosomales intergenéticos (RISA, por sus siglas en inglés), la electroforesis en gel de gradiente denaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés), el análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés) y la variante más moderna restricción terminal de fragmentos de longitud polimórfica o “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism” (T-RFLP) (Logue et al., 2008).

En esta investigación utilizamos la técnica T-RFLP, la cual, es el método de “fingerprint” más amplio que existe y más aplicable al realizar comparaciones entre comunidades. El T-RFLP utiliza resolución de tecnología de secuencias automatizadas donde los genes marcadores son amplificados por PCR utilizando un tinte fluorescente que se une al extremo 5’ de uno de los “primers” rotulando el producto (Nocker et al., 2007). Mediante el uso del PCR, los fragmentos de los genes del 16S rRNA son amplificados utilizando “primers” (Ghosh et al., 2007). En esta investigación utilizamos los “primer” 27F y el 1525R los cuales son específicos para bacterias. El polimorfismo se basa en el largo del fragmento, esto permite una referencia directa a la base de datos en secuencia. Entre las ventajas de utilizar el T-RFLP se encuentran: es altamente sensitivo, sus corridas duran corto tiempo, es potencialmente directo filogenéticamente a señales de trabajo y permite hacer buenas comparaciones entre corridas (Nocker et al., 2007).

Las técnicas de “fingerprint” nos ayudan a entender las bacterias y su dinámica en respuesta ante un ambiente tan cambiante. Además, traen impactos positivos dependiendo el uso que se les de, por tal razón, se han creado guías a seguir para evitar daños producidos por experimentos.

### **Estudio de casos**

Estudio de caso 1: En California se estudiaron dos (2) mangles: el mangle salado Carpinteria, un humedal de 92 hectáreas y el mangle Stege un humedal de 100 hectáreas. Se tomaron muestras de suelo de ambos mangles a distintas elevaciones. Se determinó que los sedimentos poseen metales pesados y que hay una asociación entre sitio y especie de microorganismos. Esto lo que demuestra es que hay una relación entre la presencia de

metales pesados en los mangles y la presencia de microorganismos en las muestras tomadas de ambos mangles (Cao, Cherr, Cordova-Kreylos, Fan, Green, Higashi, LaMontagne, Scow, Vines, Yuan & Holden, 2006).

Estudio de caso 2: En el mangle Futian de la Reserva Natural Nacional de Shenzhen en China cubre, aproximadamente, 112 hectáreas. Este mangle tidal que se inunda dos (2) veces al día se estudió mediante técnicas moleculares para realizar un inventario de los organismos procariotas que se encuentran en éste, por medio, del estudio filogenético. Se tomaron muestras de sedimento del mangle, se extrajo su DNA y amplificó por PCR. El DNA de las bacterias fueron evaluadas por el análisis T-RFLP de los genes 16S rRNA. Para este proceso se digirieron los fragmentos de DNA mediante endonucleasas y enzimas de digestión. EN DNA digerido se colocó en un gel de agarosa y se tiñó con bromuro de etilo, se corrió el gel y se compararon las secuencias obtenidas en un banco de genes. Los resultados obtenidos fueron 148 clones de bacterias que se concentran en los grupos de bacterias *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Fibrobacteres*, *Chlamydiae*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Gamaproteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes* (Liang et al., 2007).

Estudio de caso 3: Se recolectó suelo las cuevas Arcy sur Cure en Francia, de suelo agrícola, de un humedal construido y de los Alpes de Francia (Col du Lautaret, Hautes-Alpes). El proceso para la electroforesis capilar que utilizan es similar al que se hará en la investigación de la Ciénaga las Cucharillas. Para la extracción de DNA utilizaran 0.25g de muestra usando el Power Soil extracción kit de MO BIO siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se realizó PCR para amplificar el DNA donde se

utilizó un “primer” fluorescente para las muestras y fragmentos de *E. Coli* para el control negativo. Para purificar el DNA se utilizó en Qiaquick PCR purification kit. Luego se realizó la electroforesis capilar utilizando 10 ml de formamida Hi Di y 0.2µl de un marcador molecular interno. Para analizar la data utilizaron el SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism). Se determinó que el uso de este método da iguales resultados que las técnicas más utilizadas que son ARISA y T-RFLP. En cuanto a los picos obtenidos la mayoría era del mismo tamaño. Los picos que variaban identificaban bacterias como: *P. fluorescens*, *B. coagulans*, *C. metallidurans*, *E. coli*, *Sphingomonas sp.*, *S. typhimurium* y *R. capsulatu* (Zinger, Gury, Giraud, Krivobok, Gielly, Taberlet et al., 2007).

## **Marco legal**

Muchas agencias gubernamentales estatales y federales participan en el manejo y preservación de los humedales de Puerto Rico (Adams et al., 1992). A través de las experiencias y situaciones pasadas se han creado una serie leyes y reglamentos en el país con respecto a los humedales en Puerto Rico. El conocimiento de las leyes y reglamentos para humedales ayuda en la preserva, disminución de los impactos y la reducción de la pérdida de humedales.

### Leyes estatales

#### *Constitución del Estado Libre Asociado de Puerto Rico*

Es la base y fundamento de todas las leyes y reglamentos del Estado Libre Asociado de Puerto Rico. En el Artículo VI, Sección 19 se indica que “Sera política

pública del Estado Libre Asociado de Puerto Rico la más eficaz conservación de sus recursos naturales, así como el aprovechamiento de los mismos para el beneficio general de la comunidad”... Esta sección de la Constitución tiene como objetivo que se usen los recursos naturales sin dañarlos y que se puedan conservar para siguientes generaciones.

*Ley sobre la Política Pública Ambiental (LPPA) (Ley 416 del 22 de septiembre de 2004).*

La LPPA es el primer esquema estatutario en Puerto Rico donde se plantea de forma integrada la administración del medio ambiente. Esta ley trata de concienciar a las personas sobre su responsabilidad por mantener un medio ambiente saludable y por conservar y mejorar el ambiente. Además, responsabiliza a las personas por la contaminación de suelos, agua y ambiente. Esta ley establece que se deben estimular la armonía entre el ser humano y su medio ambiente y que se deben evitar daños y deterioros ambientales. LPPA establece y faculta a la Junta de Calidad Ambiental (JCA) para que ésta haga cumplir la política pública ambiental, provea educación ambiental y cree reglamentos, sistemas de permisos y fiscalice documentos ambientales.

*Ley para establecer la Política Pública de los Humedales o “Ley de Tierra” (Ley 314 del 24 de diciembre de 1998, S.E.).*

Esta ley se crea para reconocer el valor ecológico, recreativo, educativo, científico y económico de los humedales para: protegerlos, preservarlos, conservarlos, restaurarlos y manejarlos. El Departamento de Recursos Naturales y Ambientales y la Autoridad de Tierras realizan acuerdos para designar como reservas naturales los humedales y los

terrenos secos. Todo humedal se delimitará y designará como recurso natural según indica esta ley.

*Ley de Programa de Patrimonio Natural (Ley 150 del 4 de Agosto de 1988).*

Esta ley crea un mecanismo para identificar y adquirir terrenos para la conservación, manejo y restauración de áreas de alto valor ecológico en Puerto Rico. Entre otras ordenanzas de esta ley se debe realizar un inventario de las especies en peligro de extinción, de aves migratorias, de comunidades naturales de humedales y de áreas especialmente designadas.

*Ley para Establecer la Política Pública sobre la Prevención de Inundaciones y Conservación de Ríos y Quebradas (Ley 49 del 4 de enero de 2003, S.E.).*

La deforestación, el clima, la localización, la topografía y el rellenar áreas de mangles o humedales causan inundaciones cada vez más frecuentes. Esta ley autoriza al Departamento de Recursos Naturales y Ambientales para que prevenga las inundaciones y conserve los ríos y quebradas. Esta ley establece la Política Pública sobre la prevención de inundaciones, la limpieza de causes y conservación de ríos y quebradas de Puerto Rico. El Departamento de Recursos Naturales y Ambientales podrá canalizar ríos para la prevención o disminución de riesgo a inundaciones en áreas que tienen un historial de inundaciones con daños a la vida y la propiedad.

*Ley Orgánica del Departamento de Recursos Naturales (Ley 23 del 20 de junio de 1972).*

Esta ley crea el Departamento de Recursos Naturales y Ambientales, lo faculta responsabiliza y asigna conservar, vigilar y multar a violadores que atenten contra los recursos naturales de Puerto Rico. Además, faculta al Secretario de Recursos Naturales para asesorar al gobernador y a establecer la organización interna del Departamento. Dentro de la Ley Orgánica del Departamento de Recursos Naturales y Ambientales se crea la Ley 31 del 14 de enero de 2000, para adicionar el inciso (p) al Artículo 5. Esta ley faculta al Secretario de Recursos Naturales y Ambientales para reglamentar, proteger, mantener y conservar los humedales en Puerto Rico.

Reglamentos estatales

*Reglamento para el control de desperdicios sólidos peligrosos (Reglamento 2863, SE. Reglamento 5807).*

Este reglamento es regulado por la Junta de Calidad ambiental. Tiene como propósito el establecer normas y métodos adecuados para: la recuperación, uso, transportación, almacenaje, recolección, separación, procesamiento y disposición final de desperdicios sólidos. Los desperdicios sólidos son aquellos que presenten características: tóxicas, reactivas, inflamables, corrosivas y que sean una amenaza para la salud humana y el ambiente. La JCA sanciona cualquier incumplimiento con este reglamento.



*Reglamento para el aprovechamiento, vigilancia, conservación y administración de las aguas territoriales, los terrenos sumergidos bajo éstas y la Zona Marítimo Terrestre (Reglamento 4860).*

Muchos humedales de Puerto Rico son de dominio público. Bajo las leyes españolas, todos los bosques de mangle son propiedad del Estado Libre Asociado de Puerto Rico porque están dentro de la zona marítimo terrestre (Adams et al., 1992). El Reglamento 4860 está regulado por el Departamento de Recursos Naturales y Ambientales (DRNA). Tiene como propósito el establecer criterios y mecanismos para la vigilancia, conservación, saneamiento, usos y aprovechamiento de la zona marítimo terrestre, aguas territoriales y terrenos sumergidos.

*Reglamento para regir las especies vulnerables y en peligro de extinción en el Estado Libre Asociado de Puerto Rico (Reglamento 6766)*

La agencia que regula este reglamento es en Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. Este reglamento identifica, conserva y preserva especies vulnerables y hábitats críticos. En adición, se regula la protección y conservación de los recursos naturales. En la Ciénaga las Cucharillas existen gran variedad de especies algunas en peligro de extinción. El conservar su hábitat ayuda en la preserva de especies vulnerables o en peligro de extinción.

*Reglamento para el control de la erosión y prevención de la sedimentación (Reglamento 6754).*

La erosión y las escorrentías llevan contaminantes a la Ciénaga las Cucharillas, los cuales, se almacenan en los sedimentos y el suelo. La Junta de Calidad Ambiental regula este reglamento en conjunto con el Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. La JCA y el DRNA desarrollaron este reglamento para evitar la contaminación de las aguas de Puerto Rico. La erosión del terreno causado por las actividades humanas contribuye a la contaminación de los cuerpos de agua de Puerto Rico. Además, de no controlar o prevenir las escorrentías en actividades de excavación, creación de montículos, almacenaje, extracción de terreno o de la cubierta vegetativa pueden causar problemas de sedimentación. La sedimentación causa efectos en los cuerpos de agua así como en los organismos acuáticos.

*Reglamento de estándares de calidad de agua, 2003. (Reglamento Núm. 4282).*

Las aguas contaminadas son perjudiciales para: la salud humana, la vida silvestre y los peces. Este reglamento es regulado por la Junta de Calidad Ambiental. El propósito de este reglamento es el preservar, conservar y restaurar la calidad de las aguas de Puerto Rico. En este reglamento se propone designar los usos de las aguas de Puerto Rico, determinar estándares para las aguas, identificar fuentes de contaminación y buscar medidas para mantener la calidad del agua. Las áreas de valor ecológico y toda aquella que exceda los niveles para mantener la propagación de peces, mariscos, vida silvestre, amenazadas o en peligro de extinción debe ser conservada y protegida.

## Leyes federales

### *“Clean Water Act” Sección 404*

Esta ley previene la contaminación del agua con sustancias tóxicas a causa de derrames. En esta ley se crea un programa que regula las descargas de: dragado, material de relleno, construcciones o minería en los cuerpos de aguas incluyendo los humedales, aguas costeras, estuarios, aguas de superficie o subterráneas. Según esta ley requiere la aprobación de permisos para cada una de estas actividades. Las descargas al agua dañan los ambientes acuáticos y si no se cumplen con los permisos puede causar que los contaminantes se depositen en los sedimentos y el suelo. Varias agencias se encargan de que se siga esta ley. El Cuerpo de Ingenieros de los Estados Unidos revisan los permisos. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) desarrolla guías y criterios para evaluar los permisos y crea estándares para la concentración de contaminantes en agua. El Servicio Nacional de Peces y Vida Silvestre de los Estados Unidos evalúa los impactos que puedan ocurrir en los peces y la vida silvestre.

La Ley Federal de Agua Limpia, según enmendada en agosto de 1990, requiere, en la sección 305(b) que cada estado informe bianualmente, la calidad física, química y microbiológica del agua. Este estatuto legal establece el uso de las aguas y los niveles máximos y mínimos permitidos para ciertas sustancias. Así, se establecen cuatro tipos básicos de agua, según su utilización: aguas de contacto primario (natación); secundario (botes y pesca deportiva); aguas para sostener la vida acuática (propagación y preservación de especies) y como fuente cruda de agua potable (Malavé-Llamas, 2003).

*“Safe Drink Water Act” (SDWA)*

El Congreso de Estados Unidos crea en 1974 esta ley para proteger la salud pública así como los ríos, lagos, reservas riachuelos y aguas subterráneas. La SDWA autoriza a la EPA (Environmental Protection Agency) para que haga cumplir con los estándares para el agua potable. Existen gran cantidad de cuerpos de agua a los que se les arrojan desperdicios químicos, pesticidas, desperdicios animales y humanos causando que se contaminen. Si esta agua se utiliza para el consumo humano sin desinfectar previamente puede causar graves riesgos a la salud. Esta ley incluye la protección y prevención de las aguas por medio de la creación de estándares de calidad de agua.

*Ley de Ríos y Puertos Sección 10 (Rivers and Harbors Act of 1899).*

El Congreso de Estados Unidos crea en 1899 esta ley, la cual, le concede al Cuerpo de Ingenieros de los Estados Unidos la autoridad para reglamentar las actividades que se realizan en las aguas navegables. Entre esas actividades se encuentra el construir, comenzar a construir embarcaderos, lagos, malecones y puertos en bahías, canales navegables, refugio de vida silvestre o en cuerpos de aguas propiedad de los Estados Unidos sin un debido permiso. También, se prohíbe represar, profundizar, excavar, rellenar o alterar los cuerpos de agua.

*Ley sobre las especies en peligro de extinción (Endangered Species Act or ESA)*

El Congreso diseña esta ley en diciembre de 1973 con el fin de que se conserven especies de peces, vida silvestre y plantas y ecosistemas que se consideren en amenazados o en peligro de extinción en los Estados Unidos. A consecuencia de que se

le limite su territorio, el crecimiento económico y no se preserve su hábitat. Esta ley concierne a los humedales, ya que, albergan variedad de especies de aves, plantas y peces algunas de ellas en peligro o amenaza de extinción.

*Ley RCRA (Resource Conservation and Recovery Act)*

La ley federal RCRA se divide en varios subtítulos (A a la J) y tiene como objetivo velar el manejo adecuado de los desperdicios peligrosos y no peligrosos. Esta ley pretende identificar y reducir la generación del desperdicio; mantener un almacenamiento, transporte y disposición final adecuada según sea el desperdicio. Esta ley está ampliamente relacionada a la ciénaga, ya que, prohíbe arrojar desperdicios a cuerpos de agua, sobre todo, en la ciénaga. En caso de violación a esta ley, la EPA se encargará de investigar y penalizar a los violadores.

*“Emergency Wetlands Resource Act”*

Esta ley fue creada para promover la conservación de los humedales para el beneficio público y para ayudar a cumplir las obligaciones internacionales de especies migratorias amenazadas. La ley autoriza la compra de humedales por el Fondo de Conservación de Tierras y Aguas (Land and Water Conservation Fund) y se requiere que se cree un plan de manejo y conservación de los humedales. También, requiere que haya un inventario de los humedales donde se evalúe el número de acres de humedales y el porcentaje de la pérdida de acres.

### *Ley de manejo de zona costanera de 1972 (Coastal Zone Management Act)*

El Congreso de los Estados Unidos promueve el uso, mantenimiento, protección, y desarrollo de la zona costanera debido a su calor natural, comercial, recreacional, ecológico, industrial y estético. Además, incluye requisitos para la construcción de industrias, comercios y residencias; para la extracción de minerales o combustible fósil y para su uso recreacional. Por otro lado, el Congreso exige la protección y manejo de recursos naturales incluyendo los humedales, estuarios, playas, dunas barreras de islas, arrecifes de coral, peces, vida silvestre y su hábitat en la zona costanera para disminuir su pérdida. Bajo esta ley el Estado Libre Asociado de Puerto Rico ha desarrollado un plan de manejo para proteger los humedales y mangles (Adams et al., 1992). Además, se designa a la Bahía de Jobos como el sitio número once (11) en el Sistema de Reservas Nacionales de Investigación Estuarina (Field et al., 2008).

### *Agencias Privadas*

#### *El Fideicomiso de Conservación de Puerto Rico*

Es la principal organización privada envuelta en la conservación y manejo de los humedales en Puerto Rico.

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

En este capítulo detallamos la metodología utilizada para la investigación. Describimos los procedimientos realizados para obtener el perfil bacteriano a partir del DNA extraído de sedimentos recolectados del suelo cercano a algún árbol de mangle negro o de mangle blanco de la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos. Mediante esta investigación obtuvimos un listado de bacterias potenciales para la biorremediación de suelo de mangle contaminado con compuestos orgánicos volátiles y clorinados.

#### **Área de estudio**

Realizamos el estudio en la Ciénaga las Cucharillas al norte de Puerto Rico en el municipio de Cataño y en la Reserva Nacional de Investigación Estuarina Bahía de Jobos (JBNERR) localizada en la costa sureste de Puerto Rico entre los municipios de Salinas y Guayama. El norte de Puerto Rico se caracteriza por tener mayor cantidad de ríos superficiales, lagos y humedales. La costa sureste consiste en un régimen de baja energía, poca lluvia, altas temperaturas, en comparación con el norte de la Isla y poca agua potable proveniente de escorrentías (Demopoulos, 2004).

La Ciénaga las Cucharillas se encuentra entre la latitud 18.445 y la longitud -66.14. La ciénaga está constituida por 500 acres de humedal de agua dulce (San Juan Bay Estuary Program, 2000). La Ciénaga las Cucharillas colinda con la carretera PR-165 al norte, con el complejo de viviendas Coquí I y II por el este, con la comunidad William

Fuentes por el oeste y con la comunidad Juana Matos por el sur. La Ciénaga las Cucharillas se compone de bosques de mangle, humedales y áreas abiertas con agua donde sus aguas llegan al Estuario Bahía de San Juan a través del Caño la Malaria (EPA, 2004).

La Reserva Nacional de Investigación Estuarina Bahía de Jobos consiste de cayos, arrecifes de coral, canales y lagunas cubiertas de mangle y ocupa una superficie de 11 km<sup>2</sup> (2,800 acres) (Ramírez-Ochoa, 2005). El estuario colinda con una planta de procesamiento de carne, el vertedero BFI, la pista de carrera de autos al norte, la termoeléctrica de Aguirre, una planta de reciclaje de gomas y el antiguo Molino de la Central Aguirre al noreste, industrias químicas y farmacéuticas al oeste y la Refinaría de Petróleo Phillips al este (Field et al., 2008). La Bahía de Jobos se compone mayormente de bosques de mangle en especial mangle rojo y mangle negro con sistemas de canales salinos y llanos de barro (Field et al., 2008).

Colectamos sedimento de diversos puntos de la Ciénaga las Cucharillas y de la Bahía de Jobos donde la vegetación predominante eran árboles de mangle blanco y mangle negro. Identificamos cada punto mediante el Sistema de Posicionamiento Global (GPS por sus siglas en inglés) y determinamos la latitud y longitud donde tomamos las muestras. En la Ciénaga las Cucharillas tomamos muestras en dos (2) áreas: en los terrenos de Bacardí cedidos a la UMET (18°26'46"N, 66°09'12"W) y en el Barrio Palmas (18°27'80"N, 66°08'52"W) (Figura 1). En el Estuario Bahía de Jobos tomamos muestras en dos (2) áreas: Cerca del Muelle JBNERR (Jobos Bay National Estuarine Research Reserve) (17°57'28" N, 66°13'06" W) y al lado de la termoeléctrica (17°57'00" N, 66°14'39" W) (Figura 2).



## **Descripción de la muestra**

Obtuvimos las muestras del suelo o sedimento de la Ciénaga las Cucharillas y del suelo o sedimento del Estuario Bahía de Jobos. Recolectamos el sedimento de áreas cercanas a las raíces o el tallo de árboles de mangle blanco o negro. La muestra de suelo no debe poseer raíces o piedras. La cantidad de suelo que extraímos fue de 15 centímetros y eliminamos los primeros 5 centímetros para que no posea material orgánico, por ejemplo, hojas, ramitas o insectos. Entre las estaciones de muestreos 1 y 2 ó 3 y 4 dejamos una distancia de aproximadamente 10 pies o más. Recuperamos las muestras de la Ciénaga las Cucharillas en los terrenos cedidos por Bacardí a la UMET, de áreas de la Ciénaga las Cucharillas en el Barrio Palmas y del Estuario Bahía de Jobos cerca del Muelle JBNERR y de los terrenos adyacentes a la termoeléctrica.

## **Periodo de estudio**

Recolectamos sedimentos en el suelo de la Ciénaga las Cucharillas y realizamos dos (2) muestreos en los meses de junio y agosto. Luego procedimos a realizar todo el protocolo para T-RFLP, durante aproximadamente 2 meses, luego de cada muestreo para la elaboración y análisis de las muestras. En cada muestreo tomamos 4 muestras de Ciénaga las Cucharillas y 4 muestras de Bahía de Jobos. Identificamos las estaciones de la siguiente manera: Cucharillas 1 y Cucharillas 2 para los terrenos de la UMET en Ciénaga las Cucharillas, Cucharillas 3 y Cucharillas 4 para los muestreos en Barrio Palmas. Identificamos las estaciones en Bahía de Jobos de la siguiente manera: Jobos 1 y Jobos 2 para los terrenos cerca del muelle JBNERR y Jobos 3 y Jobos 4 para los predios de mangle seco al lado de la termoeléctrica. Por cada punto de muestreo tomamos una

muestra y una réplica (Por ejemplo, en el Barrio Palmas la muestra sería Cucharillas 3 y la réplica sería Cucharillas 4). Obtuvimos de esta manera (8) muestras por mes investigado en cuatro (4) puntos de muestreo y dos (2) muestras por sitio (muestra + replica).

### **Diseño metodológico**

Para esta investigación recolectamos muestras de sedimento de áreas de mangle negro y/o blanco. A las muestras ambientales se le extrajo el DNA, el cual, fue amplificado por medio de PCR. Según Gruntzig, Stres, Ayala del Río & Tiedje (2002), los genes de las bacterias se amplifican usando marcadores de DNA fluorescentes mediante el primer. Esto proporciona una mezcla de amplicón del mismo tamaño con un extremo fluorescente donde posteriormente cortará la enzima de digestión. El amplicón será digerido por medio de una enzima de restricción la que genera fragmentos de diferentes tamaños. Estos fragmentos se separan a través de la electroforesis capilar. Luego el secuenciador automático se encarga de leer y detectar los fragmentos y genera el perfil bacteriano (Applied Biosystem, 2005).

La metodología de esta investigación se divide en varias fases que envuelven el análisis de T-RFLP por electroforesis capilar (Figura 3).

#### **Recolección de muestras de suelo**

Para tomar las muestras de suelo, utilizamos un barreno en T (Apéndice 2), el cual, se sumerge en el suelo y se le da vueltas y se saca del suelo. Recolectamos 15 centímetros de suelo de cada estación y eliminamos los primeros cinco (5) centímetros de

suelo o donde se encuentre material vegetativo. Colocamos las muestras en bolsas “Ziplock” bien selladas. Las muestras recolectadas las almacenamos en hielo hasta llegar al laboratorio a una temperatura aproximada de 4° C para evitar que se degrade el DNA. Recolectamos 2 muestras de cada área para tener un total de cuatro (4) estaciones de muestreo en Ciénaga las Cucharillas y cuatro (4) estaciones de muestreo en Bahía de Jobos. Identificamos cada muestra con la fecha, hora, localización, cantidad de suelo (10 cm), tipo de mangle presente, coordenadas (latitud y longitud) de cada estación y medimos el parámetro de temperatura. Por cada extracción de suelo lavamos el barreno con agua destilada seguida por etanol y luego agua destilada nuevamente para evitar pasar DNA de una estación de muestreo a otra. En cada punto de muestreo colocamos un banderín amarillo para identificar el área y sacamos fotografías de cada estación de muestreo (Apéndice 2-5).

