



"En la Universidad de Guanajuato, todas y todos, nos comprometemos a garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia."

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0204/2020.

Asunto: TEMA DE TRABAJO.

C.

DR. JOSÉ MARIO MENDOZA CARRILLO,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación de la C. María Elena López Pérez, me permito comunicar a Usted que el tema señalado fue:

"Estudio de microorganismos resistentes a arsénico obtenidos del metagenoma de suelos del Estado de Guanajuato"

Y que dicho trabajo ha sido totalmente elaborado y cuenta con mi aprobación.

Asimismo, me permito proponer a:

Dra. Gabriela Ana Zanor
Dra. Adriana Saldaña Robles
Dra. Laila Pamela Partida Martínez
Dr. Gustavo Hernández Guzmán
Dra. María Cristina Del Rincón Castro

Para que junto conmigo integren el Jurado.

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 20 de Julio de 2020.
DIRECTOR DE TESIS


DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao;
C.P.36824 A.P. 311 , Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 01 (462) 624 18 89.



"En la Universidad de Guanajuato, todas y todos, nos comprometemos a garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia."

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0205/2020.

Asunto: REVISIÓN DE TESIS.

Irapuato, Gto., 22 de Julio de 2020.

C.

DR. JOSÉ MARIO MENDOZA CARRILLO,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

Habiendo revisado la Tesis de la Pasante C. María Elena López Pérez,

Titulada:

"Estudio de microorganismos resistentes a arsénico obtenidos del metagenoma de suelos del Estado de Guanajuato"

Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma.

DIRECTOR


DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

SINODAL


DRA. GABRIELA ANA ZANOR

SINODAL


DRA. ADRIANA SALDAÑA ROBLES

REVISOR


DRA. LAILA PAMELA PARTIDA MARTÍNEZ

REVISOR


DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ GUZMÁN

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao;
C.P.36824 A.P. 311 , Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 01 (462) 624 18 89.

www.irapuatosalamanca.ugto.mx



"En la Universidad de Guanajuato, todas y todos, nos comprometemos a garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia."

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

C.
DR. JOSÉ MARIO MENDOZA CARRILLO,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

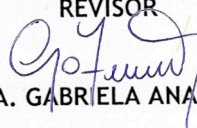
En relación al trabajo de titulación de la C. **María Elena López Pérez**, nos permitimos comunicar a Usted que el trabajo de Tesis: **"Estudio de microorganismos resistentes a arsénico obtenidos del metagenoma de suelos del Estado de Guanajuato"** que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. María Cristina Del Rincón Castro, profesora de la División de Ciencias de la Vida, ha sido terminado. El escrito fue revisado por la Dra. Gabriela Ana Zanor, Dra. Adriana Saldaña Robles, Dra. Laila Pamela Partida Martínez, y el Dr. Gustavo Hernández Guzmán y se autorizó la impresión del mismo.

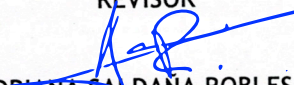
Así mismo, nos permitimos proponer para la integración del Jurado a los Señores;

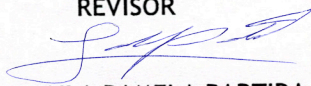
Dra. Gabriela Ana Zanor	PRESIDENTE
Dra. Adriana Saldaña Robles	SECRETARIO
Dra. Laila Pamela Partida Martínez	VOCAL
Dr. Gustavo Hernández Guzmán	VOCAL
Dra. María Cristina Del Rincón Castro	VOCAL

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 23 de Julio de 2020.


DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO
DIRECTOR

REVISOR

DRA. GABRIELA ANA ZANOR

REVISOR

DRA. ADRIANA SALDAÑA ROBLES

REVISOR

DRA. LAILA PAMELA PARTIDA MARTÍNEZ

REVISOR

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ GUZMÁN

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao:
C.P.36824 A.P. 311. Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 01 (462) 624 18 89.

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



“En la Universidad de Guanajuato, todas y todos, nos comprometemos a garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia.”

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

**“Estudio de microorganismos resistentes a arsénico
obtenidos del metagenoma de suelos del Estado de
Guanajuato”**

TESIS

QUE PRESENTA

María Elena López Pérez

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOCENCIAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

Irapuato, Gto., Julio de 2020.

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao;
C.P.36824 A.P. 311 , Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 01 (462) 624 18 89.

www.irapuatosalamanca.ugto.mx



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

**ESTUDIO DE MICROORGANISMOS RESISTENTES A ARSÉNICO
OBTENIDOS DEL METAGENOMA DE SUELOS DEL ESTADO DE
GUANAJUATO**

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOCENCIAS

Presenta

M.C. María Elena López Pérez

Directora de Tesis:

Dra. María Cristina Del Rincón Castro

Comité tutorial:

Dra. Laila Pamela Partida Martínez

Dra. Gabriela Ana Zanol

Dra. Adriana Saldaña Robles

Dr. Gustavo Hernández Guzmán

IRAPUATO, GTO.

JULIO 2020

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ
BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA CRISTINA DEL
RINCÓN CASTRO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA Y VEGETAL DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE
LA VIDA, DEL CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA, DE LA
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO.**

Resumen

El arsénico (As) es un elemento traza presente en diferentes ecosistemas. La exposición aguda y crónica al As representa un riesgo para el medio ambiente y la salud humana ya que se ha clasificado como uno de los metaloides más tóxicos y cancerígenos conocidos. La dosis letal mínima en seres humanos se sitúa en el rango de 1 a 3 mg kg⁻¹. La contaminación por As en el estado de Guanajuato ha ganado más atención en los últimos años, principalmente por los altos contenidos de As en las aguas subterráneas utilizadas para riego, que pueden acumular el As en el suelo y así ser transferido a la cadena alimentaria. También Guanajuato al ser un estado con historia de explotación minera desde el siglo XVI (principalmente para la extracción de Au y Ag), presenta suelos con relaves mineros dispersos que son una fuente de contaminación de As. En un estudio previo, se analizaron las concentraciones totales de As en suelo agrícola (MASE) y minero (SMI) en el estado de Guanajuato, México. Además, del perfil de secuencias del gen ribosomal 16S y 18S. Obteniendo que el suelo SMI mostró una mayor concentración de As (39 mg kg⁻¹) en comparación con el suelo MASE (15 mg kg⁻¹). El perfil de secuencias mostró un total de 175,240 lecturas de ambos suelos. El suelo MASE mostró una mayor diversidad de bacterias, mientras que el suelo SMI mostró una mayor diversidad de hongos. El análisis 16S rRNA mostró que las Proteobacterias son el phylum con mayor proporción (39.6% en MASE y 36.4% en SMI), seguido del phylum Acidobacterias (24.2% en SMI y 11.6% en MASE). El análisis 18S rRNA mostró que el phylum Glomeromycota se encontró solo en suelo SMI (11.6%), mientras que Ascomycota fue el más abundante, seguido de Basidiomycota y Zygomycota, en ambos suelos. Por lo tanto, en este estudio, se identificaron molecularmente aislados microbianos resistentes a As y se analizaron por su capacidad para óxido-reducir As. Asimismo, fueron identificados genes de resistencia a As en bacterias (*aoxB*, *arrA*, *arsB*, *ACR3(1)* y *ACR3(2)*), y se cuantificó el As en el medio de cultivo donde se inocularon los microorganismos. Los géneros *Bacillus* y *Penicillium* aislados de suelo SMI fueron capaces de crecer en concentraciones de As de hasta 30 mM, redujeron As (V) a As (III) y eliminaron As a tasas de 9.8% y 12.1%, respectivamente. Se identificó el gen *arsB* en *Bacillus* sp., *B. simplex* y *B. megaterium*. Se observó que la biomasa del hongo *P. rubens* disminuye 35.63% con As (III) y 51.87% con As (V). Se realizó además la extracción de proteínas en tres condiciones (sin As, con As (III) y con As (V)), encontrando diferencias en el patrón de bandeo de proteínas en el gel SDS-PAGE de una dimensión, potencialmente relacionadas a posibles proteínas involucradas en la resistencia y el transporte de arsenito en la célula microbiana. Se comprueba que los suelos altamente contaminados con As tienen una menor diversidad microbiana, pero un mayor número de microorganismos capaces de la biotransformación de este metaloide. Las bacterias y hongos encontrados en este trabajo pueden mostrar potencial para ser utilizados como agentes de biorremediación en suelos contaminados.

Palabras clave: suelo agrícola, suelo minero, arsénico, bacterias, hongos

Abstract

Arsenic (As) is a trace element present in different ecosystems. Acute and chronic exposure to As represents a risk to the environment and human health since it has been classified as one of the most toxic and carcinogenic metalloids known. The lethal dose in humans is in the range of 1 to 3 mg kg⁻¹. The contamination for As in the state of Guanajuato has gained more attention in recent years, mainly due to the high content of As in the groundwater used for irrigation, which can accumulate As in the soil that can be transferred to the food chain. Besides, Guanajuato being a state with a history of mining exploitation since the XVI century (mainly for the extraction of Au and Ag), presents soils with dispersed mining tailings that are a source of As contamination. In a previous study, concentrations of total As were analyzed in agricultural (MASE) and mining soils (SMI) in the State of Guanajuato, México. Additionally, the 16S and 18S ribosomal gene sequence profile was done. The SMI soil showed higher concentration of As (39 mg kg⁻¹) as compared to MASE soil (15 mg kg⁻¹). The sequence profile showed a total of 175,240 reads from both soils. MASE soil showed higher diversity of bacteria while the SMI soil showed higher diversity of fungi. 16S rRNA analysis showed that the phylum Proteobacteria presented the highest proportion (39.6% in MASE and 36.4% in SMI) and Acidobacteria was the second most representative (24.2% in SMI and 11.6% in MASE). 18S rRNA analysis, showed that the phylum Glomeromycota was found only in the SMI soils (11.6%), while Ascomycota was the most abundant, followed by Basidiomycota, and Zygomycota, in both soils. Therefore, in this study, As-resistant microbial isolates were molecularly identified and analyzed for their ability to oxidize-reduce As. Likewise, As-resistance genes were identified in bacteria (*aoxB*, *arrA*, *arsB*, *ACR3(1)* and *ACR3(2)*), and As was quantified in the culture medium where the microorganisms were inoculated. Genera *Bacillus* and *Penicillium* isolated from SMI soil were able to grow in As concentrations as high as 30 mM, reduced As (V) to As (III), and removed As at 9.8% and 12.1% rates, respectively. The *arsB* gene was identified in *Bacillus* sp., *B. simplex*, and *B. megaterium*. It was observed that the biomass of the *P. rubens* fungus decrease 35.63% with As (III) and 51.87% with As (V). Protein extraction was also performed under three conditions (without As, with As (III) and with As (V)), finding differences in the protein banding pattern in the one-dimensional SDS-PAGE gel, potentially related with possible proteins involved in resistance and transport of arsenite in the microbial cell. Soils highly contaminated with As are found to have a lower microbial diversity, but a greater number of microorganisms capable of biotransformation of this metalloid. Bacteria and fungi found in this work may show potential to be used as bioremediation agents in As contaminated soils.

Key words: agricultural soil, mining soil, arsenic, bacteria, fungi

Dedicatorias

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una hermosa familia. Le dedico mis esfuerzos y logros a mi mamá (Rafaela Pérez Figueroa), mi papá (Rogelio López Quiroz), mis hermanas Adry, Moni, Cecy, hermano Roge, mis sobrinos Cris, Tadeo, Matías y las pequeñas Sofi y Julieta. A mi esposo Osmar Benjamín Granados Tinoco por apoyarme y ser mi cómplice en mis aventuras de la vida, a mi bebe.

A mis amigos y compañeros que me han apoyado siempre, con los cuales he compartido incontables horas de trabajo y buenos ratos, lo cual no tiene precio. Por las conversaciones científicas de las que tanto provecho he sacado, por el respaldo y la amistad, Gracias.

*Para empezar un gran proyecto, hace falta
valentía.*

*Para terminar un gran proyecto, hace falta
perseverancia.*

(Anónimo)

Agradecimientos

Agradezco los esfuerzos, enseñanzas, atenciones, sugerencias y aportaciones en este proyecto a mi Directora de Tesis, la Dra. María Cristina del Rincón Castro, a mi Comité tutorial: la Dra. Gabriela Ana Zanor, La Dra. Laila Pamela Partida Martínez, la Dra. Adriana Saldaña Robles, el Dr. Gustavo Hernández Guzmán y todos los Profesores e Investigadores que han contribuido con mi enriquecimiento profesional y me han apoyado en mi trayectoria.

Gracias a la Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU:560783 por haberme permitido seguir y salir adelante en el campo de la investigación científica en México, gran pasión que con gusto desempeño.