#### Por ciento de Humedad y Análisis de pH

Es necesario conocer el porcentaje de humedad y el pH debido a que estos factores abióticos influyen en el crecimiento de las bacterias. Para determinar el peso húmedo de la muestra pesamos 1 gramo de suelo (Globe, 2005). Este gramo lo secamos a 105° C durante 48 horas y determinamos el peso seco de la muestra. El porcentaje de humedad lo determinamos restando el peso húmedo del peso seco y lo multiplicamos por 100. Pasadas las 48 horas pesamos en seco y determinamos el pH siguiendo el protocolo de Globe, (2005). Para determinar el pH mezclamos el suelo seco con agua destilada en una solución de 1:1. Luego mezclamos el suelo 30 segundos, esperamos 3 minutos para volver a mezclar durante 30 segundos. Este paso de mezclar y esperar se repite cinco (5)

veces. La quinta vez esperamos 5 minutos para que se asiente. Luego colocamos el papel de medir pH en el sobrenadante.

#### Extracción de DNA

La extracción de DNA la realizamos siguiendo las instrucciones del fabricante; utilizamos el protocolo de PowerSoil DNA Isolation Kit de MO BIO.

NOTA: Se recomienda el uso de guantes en todo momento y un área limpia para evitar contaminación de la muestra. Así como descartar las puntas de las pipetas en cada uso.

En este protocolo colocamos 0.25 g de muestra de suelo en el tubo Power Bead y lo mezclamos con “vortex”. Añadimos 60µl de la solución C1 y la mezclamos con “vortex” rápidamente y luego durante 10 minutos acostados (ajustamos con cinta adhesiva para evitar que se salga). Centrifugamos a 10,000 x g durante 30 segundos y transferimos el sobrenadante a un tubo de colección de 2 ml. Añadimos 250µl de la solución C2 y mezclamos con “vortex” por 5 segundos e incubamos a 4° C por 5 minutos. Procedimos a centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto y a remover 600µl de sobrenadante a un tubo de colección de 2 ml. Añadimos 200µl de la solución C3 y mezclamos con “vortex” brevemente e incubamos a 4° C por 5 minutos. Luego, centrifugamos a 10,000 x g durante 1 minuto y removimos 750µl de sobrenadante a un tubo de colección de 2 ml. Añadimos 1,200µl de la solución C4 al sobrenadante y mezclamos con el “vortex” durante 5 segundos. Movimos 675µl de esa solución a un tubo con Spin Filter, centrifugamos durante 1 minuto, removimos el sobrenadante. Añadimos 675µl más de la solución centrifugamos durante 1 minuto, removimos el sobrenadante y añadimos el restante de la solución. Por último, centrifugamos durante 1

minuto y removimos el sobrenadante. Este proceso lo realizamos 3 veces; el Spin Filter aguanta el “pellet” evitando que baje al centrifugarse. Luego, añadimos 500µl de la solución C5 y centrifugamos durante 30 segundos. Colocamos el Spin Filter en un tubo de colección limpio y añadimos 100µl de la solución C6 en el centro del filtro. Finalmente, centrifugamos durante 30 segundos y descartamos el filtro. El líquido restante es el DNA, el cual, almacenamos congelado de -20° C a -80° C para preservarlo (MO BIO Laboratories Inc., 2007).

#### PCR -“Polimerase Chain Reaction”

Diluciones: En tubos Eppendor de 2 µl añadimos: 1 µl de DNA extraído y 45 µl de agua para realizar dilución 1/10. Del tubo 1/10 sacamos 5 µl en 45 µl de agua a otro tubo para dilución 1/100. Realizamos diluciones de 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/5,000 y 1/15,000. De estas diluciones partimos para realizar el PCR.

Las diluciones para los “primers” las realizamos en agua estéril. De esa dilución realizamos un “stock”, el cual, se congelará y será de 100µM. Del stock sacamos 10µM que conocemos como la solución de trabajo (el stock sólo se recarga cuando la solución de trabajo se termina). Los “primers” o iniciadores específicos para bacterias son el 27 F y el 1525 R. Para amplificar el DNA utilizamos en protocolo de la Guía de Protocolos Moleculares de la Dra. Sharon Cantrell y Claribel Báez. Para amplificar la muestra ambiental utilizamos: 12.5µl de la solución Red Taq Ready Mix, 1.25µl del “primer” 27 F, 1.25µl del “primer” 1525 R, 9µl de agua y 1µl de DNA (de la dilución que se desea amplificar). El DNA debe ser el último en añadirse a la solución de PCR para evitar que se contamine o degrade. Estos reactivos los añadimos a un microtubo que mezclamos

con “vortex” por varios segundos. Los microtubos no deben tener burbujas y deben estar debidamente rotulados. Realizamos PCR con control negativo (se añade agua) y control positivo (experimental). Las muestras las colocamos en el termociclador (máquina para PCR) y seleccionamos el programa ya determinado que consiste en un patrón de 35 ciclos con distintas temperaturas y tiempos. El programa que utilizamos fue el siguientes: 94° C durante 5 minutos para la desnaturalización inicial del DNA, 92° C durante 30 segundos para la desnaturalización del DNA, 52° C durante 30 segundos para el acoplamiento, 72° C durante 30 segundos para la extensión del DNA y 72° C durante 10 minutos para la extensión final del DNA. Al final, obtuvimos los fragmentos específicos de DNA bacteriano.

#### Digestión del DNA amplificado mediante enzimas de restricción

Según la Guía de Protocolos de Moleculares de la Dra. Sharon Cantrell y Claribel Báez. La digestión del DNA amplificado utiliza: 2µl de solución amortiguadora Buffer G, 0.2µl de la enzima MnII, agua destilada, y el amplicón o producto de PCR (al menos 10 ng); obtuvimos un total de 20 µl. La cantidad de amplicón utilizada depende de la cantidad de DNA de cada muestra. Incubamos las muestras a 37° C durante 120 minutos. Luego, precipitamos la muestra y la resuspendimos en 14.8 Hi-Di Foramamida y 0.2 GenScan Liz Standard.

#### Precipitación de DNA

Luego de la digestión del DNA amplificado procedimos a precipitar el DNA. La precipitación de DNA es un paso selectivo y efectivo en la preparación del DNA donde

se utilizan precipitantes como sales, alcoholes, glicol, cationes, cetyltrimethylamonia y otros para este propósito (Tomanee, P., & Hsu, J., 2006).

Para precipitar el DNA preparamos en un microtubos un coctel con 49µl de Di H<sub>2</sub>O, 6µl de Acetato de Sodio 3 M con pH de 5.2 y 125µl de Etanol 95%. Mezclamos bien y e incubamos a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego centrifugamos a 5° C a 13,000 rpm durante 20 minutos (centrífuga refrigerada), sacamos el sobrenadante y añadimos 250µl de etanol 70% para lavar el etanol 95%. Centrifugamos a 5° C a 13,000 rpm durante 5 minutos y aspiramos el sobrenadante. Dejamos secar las muestras en Speed Vac a 37° C durante 10 minutos. Luego, preparamos un coctel con 14.8µl de HiDI formamida (CH<sub>3</sub>NO) y 0.2µl de GenScan Liz 500 Standard, el cual, añadimos a los microtubos con tapa de goma que colocamos en al termociclador a 95° C durante 5 minutos para desnaturalizar las muestras. Al terminar la desnaturalización colocamos las muestras en baño de agua fría durante 2 minutos para provocar “shock” térmico. Luego las colocamos en la máquina de secuenciar.

Visualización de los fragmentos digeridos mediante el uso de un secuenciador automático.

El secuenciador automático o máquina de secuenciar es un instrumento que se utiliza para lograr el T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphysm). El cual consiste en un programa en una computadora que va conectada a una máquina para secuenciar. Luego que termina de interpretar la data mediante un láser se traduce la información a una serie de picos en una gráfica donde cada pico representa un filotipo, grupo, género, o una especie de bacterias que se encuentran en la muestra.

## **Análisis de datos**

Logramos el análisis de datos utilizando el programa que trae el secuenciador automático Applied Biosystems Gene Mapper 4.0 (Applied Biosystem, 2005). El secuenciador automático produce una serie de picos, los cuales, generan una serie de tablas con los pares de bases, la altura y el tamaño de cada pico. Luego, realizamos una matriz para determinar en qué muestreo hay bacterias. Esta matriz la introducimos en el programa MiCA (Microbial Community Analysis III), el cual, contiene la secuencia de genes del rRNA 16S. El MiCA (APLAUS+) compara la data de uno o más T-RFLP que provengan de análisis en silica utilizando los primers y las enzimas (DeSantis, Dubosarskiy, Murray & Andersen, 2010). MiCA analiza el perfil de T-RFLP, el cual, se obtiene mediante este una serie de posibles bacterias por cada par de base. Estas bacterias las organizamos en una tabla, según el muestreo y estación de muestreo para (Objetivo1) comparar el perfil de la comunidad bacteriana de la Ciénaga las Cucharillas con el perfil de la comunidad bacteriana del Estuario Bahía de Jobos durante dos estaciones (seca y lluviosa). Este programa lo utilizamos para analizar el perfil bacteriano obtenido por medio de los fragmentos de DNA del suelo de la ciénaga y del estuario. Objetivo 2: Determinar la diversidad y la abundancia de las comunidades bacterianas en la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos mediante T-RFLP. Para determinar la diversidad utilizamos los pares de bases, contamos la cantidad de pares de bases obtenidos en el muestreo y calculamos el promedio. Para determinar la abundancia sumamos la altura de los picos de una estación de muestreo y calculamos el promedio. Para este objetivo realizamos un análisis estadístico avanzado utilizado el programa IBM SPSS Statistics 19, tanto para la diversidad como para la abundancia.



Para el análisis estadístico realizamos la prueba de T en pares comparando el primer muestreo de Cucharillas con el segundo muestreo de Cucharillas, el primer muestreo de Jobs con el segundo muestreo de Jobs, el primer muestreo de Cucharillas con el primer muestreo de Jobs y el segundo muestreo de Cucharillas con el segundo muestreo de Jobs. Objetivo 3: Determinar el potencial de biorremediación de contaminantes clorinados o volátiles que poseen los microorganismos encontrados mediante la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). Para determinar el potencial de biorremediación restringimos la búsqueda a aquellas bacterias que puedan biorremediar contaminantes clorinados y volátiles que aparezcan, tanto en los datos, como en literatura citada.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta parte de nuestra investigación, presentamos los resultados obtenidos de los análisis de las muestras que tomamos. Determinamos las bacterias presentes en las muestras recolectadas de la Ciénaga las Cucharillas y las comparamos con las bacterias presentes en el Estuario Bahía de Jobos. De las muestras tomadas evaluamos cuál fue la diversidad y la abundancia de las comunidades bacterianas en ambos lugares de muestreo. Por otro lado, evaluamos el posible potencial de biorremediación que tienen estos organismos ante la posible presencia de contaminantes clorinados y volátiles resultantes de las actividades humanas llevadas a cabo en los alrededores de las áreas estudiadas.

#### **Perfil de la comunidad bacteriana de la Ciénaga las Cucharillas con el perfil de la comunidad bacteriana del Estuario Bahía de Jobos durante dos estaciones (seca y lluviosa).**

Las bacterias encontradas en las diferentes áreas de muestreo resultaron ser similares al comparar Ciénaga las Cucharillas con Bahía de Jobos lo que varía es la presencia de ellas en los muestreos y la cantidad presente en cada muestreo (Objetivo 2). El T-RFLP nos ayuda a examinar las muestras ambientales y los parámetros presentes que puedan afectar los microorganismos encontrados (Applied Biosystem, 2005). Entre los parámetros podemos destacar: la temperatura, la cantidad de luz solar que recibía, el

pH, el tipo de mangle, cantidad de raíces que había en la muestra de suelo, la cantidad de agua presente en la muestra (Tabla 1 y Tabla 2).

La cantidad de luz solar que recibe cada estación de muestreo es determinante en el aumento o disminución de la temperatura del área de muestreo. Por ejemplo, en las estaciones Jobs 3 y Jobs 4 de los muestreos 1 y 2 recibían directamente la luz del sol, por tanto, las temperaturas eran más altas mientras que en las estaciones de Jobs 1 y Jobs 2 las temperaturas eran más bajas debido a la gran cantidad de vegetación presente. En las bacterias las temperaturas calientes pueden alterar el metabolismo de las bacterias provocando que su crecimiento aumente, en cambio, temperaturas más bajas causan que el crecimiento disminuya (Presscott, L. M., et. al, 2002). La temperatura del suelo obtenida en los datos recolectados depende de la hora del día en que fue recolectada la muestra (Tabla 1 y Tabla 2). Durante el mes de junio (nos referiremos a este mes como la estación seca) la temperatura del suelo variaba de 21° C a 23.5° C en la Ciénaga las Cucharillas y de 25° C a 35° C en Bahía de Jobs. Durante la estación húmeda (muestras recolectadas durante el mes de agosto) la temperatura variaba desde un 23.5° C a 27° C en Ciénaga las Cucharillas y de un 28.7° C a un 32.8° C en Bahía de Jobs.

La humedad del suelo está influenciada por muchos factores medio ambientales, como la temperatura, la precipitación y el tipo de suelo (Globe, 2005). El factor de la humedad es necesario conocerlo debido a que en ambientes de alta humedad el crecimiento de las bacterias es más rápido (Presscott, L. M., et. al, 2002). Las escorrentías y las inundaciones reducen la cantidad de bacterias del sedimento y pueden verse desplazadas a otras áreas, sedimentarse o morir si no tienen el ambiente propicio para su crecimiento o la capacidad de adaptarse a un cambio drástico. La cantidad de

agua en el muestreo 2 (época lluviosa) fue mayor por lo tanto no había tanta cantidad de bacterias como en el muestreo 1 (época seca). Durante la época seca, en las muestras de Cucharillas 2, 3 y 4 había mucha agua, por lo tanto, el porcentaje de humedad fue de 59.8%, 84.01% y 96.02%, respectivamente, mientras que en las muestras Bahía de Jobos 1 y 2 el porcentaje de humedad fue de 72.77% y 65.17%. Durante la época húmeda, las muestras de Cucharillas 3 y 4 tenían mucha cantidad de agua y, por lo tanto, el porcentaje de humedad resultó ser de 91.27% y 86.68%, respectivamente. En las muestras de Bahía de Jobos 1, la zona de inundación era de 1 a 5 pulgadas y el porcentaje de humedad era de 59.86%, en Jobos 2 recogimos la muestra de la orilla porque la estación se encontraba inundada; el porcentaje de humedad resultó ser de 53.83%. Jobos 3 y 4 se encontrada con el suelo muy húmedo y lodoso y el porcentaje de humedad fue de 38.14% y de 36.69%, respectivamente.

El pH afecta dramáticamente el crecimiento de las bacterias y un simple cambio puede ser letal para ellas. Cada especie tiene su pH óptimo, por ejemplo, muchas bacterias son neutrófilas prefiriendo pH de 5.5 a 8.0 (Presscott, L. M., et. al, 2002). Los pH pueden variar de ácido (0 a 5.5), neutral o alcalino (8.5 a 11.5). Durante la época seca obtuvimos pH's de 6.5 y 7.5 en las muestras recolectadas en la Ciénaga las Cucharillas y pH's de 5.5, 7.5 y 8.0 en Bahía de Jobos. En cambio, en la época húmeda registramos pH's de 6, 6.5 y 7 en Ciénaga las Cucharillas y de 6.5 y 7 en Bahía de Jobos.

Otros factores como el tipo de mangle, cantidad de raíces presentes en la muestra de suelo y la cantidad de agua se tomaron en cuenta. Anotamos el tipo de mangle de donde recolectamos las muestras y no hubo diferencia en la cantidad de bacterias según el tipo de mangle. La cantidad de raíces que había en la muestra de suelo dificultó el

momento de realizar la extracción de DNA, esto se debió a que tuvimos que extraer las raíces para obtener una muestra de sedimento eficiente. Encontramos que la cantidad de agua presente en la muestra afecta directamente en la cantidad de bacterias presente en la muestra. Durante la época seca (mes de junio de 2008) obtuvimos muestreos con mayor cantidad mientras que se nota una gran diferencia en la cantidad de bacterias presentes en la época húmeda (mes de agosto de 2008) (Figuras 4 a la 19).

En el estudio filogenético logramos encontrar una serie de bacterias no cultivables, bacterias sin identificar aún, bacterias candidatas a una división y bacterias cultivables. Encontramos pares de bases correspondientes a bacterias no cultivables en la investigación, como se esperaba, debido a que la técnica del T-RFLP y otras técnicas de la metagenómica determinan el DNA colectivo de la muestra ambiental a través de los “primers”. En la investigación utilizamos los “primers” 27 F y 1525 R específicos para bacterias, los cuales, permiten que se reconozcan bacterias que no se pueden cultivar en el laboratorio debido a que no se han desarrollado las condiciones adecuadas para su cultivo. En nuestra investigación pueden estar presentes bacterias no cultivables como: *uncultured rumen bacterium*, *uncultured endolithic bacterium* y *uncultured soil bacterium*. Del filum *Chloroflexi* las potenciales bacterias no cultivables son las siguientes: *uncultured sludge bacterium* y *uncultured Chloroflexi bacterium*. También, pueden encontrarse bacterias no cultivables del filum Actinobacteria como: *uncultured actinobacterium* y *uncultured Rhodococcus sp.* Bacterias del filum Firmicutes que no pueden ser cultivadas son: *uncultured synthetic wastewater bacterium*, *uncultured eubacterium*, *uncultured Bacillus sp.* y *uncultured Clostridium sp.* Potenciales bacterias no cultivables del filum Proteobacteria son las siguientes: *uncultured proteobacterium*,

*uncultured Comamonadaceae bacterium*, *uncultured Gallionella sp.*, *uncultured Rhodobacteraceae bacterium*, *uncultured Campylobacterales bacterium*, *uncultured Cycloclasticus sp.*, *uncultured Burkholderiales bacterium*, *uncultured Hydrogenophaga sp.*, *uncultured Aquabacterium sp.*, *uncultured Idiomarina sp.*, *uncultured Comamonas sp.*, *uncultured Enterobacteriaceae bacterium*, *uncultured Thiobacillus sp.*, *uncultured Arcobacter sp.*, *uncultured Rhodoferrax sp.*, *uncultured Pseudomonas sp.* y *uncultured Piscirickettsiaceae bacterium*. Bacterias no cultivables del filum Planctomycete son: *uncultured planctomycete* y *uncultured Pirellula*. Del filum Acidobacteria las posibles bacterias son: *uncultured Acidobacteria bacterium* y *uncultured Acidobacterium sp.* Las bacterias no cultivables potencialmente presente en el muestreo del filum Gemmatimonadetes es *uncultured Gemmatimonadetes bacterium*, del filum Elusimicrobia es *uncultured Termite group 1 bacterium phylotype Rs-D17* y del filum Cyanobacteria es *uncultured cyanobacterium*. (Tabla 3).

En las muestras determinamos la verosímil presencia de bacterias sin identificar como: *unidentified eubacterium* y *unidentified Clostridiaceae*. Además, para los pares de bases pudimos identificar bacterias candidatas a una división. Entre ellas cabe mencionar: *Candidatus Burkholderia kirkii*, *Candidatus Burkholderia calva*, *Candidatus Burkholderia nigropunctata*, *Candidatus Burkholderia verschuerenii*, *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*, *Candidatus Procabacter sp.*, *Candidatus Desulforudis audaxviator*, *Candidatus Ruthia magnifica str. Calyptogena magnifica*, *Candidatus Vesicomysocius okutanii* y *Candidatus Tremblaya princeps* (Tabla 3).

Los “primers” 27 F y 1525 R permitieron que solo bacterias fueran identificadas en los picos generados por el secuenciador automático. Para ver los picos diríjase desde la figura 4 hasta la figura 19. En cuanto al perfil bacteriano nuestro estudio filogenético reveló que el muestreo con mayor cantidad de bacterias fue Jobos 2 del muestreo 1 con 50 pares de bases siguiéndole Cucharillas 1 del muestreo 1 con 43 pares de bases. En el muestreo 1 Cucharillas obtuvo mayor diversidad de bacterias en comparación con Cucharillas en el muestreo 2 y Jobos en el muestreo 1 también obtuvo mayor diversidad de bacterias que en el muestreo 2. Pero entre Cucharillas y Jobos el más diverso fue Cucharillas con un total de 134 pares de bases en las que se pueden identificar bacterias. Entre las bacterias identificaremos aquellas con potencial de biorremediación de contaminantes clorinados y volátiles (a discutirse en el Objetivo 3). La mayor cantidad de TRFLP se obtuvo en los pares de bases 164, 163, 135, 132, 130, 125, 124, 123, 112, 96, 95, 94, 92, 88, 84, 81, 69, 56, 55, 53, 51 y 6 (ver análisis de abundancia en el Objetivo 2).

**Diversidad y abundancia de las comunidades bacterianas en la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos mediante la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).**

**Diversidad**

En nuestro estudio nos referimos a diversidad como el número de filotipos de cada comunidad; los filotipos son los pares de bases. En cuanto a la diversidad de bacterias encontradas en Ciénaga las Cucharillas, la desviación estándar calculada durante el muestreo de julio fue de 9.88 mientras que la del muestreo de septiembre fue de 6.18.

La desviación estándar en Bahía de Jobos durante en muestreo de julio fue de 12.69 en comparación con el muestreo de septiembre que resultó ser de 9.11. Para el análisis de hipótesis utilizamos el programa IBM SPSS Statistics 19. Determinamos en varias pruebas de T en pares la relación entre 2 puntos de muestreo con 95% de confiabilidad. En el muestreo 1 Cucharillas vs. muestreo 1 Jobos obtuvimos significancia de 0.981. En el muestreo 2 Cucharillas vs. muestreo 2 Jobos la significancia obtenida resulto ser 0.094. En el muestreo 1 Cucharillas vs. muestreo 2 Cucharillas la significancia fue de 0.080. En el muestreo 1 Jobos vs. muestreo 2 Jobos obtuvimos una significancia de 0.131. Estas significancias al ser mayores de 0.05 son indicativas de que no hubo una diferencia significativa entre los muestreos. Por ende, el proceso de biorremediación no es influido por la cantidad de agua presente en los muestreos o por la estación del año. Esto quiere decir que la biorremediación se puede realizar durante todo el año y siempre van a haber bacterias biorremediadoras en los puntos de muestreo. La Figura 20 nos permite ver que durante la época seca hay mayor diversidad de bacterias en comparación con la época lluviosa. Además, podemos ver que Cucharillas y Jobos se semejan en la diversidad durante la época seca.

La diversidad de bacterias en el suelo de mangle puede ser indicativo de la presencia de bacterias capaces de: volatilizar, fijar, oxidar y reducir elementos y compuestos así como, degradar contaminantes y biorremediar los suelos, degradar material orgánico entre otros. Por ejemplo, existe la posibilidad de tener bacterias resistentes a arsénico, un metaloide que se distribuye en los suelos de fuentes naturales o antropogenicas proveniente de prácticas de agricultura (Pepi, M., Volterrani, M., Renzi, M., Marvasi, M., Gasperini, S., Franchi, E., et al., 2007). Entre las bacterias resistentes a



arsénico presentes en los muestreos podemos destacar los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. *Bacillus* está presente en el muestreo 1 Cucharillas 1, Cucharillas 2, Cucharillas 3 y Cucharillas 4; Jobs 2, Jobs 3 y Jobs 4 y muestreo 2 Cucharillas 1, Jobs 1, Jobs 2, Jobs 3 y Jobs 4. *Pseudomonas* está presente en el muestreo 1 en Cucharillas 2, Cucharillas 3 y Cucharillas 4; Jobs 1, Jobs 2, Jobs 3 y Jobs 4. El pico de 217 pares de bases es muy importante, pues nos indica la posible presencia de géneros de bacterias como: *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, y *Bacillus*. Estas son unas de tantas bacterias consideradas patógenas para los seres humanos. La detección de indicadores patogénicos como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Pseudomona aeruginosa* es mandatorio en pruebas de calidad microbiológica (Farajnia, S., Hassan, M., Nezhadi, S., Mohammadnejad, L., Milani, M. & Lotfipour, F., 2009).

#### Abundancia

En el estudio nos referimos a abundancia como el tamaño de los picos (su altura), los cuales, representan cuanto de cada filotipo está presente en la muestra o cuanta fluorescencia fue absorbida o sea, la abundancia es el total de los "individuos" presentes en una comunidad bacteriana. El uso de la altura de los picos representan los fragmentos que se expanden durante la electroforesis (Grant, A. & Ogilvie, L., 2003). Mediante la Figura 21 podemos ver que en el muestreo 1 Jobs fue el más abundante de todos los muestreos realizados, luego le sigue Cucharillas del muestreo 1 estos dos muestreos obtuvieron mayor cantidad de filotipos. El segundo muestreo fue menos abundante en comparación con el primer muestreo debido a la cantidad de agua presente en las muestras.

En el muestreo 1 las muestras con mayor abundancia son Cucharillas 1 que tiene un pico de 112 pares de bases y con una altura de 747 (Figura 4). Cucharillas 2 con un pico de 164 y altura de 883 y otro pico de 130 pares de bases con 814 de altura (figura 5). Cucharillas 3 posee un pico de 132 pares de bases y altura de 586 altura (figura 6) mientras que Cucharillas 4 tiene pico de 164 con altura de 2086 (Figura 7). En Jobs 1 el pico de 53 pares de bases posee una altura de 2899 (Figura 8), Jobs 2 posee un pico de 56 pares de bases con altura de 781 (Figura 9). El pico más alto de Jobs 3 es de 1460 y se ubica en 123 pares de bases y le sigue otro pico con altura de 1078 y 135 pares de bases (Figura 10). En Jobs 4 el pico de 164 posee una altura de 2643 y el otro pico con mayor altura es de 1155 y 124 pares de bases (Figura 11). Las muestras que presentan mayor abundancia del muestreo 2 son las siguientes: Cucharillas 1 con picos de 92 y altura de 1623 (Figura 12). El pico más alto de Cucharillas 2 posee una altura de 2671 y 96 pares de bases (Figura 13), Cucharillas 3 posee su pico más alto de 3059 en 95 pares de bases (Figura 14) y en Cucharillas 4 el pico más alto ubica en 92 pares de bases con altura de 1996 (Figura 15). En el segundo muestreo Jobs 1 posee su pico más alto de 2974 y 53 pares de bases (Figura 16). El pico más alto de Jobs 2 tiene altura de 1567 en 88 pares de bases (Figura 17), mientras que Jobs 3 tiene picos de 88 pares de bases con altura de 3171(Figura 18). Por último, Jobs 4 posee su pico más elevado de 3548 y 88 pares de bases (Figura 19). Para ver análisis de abundancia diríjase a la Tabla 4. Por otro lado, el pico de 164 pares de bases se repite en los muestreos 1; Cucharillas 1, Cucharillas 2, Cucharillas 3, Cucharillas 4, Jobs 1, Jobs 3 y Jobs 4. El pico de 53 pares de bases se frecuenta en los muestreos 1; Jobs 1, Jobs 3 y en el muestreo 2; Cucharillas 4, Jobs 1 y Jobs 2. El pico de 55 pares de bases se exhibe en el muestreo 1;

Jobs 1 y en el muestreo 2; Jobs 1 y Jobs 2. En el muestreo 1 en Jobs 2, Jobs 3 y Jobs 4 se presenta un pico de 124 pares de bases. El pico de 92 pares de bases es abundante en el muestreo 2 en Cucharillas 1 y en Cucharillas 4. Un pico de 88 pares de bases es abundante en el muestreo 2 estaciones Jobs 2, Jobs 3 y Jobs 4. El punto de muestreo con mayor cantidad de filotipo ubica en Jobs 4 durante el muestreo 2 y le sigue Jobs 3 en el muestreo 2. En esta zona de muestreo predomina el mangle muerto y es común para ambas estaciones los pares de bases que son ambos de 88 pb. Estos pico indican la presencia de posibles bacterias como: *uncultured Thiobacillus sp.*, *Virgibacillus marismortui*, *Bacillus sp.*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Pseudomonas cichorii* y *uncultured bacterium* (Tabla 4).

La desviación estándar de la abundancia de filotipos presentes en Ciénaga las Cucharillas durante el mes de julio fue de 947.50 en comparación con el mes de septiembre que resultó ser 913.98, lo que se asemeja bastante al comparar las dos estaciones. Por el contrario, en Bahía de Jobs la desviación estándar durante el mes de julio resulto ser más baja con 416.19 y en el mes de septiembre fue mayor de 1302.93. Mediante el programa de analisis estadístico IBM SPSS Statistics 19 realizamos la prueba de hipótesis con un porcentaje de error de un 5% (95% de confiabilidad). En el muestreo 1 Cucharillas vs. muestreo1 Jobs la significancia resultó ser de 0.184. En el muestreo 2 Cucharillas vs. el muestreo 2 Jobs la significancia fue de 0.312. La significancia del análisis de pares del muestreo 1 Cucharillas comparado con el muestreo 2 Cucharillas es fue de 0.053. Durante el Muestreo1 Jobs vs. Muestreo 2 Jobs la significancia resultante fue de 0.049 la cual redondeamos a 0.05. Este análisis es indicativo de que no hubo diferencia significativa entre muestreos por ende, la biorremediación no se ve

afectada por la estación del año ni por la cantidad de agua presente en el sedimento de mangle por lo tanto las bacterias están presentes para biorremediar durante todo el año.

**Potencial de biorremediación de contaminantes clorinados o volátiles que poseen los microorganismos encontrados mediante la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).**

Los contaminantes ambientales son compuestos que son tóxicos para los organismos vivos, los cuales, son liberados a ecosistemas, usualmente, a consecuencia de actividades humanas (Díaz, E., 2004). Los mangles son expuestos a contaminantes ambientales como derrames de petróleo, pesticidas, herbicidas, compuestos tóxicos, contaminantes industriales, lixiviados de los vertederos legales y clandestinos, aguas termales provenientes de termoeléctricas, entre otras muchas causas. Por esta razón se han generado tecnologías como la biorremediación para la limpieza de los suelos impactados. La biorremediación es un proceso biológico en donde microorganismos como las bacterias degradan contaminantes hasta compuestos no tóxicos presentes en suelo, agua o aire (Olguín, E. J., Hernández, M. E. & Sánchez-Galván, G., 2007). La biorremediación es una acción de respuesta a una crisis ambiental y su ejecución depende de factores físicos y químicos (Massol-Deyá, A., 2000). Según Massol-Deyá (2000), para poder biorremediar el microorganismo debe tener la actividad enzimática necesaria y debe vivir en el área a biorremediar, el sustrato debe ser biorremediable, el químico debe estar accesible al microorganismo pues muchas veces el sustrato puede prevenir que los organismos crezcan y, por ende, evita que desaparezca el contaminante del sitio. La biorremediación para las bacterias es un proceso de ganancia de nutrientes y energía al

transformar el contaminante. Para el microorganismo es una ventaja, pues aumenta su cantidad poblacional a medida que descompone el contaminante. La biorremediación utilizando microorganismos es la mejor alternativa tecnológica correctiva (Massol-Deyá, A., 2000). Se puede llegar a la reducción o degradación de compuestos orgánicos volátiles y clorinados mediante aclimatación del área (Bayle, Malhautier, Degrange, Godon & Fanlo, 2009). Por ejemplo, se puede reducir compuestos como: metanol, acetona, metil etil cetona (MEK), metil isobutil cetona (MIBK), butil, acetato de etilo, tolueno, etilbenceno (EB), p-xileno, diclorometano y 1,2-dicloroetano al proveer fenol como fuente de carbono y energía y la bacteria *Acinetobacter radioresistens* (Bayle et al., 2009).

Tomando en cuenta de que solo un pequeño porcentaje del total de las bacterias observadas en la muestra ambiental a través de los datos obtenidos por el T-RFLP pueden ser cultivadas decidimos investigar aquellas bacterias que son capaces de biorremediar contaminantes clorinados o volátiles del sedimento de la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos. Entre los contaminantes clorinados podemos mencionar los: bifenilos policlorados (PCBs), ácidos clorobenzoicos, iones de cloruro, pentaclorobifenilos, hexaclorobifenilos, organoclorados, hidrocarburos clorados y otros. Entre los compuestos volátiles podemos destacar el formaldehído, el clorobenceno, el tolueno, el xileno, la acetona, el tetracloroetileno, tetracloruro de carbono y el tricloroetano, cloruro de metilo y el benceno. La bacteria *Dehalococcoides sp.* es capaz de degradar contaminantes como el tetracloroetileno en presencia de la bacteria *Pseudomonas putativa*. Este contaminante fue encontrado recientemente en pozos de agua potable de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados. Bacterias como *Azoarcus*

*sp.* puede degradar contaminantes como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (López, Quintero, Guevara, Jaime, Gutiérrez, & Miranda, 2006).

Según De Giorgis F., Schwarz I., Chamy, R. & Schiappacasse M.C. (2003), el uso de bacterias para biorremediar suelos contaminados con compuestos clorados como el PCB es una técnica muy eficiente. Su eficiencia es de más del 70%, es una técnica de bajo costo que no produce emanaciones al aire, la puede llevar a cabo bacterias anaerobias y aerobias y es efectiva pues se puede lograr que se mineralice completamente los compuestos clorados. Muchos compuestos químicos son tóxicos y persisten por largos periodos de tiempo en el ambiente (Massol-Deyá, A., 2000). Mientras más tiempo permanezcan en el ambiente más riesgo existe que se afecten poblaciones susceptibles. Los microorganismos pueden biorremediar de manera natural (biodegradar), por ejemplo, *Thiobacillus thiooxidans* que tiene la capacidad de recuperar cobre en un 70 % (Prescott, L. M., 2002). *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculu* (presentes en nuestro muestreo), reducen sulfatos de sedimentos de mangle (Kathiresan & Bingham, 2001). Las cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno en los neumatóforos de los arboles de mangle (Kathiresan et al., 2001). Otras bacterias de nuestro muestreo capaces de fijar nitrógeno son: las cianobacterias, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Vibrio*, *Listonella* y *Bacillus*. Estas tienen efecto beneficioso pues proveen nutrientes al árbol, producen hormonas de crecimiento y actividad antimicrobial que inhiben microorganismos patógenos en el suelo (Kathiresan, K. & Selvam, M., 2006).

La biorremediación, aunque es un proceso extenso, es más rápido que la descomposición natural de los compuestos. El degradar compuestos altamente clorados puede tardar periodos de 20 semanas mientras que compuestos medianamente clorados se

pueden degradar en 10 a 30 días y puede depender de factores como: pH, temperatura, presencia de otros contaminantes y salinidad del suelo (De Giorgis F., Schwarz I., Chamy, R. & Schiappacasse M.C., 2003). *Comamonas*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium* y *Bacillus* pueden degradar hidrocarburos y PCBs (López, et al., 2006). En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio de gases con la atmósfera y presentan riesgos a la salud humana (Peltola & Salkinoja-Salonen, 2003). Sitios contaminados por hidrocarburos pueden ser biorremediados bajo condiciones anaeróbicas o mediante procesos de aireación con estimulación de denitrificación (Massol-Deyá, A., 2000). Los siguientes géneros de bacterias tienen la capacidad de denitrificar: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Aquifex*. *Alcaligenes*, *Micobacterium* y *Bacteroides* han sido reportados como degradadores de hidrocarburos de petróleo (López, et al., 2006).

Los géneros de bacterias comunes entre este estudio y el realizado por De Giorgis F., Schwarz I., Chamy, R. & Schiappacasse M.C. (2003) se encuentran: *Alcaligenes* presentes en picos de 217 y 219 pb (Tabla 3) y puede cometabolizar tetra-, penta y hexaclorobifenilos. El género *Pseudomonas* es capaz de degradar contaminantes como el tolueno y naftaleno así como contaminantes clorinados como los hexaclorobifenilos. Este género lo podemos encontrar en el pico de: 88, 204, 205, 211, 213, 214 y de 215 pb (Tabla 3). *Pseudomonas sp.* es una bacteria muy estudiada debido a su capacidad para degradar gran variedad de contaminantes (Díaz, 2004).

Otras bacterias biorremediadoras que podemos encontrar en nuestro estudio son: *Rhodococcus*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* y *Sphingomonas*. El género *Rhodococcus* es capaz de: desulfurar el diesel, de degradar contaminantes utilizando como su fuente de carbono compuestos hidrofóbicos y puede degradar y modificar compuestos aromáticos.

*Burkholderia* puede biorremediar herbicidas y pesticidas, lo cual, es muy importante pues el Estuario Bahía de Jobos recibe constantemente estos contaminantes provenientes de los cultivos adyacentes. *Acinetobacter baumannii* puede utilizarse para degradar fracciones de alcanos y por último, el género *Sphingomonas* es capaz de degradar bajo condiciones anaerobias 2,4-diclorobenceno, produciendo el metabolito 4 clorocatenol y el 1,2,3,4 tetraclorodibenceno (López, et al., 2006).



## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las actividades que realiza el ser humano han causado degradación y pérdida de los recursos naturales. Los mangles han sido impactados negativamente con el paso de los años. Este tipo de ecosistema es importante y complejo, además, que posee diversas funciones ecológicas y posee un alto valor económico y ecológico.

Ante la necesidad de proteger, restaurar y conservar nuestros recursos naturales y manejar riesgos ambientales nos dimos a la tarea de investigar el perfil bacteriano de los sedimentos de los árboles de mangle en la Ciénaga las Cucharillas y en la Reserva Nacional Estuarina Bahía de Jobos. Este estudio utilizó una variedad de muestras ambientales, las cuales, analizamos mediante la técnica Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) a partir de una muestra de suelo ambiental. El proceso de T-RFLP es una buena fuente para recobrar el material genético de organismos noveles obtenidos de comunidades ambientales. El análisis de TRFLP es utilizado para examinar estructuras y comunidades de microorganismos que responden diferentes cambios y parámetros ambientales; también, puede utilizarse para estudiar las poblaciones de bacterias presentes en un hábitat (Applied Biosystem, 2005).

La ventaja que tiene la técnica del TRFLP es que nos permite tener una visualización rápida de la comunidad bacteriana de la muestra con un solo ensayo. Un problema que podemos encontrar al correr un gel es la interpolación en el programa de un tamaño estándar. Este tamaño de pares de base podría ser impreciso lo cual puede llevar a que se obtengan bacterias similares al analizar el gel. Por tal motivo, se procede a

practicar el T-RFLP al comparar las comunidades bacterianas, pues se crean estándares entre las corridas donde se pueden comparar los fragmentos obtenidos de la muestra (Hewson & Fuhrman, 2006).

Mediante el T-RFLP pudimos crear una lista de las posibles bacterias que se encuentran en las áreas estudiadas (Tabla 3). Determinamos que las bacterias encontradas pueden ser propicias para la biorremediación de contaminantes clorinados y volátiles. Entre las bacterias encontradas podemos destacar: *Rhodococcus*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* y *Sphingomona*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* y *Bacteroides*. Además, realizamos un perfil de bacterias presentes en los sedimentos de la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos que puede ser útil para futuras investigaciones. Esta investigación es importante pues nos ayuda a conocer las bacterias potenciales para combatir los daños causados a los sitios estudiados a causa de posibles accidentes ambientales. En el estudio, determinamos que las bacterias encontradas en la Ciénaga las Cucharillas y las encontradas en Bahía de Jobos son parecidas al comparar la época lluviosa con la seca. Determinamos que hay mayor cantidad de bacterias presentes en las muestras durante la época seca al compararlas con la época lluviosa y determinamos que la Ciénaga las Cucharillas es más diversa y abundante que el Estuario Bahía de Jobos. La gran cantidad de lluvia desplaza las bacterias hacia otras zonas o las bacterias pueden morir debido a cambios drásticos en su hábitat. Para concluir, la técnica del TRFLP se ha convertido en un método para la comparación rápida de las relaciones entre comunidades bacterianas presentes en muestras ambientales y de cambios en temporadas.

## **Recomendaciones**

Al evaluar el perfil bacteriano de Ciénaga las Cucharillas y compararlo con el perfil bacteriano de Estuario Bahía de Jobos podemos hacer las siguientes recomendaciones:

1. Se deben realizar más estudios para determinar la calidad microbiológica de ambos sitios de muestreo que puedan afectar la salud humana.
2. Prohibir la extracción de aguas subterráneas que se consideren que suplen las áreas de humedales, bosques de mangle, pantanos y ciénagas. Y permitir el reuso de aguas usadas para la irrigación. También se debe regular el uso de los terrenos aledaños a los manglares para evitar que se contaminen o se continúen muriendo hectárea de árboles de mangle como está ocurriendo en las áreas de muestreo de Jobos 3 y Jobos 4 que se encuentran colindantes a los terrenos de la termoeléctrica en la Reserva Nacional Estuarina Bahía de Jobos.
3. Los herbicidas se han añadido a suelos de cultivos por décadas, sin que se incorporen y se pierden mediante escorrentías (Flores, 2009). Recomendamos determinar que herbicidas y pesticidas están siendo utilizados cerca a los terrenos de mangle y crear una barrera para evitar que lleguen aguas de escorrentías con estos contaminantes. Un ejemplo de barrera sería la creación de canales que evitan que el agua salga fuera del área agrícola.
4. Recomendamos la realización de estudios que determinen la presencia de metales pesados, así como otros contaminantes que puedan afectar la vida silvestre, la salud de los seres humanos y la del ambiente.

5. Recomendamos la recolección de muestras de sedimento en las áreas muestreadas y la clonación de bacterias para determinar que bacterias que son capaces de biorremediar los sedimentos de la Ciénaga las Cucharillas y del Estuario Bahía de Jobos ante la presencia de posibles contaminantes.
6. Recomendamos la realización de estudios epidemiológicos para identificar problemas de salud en personas que vivan aledañas a la Ciénaga las Cucharillas.
7. Se deben enmendar leyes para que los municipios detengan el uso de los terrenos de la Ciénaga las Cucharillas para la construcción de edificaciones y se preserve la Ciénaga como se estipula en las leyes y reglamentos mencionados anteriormente.
8. Se debe educar a los ciudadanos para que protejan y preserven los recursos naturales y detengan el uso de los humedales como vertederos clandestinos, o se consideren áreas perdidas y sin valor.
9. Recomendamos el uso de la técnica T-RFLP para cualquier investigación debido a la ventaja que tiene ante el descubrimiento de microorganismos que no pueden ser cultivados ni recolectados mediante los métodos tradicionales de recolección de muestras ambientales.

### **Limitaciones**

Al momento de llevar a cabo cualquier tipo de investigación surgen gran cantidad de limitaciones y nuestra investigación no se escapa de este tipo de situaciones. Estas situaciones limitan el que se desarrolle plenamente una investigación. Entre las limitaciones encontraremos actividades: antropogénicas, naturales e involuntarias, que se salen del alcance del investigador las cuales mencionaremos a continuación.

1. Inicialmente el estudio se realizaría en Ciénaga las Cucharillas solamente y se compararía la relación entre las bacterias y contaminantes encontrados en los sitios donde Carlos Sotomayor realizó muestreos de sedimentos para determinar metales pesados. Esto no se pudo llevar a cabo debido a que el punto de muestreo que íbamos a utilizar como control de la muestra fue rellenado y un segundo punto de muestreo también, fue rellenado para construcción.
2. Una limitación involuntaria fue el hecho de que las muestras de suelo pueden sufrir de degradación de DNA al refrigerarse el PCR. Esto ocasionó que se tuviera que repetir la recolección de muestra de suelo, la extracción de DNA, las corridas de PCR, gel y la secuenciación.
3. La contaminación de las muestras fue una limitación involuntaria a causa de contaminación del agua estéril que se utilizó. Determinamos mediante corridas de PCR que el agua estéril era el causante pues aparecía una banda en el control negativo y positivo del PCR que no suponía estar presente. La contaminación de las muestras altera grandemente los resultados finales por tanto tuvimos que repetir varias veces las diluciones, el PCR y la corrida de la gel hasta que los controles no indicaran contaminación.
4. La mayor limitación de nuestra investigación fue que los terrenos para el mes de septiembre se encontraban inundados debido a que era la época lluviosa y no se pudieron recolectar las muestras del mismo punto. Así que las muestras de Jobos 1 y Jobos 2 fueron tomadas de la orilla debido a que el paso hacia el lugar de muestreo era imposible en adición que necesitábamos sedimento del árbol de mangle no del agua.

La lenta destrucción de los manglares afecta la salud y productividad de los bosques de mangle, esta pérdida se debe a actividades humanas. El uso de la técnica T-RFLP y otras técnicas de la metagenómica ha logrado la construcción de bibliotecas de genes las cuales son útiles para identificar microorganismos cultivables y no cultivables de una comunidad como los manglares. En nuestro estudio la técnica T-RFLP nos permitió tener una visualización rápida de la comunidad bacteriana de la muestra de sedimento de mangle negro y blanco en cuatro estaciones en la Ciénaga las Cucharillas y los comparamos con las cuatro estaciones del Estuario Bahía de Jobos. Nuestro propósito era realizar un análisis de diversidad y de abundancia y encontrar los microorganismos potenciales para la biorremediación de contaminantes orgánicos clorinados y/o volátiles provenientes de fuentes como: industrias, descargas domésticas, derrames de petróleo, escurrientías entre otras. Mediante un análisis de diversidad y de abundancia de los dos muestreos realizados pudimos determinar que la época de lluvia y la época seca no es un factor determinante y no afecta la biorremediación por tanto puede realizarse durante todo el año. En este estudio encontramos una serie de bacterias que pueden ser utilizadas para la biorremediación de contaminantes clorinados y volátiles. Podemos destacar los géneros: *Pseudomonas*, *Dehalococcoides*, *Geobacter*, *Rhodococcus*, entre muchas otras bacterias encontradas en el perfil que son capaces de biorremediar compuestos orgánicos volátiles y clorinados presentes en sedimento de mangle.

## LITERATURA CITADA

- Adams, D. & Hefner, J. (1992). Puerto Rico: Humedales (Publication Paper No. 2425) U. S. Geological Survey Water- Supply. Recuperado de: [http://pr.water.usgs.gov/public/online\\_pubs/wsp\\_2425es.pdf](http://pr.water.usgs.gov/public/online_pubs/wsp_2425es.pdf)
- Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59(1):143-169.
- Applied Biosystem (2005). Terminal Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analysis on applied biosystems capillary electrophoresis systems. Recuperado de: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/)
- Babar, M. (2007). Environmental pollution. *Current Science*, 92(4): 421-423.
- Bayle, S., Malhautier, L., Degrange, V., Godon, J., & Fanlo, J. (2009). Investigation of the acclimatization period: example of the microbial aerobic degradation of volatile organic compounds (VOCs). *Water Science & Technology*, 60(9), 2217-2225. doi:10.2166/wst.2009.653.
- Bowen, J. (2005). *The role of mangrove forests in intercepting land-derived nitrogen loads*. Boston University Marine Program, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts. NOAA Award # NA17OR1173.
- Campbell, N. A., Mitchell, L. G. & Reece, J. B. (1999). Aquatic and terrestrial biomes: wetlands. *Biology*. 5th edition. Menlo Park, CA: Benjamin & Cummings.
- Cantrell, S. A. & Báez, C. (2008). Reacción de PCR usando Jump Start Red Taq Ready Mix para una reacción de TRFLP usando DNA ambiental; Reacción de digestión

enzimática de productos de PCR para TRFLP; Reacción de secuenciación TRFLP y ARISA. *Guía de Protocolos Moleculares*. Universidad del Turabo, Escuela de Ciencias y Tecnología. p. 8-10.

Cao, Y., Cherr, G., Cordova-Kreylos, A., Fan, T., Green, P., Higashi, R., LaMontagne, M., Scow, K., Vines, C., Yuan J. & Holden, P. (2006). Relationships between sediment microbial communities and pollutants in two California salt marshes. *Microbial Ecology* 52: 619–633. doi: 10.1007/s00248-006-9093-1.

Chiras, D. (2001). *Environmental Science: Creating a Sustainable Future*. 6ta edición. Jones & Barlett.

Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R. & Wittwer, P. (2005). Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends in Biotechnology* 23(6): 321-329.

Cowardin, L., Carter, V., Golet, F. & La Roe, E. (1979). *Classification of wetlands and deepwater habits of the United States*. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Services, Washington, D.C. Jamestown, ND: Northern Prairie Wildlife Research Center. Recuperado de: <http://www.npwrc.usgs.gov/resource/1998/classwet/classwet.htm>

De Giorgis F., Schwarz I., Chamy, R. & Schiappacasse M.C. (2003). Alternativas de tratamientos biológicos para la remediación de suelos contaminados con PCBs en Chile. *XV Congreso de ingeniería sanitaria y ambiental AIDIS- Chile*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Valparaíso, Chile.



- Demopoulos, A. (2004). *Black mangrove benthic community structure, seedling growth and survival and sediment characteristics in antropogenically disturbed and pristine habitats*. Disertación de tesis, Grant #NA97OR0139. Jobos Bay National Estuarine Research Reserve.
- Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. (1988). *Ley de Programa de Patrimonio Natural del 4 de agosto de 1988*. Ley Núm. 150
- Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. (1992). *Reglamento para el aprovechamiento, vigilancia, conservación y administración de las aguas territoriales, los terrenos sumergidos bajo éstas y la Zona Marítimo Terrestre del 29 de diciembre de 1992*. Reglamento 4860.
- Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. (2002) Los manglares. San Juan, P.R.: DRNA. Programa de Manejo de la Zona Costanera de Puerto Rico.
- Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. (2004). *Reglamento para regir las especies vulnerables y en peligro de extinción en el Estado Libre Asociado de Puerto Rico del 11 de febrero de 2004*. Reglamento 6766.
- Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. (2006) Los recursos naturales de Puerto Rico. *Hojas de nuestro ambiente*. San Juan, P.R.: DRNA.
- DeSantis T., Dubosarskiy, I., Murray, S. & Andersen, S. (2010). Microbial community analysis III. Recuperado de: <http://mica.ibest.uidaho.edu/trflp.php>
- Díaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*. 7(3): 173–180.
- Estado Libre Asociado de Puerto Rico. (1998). *Ley para establecer la Política Pública de los humedales del 24 de diciembre de 1998*. Ley 314.