Gracias a la Universidad de Guanajuato mi máxima casa de estudios por tener las puertas abiertas para seguir mi preparación profesional.

Mi agradecimiento a las personas que me han brindado su ayuda prestándome su material de laboratorio, apoyándome en las técnicas usadas para la presente investigación, los programas necesarios, entre otras cosas más. A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal (Mayra, Ana Martha, Ingrid, Angie, Jonna, Lia, Fer, Oscar y todas aquellas personas que me faltan y me han ayudado) les agradezco.

ÍNDICE

Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. ANTECEDENTES.....	18
2.1 Arsénico (As).....	18
2.2 Los microorganismos en la bioquímica del As.....	19
2.3 Contaminación de suelos en México.....	20
2.4 Biorremediación de suelos contaminados.....	22
2.5 Principios del metagenoma.....	23
2.6 La diversidad microbiana del suelo.....	26
2.6.1 Bacterias comúnmente presentes en suelos.....	27
2.6.2 Hongos comúnmente presentes en suelos.....	28
2.7 Características físico-químicas y elementos traza que influyen en la microbiota del suelo.....	29
2.8 Muestras de suelo agrícola y de jales mineros del Estado de Guanajuato.....	30
2.8.1 Metagenoma de las muestras de suelo MASE y SMI.....	33
III. JUSTIFICACIÓN.....	35
IV. HIPÓTESIS.....	35
V. OBJETIVO GENERAL.....	36
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
7.1 Identificación de organismos con potencial biotecnológico.....	37
7.2 Construcción del árbol filogenético.....	37
7.3 Preparación de los medios de cultivo y diluciones de los suelos.....	37
7.4 Identificación de microorganismos aislados.....	39
7.4.1 Extracción de DNA de bacterias.....	40
7.4.2 Extracción de DNA de hongos.....	41
7.4.3 Medición de la Integridad y cuantificación del DNA.....	41

7.4.4	Amplificación del gen 16S rDNA y los ITS´s 4 y 5	42
7.4.5	Condiciones generales para la amplificación del gen 16S rDNA.....	42
7.4.6	Condiciones generales para la amplificación de los ITS ..	43
7.5	Detección de la óxido-reducción de As.....	44
7.6	Identificación de genes implicados en la transformación química del As.....	46
7.6.1	Amplificación del gen <i>aoxB</i>	46
7.6.2	Amplificación del gen <i>arsB</i> , <i>ACR3(1)</i> y <i>ACR3(2)</i>	47
7.6.3	Amplificación del gen <i>arrA</i>	48
7.7	Extracción de proteínas	50
7.7.1	Extracción de proteínas bacterias	50
7.7.2	Extracción de proteínas de hongo por el método de ácido tricloroacético (TCA)	50
7.8	Cuantificación de As	51
7.8.1	Determinación de As por cromatografía líquida (HPLC) ..	51
7.8.2	Determinación de As (V) por el método azul de molibdeno.....	51
7.8.3	Determinación de As por Absorción Atómica.....	52
7.8.4	Determinación de As por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	53
VIII.	RESULTADOS	54
8.1	Composición taxonómica de las comunidades microbianas de suelo MASE y SMI	54
8.2	Identificación de organismos con potencial biotecnológico en el perfil de secuencias del 16S y 18S rDNA.	58
8.3	Aislamiento y selección de microorganismos resistentes a As.....	59
8.3.1	Suelo MASE	59
8.3.2	Suelo SMI	61
8.3.3	Prueba de tolerancia a diferentes concentraciones de As (III) y (V) de microorganismos aislados del suelo SMI	73
8.4	Identificación molecular de los microorganismos resistentes a As.....	75
8.5	Detección de los genes involucrados en la detoxificación y metabolismo del As en la célula microbiana.....	80
8.6	Exploración en el patrón de bandeo de proteínas en geles SDS-PAGE.....	84
8.7	Cuantificación de As	86
IX.	DISCUSIÓN	93

X. CONCLUSIONES	98
Perspectivas.....	99
XI. LITERATURA CITADA	100
XII. ANEXOS.....	112
Tabla de abreviaturas	113
OTU´s analizados del perfil de secuenciación parcial de los genes 16S y 18S rDNA.....	115
Representación en árbol filogenético de la diversidad taxonómica de especies de bacterias y hongos encontrados en los suelos MASE y SMI.....	134
Tablas de secuencias.....	136
Artículo Científico.....	150
CVU.....	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de los diferentes procesos microbianos involucrados en la bioquímica del arsénico (Paéz Espino et al. 2009).	20
Figura 2. Riesgo estimado de As en agua potable (Schwarzenbach et al. 2010).	22
Figura 3. La diversidad y abundancia de organismos (poblaciones/m ² de superficie de suelo; Lindbo et al. 2012).	26
Figura 4. Aportaciones del gen16S rDNA de miembros de diferentes phyla en bibliotecas preparadas a partir de las comunidades bacterianas del suelo (2,920 clones en 21 bibliotecas) (Janssen 2006).	28
Figura 5. Índices métricos de diversidad (Shannon y Simpson) para los genes 16S rRNA y 18S rRNA de cada muestra de suelo (López-Pérez et al. 2015). .	34
Figura 6. A) Filtrado del medio de cultivo extracto de suelo concentrado (ESC-SMI). B) Inoculación de las diluciones (10 ⁻¹ -10 ⁻⁶) de suelo SMI.	39
Figura 7. A) Protección usada en la manipulación de As (guantes, bata, cubrebocas con filtro y lentes protectores). B) Preparación del medio de cultivo ESC enriquecido con As.	39
Figura 8. A) Cámara de electroforesis y fuente de poder, B) Gel de Agarosa. 42	
Figura 9. Determinación del color del precipitado en función de la proporción de As (V)/As (III) (Simeonova et al. 2004).	45
Figura 10. Determinación de la óxido-reducción de arsénico por la reacción colorimétrica del As (V) o As (III) con AgNO ₃ (Branco et al. 2009).	45
Figura 11. Digestión de 5 g de suelo + 10 ml de HNO ₃ + 30 ml de HCl durante 3 horas a 100°C y su filtración.	51
Figura 12. Curva de calibración con el método azul de molibdeno.	52
Figura 13. Cuantificación de As en el equipo iCE 3000 Espectrómetro de Absorción Atómica.	53
Figura 14. Determinación de As por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).	53
Figura 15. Abundancia relativa a nivel de phylum de las bacterias presentes en las muestras de suelo.	55

Figura 16. Abundancia relativa de los géneros dominantes de bacterias en ambas muestras de suelos..	56
Figura 17. Abundancia relativa a nivel de phylum de los hongos de las muestras de suelo.	57
Figura 18. Abundancia relativa del género dominante de hongos en ambas muestras de suelos..	58
Figura 19. Cepas de bacterias identificadas en medios contaminados. El 100% corresponde a 84 cepas.	59
Figura 20. Detección de las bacterias oxido-reductoras de arsénico.	61
Figura 21. Clasificación de los aislados por morfología microscópica.	62
Figura 22. Detección de las bacterias óxido-reductoras de arsénico.	71
Figura 23. Detección de los hongos oxido-reductores de As.	72
Figura 24. Prueba de reducción de As (V) del hongo 44 en medio de cultivo ESC-SMI+As(V)+AgNO ₃	73
Figura 25. Biomasa de la cepa del hongo 44 en medio PD con y sin As. PD: medio papa dextrosa sin As; PD+AsIII: medio PD suplementado con 5 mM de As (III) y PD+AsV: medio PD más As (V) 5 mM.	74
Figura 26. Extracción de DNA de bacterias.	75
Figura 27. Extracción de DNA de bacterias aisladas del suelo SMI.	75
Figura 28. Extracción de DNA del hongo 44, aislado de suelo SMI.	76
Figura 29. Extracción de DNA de hongos aislados del suelo SMI.	76
Figura 30. Amplificación por PCR de DNA de bacterias y hongos usando los oligonucleótidos ITS4 e ITS5 (carril 2-6) y los oligonucleótidos fDI y rP2 para el gen 16S rDNA (carril 7-15).	77
Figura 31. Amplificación por PCR del gen <i>aoxB</i> (500 bp) de las bacterias suelo SMI.	81
Figura 32. Amplificación por PCR del gen <i>arsB</i> (750 bp) de las bacterias de suelo SMI.	81
Figura 33. Amplificación por PCR del gen <i>arrA</i> de las bacterias de suelo SMI.	82
Figura 34. Gel SDS-PAGE del hongo <i>Penicillium rubens</i> , con una concentración de proteínas de 15 µg ml ⁻¹ . Carril 1: marcador de proteínas BenchMark (kDa). Carril 2: crecimiento en medio PD (44-H PD). Carril 3: crecimiento en medio PD	

más 5 mM de As (III) (44-H PD+AsIII). Carril 4: crecimiento en medio PD más 5 mM de As (V) (44-H PD+AsV).	84
Figura 35. Gel SDS-PAGE del hongo <i>Penicillium rubens</i> , con una concentración de proteínas de 10 µg ml ⁻¹	85
Figura 36. Gel SDS-PAGE de <i>Bacillus simplex</i> (aislado 47).	86
Figura 37. Cuantificación de As total en el sobrenadante del medio de cultivo, determinado por Espectrometría de Absorción Atómica.	90
Figura 38. Identificación de elementos químicos en el suelo SMI por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).	91
Figura 39. Identificación de elementos químicos en el medio de cultivo ESC+AsV inoculado con el consorcio <i>B. simplex</i> y <i>P. rubens</i> por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).	92
Figura A.40. Árbol filogenético del gen 16S rRNA del metagenoma de suelos MASE y SMI.	134
Figura A.41. Árbol filogenético del gen 18S rRNA del metagenoma de suelos MASE y SMI.	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de especies estimadas (y accesibles) en la naturaleza (Ferrer, 2004).....	23
Tabla 2. Estudios realizados alrededor del mundo de metagenomas en suelos (Myrold et al. 2014).....	25
Tabla 3. Composición de la Corteza Continental (Rudnick & Gao, 2003).	30
Tabla 4. Sitios de Muestreo.	31
Tabla 5. Características fisicoquímicas y de ET de las muestras de suelo agrícola (MASE) y de jales mineros (SMI).....	32
Tabla 6. Oligonucleótidos usados en la secuenciación del DNA total de las muestras de suelo.	33
Tabla 7. Número de lecturas resultado del alineamiento de secuencias.....	33
Tabla 8. Medios de cultivo para la búsqueda de microorganismos de los diferentes tipos de suelo (agrícola y minero).....	38
Tabla 9. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación del gen 16S rDNA (Weisburg et al. 1991).	42
Tabla 10. Mezcla de reacción por cada muestra examinada para la amplificación del gen 16S rDNA.....	43
Tabla 11. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de los ITS (White et al. 1990).....	43
Tabla 12. Mezcla de reacción para la amplificación de los ITS´s 4 y 5.	44
Tabla 13. Secuencia de oligonucleótidos degenerados del gen <i>aoxB</i>	46
Tabla 14. Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>aoxB</i>	46
Tabla 15. Secuencia de oligonucleótidos degenerados para los genes <i>arsB</i> , <i>ACR3(1)</i> , <i>ACR3(2)</i>	47
Tabla 16. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes <i>arsB</i> , <i>ACR3(1)</i> , <i>ACR3(2)</i>	48
Tabla 17. Secuencia de oligonucleótidos degenerados del gen <i>arrA</i>	49
Tabla 18. Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>aoxB</i>	49
Tabla 19. Concentraciones de As (V) usadas para la curva de calibración por el método azul de molibdeno.	52

Tabla 20. Resultados de crecimiento de los aislados de bacterias de suelo agrícola MASE en 5 mM de As (III) y As (V) y su óxido-reducción.	60
Tabla 21. Morfología de las colonias aisladas del suelo SMI.....	62
Tabla 22. Resultados de crecimiento de los aislados de bacterias de suelo SMI en 5 mM de As (III) y As (V) y su óxido-reducción.....	70
Tabla 23. Resultados de crecimiento de los aislados de hongos en 5 mM de As (III) y As (V) y su oxido-reducción.....	72
Tabla 24. Resistencia de microorganismos a diferentes concentraciones de sales de As.	74
Tabla 25. Identificación molecular de los microorganismos aislados.	79
Tabla 26. Identidad de bacterias reductoras de As y aislados de hongos registrados en el banco de datos de NCBI.....	80
Tabla 27. Identificación molecular del producto de PCR del gen <i>arsB</i>	82
Tabla 28. Identificación molecular del producto de PCR del gen <i>arrA</i>	83
Tabla 29. Identidad de los genes <i>arsB</i> registrados en el banco de datos de NCBI.	83
Tabla 30. Concentración de As (III) y As (V) en el suelo MASE y SMI.....	87
Tabla 31. Cuantificación de As (V) y PO ₄ en el sobrenadante del medio de cultivo PD donde creció <i>P. rubens</i>	88
Tabla A.32. Abreviaturas usadas	113
Tabla A.33. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rDNA para el phylum Acidobacteria.....	115
Tabla A.34. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Actinobacteria.....	116
Tabla A.35. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Armatimonadetes.	119
Tabla A.36. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el Phylum Bacteroidetes.	119
Tabla A.37. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Candidate_division_OD1.	120
Tabla A.38. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Candidate_division_TM7.	120