- Estado Libre Asociado de Puerto Rico. (2003). *Ley para establecer la Política Pública sobre la Prevención de Inundaciones y Conservación de Ríos y Quebradas del 4 de enero de 2003*. Ley 49.
- Estado Libre Asociado de Puerto Rico. (2004). *Ley sobre la Política Pública Ambiental (LEPPA) Ley 416 del 22 de septiembre de 2004*.
- Estado Libre Asociado de Puerto Rico. *Constitución del Estado Libre Asociado de Puerto Rico*. Recuperado de: <http://www.lexjuris.com/lexprcont.htm>
- Farajnia, S., Hassan, M., Nezhadi, S., Mohammadnejad, L., Milani, M. & Lotfipour, F., (2009). Determination of indicator bacteria in pharmaceutical samples by multiplex PCR. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 17(3): 328-338. doi:10.1111/j.1745-4581.2009.00154.x.
- Field, R., Laboy, E. N., Capella, J., Robles, P. O., González, C. M. & Dieppa, A. (2008). *Jobos Bay Estuarine Profile: A National Estuarine Research Reserve*. Aguirre, PR: National Oceanic Atmospheric Administration & Departamento de Recursos Naturales y Ambientales.
- Flores, A. (2009) ARS-Developed riparian zones reduce atrazine contamination in water. *Agricultural Research* 57(1): 20. ISSN0002-161X
- Frederick, R. (1994). Environmentally compatible applications of biotechnology. *Bioscience* 44(8): 529-535.
- Ghosh, A., Maity, B., Chakrabarti, K. & Chattopadhyay, D., (2007). Bacterial diversity of East Calcutta wetland area: Possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. *Microbial Ecology*. 54: 452-459 DOI: 10.1007/s00248-007-9244-z.

- Globe (2005). *Soil pH protocol* p.1-9 Recuperado de: [http://www.globe.gov/tctg/soilph.pdf?sectionId=97generaldocuments/cms\\_042272.pdf](http://www.globe.gov/tctg/soilph.pdf?sectionId=97generaldocuments/cms_042272.pdf)
- Grant, A. & Ogilvie L. (2003). Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69(10): 6342-6343. Doi:10.1128/AEM.69.10.6342-6343.2003
- Gentry, T. J., Wickham, G.S., Schadt, C.W., He, Z. & Zhou, J. (2006). Microarray applications in microbial ecology research. *Microbial Ecology*. 52: 159–175. doi: 10.1007/s00248-006-9072-6.
- Gruntzig, V., Stres, B., Ayala del Río, H. & Tiedje, J. (2002). *Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis*. Center for Microbial Ecology, Michigan State University East Lansing, Michigan, 48824. Recuperado de: [http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp\\_jul02.html](http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html)
- Hewson, I. & Fuhrman, J. (2006). Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. *Microbial Ecology*. 51: 147–153. doi:10.1007/s00248-005-0144-9.
- Junta de Calidad Ambiental. (1997). *Reglamento para el control de la erosión y prevención de la sedimentación del 30 de diciembre de 1997*. Reglamento 6754.
- Junta de Calidad Ambiental. (1998). *Reglamento para el control de desperdicios sólidos peligrosos de septiembre de 1998*. Reglamento 2863, SE. Reglamento 5807.
- Junta de Calidad Ambiental (2003). *Reglamento de estándares de calidad de agua de 28 de marzo de 2003*. Reglamento Núm. 4282.
- Junta de Planificación (2006). *Plan de Uso de Terrenos de Puerto Rico: Perfil regional, región sur*. Recuperado de: [http://coalicionventanasverraco.org/files/Perfil\\_Regional\\_de\\_la\\_Region\\_Sur\\_de\\_Puerto\\_Rico.pdf](http://coalicionventanasverraco.org/files/Perfil_Regional_de_la_Region_Sur_de_Puerto_Rico.pdf)

- Jurkowski, A. & Reid, A. (2007). Understanding our microbial planet. *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. National Academies of Science.
- Kathiresan K. & Bingham, B.L. (2001). Biology of mangrove and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology* 40:81-251.
- Kathiresan K. & Selvam, M. (2006). Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil. *Botanica Marina*, 49, 86–88. doi: 10.1515/BOT.2006.011
- Liang, J. B., Chen, Y. Q., Lan, C. Y., Tam, N. F. Y., Zan, Q. J. & Huang, L. N. (2007). Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. *Marine Biology* 150: 739–747 DOI: 10.1007/s00227-006-0377-2.
- Logue, J., Burgmann, H. & Robinson, C. (2008). Progress in the ecological genetics and biodiversity of freshwater bacteria. *Bio Science* 58(2): p.103-113. Doi: 10.1641/B580205.
- López de Mesa, J. B., Quintero, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaimes Cáceres D. C., Sandra Milena Gutiérrez Riaño, S. M. & Miranda García, J. (2006) Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA Publicacion Científica*. 4(5): 1-116.
- Lugo, A. (2006). Lecciones ecológicas de una isla que lo ha visto todo. *Ecotrópicos* 19(2): 57-71.
- Malavé-Llamas K. (2003). *Estudio sobre la medición de algunos parámetros de la calidad del agua del Río Humacao, y visualización de estos indicadores mediante la utilización de los Sistemas de Información Geográfica*. Tesis de Maestría.

Escuela Graduada de Salud Pública, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Ciencias Médicas.

Massol-Deyá, A. (2da Ed.) (2000). Biorremediación: de una realidad social a una solución ecológica. Adjuntas: Publicaciones Casa Pueblo.

McKinney, R. (2004). Bacteria. *Environmental Pollution Control*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.

MO BIO Laboratories, INC (2007). Power soil DNA isolation kit: Instruction manual. Recuperado de: [www.mobio.com](http://www.mobio.com).

Nelson, K., Methe, B.A. & Kowalchuk, G.A. (2007). Environmental microbial ecology in an “omics” era. *Microbial Ecology*. 53: 369–370 DOI: 10.1007/s00248-007-9215

Nocker, A., Burr, M & Camper, A. K. (2007). Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*. 54: 276–289

Olguín, E. J., Hernández, M. E. & Sánchez-Galván, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 23(3): 139-154. Recuperado de <http://www.uaemex.mx>

Peltola, R. & Salkinoja-Salonen, M. (2003). Improving biodegradation of VOCs in Soil by controlling volatilization. *Bioremediation Journal*, 7(2): 129-138. doi:10.1080/10889860390246169.

Pepi, M., Volterrani, M., Renzi, M., Marvasi, M., Gasperini, S., Franchi, E., et al. (2007). Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2299-2308. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03471.x.

- Presscott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. (2002). *Microbiology*. 5<sup>ta</sup> edición. New York: McGraw Hill.
- Ramírez-Ochoa, L. F. (2005). *Factores que afectan la propagación y establecimiento de Avicennia germinans en ambientes degradados de regiones semiáridas subtropicales*. Disertación de tesis de maestría no publicada. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, Puerto Rico.
- Reible, D. & Lanczos, T. (2006). *Assessment and remediation of contaminated sediments*. Bratislava, Slovak Republic: Springer
- Reserva Nacional de Investigación Estuarina Bahía de Jobos (JBNERR) (1995). El Estuario Bahía de Jobos. *Boletín Informativo de la Reserva Nacional de Investigación Estuarina Bahía de Jobos*. 1(3).
- Riesenfeld, C., Schloss, P., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, 38, 525-52. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091216
- Ríos, G. M. (1985). *Los Estuarios*. Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. (CEE-SA-08-314). San Juan, Puerto Rico: Oficina de Educación y Publicaciones.
- Ronchel, M. C., Ramos, C., Jensen, L. B., Molin, S. & Ramos, J. L. (1995). Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8) 2990-2994.
- Ruiz, C. (1999). Ciénaga las Cucharillas. *Eco-Isla*, Recuperado de: [www.ceducapr.com](http://www.ceducapr.com).
- San Juan Bay Estuary Program (2000). *Management Plan*. San Juan Bay Estuary Program.
- Smith, R. L. & Smith, T. M. (2000) *Ecología*. 4ta edición. Addison Wesley.

- Sotomayor, C. (2007). Presencia de metales pesados en la Ciénaga las Cucharilla. San Juan, P.R. Diseración de maestría no publicada. Escuela de Asuntos Ambientales Universidad Metropolitana.
- Tomanee, P., & Hsu, J. (2006). Selective precipitation of RNA, supercoiled plasmid DNA, and open-circular plasmid DNA with different cationic surfactants. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29(11), 1531-1540. doi:10.1080/10826070600675361.
- United States Congress. (1972). *Coastal Zone Management Act of October 27, 1972*. (16 U.S.C. 1451-1456).
- United States Congress. (1986). *Emergency Wetlands Resource Act of November 10, 1986*. (16 USC 3901-3932).
- United States Congress/ Environmental Protection Agency. (1974). *Safe Drink Water Act of 1974*.
- United States Congress/ Environmental Protection Agency. (1977). *Clean Water Act of 1977*. Sección 404
- United States Congress/ United States Engineering Corp. (1899). *Rivers and Harbors Act of 1899*. Section 10. (33 USC 403).
- United States Congress/ United States Fish and Wildlife Service. (1973). *Endangered Species Act of December of 1973*. Section 2 to 18.
- United States Environmental Protection Agency (2004). *Property transfer in Cataño area adds valuable land for preservation to las Cucharillas marsh*. United States Environmental Protection Agency, USA. Recuperado de:

<http://yosemite.epa.gov/opa/admpress.nsf/a883dc3da7094f97852572a00065d7d8/35062e3bc2675eea8525711f006392f3!OpenDocument>

- Urgun-Demirtas, M., Stark, B. & Pagilla, K. (2006). Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the biorremediation of contaminants. *Critical Reviews in Biotechnology* Vol. 26: p. 145-164.
- Wexler, M., Bond, P. L., Richardson, D. J. & Johnston, A. W. B. (2005). A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environmental Microbiology* Vol. 7 (No.12): p. 1917- 1926.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. National Academy of Science* Vol. 87; p. 4576-4579.
- Zinger, L., Gury, J., Giraud, F., Krivobok, S., Gielly, L., Taberlet, P. & Geremia, R. A. (2007). Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: Toward a high-throughput method for microbial diversity studies in Soil. *Microbial Ecology*. Vol. 54(2): p.203-216. doi:10.1007/s00248-006-9151-8



## **TABLAS**

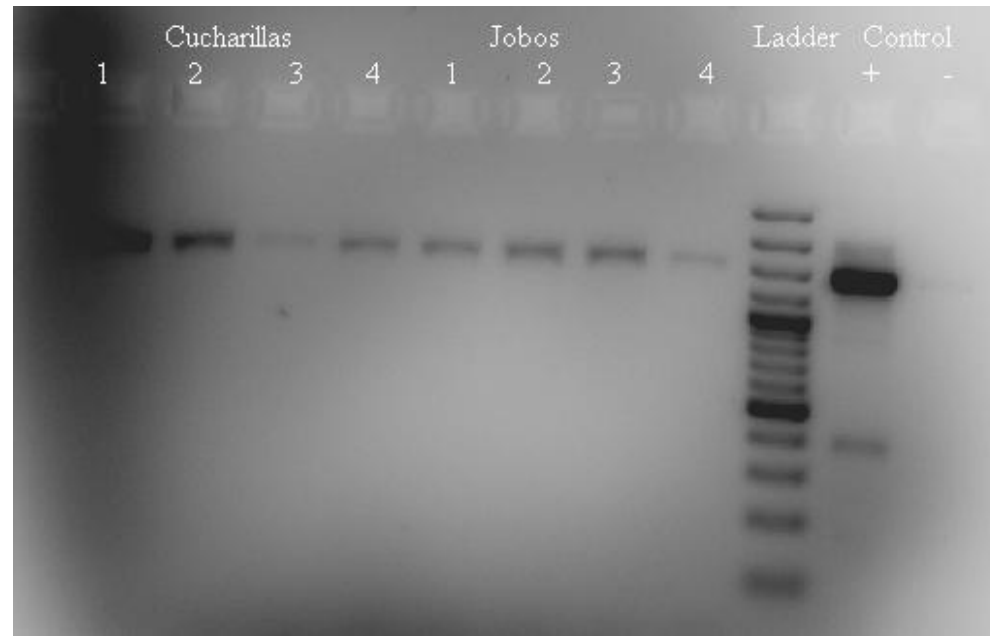
Tabla 1:

*Resultados del muestreo 1 en Ciénaga las Cucharillas y Bahía de Jobos*

<b>Suelo</b>	<b>Sedimento de Mangle</b>							
<b>Localización</b>	<b>Cucharillas</b>				<b>Jobos</b>			
<b>Estación</b>	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Fecha de la recolección</b>	4/6/08	4/6/08	4/6/08	4/6/08	2/6/08	2/6/08	2/6/08	2/6/08
<b>Hora</b>	2:20 pm	2:20 pm	2:50 pm	2:50 pm	10:30 am	10:45 am	12:05 pm	12:30 pm
<b>Coordenadas</b>	18°26'46'' N	18°26'46'' N	18°27'80'' N	18°27'80''N 66°08'52''W	17°57'28'' N 66°13'06'' W	17°57'29'' N 66°13'06'' W	17°57'00'' N 66°14'39'' W	17°57'01'' N 66°14'40'' W
<b>Cantidad de Suelo Extraída</b>	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm
<b>Temperatura</b>	21° C	21° C	23° C	23.5° C	25° C	32° C	35° C	33° C
<b>Tipo de Mangle</b>	Blanco	Blanco	Negro	Negro	Rojo y Negro	Rojo y Negro	Mangle negro muerto	Mangle negro muerto

<b>Observación de la recolección</b>	Muchas Piedras	Agua	Agua	Muchas Piedras Corriente de Agua	Área de Sombra; Suelo color negro	Neumatóforos de más de 31 cm; Suelo color negro	Area abierta con mangle negro muerto. Al lado de la termoeléctrica Suelo gris	Área abierta con mangle negro muerto. Al lado de la Termoeléctrica Suelo gris
<b>pH</b>	6.5	6.5	7.5	6.5	5.5	5.5	7.5	8.0
<b>Peso Húmedo</b>	1.0460	1.0456	1.0120	1.346	1.0024	1.0010	1.0015	1.0013
<b>Peso Seco</b>	0.6954	0.4476	0.1719	0.3858	0.2747	0.3493	0.6280	0.6410
<b>% Humedad</b>	35.06%	59.8%	84.01%	96.02%	72.77%	65.17%	37.35%	36.03%
<b>Dilución PCR</b>	1/1000	1/5000	1/5000	1/5000	1/5000	1/1000	1/1000	1/5000

### Foto del Gel



---

Nota: Para poder calcular pH se agregó doble cantidad de agua en la estación de Jobos 5 y el pH del agua utilizada para añadirla a las muestras de Cucharillas fue de 5 y el pH del agua de Jobos fue de 6.

Tabla 2:

*Resultados del muestreo 2 en Ciénaga las Cucharillas y Bahía de Jobos*

<b>Suelo</b>	<b>Sedimento de Mangle</b>							
<b>Localización</b>	<b>Cucharillas</b>				<b>Jobos</b>			
<b>Estación</b>	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Fecha de la recolección</b>	7/8/2008	7/8/2008	7/8/2008	7/8/2008	6/8/2008	6/8/2008	6/8/2008	6/8/2008
<b>Hora</b>	9:45 am	9:45 am	10:10 am	10:15 am	10:50am	11:02 am	9:20 am	9:35 am
<b>Coordenadas</b>	18°26'46" N 66°09'12" W	18°26'46" N 66°09'12" W	18°27'80" N 66°08'52" W	18°27'80" N 66°08'52" W	17°57'28"N 66°13'06"W	17°57'29" N 66°13'06" W	17°57'00" N 66°14'39" W	17°57'01" N 66°14'40" W
<b>Cantidad de Suelo Extraída</b>	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm
<b>Temperatura</b>	24° C	27° C	23.5° C	26° C	28.7° C	29.2° C	32.8° C	30.5° C
<b>Tipo de Mangle</b>	Blanco	Blanco	Negro	Negro	Rojo y Negro	Rojo y Negro	Mangle negro muerto	Mangle negro muerto
<b>Observación de la recolección</b>	Muchas raíces. Suelo color marrón.	Suelo húmedo con poco agua. Muchas raíces.	Muchas raíces y materia orgánica. Suelo color marrón.	Mucha agua. Mal olor. Muchas raíces. Suelo color	Zona inundada de 1 a 5 pulgadas. Suelo negro.	Se recogió muestra de suelo de la orilla por que la estación se encontraba	Área abierta con mangle negro muerto. Al lado de la termoelectrica. Suelo color	Área abierta con mangle negro muerto. Al lado de la termoelectrica. Suelo color gris.

		Suelo color marrón.		marrón.		inundada. Suelo color negro.	gris. Irrigación de agua de áreas agrícolas cercana	Irrigación de agua de áreas agrícolas adyacentes
<b>pH</b>	7	6.5	6	6	7	6.5	6.5	6.5
<b>Peso Húmedo</b>	1.0405 g	1.0014 g	1.0220 g	1.0120 g	1.0031 g	1.0070 g	1.0058 g	1.0096 g
<b>Peso Seco</b>	0.5697 g	0.5705 g	0.1093 g	0.1452 g	0.4045 g	0.4687 g	0.6244 g	0.6427 g
<b>% Humedad</b>	47.08%	43.09%	91.27%	86.68%	59.86%	53.83%	38.14%	36.69%
<b>Dilución PCR</b>	1/10,000	1/5,000	1/5,000	1/15,000	1/5,000	1/5,000	1/10,000	1/10,000

### Foto del Gel



---

Nota: Para poder calcular pH se agregó doble cantidad de agua para las siguientes estaciones: Cucharillas 3, Cucharillas 4, Jobos 1 y Jobos 2 y el pH del agua utilizada para añadirla a las muestras de Cucharillas y Jobos fue de 5.

Tabla 3:

*Pares de bases por muestreo con sus respectivas bacterias*

<b>Par de base</b>	<b>Muestreo</b>	<b>Bacteria</b>
58	1- J4	Methylobacterium podarium
74	1- J2	Rhizobium tropici Lactobacillus pentosus uncultured Crater Lake bacterium
75	1- C1	Bartonella elizabethae Anaerobaculum thermoternnum Centaurea solstitialis virescence phytoplasma
80	2- J1	Adiantum capillus-veneris Streptomyces espinosus
91	1- C1	Geobacillus stearothermophilus Macrococcus bovicus Macrococcus brunensis Staphylococcus condimenti Staphylococcus croceolyticus Staphylococcus epidermidis Staphylococcus piscifermentans swine manure bacterium uncultured actinobacterium uncultured bacterium uncultured rumen bacterium
97	1- J2	Paenibacillus naphthalenovorans
105	1- J4	Salmonella enterica
126	1- C2	uncultured Bacillus sp. uncultured bacterium Sporomusa aerivorans
128	1- C4	uncultured bacterium uncultured sludge bacterium
135	1- J3	Algoriphagus sp. Mantoniella squamata Rhodothermus marinus Ruminococcus flavefaciens uncultured bacterium uncultured eubacterium uncultured rumen bacterium
137	1- C1	Bacillus gelatini Brachybacterium faecium Brachybacterium nesterenkovi Brachybacterium tyrofermentans Helicobacter pylori



---

		Myceligenans xiligouense Streptococcus dysgalactiae Streptococcus parauberis Streptococcus pyogenes Streptococcus sp. swine manure bacterium Thermotoga maritima Thermotoga naphthophila Thermotoga petrophila Thermotoga sp. uncultured bacterium uncultured Pirellula uncultured planctomycete uncultured rumen bacterium bacterium oral clone Clostridium sp. Frankia sp. Jonesia quinghaiensis Paenibacillus campinasensis Paenibacillus graminis Paenibacillus sp. Paenibacillus xylanilyticus uncultured bacterium uncultured bacterium uncultured epsilon proteobacterium uncultured rumen bacterium uncultured rumen bacterium unidentified Clostridiaceae
140	2- J1	
148	1- J2	Actinoplanes digitatis Actinoplanes durhamensis Actinoplanes ferrugineus Actinoplanes palleronii Actinoplanes pyriformis Actinoplanes roseosporangius Actinoplanes sp. Actinoplanes tuftoflagellus Actinoplanes utahensis Actinoplanes utahensis Actinoplanes violaceus Asanoa ferruginea Asanoa ishikariensis Enterococcus asini Micromonospora matsumotoense Micromonospora sp. uncultured bacterium uncultured rumen bacterium

---

---

150	1- J2	Actinoplanes sp. Butyrivibrio fibrisolvens Clostridium collagenovorans Clostridium mesophilum Clostridium sp. Coprothermobacter sp. Kribbella koreensis Pseudosporangium ferruginea Stackebrandtia flavoalba swine manure pit bacterium uncultured bacterium swine fecal bacterium
157	1- C1	Lactobacillus pantheris
160	1- J4	uncultured alpha proteobacterium uncultured bacterium uncultured rumen bacterium
162	1- J2	Conopholis americana Syntrophomonas wolfei uncultured bacterium uncultured rumen bacterium
165	1- J2	Weissella confusa Weissella cibaria
167	1- C1	Eubacterium sp. Firmicutes oral clone Flavobacterium psychrophilum Haliscomenobacter hydrossis Proteolyticum ethanologenes uncultured bacterium uncultured rumen bacterium
168	2- J4	uncultured bacterium alpha proteobacterium Sporanaerobacter acetigenes
169	1- C2	uncultured bacterium Eubacterium sp. Gemmata obscuriglobus Flavobacterium johnsoniae
180	1- J3	uncultured bacterium Mycobacterium sp. Streptomyces lividans Actinocorallia longicatena
187	1- C1	uncultured rumen bacterium
188	2- J1	Bacillus sp. Caedibacter caryophilus Cellulosimicrobium sp. Crocebacterium ilecola Saccharomonospora sp.

---

---

		uncultured bacterium
		uncultured rumen bacterium
191	1- J3	Anaerobaculum mobile
		Bacillus acidicola
		Bacillus coagulans
		uncultured rumen bacterium
		uncultured sludge bacterium
193	1- J2	uncultured bacterium
200	1- J2	Alkalilimnicola ehrlichei
		Lactobacillus manihotivorans
		delta proteobacterium
208	1- C2	Alder yellows phytoplasma
		Burkholderia sp.
		Desulfovibrio vulgaris
		Loofah witches-broom phytoplasma
		Pantoea stewartii
		Salmonella enterica
		Thiomonas sp.
		uncultured bacterium
		uncultured eubacterium
		uncultured gamma proteobacterium
		uncultured sludge bacterium
212	1- J2	Clostridium leptum
		Myxococcus sp.
		Ralstonia sp.
		Thauera aromatica
		uncultured beta proteobacterium
		uncultured sludge bacterium
		uncultured bacterium
219	1- C1	Alcaligenes faecalis
		Alcaligenes sp.
		Buchnera aphidicola
		Candidatus Tremblaya princeps
		Colwellia sp.
		Edwardsiella ictaluri
		Photobacterium leiognathi
		Photobacterium phosphoreum
		Photorhabdus asymbiotica
		Photorhabdus luminescens
		proteobacterium
		Pseudoxanthomonas sp.
		Pseudoxanthomonas taiwanensis
		uncultured bacterium
		uncultured marine bacterium
		uncultured rumen bacterium
		uncultured sludge bacterium

---

---

		uncultured synthetic wastewater bacterium
227	2- C4	Vibrio sp. Listonella pelagia Photobacterium damsela Vibrio fischeri. Vibrio harveyi Vibrio lentus Vibrio nigripulchritudo Vibrio sp.
234	1- J4	uncultured rumen bacterium
254	1- C2	Clostridiales bacterium
282	1- J2	uncultured bacterium
73	1- C2, J1	alpha proteobacterium Bartonella elizabethae Parvibaculum lavamentivorans uncultured bacterium
82	1- C1, C4	uncultured phototrophic eukaryote uncultured bacterium Eggerthella lenta uncultured rumen bacterium
83	1- C1,C2	Mycoplasma sp.
87	1- C2, C4	uncultured Burkholderiales bacterium
92	2- C1, C4	Enterobacter asburiae Halorhodospira halophila Paenibacillus sp. Pantoea agglomerans Pantoea ananatis Pantoea sp. Staphylococcus epidermidis uncultured gamma proteobacterium uncultured rumen bacterium
118	1- C4, J1, J2	uncultured bacterium
119	1- C2, J2, J3	Aphanothece sp. Clostridium irregulare cyanobacterium Cyanobium sp. Synechococcus sp. uncultured Acidobacteria bacterium uncultured bacterium uncultured cyanobacterium unidentified bacterium
120	1- C2, J2, J3, J4	Cyanothece sp. Granulicatella sp. Magnetospirillum magneticum Rivularia sp. uncultured bacterium

---

---

122	1- C1, J1	uncultured sludge bacterium Phytoplasma sp. uncultured sludge bacterium
136	1- C2, J2	Candidatus Phytoplasma mali Brachybacterium conglomeratum Faecalibacterium prausnitzii Pirellula sp. Streptococcus sp. Symbiobacterium thermophilum uncultured bacterium uncultured Chloroflexi bacterium uncultured Rhodobacteraceae bacterium uncultured rumen bacterium
139	1- C1, C2	Xylanimonas cellulositytica Sphingomonas sp. Streptococcus macacae Streptococcus sp. uncultured bacterium uncultured Campylobacterales bacterium uncultured endolithic bacterium uncultured marine bacterium
143	1- C3, J3	Syntrophobotulus glycolicus uncultured rumen bacterium
145	1- C2, J2	unidentified bacterium Streptococcus suis Streptococcus bovis
147	1- J2, J4	Actinoplanes kinshanensis Chlorobium phaeobacterioide Prosthecochloris vibrioformis Firmicutes bacterium uncultured Acidobacterium sp. uncultured bacterium uncultured rumen bacterium unidentified Clostridiaceae unidentified eubacterium
151	1- J1, J3, J4	Clostridium septicum Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum uncultured Acidobacteria bacterium uncultured bacterium uncultured rumen bacterium uncultured sludge bacterium
153	1- C1, J2, J4	Clostridium sp. Desulfotomaculum thermobenzoicum jellyfish-degrading bacterium Leifsonia xyli