Tabla A.39. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Candidate_division_WS3.	121
Tabla A.40. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Chloroflexi.	121
Tabla A.41. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Cyanobacteria.	122
Tabla A.42. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Firmicutes.	122
Tabla A.43. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Gemmatimonadetes.	122
Tabla A.44. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Nitrospirae.	124
Tabla A.45. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Planctomycetes.	124
Tabla A.46. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Proteobacteria.	124
Tabla A.47. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Verrucomicrobia.	129
Tabla A.48. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 18S rRNA para el phylum Ascomycota.	129
Tabla A.49. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 18S rRNA para el phylum Basidiomycota.	131
Tabla A.50. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 18S rRNA para el phylum Glomeromycota.	132
Tabla A.51. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 18S rRNA para el phylum Zygomycota.	132
Tabla A.52. Secuencias obtenidas de la amplificación del gen rDNA 16s y los ITS's 4 y 5 de los diferentes aislados.	136
Tabla A.53. Secuencias obtenidas de la amplificación de los genes implicados en la oxido-reducción de arsénico de los diferentes aislados.	145

I. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es uno de los elementos presentes en el suelo ya sea de forma natural o antropogénica que puede ocasionar problemas al ambiente y la salud humana por su alta toxicidad (Medel et al. 2008). La concentración promedio de As en suelos alrededor del mundo varía de 0.2 a 40 mg kg⁻¹ (Bundschuh et al. 2008) y la dosis letal mínima en seres humanos se sitúa en el rango de 1 a 3 mg kg⁻¹ (ATSDR 2009). Este metaloide se puede encontrar en diferentes especies químicas, siendo el arsenito [As (III)] y el arsenato [As (V)] las formas inorgánicas más abundantes en el ambiente y el As (III) la especie más tóxica y móvil (Cai et al. 2009).

En las últimas décadas, el aumento de la población y consecuentemente el desarrollo urbano, industrial y agrícola, han ocasionado que aumenten los niveles de contaminación de As en el suelo. En el estado de Guanajuato, México, estudios revelaron que la región contiene altos niveles de As en las aguas subterráneas utilizadas para riego y además están por encima de los límites estándar mundiales aceptados (0.01 mg L⁻¹), con una media de 0.33 mg L⁻¹ (Rodríguez et al. 2016), una acumulación en suelos en un rango de 1.0 a 14.0 mg kg⁻¹ (López-Pérez et al. 2017; Zanol et al. 2019) y en cultivos con una media de 14.1 mg kg⁻¹ en cebada (Saldaña-Robles et al. 2018). Asimismo, Guanajuato tiene una historia de explotación minera desde el siglo XVI (principalmente para la extracción de Au y Ag), con relaves mineros históricos dispersos alrededor de la ciudad de Guanajuato y extendidos en la cuenca hidrológica, que hoy en día están cubiertos principalmente por vegetación, urbanización o dispersos por la erosión que pueden ocasionar problemas a la salud humana y el medio ambiente (Carrillo-Chávez et al. 2003).

La resistencia de los microorganismos a elementos tóxicos como el As ha hecho que estos jueguen un rol muy importante en la movilización, biotransformación y biodisponibilidad de las distintas especies de As (Cai et al., 2009; Mellado et al., 2011). Estos microorganismos se encuentran entre los miles de taxones de bacterias, arqueas y eucariotas que existen en el suelo y que, a pesar de comprender solo un pequeño porcentaje del total de la masa de la materia orgánica del suelo, son considerados una gran influencia para el buen funcionamiento de los ecosistemas. En estudios previos se han aislado microorganismos capaces de oxidar y reducir las especies de As en el medio transformando su toxicidad, entre los cuales se han

obtenido bacilos Gram negativos identificados como *Pseudomonas alcaligenes* y *Wautersia solanacearum*, así como otras bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, capaces de tolerar altas concentraciones de As (8-20 mM), donde además se observó que la capacidad de oxidar arsenito de las cepas aisladas, favorecería la colonización de otras especies no tolerantes a As importantes en los ciclos biogeoquímicos (Campos et al. 2007; Cai et al. 2009).

Las interacciones de los microorganismos con su entorno y con otros seres vivos han sido el objeto de innumerables investigaciones, no solamente con el fin de entenderlas sino también de revelar el potencial biotecnológico que esconden. Actualmente se pueden abordar estrategias moleculares para estudiar las comunidades microbianas tanto cultivables como no cultivables en su entorno natural, una de estas estrategias es la metagenómica. El metagenoma se puede definir como el total de DNA de una muestra ambiental, que después con el uso de métodos de secuenciación masiva generarán genomas completos de organismos no cultivables para su estudio (Hernández-León et al. 2010). Se han investigado metagenomas de diversos ambientes, incluyendo ecosistemas acuáticos, minas, suelos agrícolas y forestales, entre otros. En algunos casos, se han descubierto novedosos elementos genéticos que podrían tener aplicación en la industria, mientras que, en otros, han aportado novedosos aspectos de la ecología microbiana en un ecosistema en particular. Además, el uso de la metagenómica ha permitido monitorear el efecto de contaminantes en ecosistemas, así como también estudiar las comunidades microbianas que le hacen frente a esos compuestos (Hernández-León et al. 2010).

Para contribuir al conocimiento de microorganismos con potencial biotecnológico, este proyecto tuvo la finalidad de estudiar la comunidad microbiana de dos tipos suelos con alto contenido de As, uno de dedicación a la agricultura (15 mg de As kg⁻¹) y otro con restos de jales mineros (39 mg de As kg⁻¹). Se identificaron los microorganismos resistentes a As (>5 mM, equivalente a 374.6 mg L⁻¹) y se probó su capacidad para óxido-reducir este metaloide, además del estudio de genes implicados en esta transformación química y la cuantificación del As transformado.

II. ANTECEDENTES

2.1 Arsénico (As)

El arsénico (As) es un elemento traza tóxico presente en diferentes ecosistemas por procesos naturales (en la corteza terrestre en un promedio de 2 ppm) y la actividad antrópica. El As se encuentra comúnmente en forma inorgánica [As (III) y As (V)], cambiando su estado de oxidación por procesos redox en el medio ambiente natural. El As (III) es mucho más tóxico y móvil que el As (V), por lo que su transformación puede influir en gran medida en la salud humana (Galvão & Corey 1987; Cai et al., 2009).

La combinación del As con otros compuestos químicos altera su toxicidad según la solubilidad del compuesto y según la valencia del As en él. El As se usa en la agricultura (plaguicidas), en la industria (acero, cerámica, etc.) y en la extracción o purificación de otros minerales. Se dispersa a través del aire, agua, suelo, alimentos y otros productos como el tabaco (Galvão & Corey 1987). La exposición a altos niveles de As inorgánico puede deberse a diversas causas, como el consumo de agua contaminada o su uso para el riego de cultivos alimentarios y para procesos industriales. Según la organización mundial de la salud (OMS, 2017), la exposición prolongada al As a través del consumo de agua y alimentos contaminados puede causar cáncer (principalmente en pulmón, piel y vejiga) y lesiones cutáneas. También se ha asociado a problemas de desarrollo, enfermedades cardiovasculares, neurotoxicidad y diabetes, por lo que la intervención más importante consiste en prevenir que la población se prolongue a la exposición de As.

La alta toxicidad del As se puede explicar porque este metaloide interfiere directamente con la respiración celular. El As se une a los grupos sulfhídricos y descompone a las enzimas que los contienen. El As (III) es particularmente potente en este sentido. Como resultado de estos efectos críticos enzimáticos también: se inhibe la ruta de oxidación del piruvato y el ciclo del ácido tricarbóxico, se afecta la gluconeogénesis, y se reduce la fosforilación oxidativa. También el anión de As (V) poco estable reemplaza al anión de fósforo presente en los fosfatos, lo cual provoca una rápida hidrólisis de los enlaces de alta energía de compuestos como el ATP. Cuando el As se presenta en forma inorgánica como gas arsina (AsH_3) se pega

rápida a los glóbulos rojos, causándoles un daño irreversible en la membrana celular (ATSDR, 2009).

2.2 Los microorganismos en la bioquímica del As

La movilidad, disponibilidad y especiación del As es afectada por el metabolismo microbiano que participa en el ciclo biogeoquímico de este elemento. Entre las actividades microbianas se ha encontrado que algunas cepas juegan un papel fundamental en la incorporación de As en su metabolismo a través de reacciones de óxido-reducción, transformación enzimática, metilación, quelación, exclusión e inmovilización (Cai et al. 2009; Rangel-Montoya et al. 2015). Los principales mecanismos de resistencia bacteriana, se encuentran asociados a determinantes genéticos. En el caso de las bacterias arseniato-reductoras Gram-negativas, el sistema más estudiado corresponde al operón *ars* el cual puede ser de origen plasmidial o cromosomal y funcionar bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Silver & Phung 2005; Mellado et al. 2011). En el plásmido R733, de *E. coli*, se han encontrado cinco genes: *arsA*, *arsB*, *arsC*, *arsD* y *arsR*, mientras que a nivel cromosomal solo tres: *arsB*, *arsC*, y *arsR*. El gen *arsC*, codifica para una proteína encargada de mediar la reducción de arseniato a arsenito en el citoplasma, para luego ser eliminado hacia el exterior de la célula a través de una bomba específica de eflujo (ATPasa) asociada a una subunidad integral en la membrana, formando el complejo *arsAB*, codificado por los genes *arsA* y *arsB*, respectivamente. Los genes *arsD* y *arsR* codifican para proteínas responsables de la regulación del operón (Rosen 2002; Mellado et al. 2011). Además, estos genes se encuentran presentes en bacterias que se han caracterizado en términos de su resistencia a arsénico (Jackson et al. 2005). Asimismo, Cai et al. en el 2009 realizó la búsqueda de genes involucrados en la oxidación de As (III); el gen *aoxB* que codifica para la subunidad mayor de la enzima arsenito-oxidasa (large Mo-pterin) y los genes que codifican para diferentes proteínas transportadoras de arsenito en la célula microbiana (*arsB*, *ACR3(1)* y *ACR3(2)*) resultando que, generalmente éstos se encuentran en bacterias aisladas de suelo altamente contaminado con As (20 mM). También se encontró que los microorganismos requieren de proteínas asociadas a la membrana que transfieran

electrones desde o hacia el arsenito (*AoxAB* o *ArrAB*), u otras transformaciones enzimáticas como la metilación-dimetilación, proponiendo el modelo de la Figura 1.

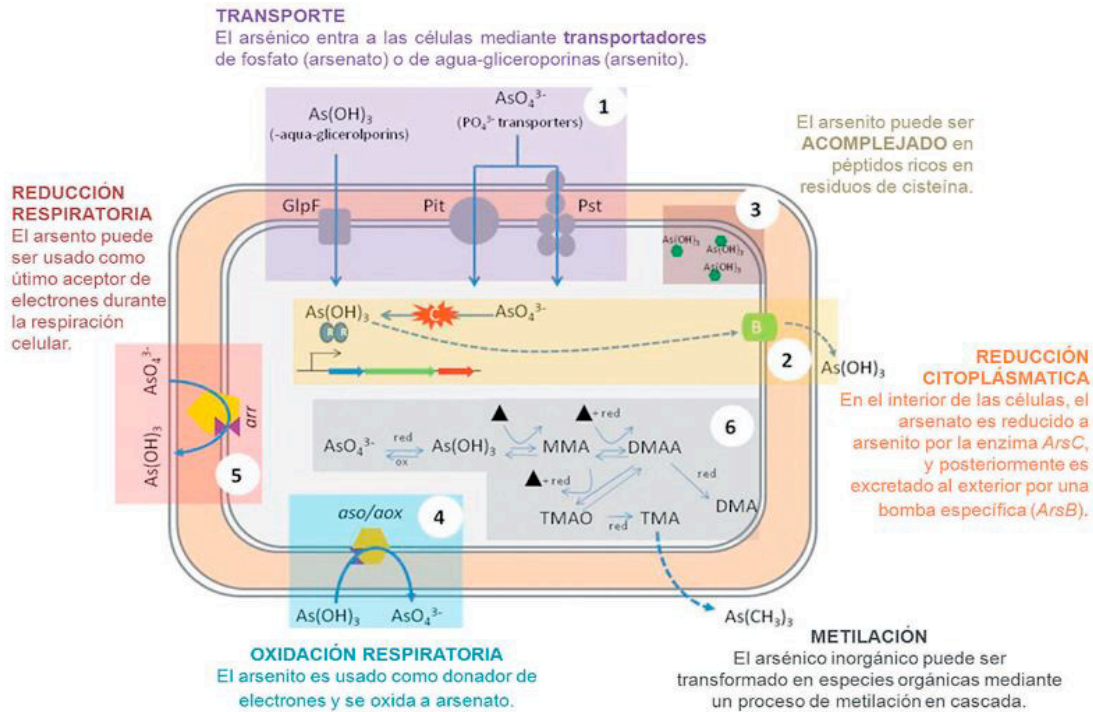


Figura 1. Diagrama de los diferentes procesos microbianos involucrados en la bioquímica del arsénico (Paéz Espino et al. 2009).

2.3 Contaminación de suelos en México

La composición del suelo puede ser alterada por diversas actividades antropogénicas además de aspectos naturales (condiciones abióticas y bióticas), transformando la biodisponibilidad de los nutrientes del suelo y, como consecuencia, las poblaciones microbianas presentes en el mismo.

En las últimas décadas, el aumento de la población y consecuentemente el desarrollo urbano, industrial y agrícola, han ocasionado que el suelo se convierta en un recurso natural en estado crítico. SEMARNAT (2012) reportó que la degradación química (disminución de la fertilidad, polución, salinización/alcalinización y eutrofización) asociada a las actividades agrícolas fue el proceso de degradación del suelo más extendido en México en el año 2002, con alrededor de 34.04 millones de hectáreas afectadas (17.8 % del territorio nacional). A nivel estatal, Guanajuato registró un 28.9 % de suelo afectado por degradación química mientras que un 2.5 %

del territorio del estado mostró algún tipo de degradación física (disminución de la capacidad para absorber y almacenar agua), conllevando a la pérdida de la función productiva de los terrenos. La contaminación por fertilizantes, plaguicidas, derivados de petroquímicos como la gasolina y pinturas, deposiciones atmosféricas procedentes de zonas industriales y urbanas, los vertidos de aguas residuales, riego procedente de aguas subterráneas, desechos de las minas, entre otros, son los principales factores que contribuyen al deterioro del suelo ocasionando un riesgo significativo para el sistema edáfico y las cadenas tróficas involucradas (Balderas-Plata et al. 2003; Alloway 2012).

Los procesos mineros utilizados para la obtención de minerales con valor comercial generan residuos que constituyen una de las principales causas de la contaminación de los suelos con elementos potencialmente tóxicos (EPT). En diferentes regiones de México, las actividades mineras se caracterizan por la generación de grandes cantidades de residuos que contienen EPT que se pueden dispersar al entorno con la subsecuente afectación de los suelos y sedimentos, donde se acumulan por tiempo indefinido, lo que puede representar un riesgo a la salud humana y al ambiente en general. Los residuos mineros son una fuente importante de arsénico y metales pesados que, al estar sujetos a la dispersión eólica e hídrica, pueden ser la causa de la contaminación de suelos en grandes superficies de terreno (Pérez-Martínez & Romero, 2015).

En cuanto a la distribución de As en México, en la Figura 2, se puede observar que el centro y sur del país presentan un alto riesgo por contaminación de As en agua potable que afecta la contaminación de suelos, mientras que en otras zonas del país presentan un riesgo bajo (Schwarzenbach et al. 2010).

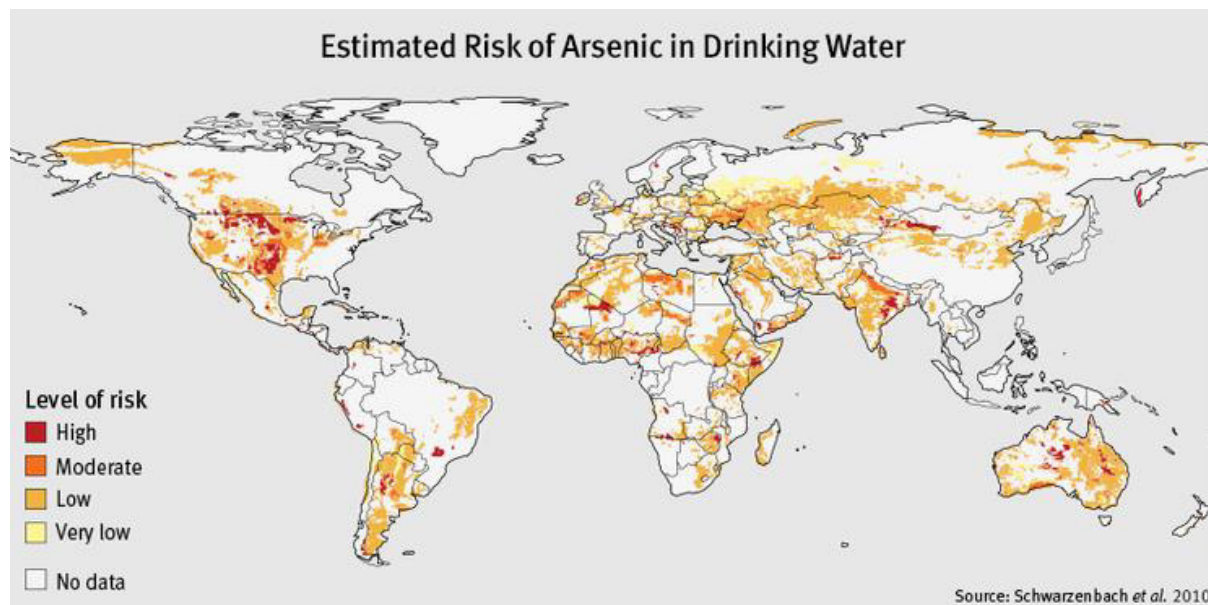


Figura 2. Riesgo estimado de As en agua potable (Schwarzenbach et al. 2010).

2.4 Biorremediación de suelos contaminados

El concepto de biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros), para remover (extraer), degradar (biodegradar) o transformar (biotransformar) compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos (Van Deuren et al. 1997; Velasco & Volke-Sepúlveda 2003). La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio (autóctonos) o ajenos a éste (exógenos) y llevarse a cabo en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). Al igual que otras tecnologías de remediación, la biorremediación puede realizarse en el mismo sitio sin necesidad de excavar el material contaminado (*in situ*), o bien excavándolo para tratarlo en el sitio (*on site*) o fuera de él (*ex situ*) (Eweis et al. 1998; Velasco & Volke-Sepúlveda, 2003).

En los últimos años se ha usado la biorremediación para tratar diferentes contaminantes en suelo, por ejemplo, en el tratamiento de combustibles derivados del petróleo y metales pesados que causan gran daño en la fertilidad de los suelos. Dueñas et al. (2014) realizó un estudio donde logró hasta un 60 % de remoción de As en agua con la microalga *Chlorella vulgaris*. Gu et al. (2018), en la búsqueda de microorganismos resistentes a altas concentraciones de As y capaces de actuar en la transformación química del mismo, reporta que aisló una cepa del helecho *Pteris vittata* que puede contribuir en incrementar la eficiencia de la extracción del metaloide.

Asimismo, hay un gran número de estudios de bacterias tolerantes y capaces de transformar las especies químicas de As para hacerlo menos tóxico (Silver & Phung 2005; Cai et al. 2009; Paéz Espino et al. 2009; Mellado et al. 2011).

2.5 Principios del metagenoma

Hasta hace algunos años la microbiología tradicional se basaba en el estudio de microorganismos como especies aisladas, y se conocía muy poco sobre el papel que desempeñaban las comunidades microbianas en su ambiente natural. Debido probablemente a que la mayoría de las especies eran microorganismos no cultivables, es decir, se desconocía de sus requerimientos nutricionales y fisiológicos para su crecimiento y, por lo tanto, no eran estudiadas (Rondon et al. 2000). Para contrarrestar esta limitante, se han desarrollado métodos que permiten poder aislar y amplificar el material genético de todos los microorganismos contenidos en diferentes ambientes (Rondon et al. 2000). El desarrollo de métodos moleculares (y las herramientas necesarias para analizar la asociación de datos) aplicados a la ecología microbiana ha permitido estimar que la diversidad existente en la naturaleza se encuentra entre 10^5 y 10^7 especies (siendo el concepto de especie en procariontas más amplio que en eucariotas), se estima que sólo el 1% de los microorganismos procariontas han sido cultivados y caracterizados, dejando una gran cantidad de ellos sin explorar (Tabla 1).

Tabla 1. Número de especies estimadas (y accesibles) en la naturaleza (Ferrer, 2004).

Organismo	Especies estimadas	Accesibilidad (% del total)
Animales (mamíferos, aves, peces)	$3,5 \times 10^4$	>90
Artrópodos/invertebrados	10^6-10^7	10
Nematodos	5×10^5	3
Plantas superiores	$2,7 \times 10^5$	>90
Algas	10^4-10^5	70
Hongos	$1,5 \times 10^6$	5
Bacterias	10^4-10^5	1-10
Arqueas	10^5-10^6	0,1-1
Virus	10^5-10^6	4

Una de las herramientas moleculares en auge es la metagenómica. El término metagenómica hace referencia al estudio de genomas de una comunidad microbiana.

Meta viene del griego 'más allá de' entendiéndolo como ir más allá del genoma ya que permite analizar la estructura y función en conjunto de un gran número de genes presentes en un ambiente determinado y a su vez ha permitido mostrar el potencial genético de los microorganismos no-cultivables mediante estudios *in situ* de varios fragmentos de DNA que juegan diversas funciones (Tabla 2). Además, permite caracterizar la taxonomía, filogenética, y la diversidad funcional de las comunidades microbianas en una medida que hace sólo unos años atrás era inimaginable (Gilbert et al. 2010). La diversidad de microorganismos de cualquier ambiente puede ser determinada utilizando la unidad taxonómica operativa (OTU's por sus siglas en inglés: *Operational Taxonomic Unit*), correspondiendo cada uno de ellos a una población de microorganismos diferente en la comunidad microbiana, de esta manera se facilita su clasificación (Gondim-Porto 2013).

Tabla 2. Estudios realizados alrededor del mundo de metagenomas en suelos (Myrold et al. 2014).

Localización	Descripción del Sitio	Tipo de Suelo	Diseño Experimental	Plataforma de Secuenciación	Profundidad de la Secuenciación	Referencia
Nunavut, Canada	Tundra	Permafrost	Dos profundidades: capa activa y permafrost	454 GS FLX	0.35–0.99 millones de lecturas/muestra	Yergeau et al. (2010)
Rothamsted, UK	Pradera	Franco arcillo limoso	Comparación de métodos de extracción de DNA directo e indirecto	454 GS FLX	Aproximadamente 1 millón de lecturas	Delmont et al. (2011)
Pru Toh Daeng, Thailand	Bosque pantanoso	Turba	Muestra colectiva	454 GS FLX	0.18 millones de lecturas	Kanokratana et al. (2011)
New Hampshire	Bosque	Franco arenoso	Composición simple de dos núcleos de suelo	454 GS FLX	1.4 millones de lecturas	Stewart et al. (2011)
São Paulo, Brazil	Bosque de mangle	Sedimento sumergido	Muestras de 4 sitios, uno impactado por contaminación de petróleo	454 GS FLX	0.25 millones de lecturas/sitio	Andreote et al. (2012)
Michigan and Minnesota	Campo cosechado y pradera	Franco arenoso y arenoso	Adición de N en cada sitio	454 GS FLX	1.35 millones de lecturas	Fierer et al. (2012)
Lucknow, India	Vertedero	No especificado	3 suelos con un gradiente de contaminación	454 GS FLX	1.1 a 1.2 millones de lecturas/suelo	Sangwan et al. (2012)
Nevada,	Desierto	Arcillo arenoso	4 muestras con puntos elevados de CO ₂	454 GS FLX	0.31-0.38 millones de lecturas por muestra	Steven et al. (2012)
Breuil-Chenue, France	Plantación de abetos	-	Muestras separadas en horizontes orgánicos y minerales	454 GS FLX	0.41-0.62 millones de lecturas/muestra	Uroz et al. (2013)

La composición de comunidades microbianas complejas se ha estimado principalmente de acuerdo con la diversidad de las secuencias de DNA, existiendo en la actualidad una enorme base de datos que las convierte en útiles herramientas identificadoras y filogenéticas. La obtención de todo el DNA genómico (el “metagenoma”) en complejas genotecas (fuente de información genética de organismos tanto cultivables como no cultivables), puede constituir una herramienta importante en la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas de interés industrial y

medioambiental (Ferrer 2004). Miles de secuencias de diversos microorganismos, cultivables y no cultivables, son reportadas a las bases de datos como el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), el Ribosomal Database Project (RDP), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), entre otros, los cuales contienen miles de secuencias, pertenecientes a una gran cantidad de microorganismos (Hernández et al. 2010). Estas bases de datos pueden consultarse libremente para realizar una comparación estadística de las secuencias obtenidas de un aislamiento, contra las que ya están publicadas, y así poder elaborar dendrogramas, en los que se indique la posición del nuevo microorganismo recién identificado.