---

---

		naphthalene-utilizing bacterium
		uncultured rumen bacterium
156	1- C2, C4	Luteimonas sp.
		Cycloclasticus pugetii
		uncultured rumen bacterium
		uncultured Cycloclasticus sp.
171	1- J2, J3, J4	Cytophaga sp.
		Desulfotomaculum kuznetsovii
		Jannaschia sp.
		Riemerella anatipestifer
		uncultured bacterium
175	1- C1, J3	Herpetosiphon aurantiacus
		Ruminococcus flavefaciens
		Ruminococcus albus
		uncultured Chloroflexi bacterium
177	1- J2, J3, J4	Ruminococcus flavefaciens
		uncultured rumen bacterium
179	1- C1, J3	Actinocorallia glomerata
		Micromonospora sp.
		Nocardia puris
		Rhodococcus erythropolis
		Rhodococcus sp.
		Sulfurovum sp.
		swine manure bacterium
		uncultured bacterium
		uncultured Rhodococcus sp.
183	1- C1, J2	Arthrobacter sp.
		Kocuria sp.
		Microbispora sp.
		Microlunatus aurantiacus
		Prevotella sp.
		Rhodococcus sp.
		Streptomyces aureofaciens
		Streptomyces sp.
190	1- C1, C4, J2	Bacillus alcalophilus
		Bacillus aquimaris
		Bacillus firmus
		Bacillus sp.
		Brevibacterium celere
		Pelobacter sp.
		Planococcus maritimus
		Prauserella rugosa
		uncultured Bacillus sp.
		uncultured bacterium
		uncultured Crater Lake bacterium
		uncultured soil bacterium

---

---

201	1- C1, J2, J3	uncultured bacterium
204	1- C3, J1	Candidatus Vesicomysocius okutanii Piscirickettsia salmonis Polaromonas naphthalenivorans Pseudomonas sp. uncultured bacterium uncultured beta proteobacterium unidentified bacterium
205	1- C3, C4	Candidatus Ruthia magnifica Clostridium ramosum Desulfovibrio defluvii Pseudomonas sp. Sphaerotilus sp. uncultured bacterium uncultured eubacterium uncultured gamma proteobacterium uncultured rumen bacterium
206	1- C2, J3	uncultured beta proteobacterium Moritella marina Psychromonas ingrahamii Halobacillus sp.
209	1- C1, C2, C3, C4, J2	uncultured Crater Lake bacterium Achromatium oxaliferum Acidithiobacillus sp. Acidovorax sp. aniline-degrading bacterium arsenite-oxidizing bacterium beta proteobacterium Candidatus Procabacter sp. Comamonadaceae bacterium Delftia acidovorans Desulfovibrio burkinensis Desulfovibrio oryzae Diaphorobacter nitroreducens Hydrogenophaga atypica Janthinobacterium sp. Leptothrix sp. Limnobacter thiooxidans Malikia granosa Morganella morgani Ottowia thiooxydans Simplicispira metamorpha Thiomonas sp. uncultured Aquabacterium sp. uncultured bacterium uncultured bacterium

---

---

		uncultured bacterium uncultured beta proteobacterium uncultured Burkholderiales bacterium uncultured Comamonadaceae bacterium uncultured Gallionella sp. uncultured Hydrogenophaga sp. uncultured Idiomarina sp. uncultured sludge bacterium uncultured synthetic wastewater bacterium unidentified bacterium Zoogloea ramigera Azoarcus tolulyticus Bordetella trematum Burkholderia sp. Candidatus Burkholderia kirkii Candidatus Procabacter sp. Desulfovibrio desulfuricans Desulfovibrio magneticus Desulfovibrio senezii Desulfovibrio sp. Escherichia coli Kinetoplastibacterium crithidii uncultured bacterium uncultured beta proteobacterium uncultured Gallionella sp. uncultured Gemmatimonadetes bacterium uncultured sludge bacterium
210	1- J3, J4	Acidaminococcaceae bacterium Azospira oryzae Bordetella sp. Burkholderia ambifaria Burkholderia cenocepacia Burkholderia cepacia Burkholderia gladioli Burkholderia multivorans Burkholderia sp. Burkholderia tropica Burkholderia unamae Burkholderia vietnamiensis Candidatus Burkholderia kirkii Cupriavidus necator Cupriavidus taiwanensis gamma proteobacterium Herbaspirillum seropedicae Herbaspirillum sp. Herminiimonas arsenicoxydans
213	1- C2, C3, C4	

---



---

		<p> <i>Janthinobacterium</i> sp.  <i>Pandoraea</i> sp.  <i>Polynucleobacter</i> sp.  <i>Pseudomonas</i> sp.  <i>Ralstonia</i> sp.  <i>Rhodoferax ferrireducens</i>  <i>Sporotalea propionica</i>  uncultured bacterium  uncultured beta proteobacterium  uncultured Burkholderiales bacterium  uncultured Comamonadaceae bacterium  uncultured Comamonas sp.  uncultured Rhodobacteraceae bacterium  uncultured soil bacterium </p>
216	1- C1, C2, J2	<p> <i>Escherichia coli</i>  <i>Klebsiella</i> sp.  <i>Pantoea agglomerans</i>  <i>Pantoea ananatis</i>  <i>Salinivibrio costicola</i>  <i>Salmonella enterica</i>  <i>Shewanella putrefaciens</i>  <i>Shigella flexneri</i>  <i>Syntrophus aciditrophicus</i>  <i>Syntrophus buswellii</i>  <i>Syntrophus gentianae</i>  <i>Syntrophus</i> sp.  uncultured bacterium  uncultured Crater Lake bacterium  uncultured rumen bacterium </p>
217	1- C2, C4, J4	<p> <i>Alcaligenes faecalis</i>  <i>Alcaligenes</i> sp.  <i>Bacillus</i> sp.  <i>Citrobacter freundii</i>  <i>Citrobacter</i>  Cloning vector  cucurbit yellow vine disease bacterium  <i>Desulfotrustis glycolicus</i>  <i>Enterobacter nickellidurans</i>  <i>Enterobacter pyrinus</i>  <i>Enterobacter sakazakii</i>  <i>Enterobacter</i> sp.  <i>Erwinia</i> sp.  <i>Erwinia tracheiphila</i>  <i>Escherichia coli</i>  <i>Escherichia senegalensis</i>  <i>Escherichia</i> sp. </p>

---

---

		<p> <i>Klebsiella</i> sp.  <i>Pectobacterium atrosepticum</i>  <i>Photorhabdus</i> sp.  <i>Pseudoalteromonas</i> sp.  <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>  <i>Rahnella aquatilis</i>  <i>Ralstonia detusculanense</i>  <i>Ralstonia</i> sp.  <i>Salmonella enterica</i>  <i>Selenomonas</i> sp.  <i>Serratia marcescens</i>  <i>Serratia proteamaculans</i>  <i>Shewanella</i> sp.  <i>Shigella boydii</i>  <i>Shigella dysenteriae</i>  <i>Shigella flexneri</i>  <i>Shigella sonnei</i>            swine manure bacterium            uncultured bacterium            uncultured Enterobacteriaceae bacterium            unidentified bacterium  <i>Vibrio logei</i>  <i>Xylella fastidiosa</i> </p>
220	1- C2, C4	<p> <i>Bacillus oleronius</i>  <i>Bacillus</i> sp.  <i>Candidatus Desulforudis audaxviator</i>  <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>  <i>Thermomonospora chromogena</i>            uncultured Acidobacteria bacterium            uncultured bacterium         </p>
222	1- C1, C2	<p> <i>Aquifex aeolicus</i>  <i>Vibrio lentus</i>            uncultured rumen bacterium         </p>
277	1- C1, C4, J1, J2, J3, J4	<p>           uncultured rumen bacterium         </p>
<b>Pares de bases SIMILARES en 2 muestreos</b>		
53	1- C1, C2, J1, J2, J3, J4 2- C4, J, J2	<p>           uncultured phototrophic eukaryote         </p>
72	1- C3, J2 2- C1	<p> <i>Enterococcus</i> sp.  <i>Mesorhizobium loti</i>  <i>Rhizobium</i> sp.  <i>Rhizobium vitis</i>            uncultured alpha proteobacterium         </p>
76	1- C3 2- C1	<p>           Brinjal little leaf phytoplasma BLL  <i>Arthrobacter</i> sp.  <i>Methylobacterium</i> sp.            uncultured bacterium         </p>

---

---

81	1- C4 2- C1, J3	Desulfohalobium retbaense uncultured rumen bacterium
84	1- J1, J2 2- C2	Caldanaerobacter subterraneus Mycoplasma capricolum Mycoplasma monodon Australian Mycoplasma mycoides Mycoplasma sp. Selenomonas ruminantium uncultured bacterium
88	1- C2, C3, C4, J4 2- C1, J1, J2, J3, J4	uncultured bacterium uncultured Thiobacillus sp. Pseudomonas cichorii Oceanobacillus iheyensis Virgibacillus marismortui Bacillus sp.
94	1- J1 2- C1	Pseudoxanthomonas sp.
96	1- J2 2- C2	Staphylococcus caprae
101	1- C1, C2 2- C2	Lactobacillus sake uncultured bacterium
116	1- C2, C3, C4, J1, J3, J4 2- J1	Erysipelothrix muris
123	1- C2, C4, J2, J3, J4 2- J1	Bacillus sp. Bartonella sp. Bartonella vinsonii Brevibacillus agri Brevibacillus sp. Clostridium acetobutylicum Clostridium sp. Mycoplasma vulturii uncultured bacterium uncultured bacterium uncultured sludge bacterium
124	1- C4, J1, J2, J3, J4 2- C1	Bartonella tribocorum Mycoplasma cynos uncultured bacterium uncultured sludge bacterium
125	1- C4 2- J3	Dehalococcoides sp. Roseiflexus castenholzii uncultured bacterium
129	1- C1, C4, J1, J2, J3, J4 2- C1	Anaerobacter polyendosporus Clostridium proteolyticum Kineosporia aurantiaca Mycoplasma pulmonis

---

---

		<i>Nocardia aobensis</i> <i>Nocardia arthritidis</i> <i>Nocardia crassostreae</i> <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> <i>Nocardia lijiangensis</i> <i>Nocardia nova</i> <i>Nocardia polyresistens</i> <i>Simkania negevensis</i> uncultured bacterium uncultured sludge bacterium <i>Kribbella sandramycini</i> <i>Microbispora rosea</i> <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> <i>Pseudonocardia hydrocarbonoxydans</i> <i>Thalassospira</i> sp. uncultured <i>Acidobacterium</i> sp. uncultured actinobacterium uncultured bacterium uncultured delta proteobacterium uncultured soil bacterium <i>Xylanibacterium ulmi</i>
130	1- C2, C3 2- J1, J4	
131	1- C1, C4, J3 2- J1	<i>Amycolatopsis jejuensis</i> <i>Blastopirellula marina</i> <i>Clostridium algidicarnis</i> <i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium</i> sp. <i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Cryptosporangium aurantiacum</i> <i>Geovibrio ferrireducens</i> <i>Isoptricola</i> sp. magnetic proteobacterium uncultured actinobacterium uncultured bacterium uncultured <i>Thermodesulfobacteriaceae</i> swine manure bacterium
132	1- C1, C2, C3, J2, J3 2- C1	<i>Actinomadura rubrobrunea</i> <i>Alvinella pompejana</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Desulfovibrio piger</i> <i>Ilyobacter insuetus</i> <i>Ilyobacter polytropus</i> <i>Ilyobacter tartaricus</i> <i>Kribbella flavida</i>

---

---

		Kribbella jejuensis
		Kribbella solani
		Kribbella sp.
		Propionigenium modestum
		Pseudonocardia alni
		Pseudonocardia autotrophica
		Pseudonocardia compacta
		Pseudonocardia halophobica
		Pseudonocardia kongjuensis
		Pseudonocardia petroleophila
		Pseudonocardia saturnea
		Pseudonocardia sp.
		Pseudonocardia yunnanensis
		Rubrobacter radiotolerans
		uncultured actinobacterium
		Solibacter usitatus
		uncultured Acidobacteria bacterium
		uncultured bacterium
		uncultured rumen bacterium
		uncultured sludge bacterium
133	1- J2, J3	Clostridium argentinense
	2- J1	Clostridium baratii
		Clostridium botulinum
		Clostridium perfringens
		Clostridium sardiniense
		Clostridium sp.
		Clostridium tetani
		Desulfovibrio sp.
		swine manure bacterium
		uncultured actinobacterium
		uncultured bacterium
		uncultured Campylobacterales bacterium
		uncultured Clostridium sp.
		uncultured Crater Lake bacterium
		uncultured endolithic bacterium
		uncultured Poribacteria bacterium
		uncultured Rhodobacteraceae bacterium
		uncultured rumen bacterium
141	1- C1, C4	Arcobacter butzleri
	2- C1	Clostridium sp.
		Clostridium thermocellum
		Frankia alni
		Frankia sp.
		Nitrosococcus halophilus
		uncultured Arcobacter sp.
		uncultured bacterium

---

---

		uncultured rumen bacterium
		unidentified bacterium
146	1- C4, J3	uncultured bacterium
	2- C1, J1	
164	1- C1, C2, C3, C4, J1,	Porphyra purpurea
	J2, J3, J4	Porphyra yezoensis
	2- C1	uncultured rumen bacterium
172	1- J2, J3	Bartonella quintana
	2- J4	Alvinella pompejana epibiont
174	1- C1	Prochlorales cyanobacterium
	2- J1	uncultured bacterium
182	1- C1, C4	Alvinella pompejana epibiont
	2- J1	Kitasatospora cochleata
		Kitasatospora kifunensis
		Kitasatospora paracochleata
		Nonomurea bangladeshensis
		Streptomonospora sp.
		uncultured actinobacterium
199	1- J2	uncultured bacterium
	2- J1	
203	1- C1, C4	uncultured beta proteobacterium
	2- J1	
207	1- C1	Leptothrix mobilis
	2- J2	Patulibacter minatonensis
		Phytoplasma sp.
		uncultured bacterium
		uncultured beta proteobacterium
		uncultured Gallionella sp.
211	1- C4, J3	Acidiphilium sp
	2- J1	Azoarcus anaerobius
		Azoarcus sp.
		beta proteobacterium
		blackwater bioreactor bacterium
		Bordetella bronchiseptica
		Bordetella hinzii
		Bordetella parapertussis
		Bordetella pertussis
		Bordetella sp.
		Burkholderia andropogonis
		Burkholderia silvatlantica
		Burkholderia sp.
		Burkholderia xenovorans
		Candidatus Burkholderia calva
		Candidatus Burkholderia kirkii
		Candidatus Burkholderia nigropunctata
		Candidatus Burkholderia verschuerenii

---

---

		Candidatus Procabacter sp.
		Cupriavidus metallidurans
		Cupriavidus necator
		dehydroabietic acid-degrading bacterium
		Desulfovibrio indonesiensis
		Dichelobacter nodosus
		gamma proteobacterium
		Janthinobacterium lividum
		Lawsonia intracellularis
		Leptothrix sp.
		Mariprofundus ferrooxydans
		Methylocystis sp.
		Petrobacter succinatimandens
		Polaromonas sp.
		Pseudomonas aeruginosa
		Pseudomonas anguilliseptica
		Pseudomonas otitidis
		Pseudomonas sp.
		Pseudomonas stutzeri
		Ralstonia sp.
		Salmonella enterica
		Sporotalea propionica
		Thiobacillus sp. ML1-16."
		uncultured bacterium
		uncultured beta proteobacterium
		uncultured eubacterium
		uncultured Gallionella sp.
		uncultured gamma proteobacterium
		uncultured proteobacterium
		uncultured Rhodoferrax sp.
		uncultured sludge bacterium
		uncultured Thiobacillus sp.
		unidentified bacterium
		Wautersia numadzuensis
		Zoogloea ramigera
214	1- J2	Anaeromyxobacter dehalogenans
	2- J1, J4	Anaeromyxobacter sp.
		Candidatus Burkholderia kirkii
		Desulfobulbus sp. oral clone
		Desulfovibrio profundus
		Myxococcus fulvus
		Myxococcus macrosporus
		Myxococcus sp.
		Myxococcus xanthus
		Polyangium cellulosum
		Pseudomonas aeruginosa

---

---

		Sorangium cellulosum
		uncultured bacterium
		uncultured sludge bacterium
215	1- C1, C4	Castellaniella defragrans
	2- J1	delta proteobacterium
		Enterobacter cloacae
		Enterobacter sp.
		Erwinia amylovora
		Erwinia persicina
		Erwinia pyrifoliae
		Geobacter uraniireducens
		Grimontella senegalensis
		Halomonas elongata
		Klebsiella oxytoca
		Klebsiella pneumoniae
		Klebsiella sp.
		Pantoea agglomerans
		Pantoea ananatis
		Polynucleobacter necessarius
		Pseudoalteromonas sp.
		Ralstonia solanacearum
		swine manure bacterium
		Thalassomonas viridans
		uncultured bacterium
		uncultured gamma proteobacterium
		uncultured Pseudomonas sp.
		uncultured Rhodobacteraceae bacterium
		uncultured rumen bacterium
		uncultured Piscirickettsiaceae bacterium
235	1- C1, C2, C3, C4, J1, J2, J3	uncultured bacterium
	2- J4	
276	1- C3, C4, J2, J3	uncultured rumen bacterium
	2- J4	
280	1- C1, C3, C4, J1, J2, J3, J4	uncultured bacterium
	2- C1, J1	

---



Tabla 4:

*Abundancia*

<b>Muestreo 1</b>	<b>Altura</b>	<b>Pb</b>	<b>Bacterias</b>
<b>Cucharillas 1</b>	747	112	No hay bacteria reconocida por MiCA
	609	164	Porphyra purpurea Avonport Porphyra yezoensis uncultured rumen bacterium
<b>Cucharillas 2</b>	883	164	Porphyra purpurea Avonport Porphyra yezoensis uncultured rumen bacterium
	814	130	Xylanibacterium ulmi uncultured soil bacterium uncultured delta proteobacterium uncultured bacterium uncultured actinobacterium uncultured Acidobacterium sp. Thalassospira sp. Pseudonocardia hydrocarbonoxydans Nocardia cyriacigeorgica Microbispora rosea Kribbella sandramycini Kineococcus-like bacterium
<b>Cucharillas 3</b>	3364	164	Porphyra purpurea Avonport Porphyra yezoensis uncultured rumen bacterium
	586	132	Actinomadura rubrobrunea Alvinella pompejana epibiont Clostridium botulinum Clostridium perfringens Desulfovibrio piger Ilyobacter insuetus Ilyobacter polytropus Ilyobacter tartaricus Kribbella flavida Kribbella jejuensis Kribbella solani Kribbella sp. Propionigenium modestum Pseudonocardia alni Pseudonocardia autotrophica Pseudonocardia compacta Pseudonocardia halophobica

---

			Pseudonocardia kongjuensis
			Pseudonocardia petroleophila
			Pseudonocardia saturnea
			Pseudonocardia sp.
			Pseudonocardia yunnanensis
			Rubrobacter radiotolerans
			Solibacter usitatus
			uncultured Acidobacteria bacterium
			uncultured actinobacterium
			uncultured bacterium
			uncultured rumen bacterium
			uncultured sludge bacterium
<b>Cucharillas 4</b>	2086	164	Porphyra purpurea Avonport
			Porphyra yezoensis
			uncultured rumen bacterium
<b>Jobs 1</b>	2899	53	uncultured phototrophic eukaryote
	995	164	Porphyra purpurea Avonport
			Porphyra yezoensis
			uncultured rumen bacterium
	934	55	No hay bacteria reconocida por MiCA
<b>Jobs 2</b>	781	56	No hay bacteria reconocida por MiCA
	669	124	uncultured sludge bacterium
			Bartonella tribocorum
			Mycoplasma cynos
			uncultured sludge bacterium
			uncultured bacterium
<b>Jobs 3</b>	1460	124	uncultured sludge bacterium
			Bartonella tribocorum
			Mycoplasma cynos
			uncultured sludge bacterium
			uncultured bacterium
	1078	164	Porphyra purpurea Avonport
			Porphyra yezoensis
			uncultured rumen bacterium
	794	53	uncultured phototrophic eukaryote
	767	123	Bacillus sp.
			Bartonella sp.
			Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii
			Brevibacillus agri
			Brevibacillus sp.
			Clostridium acetobutylicum
			Clostridium sp.
			Mycoplasma vulturii
			uncultured bacterium

---

---

	543	135	uncultured sludge bacterium Algoriphagus sp. Mantoniella squamata Rhodothermus marinus Ruminococcus flavefaciens uncultured bacterium uncultured eubacterium uncultured rumen bacterium
<b>Jobos 4</b>	2643	164	Porphyra purpurea Avonport Porphyra yezoensis uncultured rumen bacterium
	1155	124	uncultured sludge bacterium Bartonella tribocorum Mycoplasma cynos uncultured sludge bacterium uncultured bacterium
<b>Muestreo 2</b>			
<b>Cucharillas 1</b>	1623	92	Enterobacter asburiae Halorhodospira halophila Paenibacillus sp. Pantoea agglomerans Pantoea ananatis Pantoea sp. Staphylococcus epidermidis uncultured gamma proteobacterium uncultured rumen bacterium
	969	94	Pseudoxanthomonas sp.
	654	81	No hay bacteria reconocida por MiCA
<b>Cucharillas 2</b>	2671	96	Staphylococcus caprae
	1384	84	Caldanaerobacter subterraneus subsp. Tengcongensis Mycoplasma capricolum Mycoplasma capricolum subsp. capricolum Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae Mycoplasma monodon Australiain Mycoplasma mycoides subsp. capri Mycoplasma mycoides subsp. mycoides Mycoplasma sp. Selenomonas ruminantium uncultured bacterium
<b>Cucharillas 3</b>	3059	95	No hay bacteria reconocida por MiCA
	784	69	No hay bacteria reconocida por MiCA
<b>Cucharillas 4</b>	1996	92	Enterobacter asburiae Halorhodospira halophila

---

---

			Paenibacillus sp.
			Pantoea agglomerans
			Pantoea ananatis
			Pantoea sp.
			Staphylococcus epidermidis
			uncultured gamma proteobacterium
			uncultured rumen bacterium
	893	52	No hay bacteria reconocida por MiCA
	847	53	uncultured phototrophic eukaryote
<b>Jobs 1</b>	2974	53	uncultured phototrophic eukaryote
	731	51	No hay bacteria reconocida por MiCA
	576	55	No hay bacteria reconocida por MiCA
<b>Jobs 2</b>	1567	88	Bacillus sp.
			Oceanobacillus iheyensis
			Pseudomonas cichorii
			uncultured bacterium
			uncultured Thiobacillus sp.
			Virgibacillus marismortui
	847	55	No hay bacteria reconocida por MiCA
	525	53	uncultured phototrophic eukaryote
<b>Jobs 3</b>	3171	88	Bacillus sp.
			Oceanobacillus iheyensis
			Pseudomonas cichorii
			uncultured bacterium
			uncultured Thiobacillus sp.
			Virgibacillus marismortui
	660	68	No hay bacteria reconocida por MiCA
	524	125	Dehalococcoides
			Roseiflexus castenholzii
			uncultured bacterium
<b>Jobs 4</b>	3548	88	Bacillus sp.
			Oceanobacillus iheyensis
			Pseudomonas cichorii
			uncultured bacterium
			uncultured Thiobacillus sp.
			Virgibacillus marismortui
	525	163	No hay bacteria reconocida por MiCA