2.6 La diversidad microbiana del suelo

Los microorganismos del suelo (Figura 3) son el componente vivo de la materia orgánica del mismo, cada gramo de suelo alberga miles de taxones de bacterias, arqueas y eucariotas. A pesar de que comprende solo un pequeño porcentaje del total de la masa de la materia orgánica del suelo son considerados una gran influencia en el ciclo de los nutrientes para el buen funcionamiento de los ecosistemas, por lo que son incluidos en los programas de monitoreo de la calidad del suelo (Cheng et al. 2013).

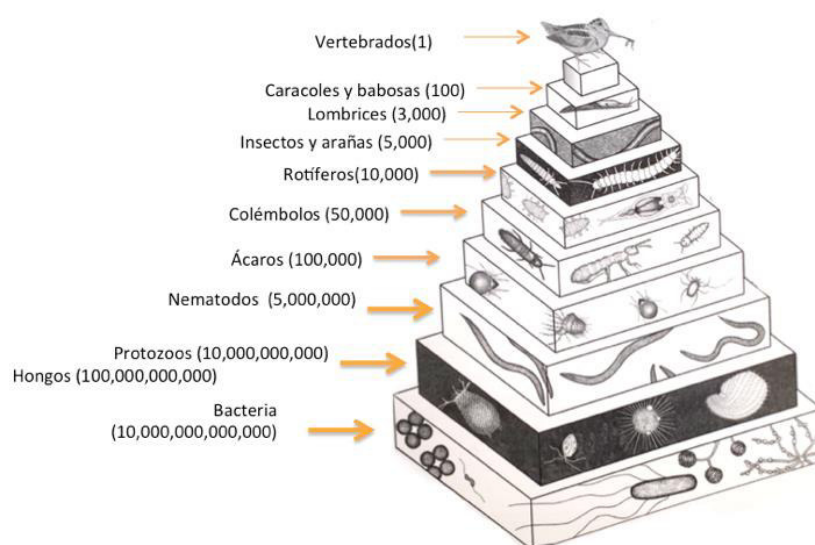


Figura 3. La diversidad y abundancia de organismos (poblaciones/m² de superficie de suelo; Lindbo et al. 2012).

Las comunidades microbianas del suelo son una amplia gama de organismos en diferentes estados fisiológicos. Estos son con frecuencia denominados como activos, inactivos y muertos. Los microorganismos activos están involucrados en la utilización continua de sustratos (procesos funcionales) y transformaciones bioquímicas (conducen los ciclos biogeoquímicos en el suelo). En cambio, los microorganismos inactivos no contribuyen en procesos funcionales, pero pueden contribuir en circunstancias alteradas (cuando ocurren modificaciones fisicoquímicas o biológicas en su entorno). Por su parte los microorganismos muertos (incluyendo las células lisadas y los residuos microbianos), no contribuyen directamente a ningún funcionamiento en proceso, sin embargo, afecta la cantidad de carbono (C) y nitrógeno (N) como fuente de sustratos fácilmente disponibles. Todas estas piezas de la biomasa microbiana total son importantes para la evaluación de las funciones del suelo y los tratamientos, las condiciones ambientales, usos del suelo, y prácticas de gestión (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2013).

2.6.1 Bacterias comúnmente presentes en suelos

Mediante el análisis genético realizado con secuencias del gen ribosomal conservado 16S (Janssen 2006), se ha estimado que la mayor parte de la microbiota de varios tipos de suelos está compuesta por bacterias de los Phylum *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* y *Firmicutes* (Figura 4). Dentro de esos Phylum más comunes, los géneros bacterianos más frecuentemente encontrados son *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Actinomicetes* o *Bacillus*, entre otros (Gondim-Porto 2013; Janssen 2006).

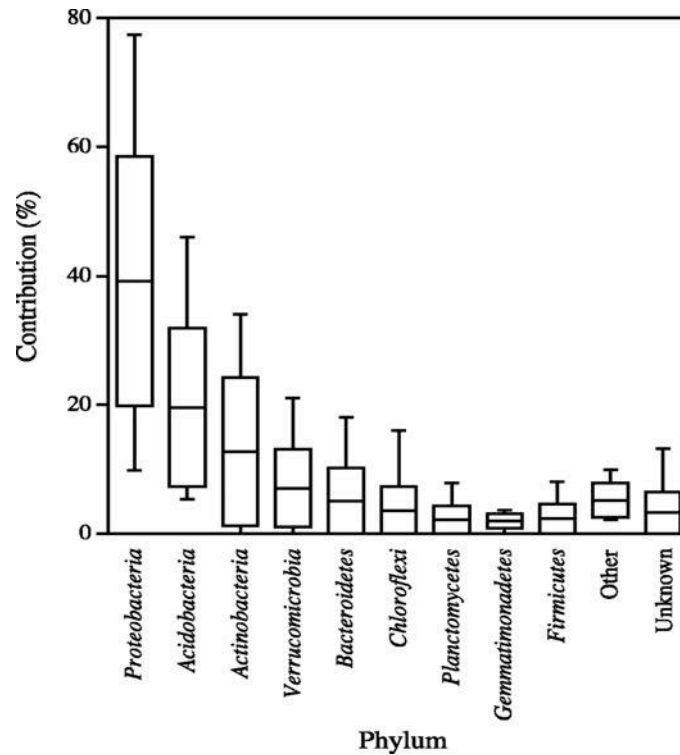


Figura 4. Aportaciones del gen16S rDNA de miembros de diferentes phyla en bibliotecas preparadas a partir de las comunidades bacterianas del suelo (2,920 clones en 21 bibliotecas). La línea horizontal en el centro de cada bloque indica la media. Las líneas verticales que extienden arriba y debajo de cada bloque indican la contribución máxima y mínima de cada phylum (Janssen 2006).

2.6.2 Hongos comúnmente presentes en suelos

Los hongos son microorganismos numerosos en el suelo y se estima que existen entre 10^5 y 10^6 células por gramo de suelo. Constituyen una gran proporción de la biomasa microbiana del suelo debido a sus micelios, aunque en ciertos ecosistemas tropicales o agrícolas donde existe una gran disponibilidad de materia orgánica, los hongos son menos predominantes en términos de biomasa, diversidad y actividad (Gondim-Porto 2013). Los hongos generalmente predominan en suelos ácidos en los cuales monopolizan la utilización de sustratos orgánicos. Los principales grupos de hongos encontrados en el suelo son *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Dentro de estos grupos más comunes, los géneros más frecuentemente encontrados en el suelo son *Penicillium* y *Aspergillus* (Gondim-Porto 2013).

2.7 Características físico-químicas y elementos traza que influyen en la microbiota del suelo

Para lograr una mayor comprensión del comportamiento y atributos de los microorganismos del suelo es necesario llevar a cabo un estudio integral de sus propiedades físicas, químicas y de elementos traza (ET) presentes. Desde el punto de vista edáfico, un suelo es un sistema trifásico, es decir, una parte sólida (agregados minerales y orgánicos), una parte líquida (agua de la solución del suelo) y una gaseosa (atmósfera del suelo contenida en el espacio poroso), que le confieren al suelo características para clasificarlos por propiedades físico-químicas (textura, porosidad, capacidad de retención de agua, densidad, materia orgánica, pH, entre otros) y de ET (As, Cd, Cu, Pb, Zn, etc.; Jordán 2005).

Las propiedades físicas de los suelos determinan en gran medida, la rigidez y la fuerza de sostenimiento, la facilidad para la penetración de las raíces, la aireación, la capacidad de drenaje y de almacenamiento de agua, la plasticidad, y la retención de nutrientes. El conjunto de las propiedades químicas permite evidenciar la movilidad de elementos, la disponibilidad de nutrientes y entender como la diversidad microbiana del suelo cambia dentro de la biosfera y como se relaciona con las características abióticas y bióticas de los ecosistemas (Coyne & Rasskin 2000).

Los ET están presentes en relativamente bajas concentraciones en la corteza de la Tierra (Tabla 3), suelos y plantas. El contenido de ET en el suelo es la suma de los elementos procedentes de procesos naturales y de la actividad humana. Cuando los ET se encuentran en el suelo de manera natural derivan de la roca madre que fue sometida a procesos de meteorización (Tarbuck & Lutgens 2005). En cambio, las principales fuentes antropogénicas de ET en los suelos son las actividades mineras, la agricultura (riego, fertilizantes inorgánicos, pesticidas), la generación de energía eléctrica, las actividades industriales y los residuos domésticos (Galán & Romero 2008). Dentro de los nutrientes, los ET juegan un papel primordial en el desarrollo de la biomasa. En el suelo se pueden encontrar como especies solubles, fácilmente disponibles, débilmente unidas a las partículas sólidas, fuertemente unidas o precipitadas por lo que son insolubles y no disponibles en algunos casos para la biomasa. Según Álvarez (2010), la disponibilidad de los ET está regida por los parámetros edafológicos (pH, condiciones redox, capacidad de intercambio catiónico) y por su tendencia a reaccionar con los componentes del suelo. Las fases activas del

suelo (arcilla, óxidos de hierro (Fe) y manganeso (Mn) procedentes de la meteorización y materia orgánica) y las reacciones fisicoquímicas que se producen entre la fase sólida y la solución del suelo son las que rigen su disponibilidad, y son de especial interés dentro del ámbito de la fertilidad del suelo, y en temas ambientales, como la remediación y descontaminación de suelos.

Tabla 3. Composición de la Corteza Continental (Rudnick & Gao, 2003).

Elemento	Unidad	Corteza Superior	Elemento	Unidad	Corteza Superior
Li	µg g ⁻¹	24	Zn	µg g ⁻¹	67
Be	“	2.1	Ga	“	17.5
B	“	17	Ge	“	1.4
N	“	83	As	“	4.8
F	“	557	Se	“	0.09
S	“	62	Br	“	1.6
Cl	“	370	Rb	“	84
Sc	“	14	Sr	“	320
V	“	97	Y	“	21
Cr	“	92	Zr	“	193
Co	“	17.3	Nb	“	12
Ni	“	47	Mo	“	1.1
Cu	“	28	Ru	ng g ⁻¹	0.34
Cd	“	0.09	Pd	“	0.52
Pb	“	17			

2.8 Muestras de suelo agrícola y de jales mineros del Estado de Guanajuato

En un estudio previo a este proyecto, se analizó la comunidad microbiana de dos muestras de suelo, de las cuales, una pertenece a un suelo agrícola denominada MASE y otra a un suelo con jales mineros de la capital del estado de Guanajuato denominada SMI, las características de cada sitio se resumen en la Tabla 4 y 5 (López-Pérez et al. 2015).

Tabla 4. Sitios de Muestreo.



Nombre de la muestra	Ubicación UTM	Elevación (m)	Características del sitio de muestreo	Sitio
MASE (Muestra Agrícola)	2285086.96 265924.63	1726	Es un suelo con cultivo de espárragos, que presentaba un color café oscuro, húmedo y compacto. Su riego se basaba en lixiviados de lombricomposta y se le adicionaba fertilizantes químicos.	
SMI (Suelo Minero)	2324859.63 264345.89	1996	Cianuración de la mina Sirena y sedimentos del río. Terrazas de erosión, colonización vegetal. ~75 años de abandono y evolución Natural (Ramos & Siebe, 2006).	

Tabla 5. Características fisicoquímicas y de ET de las muestras de suelo agrícola (MASE) y de jales mineros (SMI).

Propiedades	MASE	SMI	*CR _T
Humedad (%)	6.74	1.47	
Textura	Arcilla	Franco	
DA (g/cm ³)	1.07	1.00	
DR (g/cm ³)	1.97	2.30	
Porosidad (%)	45.50	56.72	
pH	6.40	8.10	
PPI550	4.54	5.57	
PPI950	2.23	1.05	
MO (%)	8.41	7.14	
% N	0.38	0.17	
C/N	11.86	25.69	
As	15	39	22
Cd	0.5	0.39	37
Cr	19	19	280
Cu	50	58	+60
Ni	10	11	1600
Pb	42	133	400
V	39	39	78
Zn	109	292	+150

*CR_T= Concentración de referencia total clasificación de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.
+Concentración máxima para la Unión Económica Europea.

De acuerdo con el índice de geoacumulación (I_{geo}) propuesto por Müller (1969), el suelo MASE corresponde a la categoría 2 moderadamente contaminado, mientras que el suelo SMI corresponde a la categoría 3 de moderado a fuertemente contaminado para el elemento As, que, al igual que el Cadmio (Cd) y Cobre (Cu) son los ET que presentaron los valores más altos en contaminación (López-Pérez et al. 2015).