---

## **FIGURAS**



Figura 1: Mapa de las Estaciones de Muestreo en Cucharillas

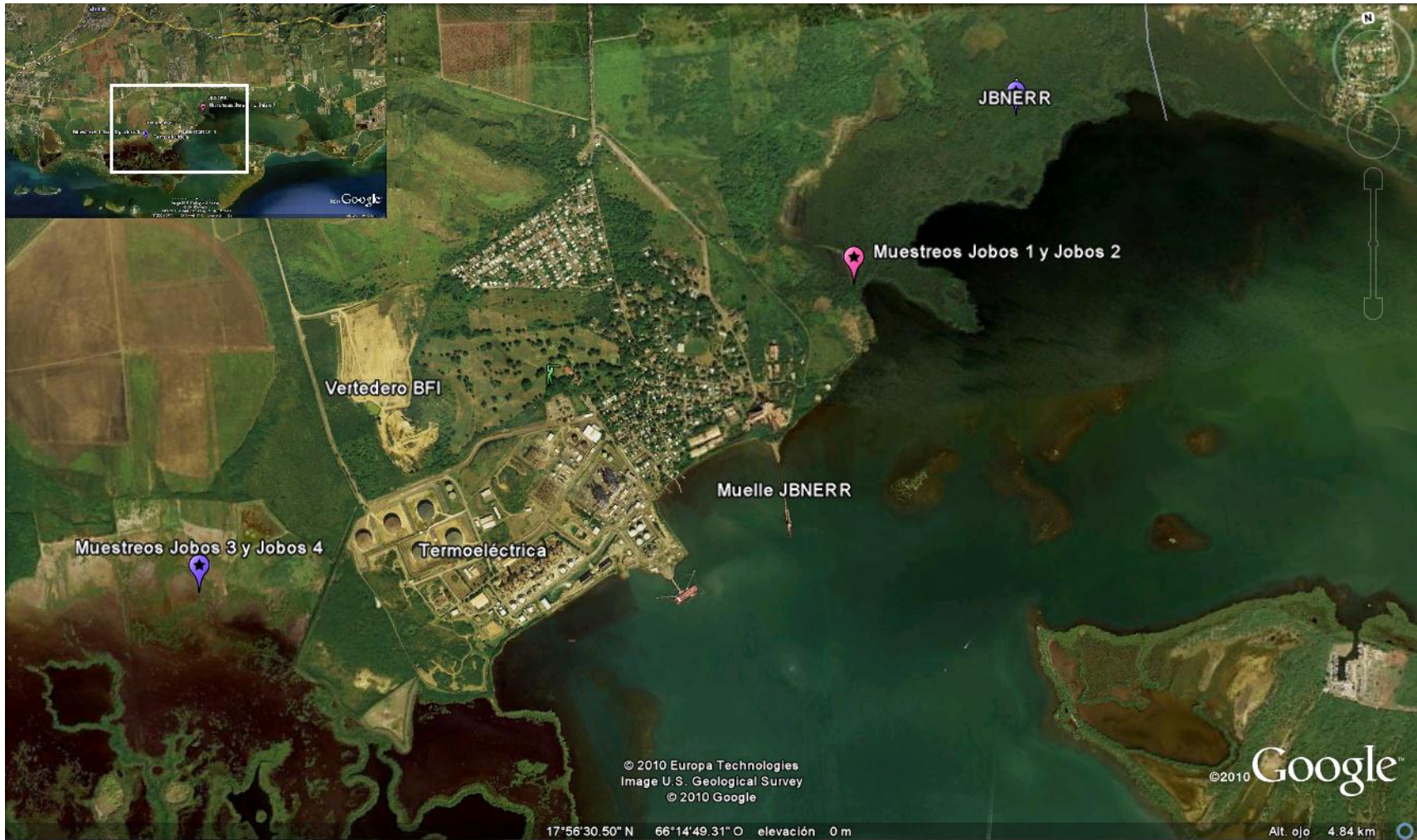


Figura 2: Mapa de las Estaciones de muestreo en Bahía de Jobos

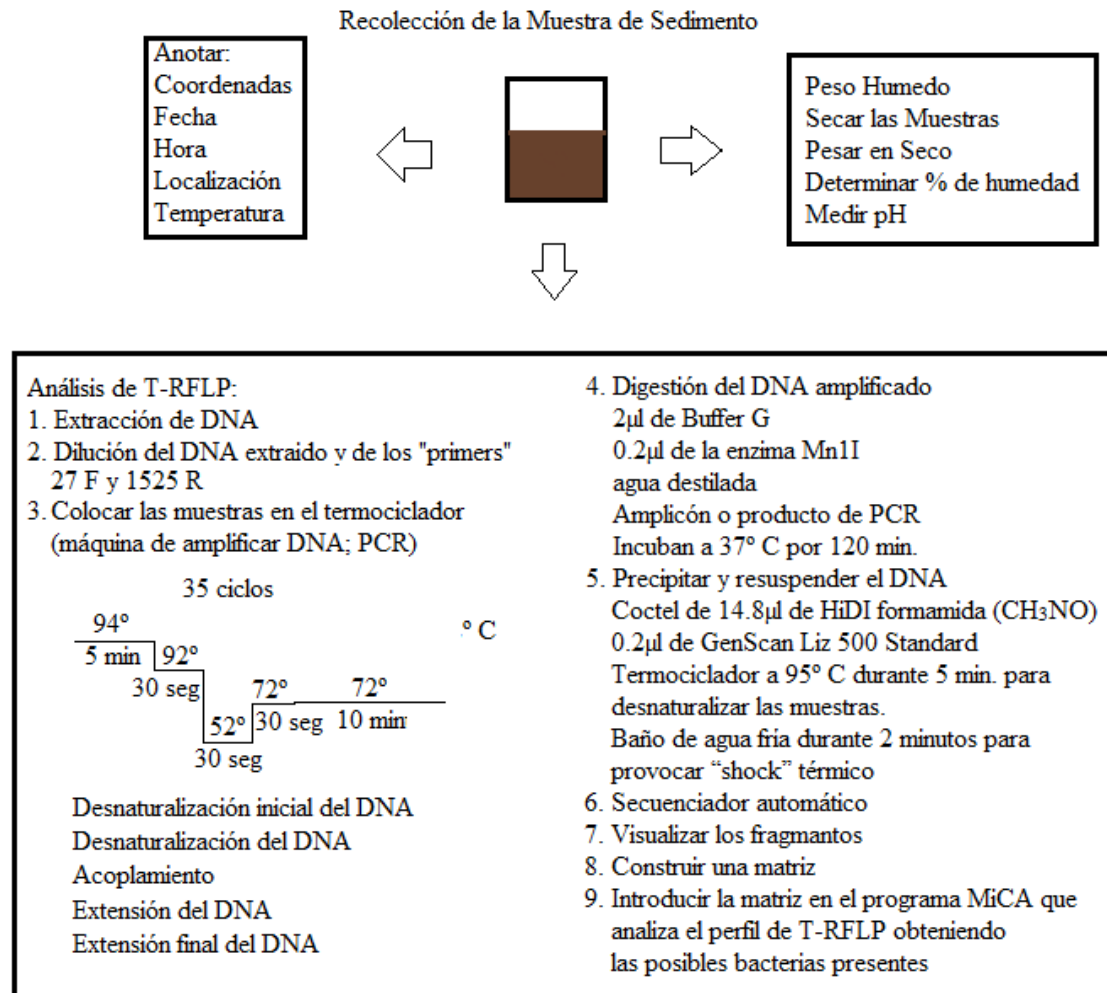


Figura 3: Metodología



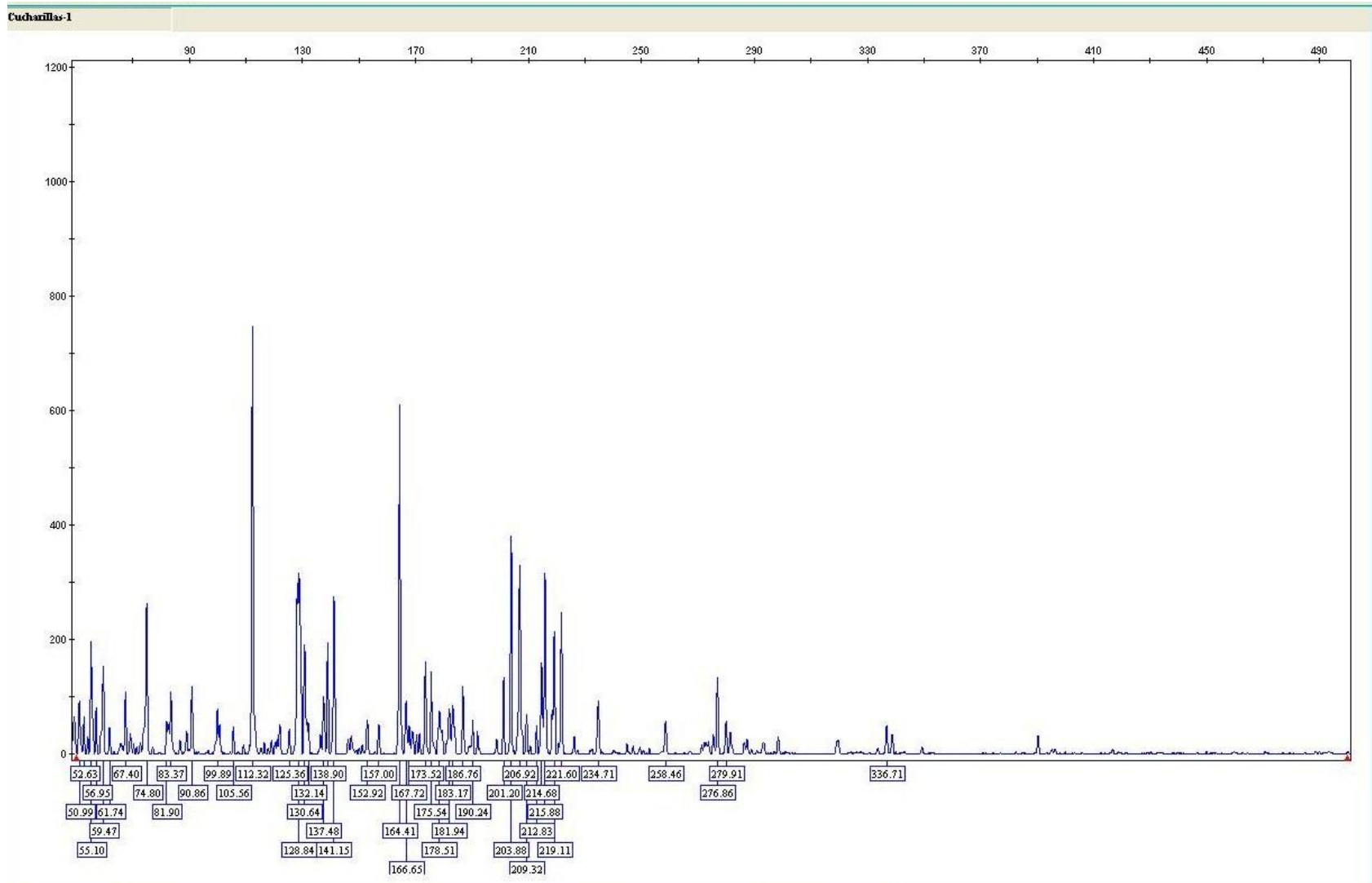


Figura 4: Picos de T-RFLP del Muestreo 1 Cucharillas 1

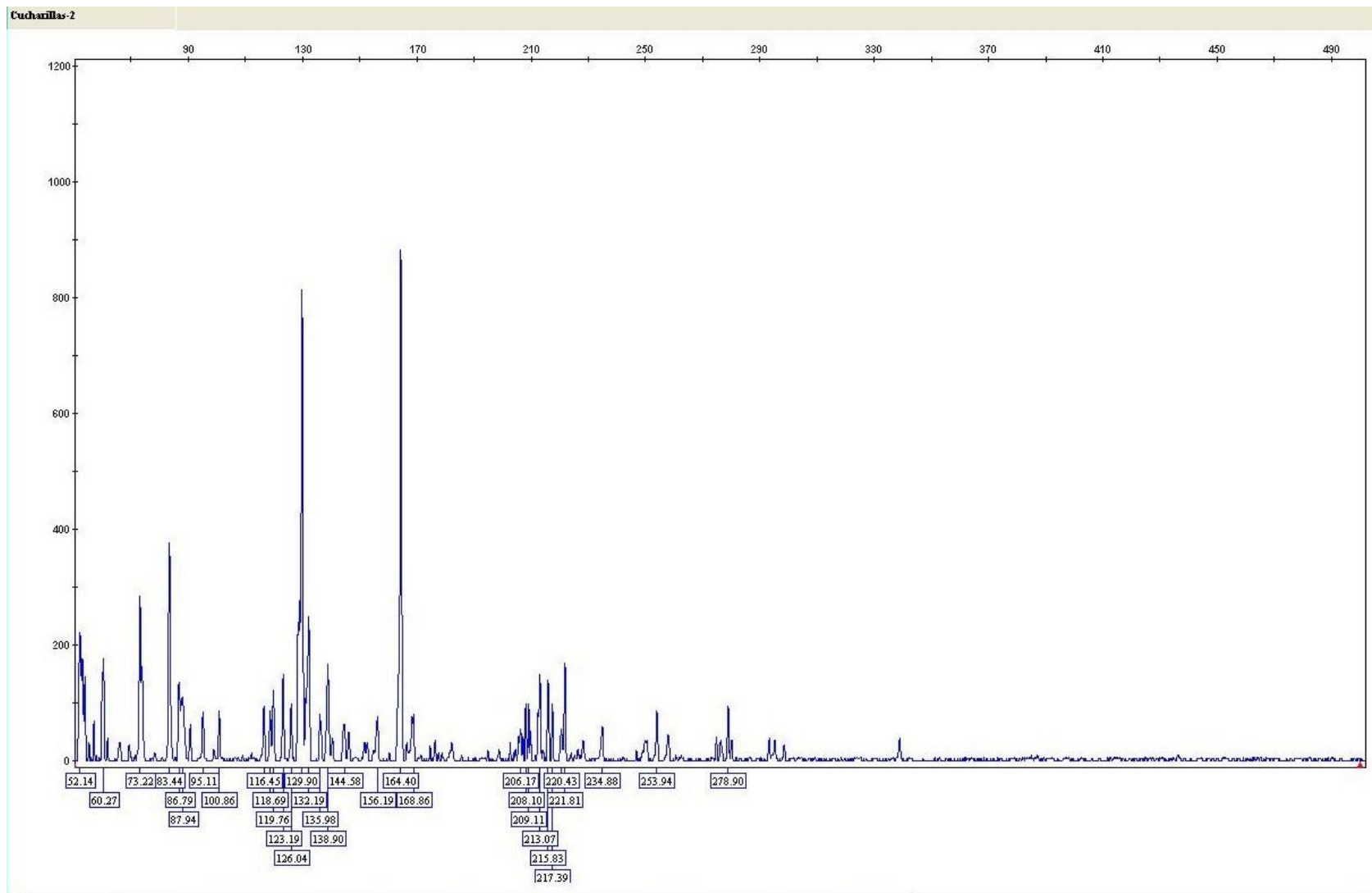


Figura 5: Picos de T-RFLP del Muestreo 1 Cucharillas 2

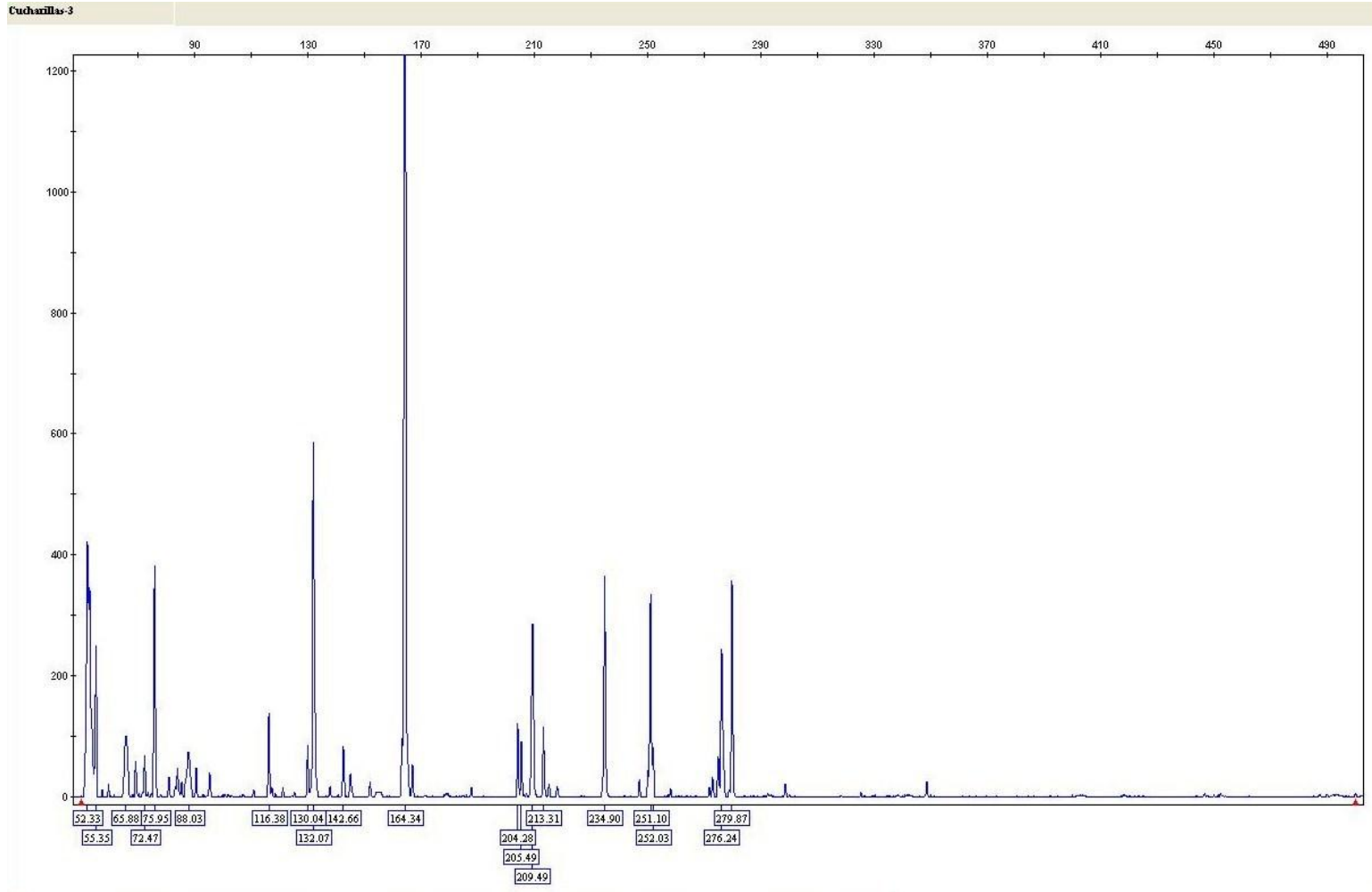


Figura 6: Picos de T-RFLP del Muestreo 1 Cucharillas 3

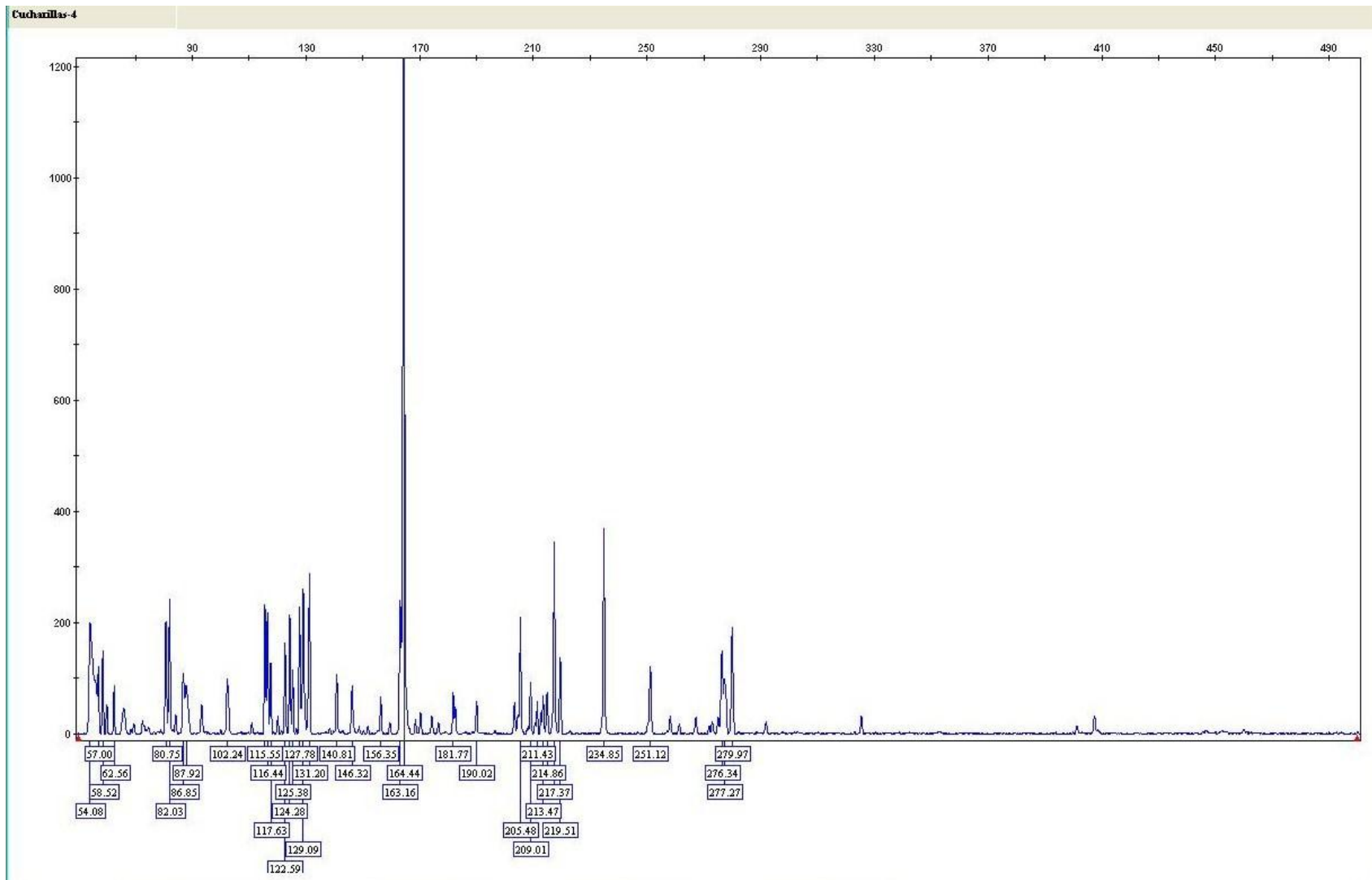


Figura 7: Picos de T-RFLP del Muestreo 1 Cucharillas 4

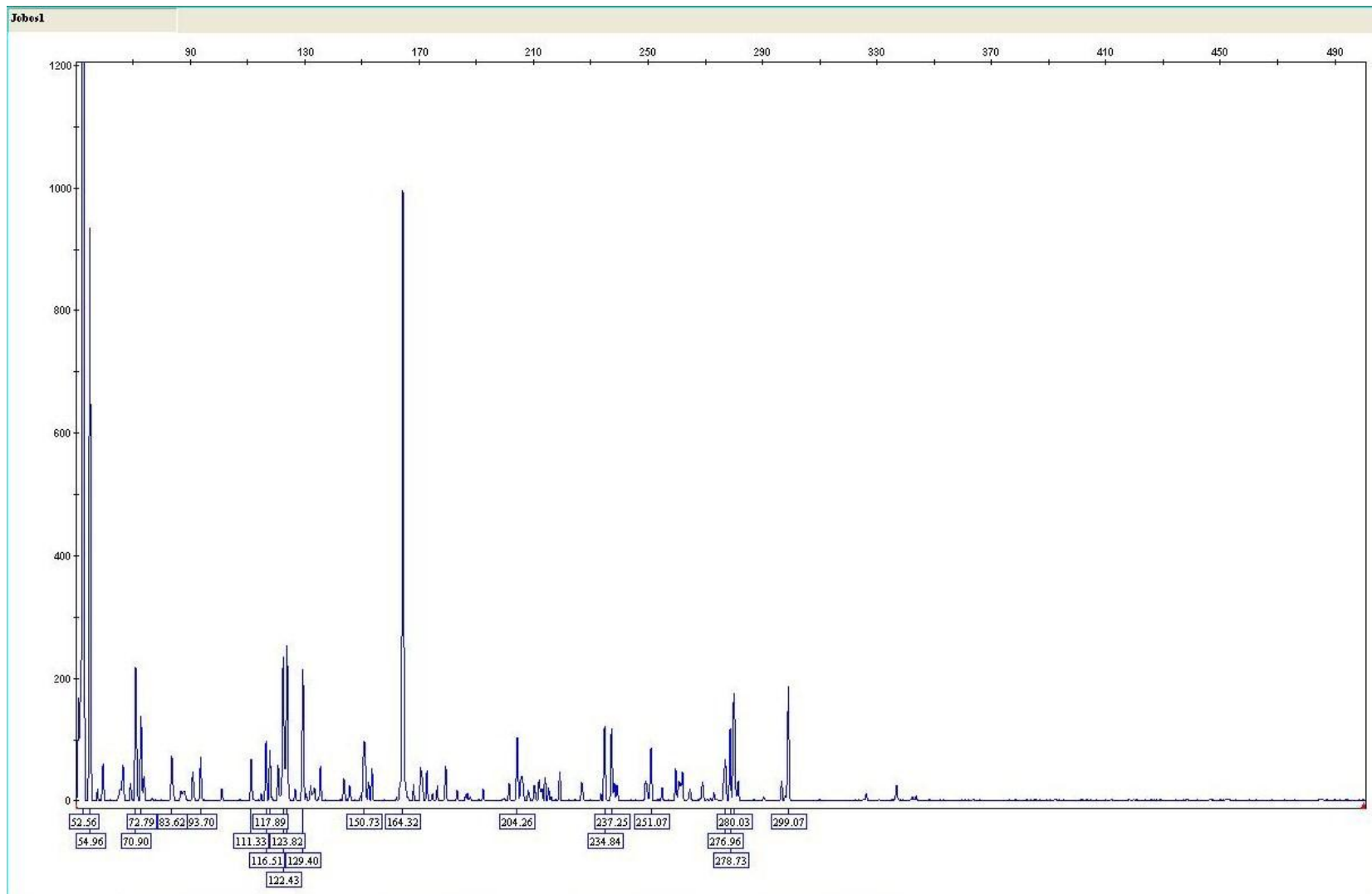


Figura 8: Picos de T-RFLP del Muestreo 1 Jobos 1

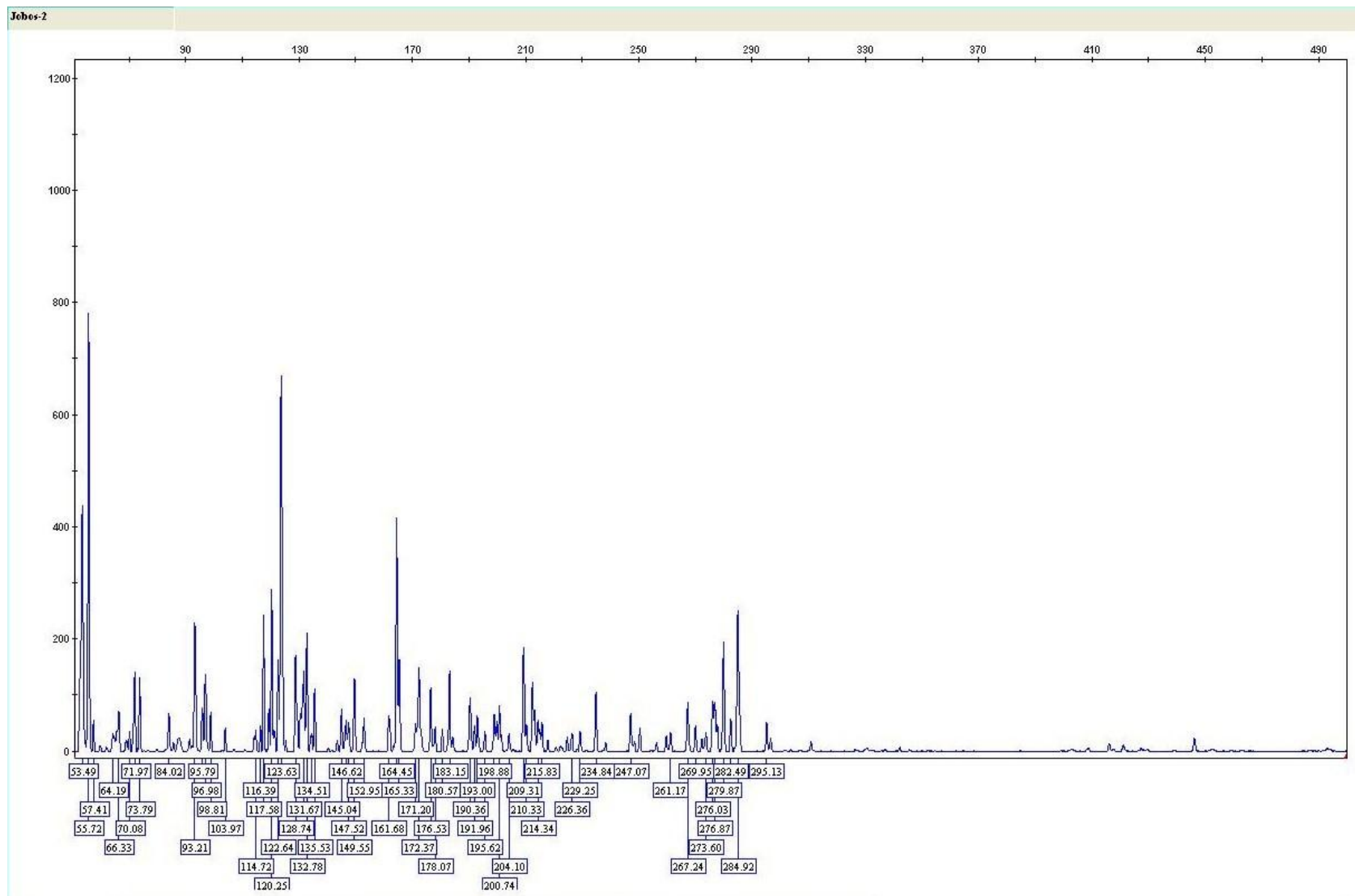


Figura 9: Picos de T-RFLP del Muestreo 1 Jobos 2

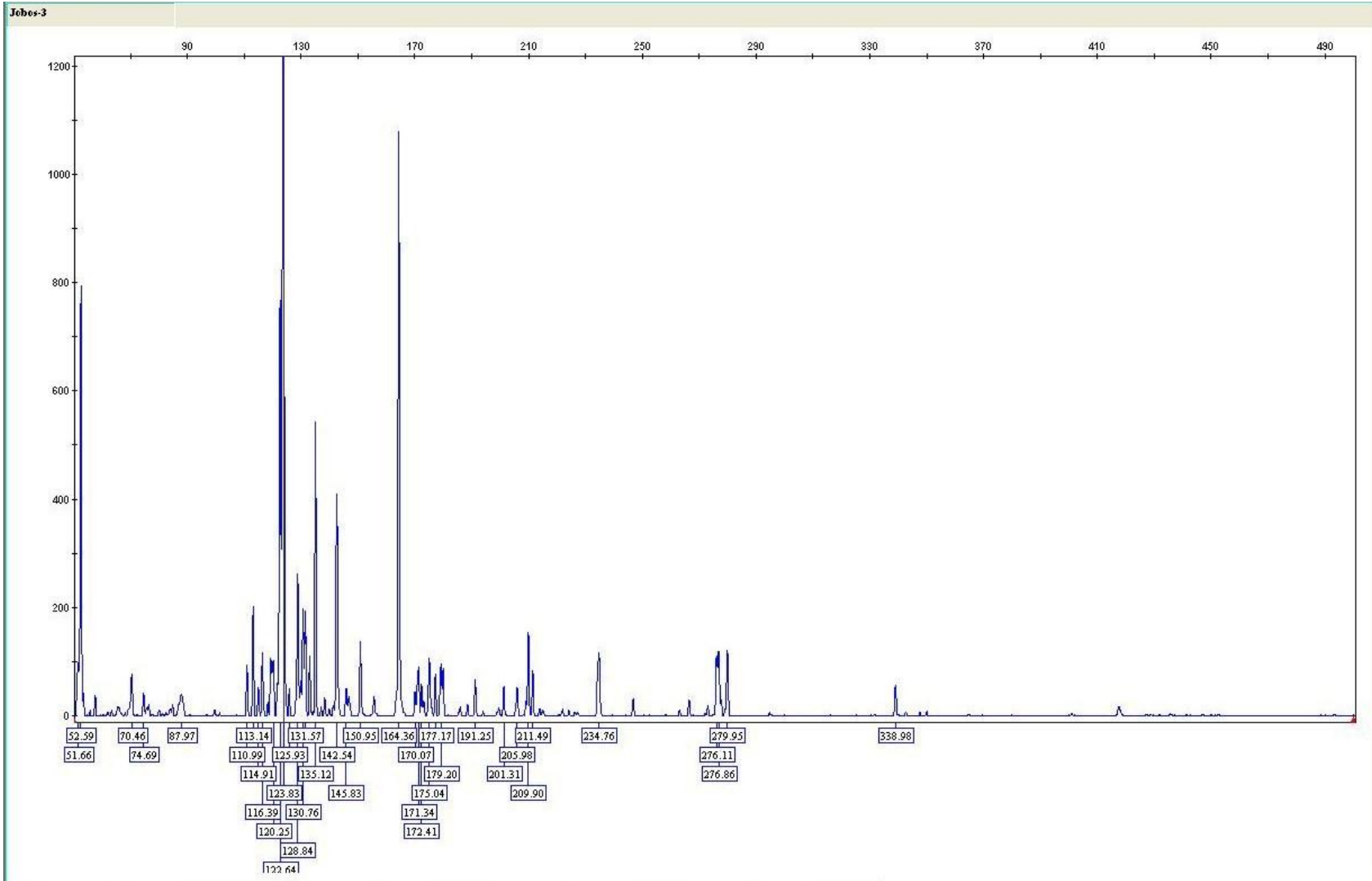


Figura 10: Picos de T-RFLP del Muestreo 1 Jobs 3

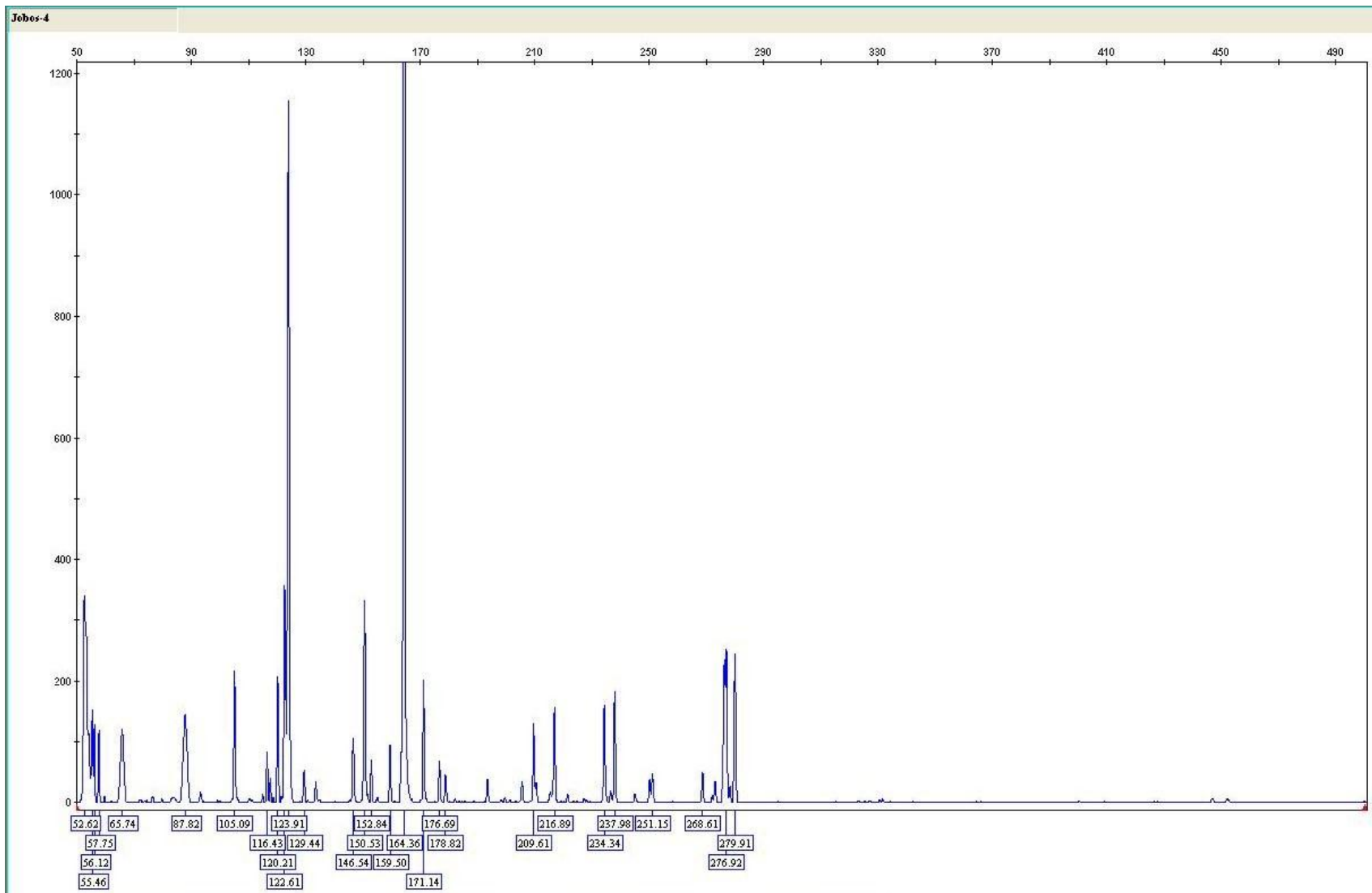


Figura 11: Picos de T-RFLP del Muestreo 1 Jobos 4



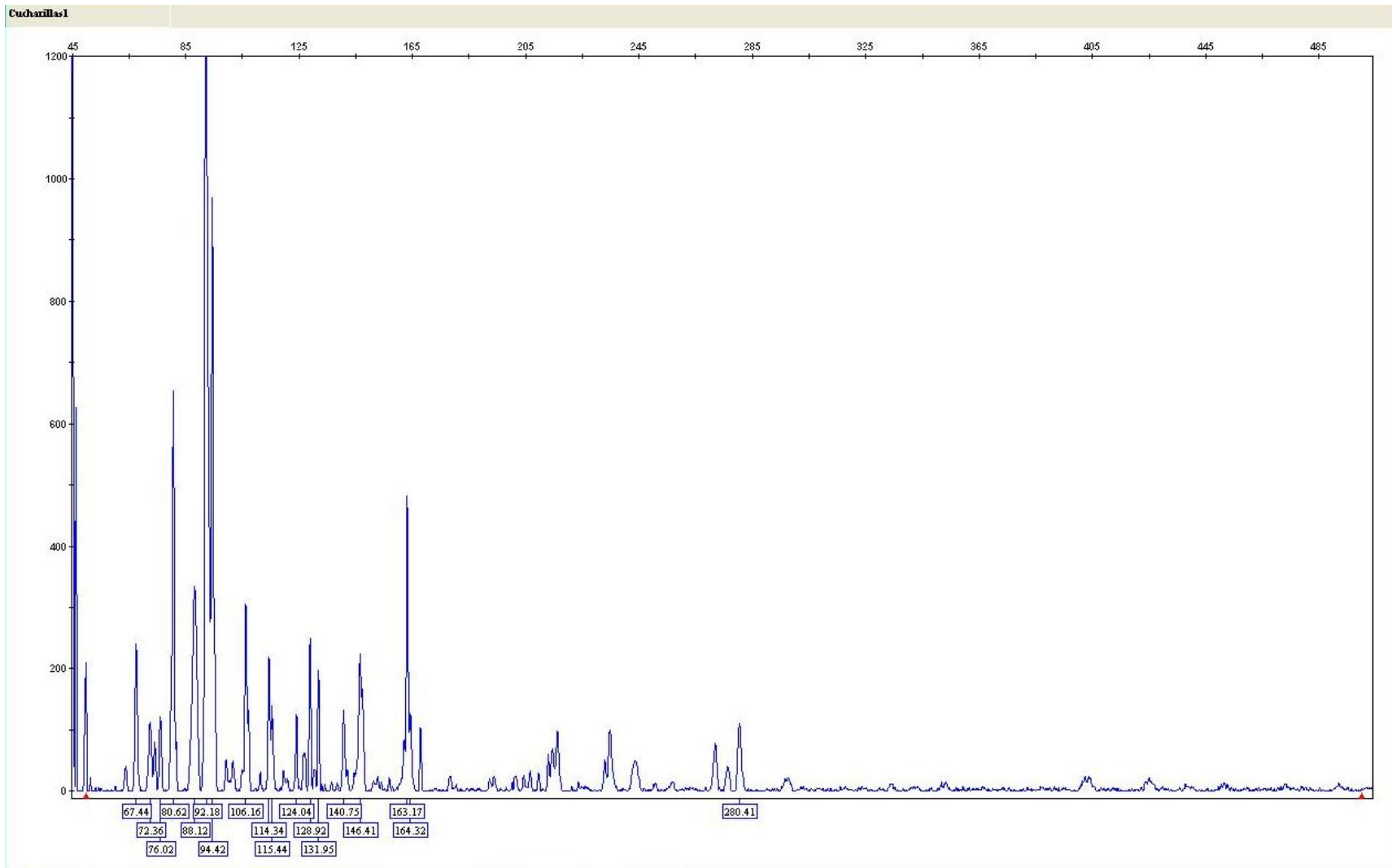


Figura 12: Picos de T-RFLP del Muestreo 2 Cucharillas 1

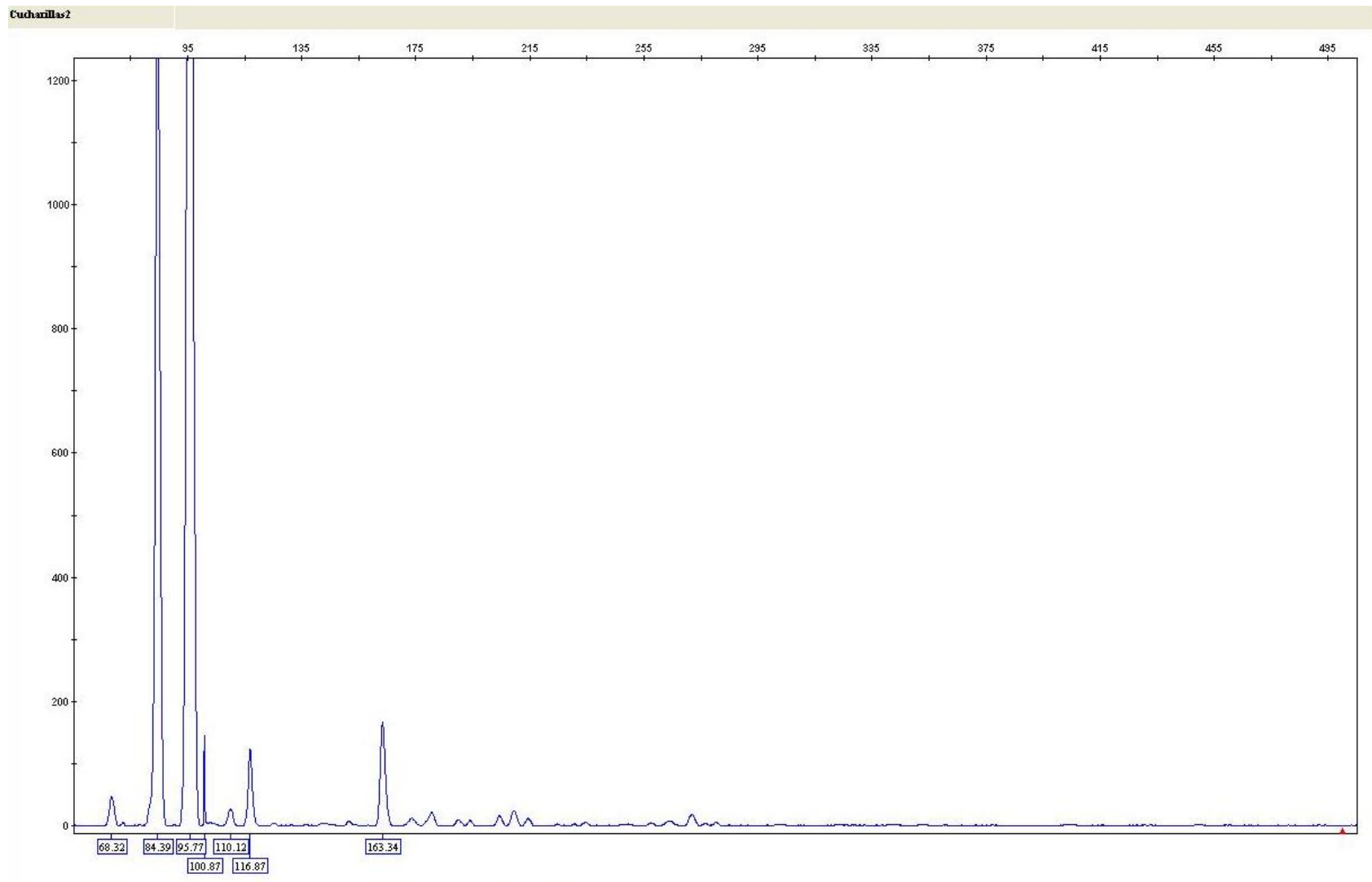


Figura 13: Picos de T-RFLP del Muestreo 2 Cucharillas 2

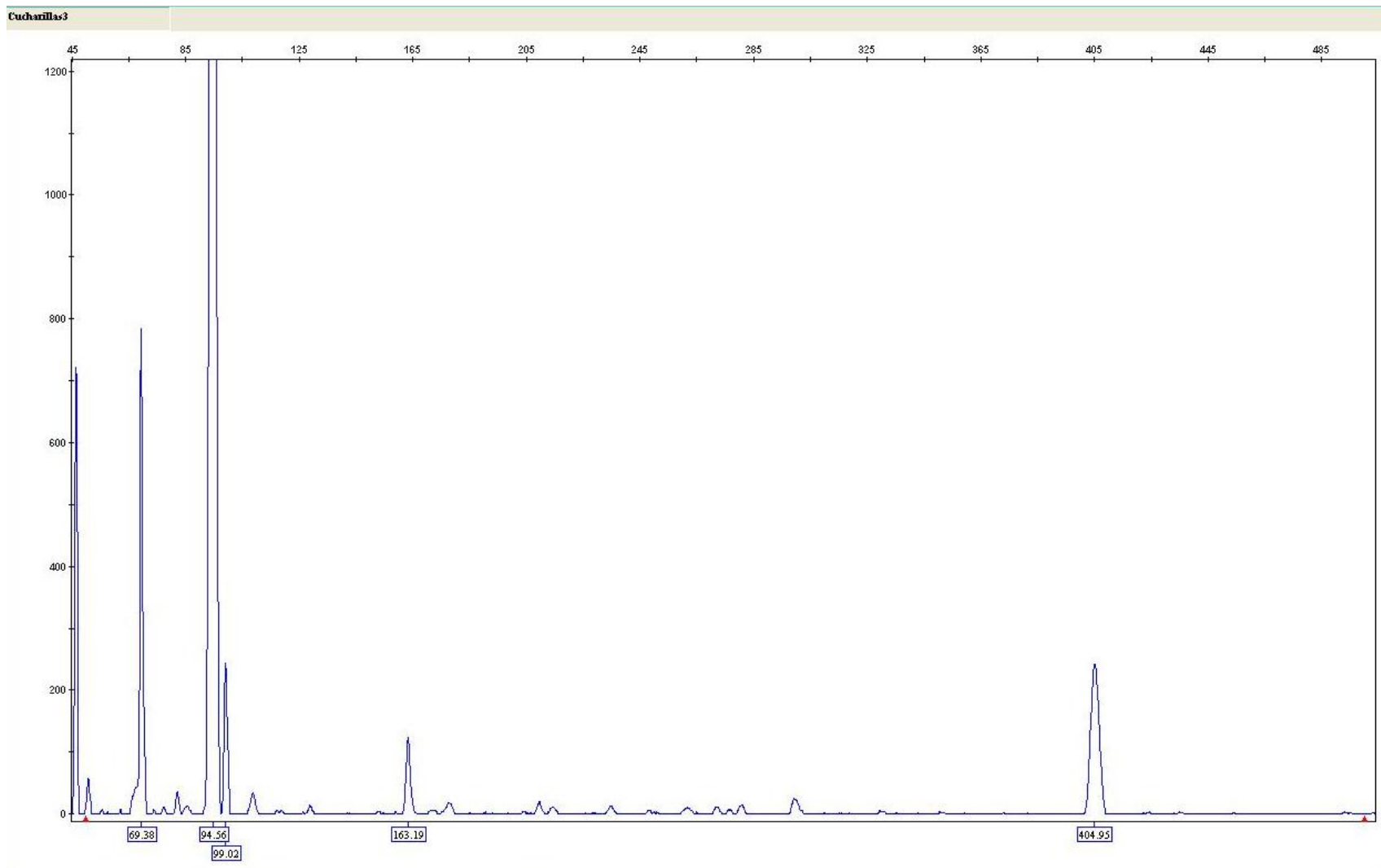