Debido a que el As es uno de los elementos traza más tóxico y carcinogénico presente en elevadas concentraciones en estos suelos, MASE y SMI fueron utilizados para los estudios del presente trabajo.

2.8.1 Metagenoma de las muestras de suelo MASE y SMI

Para la amplificación y secuenciación masiva del DNA total de suelos del estudio de López-Pérez et al. (2015), se usaron los oligonucleótidos universales 27F-518R para el gen ribosomal 16S y los espaciadores internos transcritos (ITS) 1F-4R descritos en la Tabla 6, estos oligonucleótidos universales son los utilizados en el servicio brindado por Macrogen Inc., (Korea). Los oligonucleótidos que mejor amplifiquen el 16S rDNA o ITS varían dependiendo el objetivo del estudio, el diseño experimental y el tipo de muestra, entre otros. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo son los comúnmente usados para el análisis de comunidades microbianas.

Tabla 6. Oligonucleótidos usados en la secuenciación del DNA total de las muestras de suelo.

Oligonucleótido	Secuencia	Gen	Reino	Sitio
27F	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S	Bacteria	V1F
518R	WTTACCGCGGCTGCTGG	16S	Bacteria	V3R
1F	CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA	ITS	Fungi	1F
4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	Fungi	4R

En el metagenoma obtenido del estudio de López-Pérez et al. (2015) se encontró un total de 7,141 secuencias alineadas del gen ribosomal 16S a la base de datos SILVA (RNA ribosomal 16S) y 34,059 secuencias alineadas del gen 18S a la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; RNA ribosomal 18S) en ambas muestras de suelo (Tabla 7).

Tabla 7. Número de lecturas resultado del alineamiento de secuencias.

Muestra	#Lecturas	Total
MASE.16S	3,716	7,141
SMI.16S	3,425	
MASE.18S	17,299	34,059
SMI.18S	16,760	

Las secuencias alineadas se clasificaron en un total de 254 unidades taxonómicas funcionales (OTU's) de los genes 16S rRNA para la muestra de suelo agrícola MASE y 206 OTU's para la muestra de suelo minero SMI, mientras que para los genes 18S rRNA se obtuvieron 98 y 110 OTU's respectivamente, de acuerdo con el reporte emitido por el servicio de Macrogen Inc., (Korea).

De la diversidad de la comunidad microbiana en cada suelo, se observó que el suelo agrícola MASE posee mayor riqueza de especies bacterianas (gen 16S rRNA), mientras que la muestra de jales mineros (SMI) posee mayor diversidad de especies eucariotas correspondiente al reino Fungi (gen 18S rRNA; Figura 5).

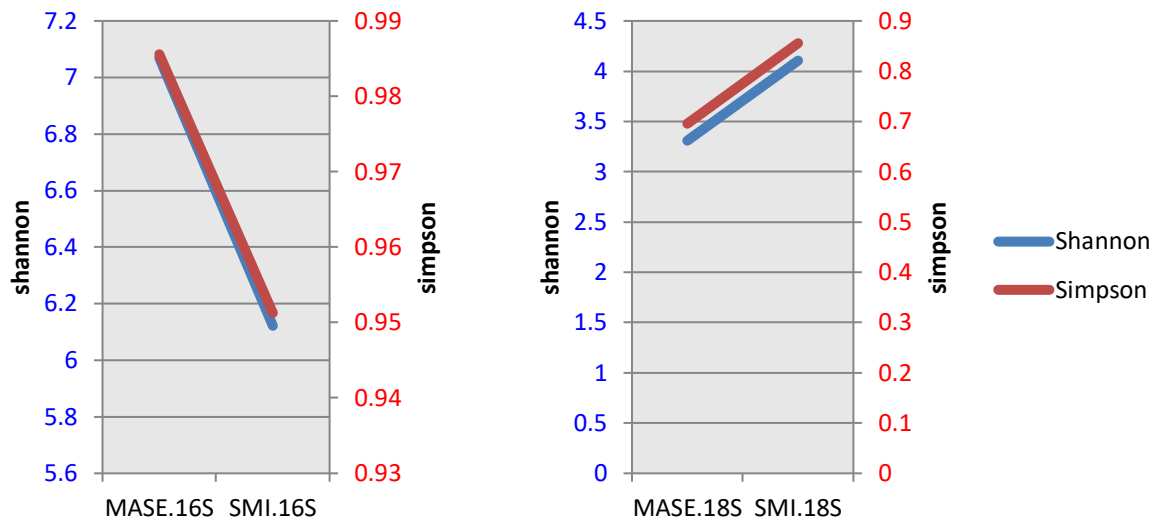


Figura 5. Índices métricos de diversidad (Shannon y Simpson) para los genes 16S rRNA y 18S rRNA de cada muestra de suelo (López-Pérez et al. 2015).

El índice de Shannon refleja el número de los diferentes tipos de especies presentes dentro de una base de datos. Simultáneamente también toma en cuenta cómo se distribuyen de manera uniforme las entidades básicas (individuos). Valores inferiores a dos se consideran bajos en diversidad, y, superiores a tres son altos en diversidad de especies (Pla 2006).

El índice de Simpson indica cómo se distribuyen de manera uniforme las especies y mide el grado de concentración cuando los individuos son clasificados en especies, nos permite medir la riqueza de organismos. Es la probabilidad de que dos individuos, dentro de un hábitat, seleccionados al azar, pertenezcan a la misma especie. Es decir, cuanto más se acerca el valor de este índice a la unidad existe una mayor posibilidad de dominancia de una especie y de una población; y cuanto más se acerque el valor de este índice a cero mayor es la biodiversidad de un hábitat (Simpson 1949).

III. JUSTIFICACIÓN

El As es un metaloide altamente tóxico que representa un riesgo para el medio ambiente y la salud humana. El As se usa principalmente en la agricultura (plaguicidas), en la industria (acero, cerámica, etc.) y en la extracción o purificación de otros minerales. Se dispersa a través del aire, agua y suelo llegando a la cadena trófica. La exposición prolongada al As puede causar cáncer (principalmente en pulmón, piel y vejiga) y lesiones cutáneas. También se ha asociado a problemas de desarrollo, enfermedades cardiovasculares, neurotoxicidad y diabetes, por lo que la intervención más importante consiste en prevenir que la población se prolongue a la exposición de As. La combinación del As con otros compuestos químicos altera su toxicidad según la solubilidad del compuesto y según la valencia del As en él. El As se encuentra comúnmente en forma inorgánica [As (III) y As (V)], cambiando su estado de oxidación por procesos redox en el medio ambiente natural. El As (III) es mucho más tóxico y móvil que el As (V), por lo que su transformación puede influir en gran medida en la salud humana. Debido a que el suelo en el Estado de Guanajuato, México, es uno de los principales ambientes afectados por la contaminación de As procedente de la agricultura y la minería, y al ser el hábitat de una gran cantidad y diversidad de especies de microorganismos que pueden adaptarse al estrés del ambiente. Este estudio tiene por objetivo revisar el metagenoma previamente obtenido de la comunidad microbiana de dos muestras de suelo (agrícola y minero) contaminadas con As. Asimismo, aislar, identificar molecularmente y seleccionar microorganismos tolerantes, resistentes y capaces de óxido-reducir altas concentraciones de As, para estudiar su potencial biotecnológico en futuros procesos de biorremediación, lo cual aportará un mayor conocimiento de la fisiología y se podrán establecer condiciones en laboratorio para el cultivo de microorganismos importantes en la remediación de suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos.

IV. HIPÓTESIS

Los suelos contaminados con arsénico tienen una menor diversidad microbiana, pero un mayor número y diversidad de microorganismos capaces de biotransformar este metaloide.

V. OBJETIVO GENERAL

Concluir con el análisis del metagenoma de la comunidad microbiana de dos muestras de suelo (agrícola y minero) contaminadas con As y aislar, identificar molecularmente y seleccionar microorganismos (bacterias y hongos) resistentes y/o capaces de óxido-reducir altas concentraciones de As.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Concluir con el análisis de los datos del metagenoma de las muestras de suelo agrícola (MASE) y minero (SMI) y evaluar la biodiversidad de los organismos presentes.
- 2) Revelar en el metagenoma aquellas especies de microorganismos (bacterias y hongos) de interés biotecnológico en el área de biorremediación.
- 3) Estandarizar medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos resistentes a As.
- 4) Seleccionar los microorganismos resistentes a As en ambos suelos (agrícola y minero).
- 5) Identificar las bacterias y hongos capaces de oxido-reducir las especies químicas de As [As (III) y As (V)].
- 6) Identificar molecularmente las bacterias y hongos resistentes a As.
- 7) Analizar la presencia de genes involucrados en la biotransformación de As en los organismos resistentes.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Identificación de organismos con potencial biotecnológico

Se realizó la identificación de organismos con posible potencial biotecnológico en el estudio del metagenoma del suelo MASE y SMI. Una vez que las secuencias analizadas se alinearon en la base de datos SILVA para el gen 16S rRNA y en la base de datos del Genbank del NCBI para el gen 18S rRNA, se verificó la fuente de aislamiento y características del sitio de la especie de su secuencia más cercana, seleccionando aquellos organismos que fueron identificados en medios alterados por algún factor contaminante.

7.2 Construcción del árbol filogenético

El análisis filogenético de la secuenciación del metagenoma de MASE y SMI de López-Pérez et al. (2015), se realizó utilizando el software MEGA versión 6.0 (Tamura et al. 2013), una vez obtenido el alineamiento con ClustalW o en su caso MUSCLE, la construcción del árbol filogenético se realizó por el método Neighbor-joining y 500 Bootstrap. La secuencia 16S rRNA de *Sulfolobus metallicus* fue usada como grupo externo (out-group).

7.3 Preparación de los medios de cultivo y diluciones de los suelos

Se utilizaron diferentes medios de cultivo para el aislamiento de los microorganismos del suelo, los cuales fueron esterilizados a 121°C durante 15 min. Al término de la siembra los medios de cultivo inoculados fueron incubados según las especificaciones de cada medio de cultivo (Tabla 8).

Tabla 8. Medios de cultivo para la búsqueda de microorganismos de los diferentes tipos de suelo (agrícola y minero).

Medios de Cultivo	Composición	Especificaciones, Temperatura y tiempo de incubación
Extracto de suelo Concentrado (ESC)	Extracto de suelo (esterilizado durante 1 hora y filtrado) 500 g L ⁻¹ Extracto de levadura 1 g L ⁻¹ Glucosa 2 g L ⁻¹ Agar 18 g L ⁻¹ Agua destilada 1000 ml	Recuento de microorganismos oligotróficos Incubación a 30° C
Luria Bertani (LB Broth)	Peptona de caseína (10 g L ⁻¹) Extracto de levadura (5 g L ⁻¹) Cloruro de sodio (5 g L ⁻¹)	Desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos. Incubar 24 h a 35 °C
Agar Dextrosa Saboraud (DAS)	Dextrosa (40 g L ⁻¹) Peptona de carne (5 g L ⁻¹) Peptona de caseína (5 g L ⁻¹) Agar (15 g L ⁻¹)	Para el cultivo de levaduras, hongos y otros microorganismos ácidouricos
Papa Dextrosa (PD)	Infusión de papa (4 g L ⁻¹) Dextrosa (20 g L ⁻¹)	Para el cultivo de levaduras y mohos
Medio químico definido (CDM, Weeger et al., 1999)	Solución A: 0.0812 M MgSO ₄ 7H ₂ O 0.187 M NH ₄ Cl 0.07 M NaSO ₄ 0.574 mM K ₂ HPO ₄ 4.57 mM CaCl ₂ 2H ₂ O Solución B: 4.8 mM Fe ₂ SO ₄ 7 H ₂ O Solución C: 0.95 M NaHCO ₃	Para el cultivo de bacterias, pH 7.2

La inoculación de los microorganismos presentes en las diluciones de suelo se llevó a cabo en el medio de cultivo extracto de suelo concentrado (ESC) del suelo minero SMI (ESC-SMI), ESC del suelo agrícola MASE (ESC-MASE), el medio Luria Bertani (LB) y el medio Agar Dextrosa Saboraud (DAS), siguiendo la metodología reportada por Gondim-Porto (2013). Para preparar las diluciones a inocular se pesó 1 g de muestra de suelo y se resuspendió en 9 ml de agua destilada estéril, la muestra se homogeneizó tres veces durante 1 min, con 1 min de reposo entre cada una de ellas. Posteriormente las diluciones decimales se realizaron tomando 1 ml de la dilución 10⁻¹ y añadiendo 9 ml de agua destilada estéril para obtener la dilución 10⁻², asimismo se continuo hasta obtener la dilución 10⁻⁶. Las siembras se comenzaron por la muestra de mayor dilución (10⁻⁶), inoculándose 100 µl en cada placa de medio de cultivo por triplicado y se homogeneizó con una varilla en forma de “L” (Figura 6). El medio Papa Dextrosa fue usado para la siembra de hongos aislados y el medio químico definido para el crecimiento de bacterias.