Figura 14: Picos de T-RFLP del Muestreo 2 Cucharillas 3

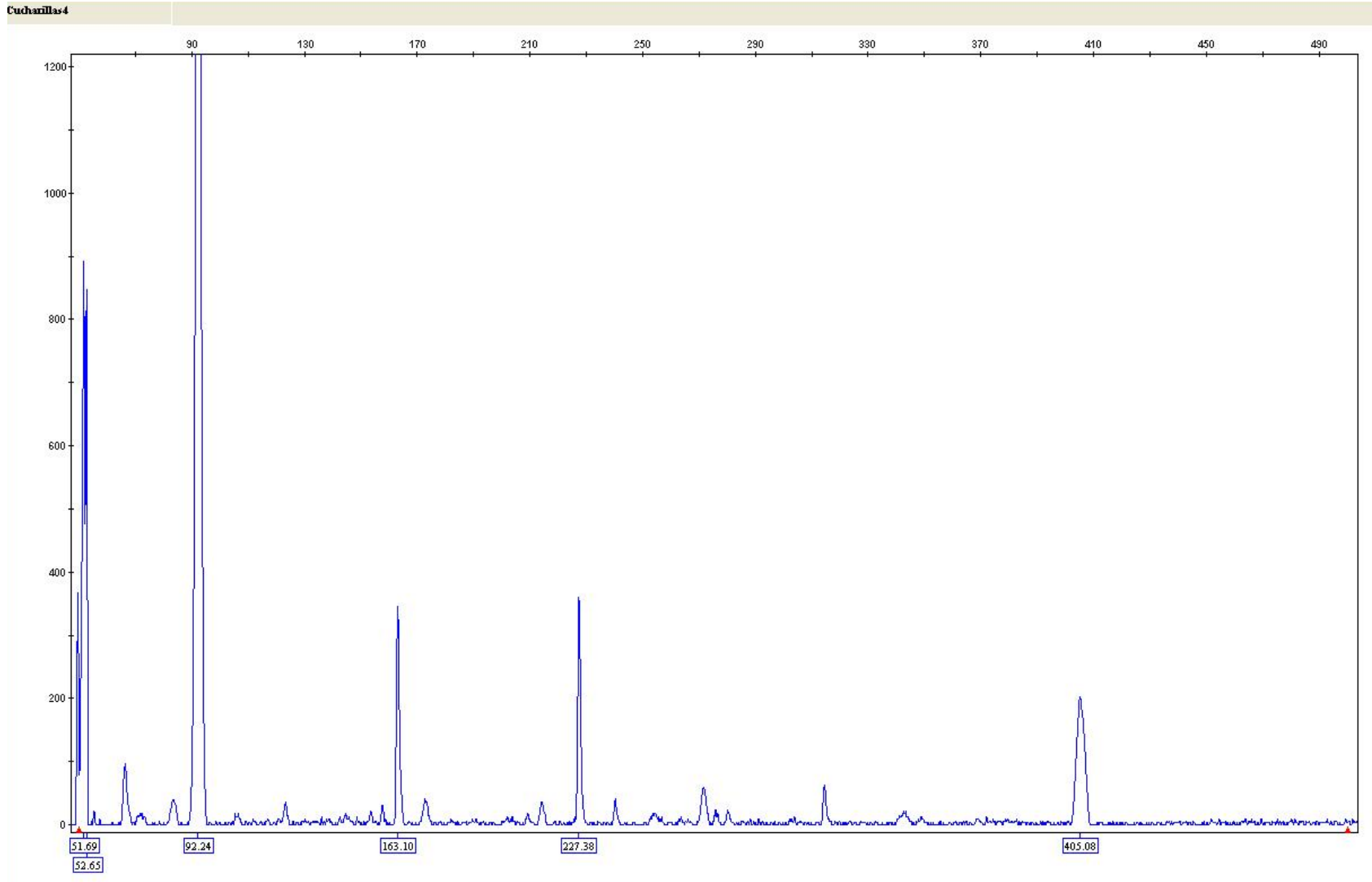


Figura 15: Picos de T-RFLP del Muestreo 2 Cucharillas 4

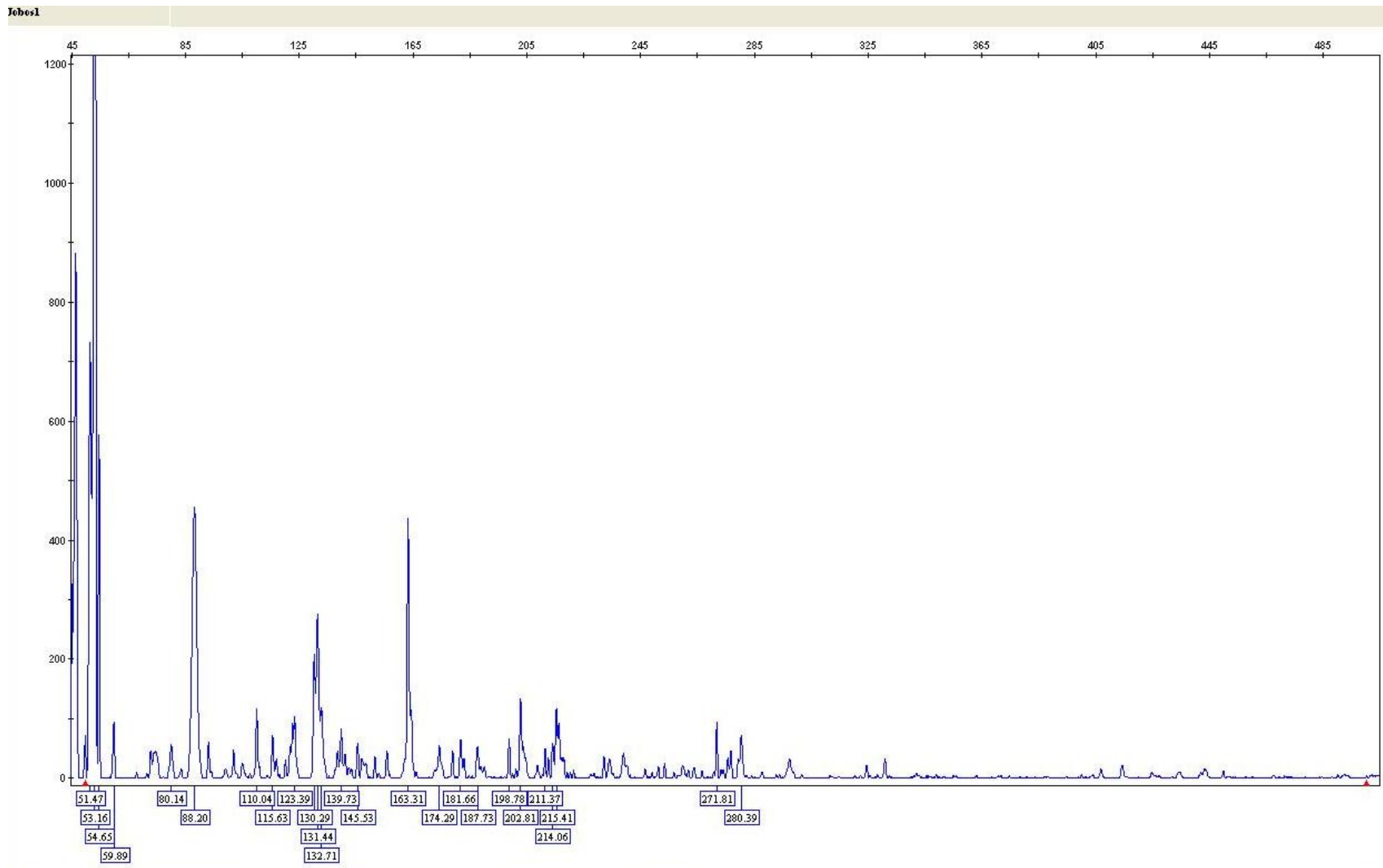


Figura 16: Picos de T-RFLP del Muestreo 2 Jobos 1

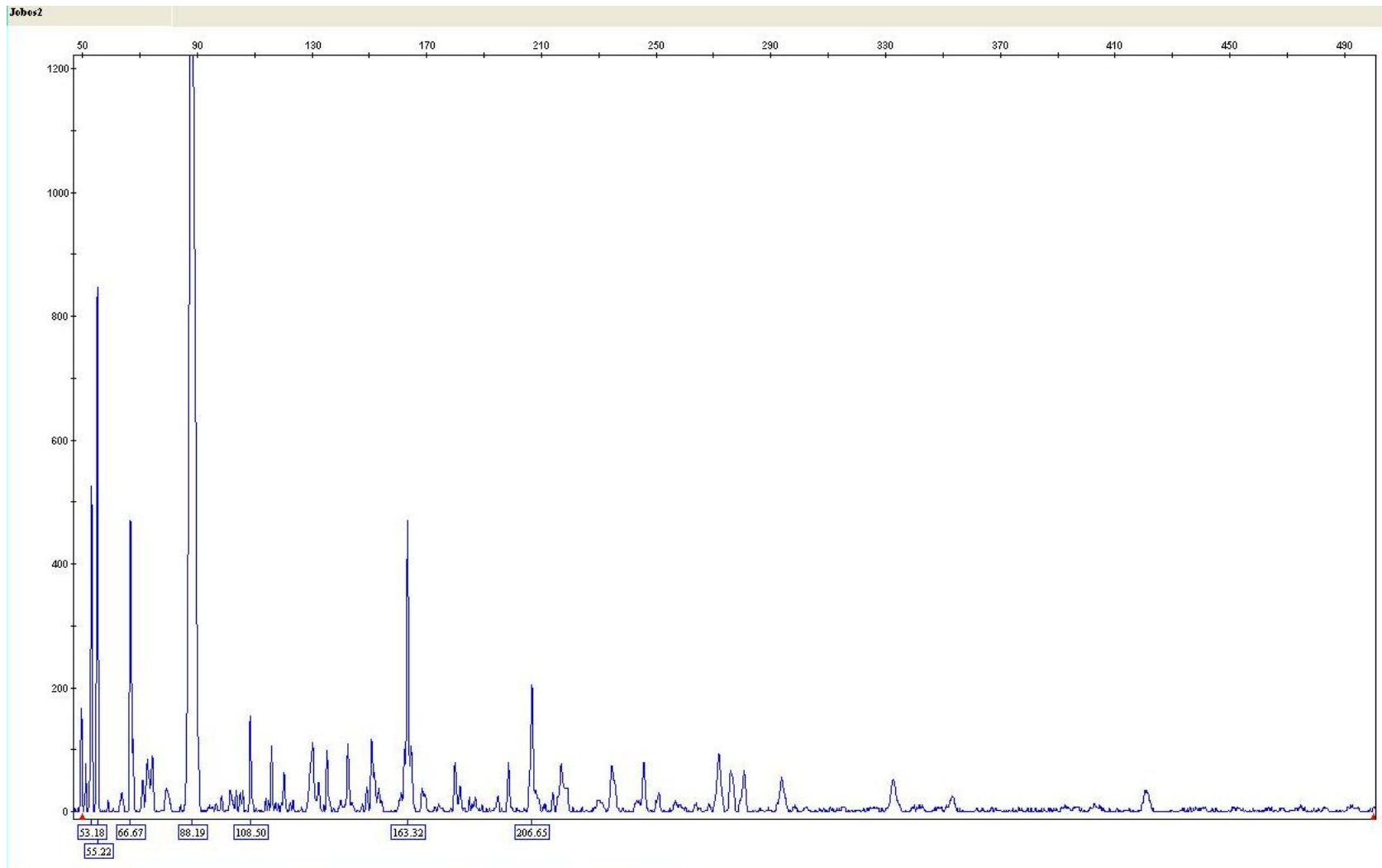


Figura 17: Picos de T-RFLP del Muestreo 2 Jobos 2

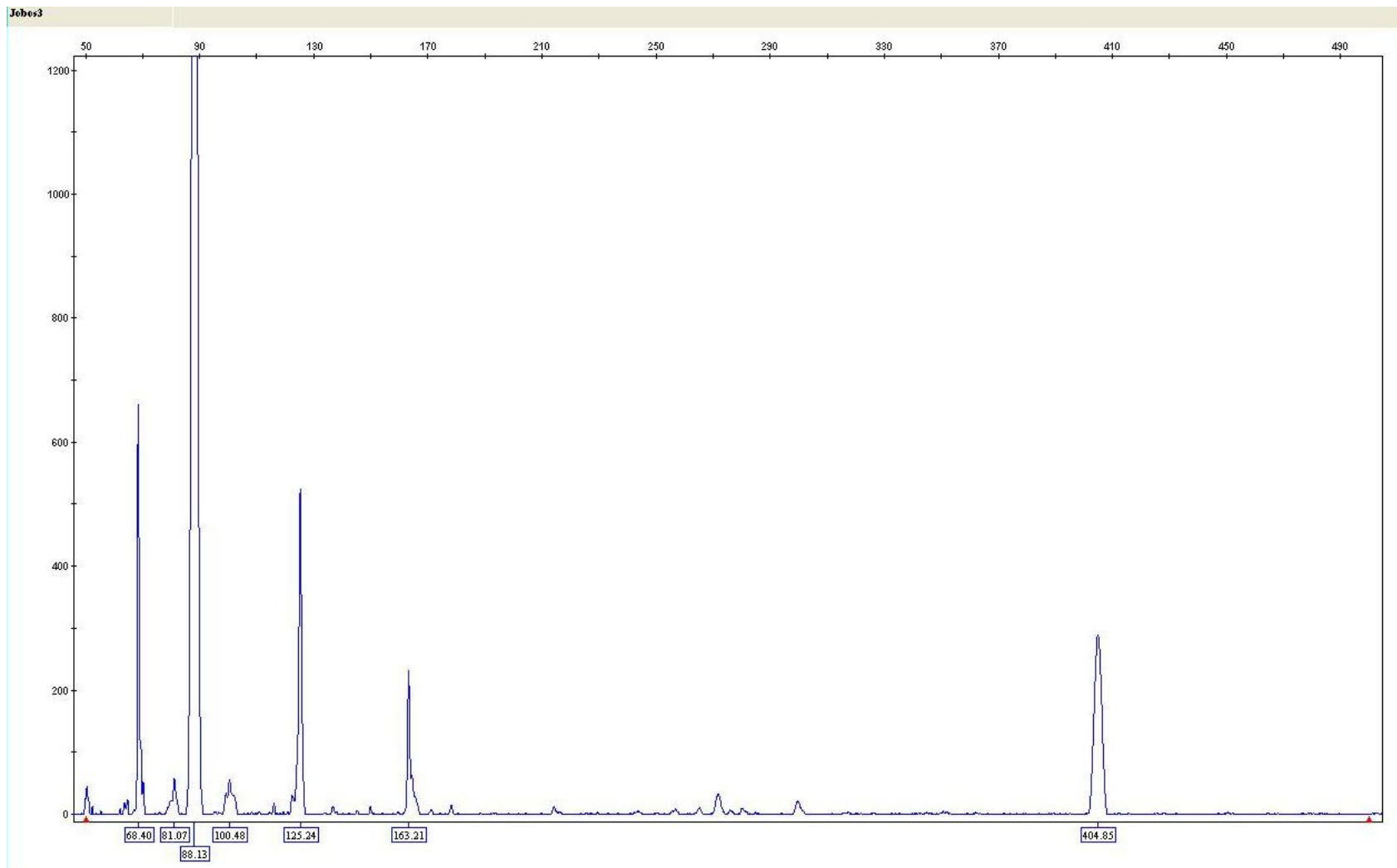


Figura 18: Picos de T-RFLP del Muestreo 2 Jobs 3

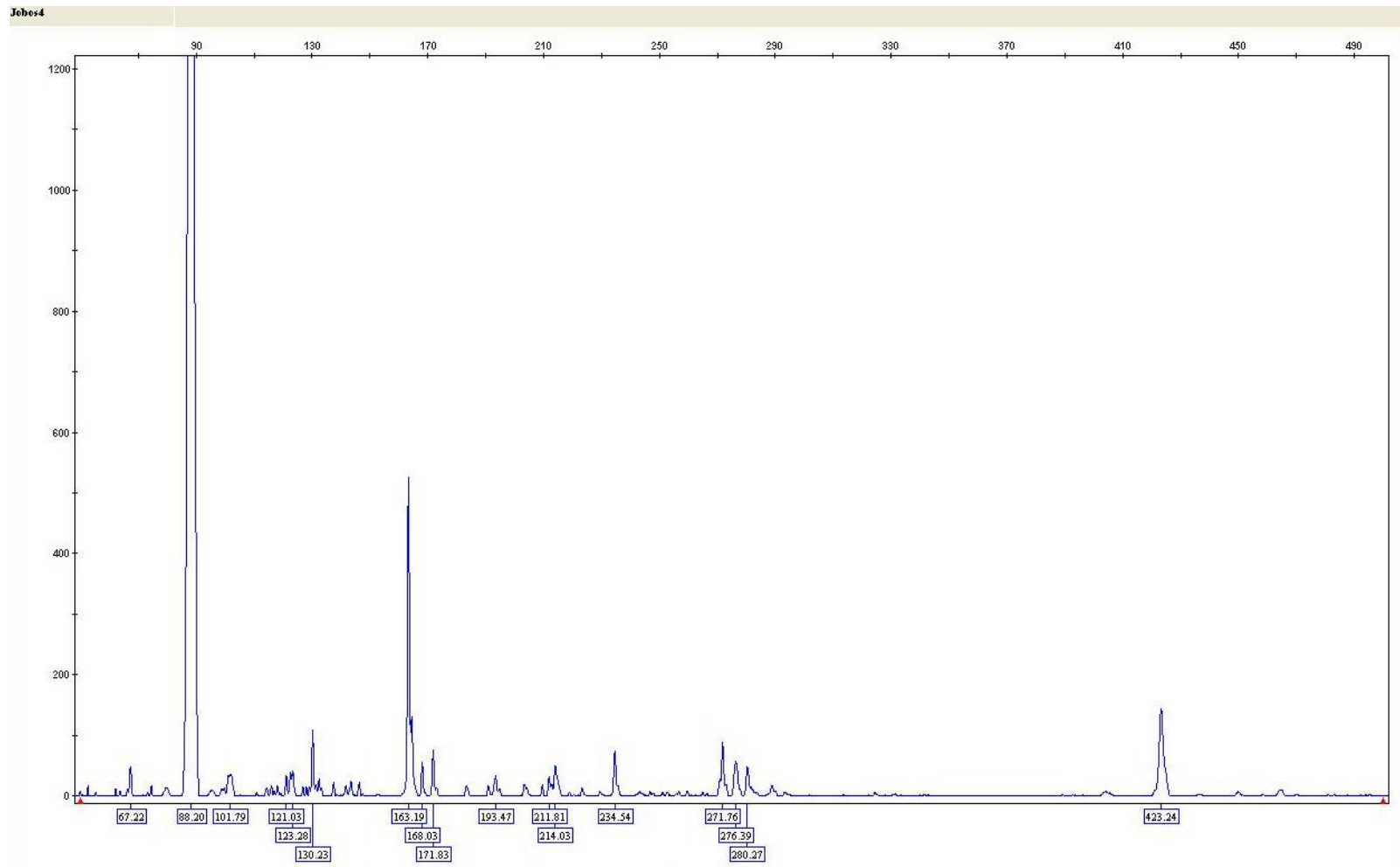
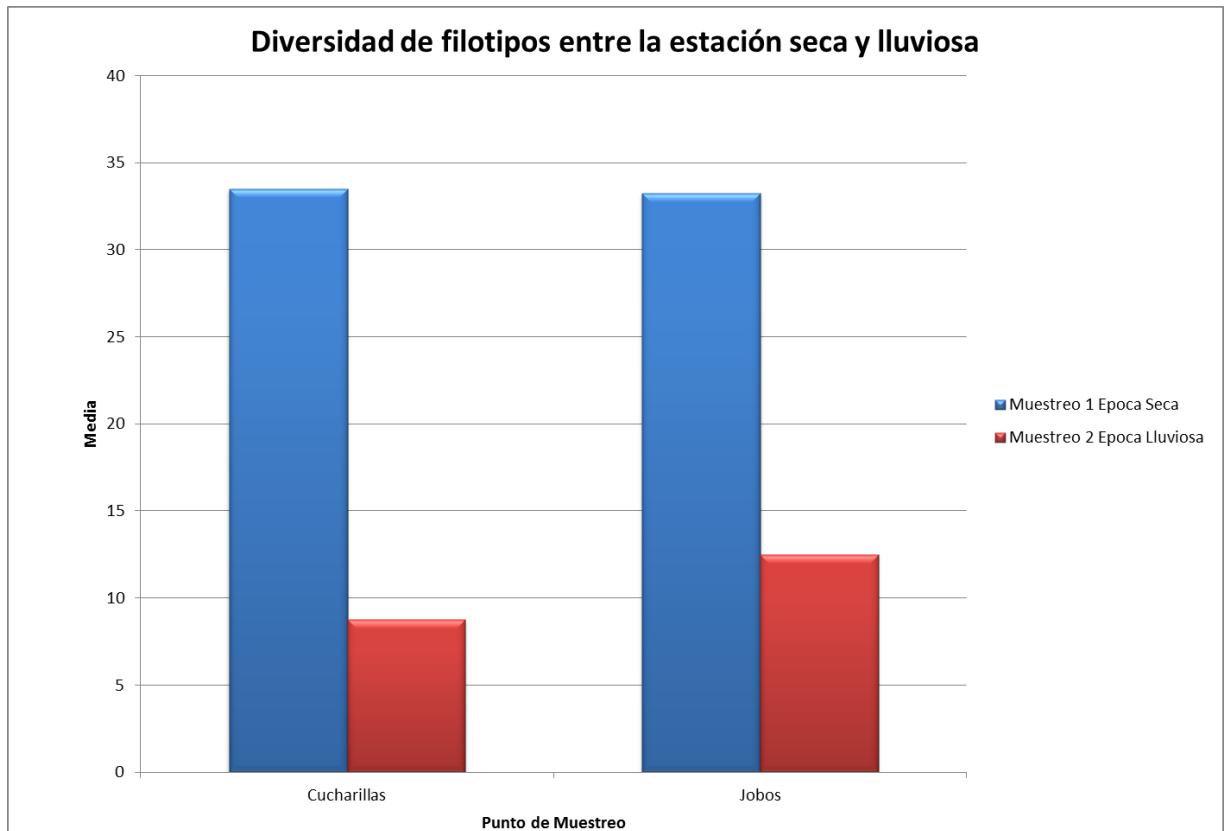


Figura 19: Picos de T-RFLP del Muestreo 2 Jobs 4

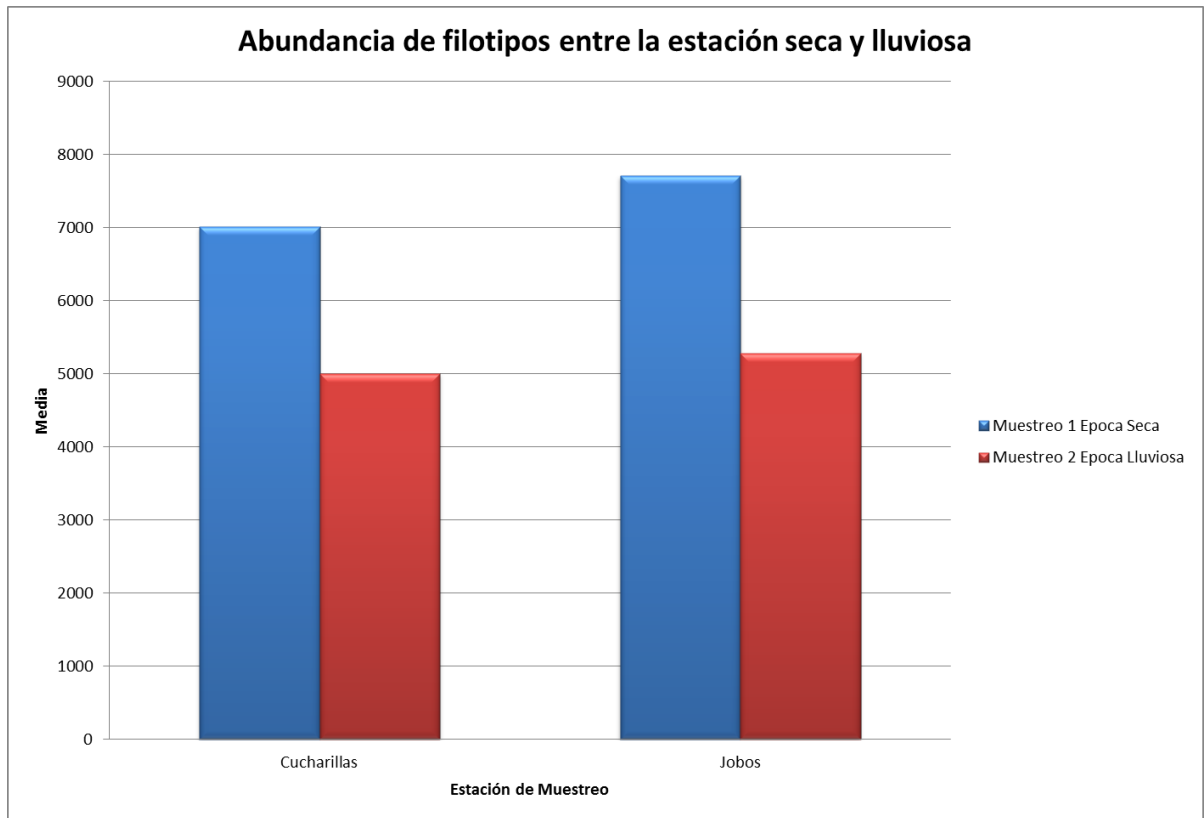
NOTA: Los picos utilizados para la investigación serán aquellos con menos de 50 de fluorescencia debido a que menos de 50 es considerado ruido y se descarta.





Paired Samples T Test		
	95% Confidence Interval of the Difference	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Muestreo 1 Cucharillas vs. Muestreo1 Jobos	.981
Pair 2	Muestreo 2 Cucharillas vs. Muestreo 2 Jobos	.094
Pair 3	Muestreo 1 Cucharillas vs. Muestreo 2 Cucharillas	.080
Pair 4	Muestreo1 Jobos vs. Muestreo 2 Jobos	.131

Figura 20: Grafica de Diversidad entre los muestreos 1 y 2 en la Ciénaga las Cucharillas vs. Bahía de Jobos con análisis de SPSS



<b>Paired Samples Test</b>		
	95% Confidence Interval of the Difference	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Muestreo 1 Cucharillas vs. Muestreo1 Jobs	.184
Pair 2	Muestreo 2 Cucharillas vs. Muestreo 2 Jobs	.312
Pair 3	Muestreo 1 Cucharillas vs. Muestreo 2 Cucharillas	.053
Pair 4	Muestreo1 Jobs vs. Muestreo 2 Jobs	.049

*Figura 21:* Grafica de Abundancia entre los Muestréos 1 y 2 en la Ciénaga las Cucharillas vs. Bahía de Jobs con análisis de SPSS

## **APÉNDICES**

APÉNDICE 1: FOTOS



Mangle Muerto - Vista desde el Vertedero BFI en el Estuario Bahía de Jobos Estaciones 3 y 4

APÉNDICE 2: FOTOS DE CUCHARILLAS ESTACIONES 1 Y 2 - TERRENOS DE LA UMET



Terrenos de la UMET



Barreno en forma de T

APÉNDICE 3: FOTOS DE CUCHARILLAS ESTACIONES 3 Y 4 - BARRIO PALMAS



Edificio frente a los puntos de muestreo C3 y C4



Area de muestreo vista desde afuera



Area de muestreo vista desde adentro

APÉNDICE 4: FOTOS DE JOBOS ESTACIONES 1 Y 2 – JBNERR



Antigua Central Azucarera



Estación de Muestreo 1



Foto General del Area de Muestreo 1



Estación de Muestreo 2



Vista General del Area de Muestreo 2

APÉNDICE 5: FOTOS DE JOBOS ESTACIONES 3 Y 4



Mangle Muerto - Vista General



Estación de Muestreo 3



Estación de Muestreo 4



APÉNDICE 6: TRES DOMINIOS DE CARL WOESE

Arbol Filogenético Universal