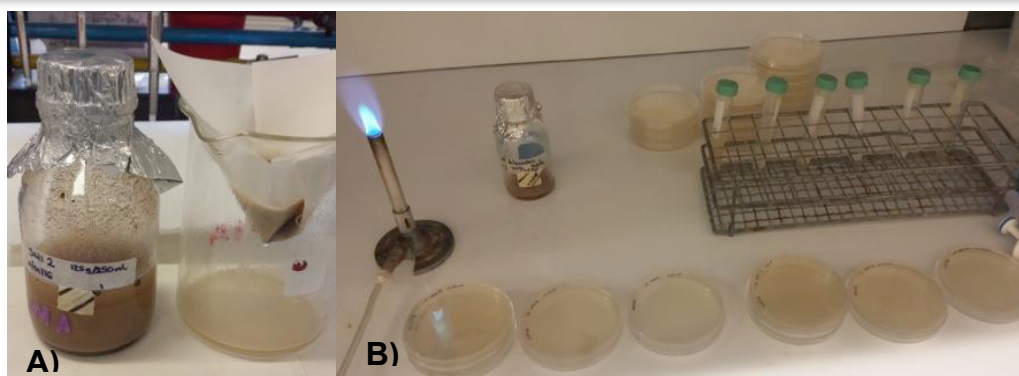


Figura 6. A) Filtrado del medio de cultivo extracto de suelo concentrado (ESC-SMI). B) Inoculación de las diluciones (10^{-1} - 10^{-6}) de suelo SMI.

Los cultivos que mostraron desarrollo de microorganismos en sus diferentes diluciones fueron seleccionados para aislar colonias de bacterias y hongos por estría cruzada, en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de sales de As [arsenito (NaAsO_2) y arsenato (HAsNa_2O_4)]. Las concentraciones de As utilizadas fueron 20 y 50 mg de As (III) kg^{-1} que corresponde a 0.67 y 1.5 mM de As respectivamente (Figura 7), además de 5, 10, 15 y 30 mM de las sales de arsenito [As (III)] y arsenato [As (V)].

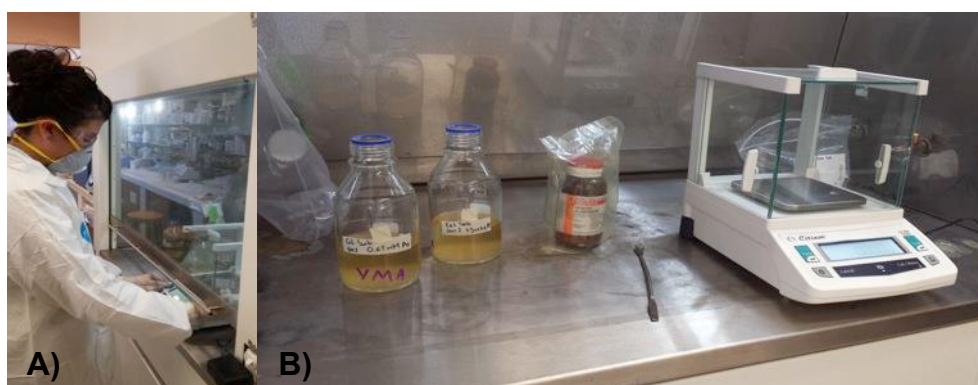


Figura 7. A) Protección usada en la manipulación de As (guantes, bata, cubrebocas con filtro y lentes protectores). B) Preparación del medio de cultivo ESC enriquecido con As.

7.4 Identificación de microorganismos aislados

Los microorganismos aislados fueron identificados molecularmente y mediante su crecimiento y morfología colonial de acuerdo con su color, forma, elevación, superficie, aspecto y bordes. Posteriormente se inocularon en los medios de cultivo de acuerdo con lo reportado por Mellado et al. (2011) y se midió su curva

de crecimiento celular por densidad óptica (DO; a 600 nm) en un espectrofotómetro Lambda XLS marca PerkinElmer en el caso de las bacterias. En el caso de los hongos se llevó a cabo la determinación de biomasa micelial por el método del peso seco; la biomasa total obtenida de cada matraz fue filtrada y lavada con abundante agua desionizada y, finalmente, llevada a un horno de secado a 105 °C, hasta peso constante (Zapata et al. 2007). Una vez obtenido el crecimiento celular deseado las bacterias y las esporas de los hongos fueron contadas con la cámara de Neubauer y observadas con el microscopio AXIO LabA1 marca Zeiss usando el objetivo 40 y 100X.

La identificación molecular de los microorganismos aislados se describe en los apartados siguientes, los cuales consisten en la extracción de DNA de los microorganismos aislados, la amplificación de genes conservados y el análisis de la secuenciación obtenida.

7.4.1 Extracción de DNA de bacterias

La extracción de DNA de bacterias se llevó a cabo con el método reportado por Shuhaimi et al. (2001) realizando algunas modificaciones. Cuando las bacterias se desarrollaron en medio líquido, primero se centrifugó el medio con la cepa bacteriana a 5000 rpm por 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se recuperó la pastilla, para posteriormente ser lavada con 1 ml de agua destilada estéril (dos veces), se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en el sobrenadante restante. Cuando las bacterias se desarrollaron en medio sólido se tomó una asada de la cepa bacteriana (una cantidad considerable para formar una pastilla) y se disolvió en 1 ml de agua destilada estéril, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 4 °C para recuperar la pastilla y finalmente se resuspendió la pastilla bacteriana en el sobrenadante restante. Una vez limpia la pastilla en ambos casos se procedió a agregar 700 µl de amortiguador glucosa/Tris/EDTA (50 mM glucosa, 25 mM Tris/HCl, y 10 mM de EDTA, pH 8). Se añadió 1.2 µl de lisozima (50 mg ml⁻¹) y se incubó a 37 °C durante 120 min. Las células fueron adicionalmente lisadas añadiendo 10 µl de SDS al 25% (peso/volumen). Además, se agregó 5 µl de Proteínasa K a 20 mg ml⁻¹ y se incubó durante 60 min a 60 °C para completar la digestión de la proteína. Posteriormente se adicionó 500 µl de una solución de Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 volumen), y se mezcló invirtiendo el tubo tres veces (lentamente).

Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min, para transferir la capa superior resultante a un tubo nuevo, adicionando un volumen igual de acetato de sodio 3 M (pH 5) y dos volúmenes de isopropanol. Se incubó 60 min a -20 °C y la mezcla se centrifugó a 13000 rpm 7 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante para lavar la pastilla con 500 µl de etanol al 70% (volumen/volumen), reposando 15 min a -20 °C, se centrifugó nuevamente la muestra a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla finalmente contiene el DNA que se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

7.4.2 Extracción de DNA de hongos

En la extracción de DNA de hongos, se tomó el micelio de los hongos con una espátula de acero inoxidable (estéril) colocándolo en un mortero (estéril) para su maceración, se adicionó 500 µl de buffer de extracción a 70 °C (200 mM de Tris-HCl pH 8, 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, 0.5% de SDS) y se agregó nuevamente 500 µl para realizar muy bien el macerado del micelio. Se recuperó el micelio macerado en tubos eppendorf de 1.5 ml, después de esto se colocaron los tubos en el thermoblock a 70 °C por 30 min y a la suspensión formada con el buffer y los restos celulares extraídos se le adicionaron 500 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) mezclando por inmersión durante 10 min. Se centrifugó a 13000 rpm de 10 a 20 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionó 500 µl de isopropanol frío mezclando por inmersión durante 1 min, nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70% se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla que contiene el DNA es diluida en 20 µl de agua destilada estéril (Cruz-Avalos et al. 2019).

7.4.3 Medición de la Integridad y cuantificación del DNA

La integridad del DNA se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa 1% (masa/volumen), 80 V por 45 min, en tampón 1x TAE (Tris, acetato y EDTA, pH 8). Las muestras de DNA se tiñeron con Gel Red (1 µg·mL⁻¹) y se usó el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. Las imágenes fueron capturadas en Gel Doc™ EZ Imager de BIO-RAD (Figura 8).

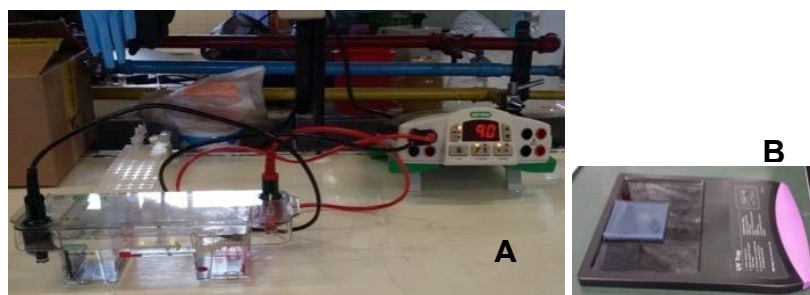


Figura 8. A) Cámara de electroforesis y fuente de poder, B) Gel de Agarosa.

La cantidad y calidad del DNA obtenido se determinó con el NanoDrop Lite Spectrophotometer marca Thermo Scientific a una absorbancia (A) de 260/280 nm.

7.4.4 Amplificación del gen 16S rDNA y los ITS´s 4 y 5

La amplificación del gen 16S rDNA y los ITS´s se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler marca BIO-RAD, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó el DNA extraído de las bacterias y hongos a partir de un cultivo puro. Las condiciones de PCR se describen en los siguientes apartados.

7.4.5 Condiciones generales para la amplificación del gen 16S rDNA

Para la amplificación del gen 16S rDNA se emplearon los oligonucleótidos universales descritos en la Tabla 9.

Tabla 9. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación del gen 16S rDNA (Weisburg et al. 1991).

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5´ - 3´)
fD1	CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	GGTACCTTGTTACGACTT

En un tubo para PCR se colocó la mezcla de soluciones para llevar a cabo el experimento. Cada tubo de PCR contenía un volumen total de 25 µl y la mezcla de reacción descrita en la Tabla 10.

Tabla 10. Mezcla de reacción por cada muestra examinada para la amplificación del gen 16S rDNA.

Reactivo	Volumen (μ l)
H ₂ O	16.8
Buffer 10x (1x)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.5
dNTP's (10 mM)	1
Oligo F	1
Oligo R	1
Platinum SuperFi II (5U)	0.2
DNA (100 ng/ μ l aprox.)	1
Volumen final	25

Las condiciones de PCR consistieron en una temperatura de 95 °C durante 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos. Se usó un gradiente de temperatura de 50 a 60 °C por 1 min en la etapa de alineamiento y 72 °C por 1 min en la extensión. Para la extensión final se utilizó una temperatura de 72 °C durante 10 min y finalmente el termociclador se programó para conservar las muestras a 4 °C.

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por MacroGen Inc., Korea. El análisis de las secuencias (la corrección de electroferogramas y ensamble de secuencias) se realizó utilizando el software SeqMan del paquete DNASTAR Inc. La alineación de secuencias se llevó a cabo usando la herramienta BLAST del NCBI y RDP Classifier (Wang et al. 2007).

7.4.6 Condiciones generales para la amplificación de los ITS

Para la amplificación de los espaciadores internos transcritos (ITS) se emplearon los oligonucleótidos descritos en la Tabla 11 (Vilgalys 2005).

Tabla 11. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de los ITS (White et al. 1990).

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
ITS5-F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC

En un tubo para PCR se colocó la mezcla de soluciones para llevar a cabo el experimento. Cada tubo de PCR contenía un volumen total de 25 μl y la mezcla de reacción descrita en la Tabla 12.

Tabla 12. Mezcla de reacción para la amplificación de los ITS's 4 y 5.

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O	17.2
Buffer 10x (1x)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1
dNTP's (10 mM)	1
Oligo F	1
Oligo R	1
Platinum SuperFi II (5U)	0.3
DNA (100 ng/ μl aprox)	1
Volumen final	25

Las condiciones de PCR consistieron en una temperatura de 94 °C durante 4 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 40 segundos. Se usó un gradiente de temperatura de 55 a 65 °C por 40 segundos en la etapa de alineamiento y 72 °C por 40 segundos en la extensión. Para la extensión final se utilizó una temperatura de 72 °C durante 10 min y finalmente el termociclador se programó para conservar las muestras a 4 °C.

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por MacroGen Inc., Korea. El análisis de las secuencias (la corrección de electroferogramas y ensamble de secuencias) se realizó utilizando el software SeqMan del paquete DNASTAR Inc. La alineación de secuencias se llevó a cabo usando la herramienta BLAST del NCBI y RDP Classifier (Wang et al. 2007).

7.5 Detección de la óxido-reducción de As

En la detección de microorganismos óxido-reductores de As se siguió el procedimiento reportado por Simeonova et al. (2004). El ensayo se basó en el análisis colorimétrico de los precipitados formados por la reacción de nitrato de plata (AgNO₃)

con As. El método es fiable y sensible para la detección de la oxidación de As (III) y la reducción de AS (V) y es posible utilizarlo en un amplio rango de pH (5.8 a 8.4). Una vez obtenido el cultivo puro se lavaron las células suspendidas en 1.2 ml de agua destilada estéril (DO a 600 nm de 0.4 a 0.6). Se colocaron 20 μ l de las células suspendidas en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregó 80 μ l de amortiguador Tris-HCl 0.2 M (pH 7.4) suplementado con As (III) o As (V) en diferentes concentraciones. Antes de la iniciación de la reacción de color, las muestras se incubaron de 72 a 120 horas a 28 ± 2 °C/200 rpm y se comprobó su viabilidad resembrando la cepa en medio de cultivo sólido ESC. La reacción se llevó a cabo con la adición de 250 μ l de AgNO₃ 0.1 M. La formación del precipitado da coloraciones desde rojo parduzco para As (V) y amarillo para As (III) (Figura 9).



Figura 9. Determinación del color del precipitado en función de la proporción de As (V)/As (III) (Simeonova et al. 2004).

Para identificar la óxido-reducción de arsénico en medio de cultivo ESC sólido suplementado con As, las cajas Petri fueron inundadas con una solución de AgNO₃ 0.1 M, un color rojo parduzco revela la presencia de As (V) en el medio, mientras que la presencia de As (III) se detecta por un color amarillo (Branco et al. 2009; Figura 10).

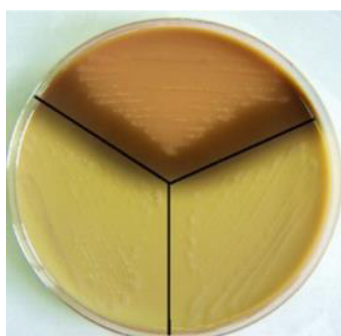


Figura 10. Determinación de la óxido-reducción de arsénico por la reacción colorimétrica del As (V) o As (III) con AgNO₃ (Branco et al. 2009).

7.6 Identificación de genes implicados en la transformación química del As

La amplificación de los genes implicados en la transformación de las especies químicas de As se realizó usando oligonucleótidos degenerados como se describe a continuación.

7.6.1 Amplificación del gen *aoxB*

La amplificación del gen *aoxB* se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos degenerados reportados por Inskeep et al. (2007) denominados como primers #1F y #1R (Tabla 13) que codifican para la subunidad mayor de la enzima arsenito-oxidasa (large Mo-pterin).

Tabla 13. Secuencia de oligonucleótidos degenerados del gen *aoxB*.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
# 1F	GTSGGBTGYGGMTAYCABGYCTA
# 1R	TTGTASGCBGGNCGRTTTRTGRAT

B = G, T o C; M = A o C; N = A, C, G, o T; R = A o G; S = G o C; V = A, C, o G; Y = C o T.

En un tubo para PCR se colocó la mezcla de soluciones para llevar a cabo el experimento. Cada tubo de PCR contenía un volumen total de 25 μ l y la mezcla de reacción descrita en la Tabla 14.

Tabla 14. Mezcla de reacción para la amplificación del gen *aoxB*.

Reactivo	Volumen (μ l)
H ₂ O	16.8
Buffer 10x (1x)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.5
dNTP's (10 mM)	1
Oligo F	1
Oligo R	1
Platinum SuperFi II (5U)	0.2
DNA (100 ng/ μ l aprox)	1
Volumen final	25

Las condiciones de PCR consistieron en una temperatura de 94 °C durante 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos. Se usó una temperatura de 44 °C por 45 segundos en la etapa de alineamiento y 72 °C por 30 segundos en la extensión. Para la extensión final se utilizó una temperatura de 72 °C durante 7 min y finalmente el termociclador se programó para conservar los tubos a 12 °C (Achour et al. 2007).

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por MacroGen Inc., Korea. El análisis de las secuencias (la corrección de electroferogramas y ensamble de secuencias) se realizó utilizando el software SeqMan del paquete DNASTAR Inc. La alineación de secuencias se llevó a cabo usando la herramienta BLAST del NCBI.

7.6.2 Amplificación del gen *arsB*, *ACR3(1)* y *ACR3(2)*

En la amplificación del gen *arsB*, *ACR3(1)* y *ACR3(2)*, se realizó un PCR con los oligonucleótidos degenerados descritos en la Tabla 15 por Achour et al. (2007), que codifican para diferentes proteínas transportadoras de arsenito en la célula.

Tabla 15. Secuencia de oligonucleótidos degenerados para los genes *arsB*, *ACR3(1)*, *ACR3(2)*.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
<i>arsB</i>	darsB1F	GGTGTGGAACATCGTCTGGAAYGCNAC
	darsB1R	CAGGCCGTACACCACCAGRTACATNCC
<i>ACR3(1)</i>	dacr1F	GCCATCGGCCTGATCGTNATGATGTAYCC
	dacr1R	CGGCGATGGCCAGCTCYAAYTTYTT
<i>ACR3(2)</i>	dacr5F	TGATCTGGGTCATGATCTTCCC VATGMTGVT
	dacr4R	CGGCCACGGCCAGYTCRAARAARTT

B = G, T o C; M = A o C; N = A, C, G, o T; R = A o G; S = G o C; V = A, C, o G; Y = C o T.

En un tubo para PCR se colocó la mezcla de soluciones para llevar a cabo el experimento. Cada tubo de PCR contenía un volumen total de 25 µl y la mezcla de reacción descrita en la Tabla 16.

Tabla 16. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes *arsB*, *ACR3(1)*, *ACR3(2)*.

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O	16.8
Buffer 10x (1x)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.5
dNTP's (10 mM)	1
Oligo F	1
Oligo R	1
Platinum SuperFi II (5U)	0.2
DNA (100 ng/μl aprox)	1
Volumen final	25

Las condiciones de PCR consistieron en una temperatura de 94 °C durante 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos. Se usó una temperatura de 52.9, 55 y 52.7 °C por 45 segundos en la etapa de alineamiento para cada gen (*arsB*, *ACR3(1)*, *ACR3(2)*, respectivamente) y 72 °C por 30 segundos en la extensión. Para la extensión final se utilizó una temperatura de 72 °C durante 7 min y finalmente el termociclador se programó para conservar los tubos a 12 °C (Achour et al. 2007).

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por Macrogen Inc., Korea. El análisis de las secuencias (la corrección de electroferogramas y ensamble de secuencias) se realizó utilizando el software SeqMan del paquete DNASTAR Inc. La alineación de secuencias se llevó a cabo usando la herramienta BLAST del NCBI.

7.6.3 Amplificación del gen *arrA*

En la amplificación del gen *arrA* se realizó la PCR utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 17 reportados por Mirza et al. (2017) denominados como primers CVF1 y CVR1 que codifican para la arsenato-reductasa con una talla de amplicón de 330 bp.

Tabla 17. Secuencia de oligonucleótidos degenerados del gen *arrA*.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
CVF1	CACAGCGCCATCTGCGCCGA
CVR1	CCGACGAACTCCYTGYTCCA

Y = C o T.

En un tubo para PCR se colocó la mezcla de soluciones para llevar a cabo el experimento. Cada tubo de PCR contenía un volumen total de 25 μ l y la mezcla de reacción descrita en la Tabla 18.

Tabla 18. Mezcla de reacción para la amplificación del gen *aoxB*.

Reactivo	Volumen (μ l)
H ₂ O	16.8
Buffer 10x (1x)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.5
dNTP's (10 mM)	1
Oligo F	1
Oligo R	1
Platinum SuperFi II (5U)	0.2
DNA (100 ng/ μ l aprox)	1
Volumen final	25

Las condiciones de PCR consistieron en una temperatura de 95 °C durante 3 min para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos. Se usó una temperatura de 60 °C por 45 segundos en la etapa de alineamiento y 72 °C por 1 min en la extensión. Para la extensión final se utilizó una temperatura de 72 °C durante 7 min y finalmente el termociclador se programó para conservar los tubos a 12 °C (Mirza et al., 2017).

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por MacroGen Inc., Korea. El análisis de las secuencias (la corrección de electroferogramas y ensamble de secuencias) se realizó utilizando el software SeqMan del paquete DNASTAR Inc. La alineación de secuencias se llevó a cabo usando la herramienta BLAST del NCBI.

7.7 Extracción de proteínas

7.7.1 Extracción de proteínas bacterias

La extracción de proteínas de bacterias se realizó con el método de extracción directo con la solución de Laemmli (1970), la pastilla de bacteria previamente lavada con agua destilada estéril fue mezclada con 50 μ l de la solución de Laemmli (Tris 0.5 M, SDS al 20%, glicerol, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.02%) y puesta a ebullición por 10 minutos. Una vez desnaturalizada, la muestra fue cargada en un gel discontinuo de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) colocado en una cámara vertical de electroforesis (Mini-Protean Tetra Cell de BioRad) y se sometió a un voltaje inicial de 80 V durante 20 minutos y 120 V aproximadamente 2 horas. Posteriormente se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie (G-250) durante 10 minutos y destinción durante toda la noche. El gel fue visualizado en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imagen marca BioRad (Gallardo et al. 2017).

7.7.2 Extracción de proteínas de hongo por el método de ácido tricloroacético (TCA)

Después del crecimiento de los hongos durante aproximadamente 6 días en medio PD, se recupera el micelio en papel filtro poro mediano (10 μ m) y se lava con agua destilada estéril centrifugando a 13000 rpm durante 15 min. Se toma un gramo de micelio y se coloca a -70 °C durante 24 horas. El micelio congelado es macerado hasta obtener un polvo fino y se le agregan 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% en acetona con 0.07% de β -mercaptoetanol. La suspensión se vortexea e incuba a -20 °C durante una hora. La proteína es recuperada a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C, desechando el sobrenadante. La pastilla es lavada con 500 μ l de acetona con 0.07% v/v de β -mercaptoetanol y posteriormente se deja secar. La rehidratación de la proteína se lleva a cabo con 100 μ l de buffer de lisis (8 M urea, 2 M tiurea, 0.5% CHAPS, 1% DTT y 1% de PMBS), vortexeando e incubando en hielo 3 veces durante 30 min. El lisado se centrifuga a 11700 rpm durante 30 min y se recupera el sobrenadante (Lakshman et al. 2008). La proteína se cuantifica con el método de Bradford (1976) y posteriormente se analiza en un gel SDS-PAGE (Gallardo et al. 2017).

7.8 Cuantificación de As

7.8.1 Determinación de As por cromatografía líquida (HPLC)

La cuantificación de las especies químicas de As [As (III) y As (V)] se realizó en el Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas (CIATEC) por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con la columna Ion Pac AS21. Las muestras de suelo MASE y SMI fueron digeridas con una mezcla 1:3 de ácido nítrico (HNO_3) y ácido clorhídrico (HCl) respectivamente durante tres horas a $100\text{ }^\circ\text{C}$ y filtradas (Filtro Ahlstrom, $10\text{ }\mu\text{m}$; Figura 11).

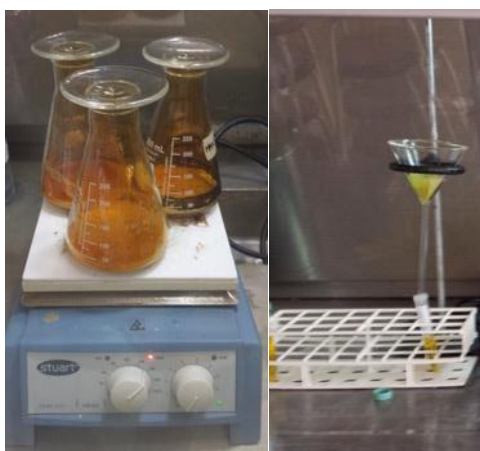


Figura 11. Digestión de 5 g de suelo + 10 ml de HNO_3 + 30 ml de HCl durante 3 horas a 100°C y su filtración.

7.8.2 Determinación de As (V) por el método azul de molibdeno

Se utilizó el método azul de molibdeno de acuerdo con lo reportado por Tsang et al. (2007), para determinar el As (V) presente en el sobrenadante del medio de cultivo ESC-SMI, después de 72 horas de crecimiento de los microorganismos en el medio. El método de azul de molibdeno determina concentraciones inferiores a $10\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ ($0.7492\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) de As (V), por lo que se realizó una curva de calibración (Figura 12) con las concentraciones descritas en la Tabla 19. La curva de calibración se analizó en el espectrofotómetro Lambda 365 (doble haz) marca PerkinElmer a una longitud de onda (λ) de 845 nm (Tsang et al. 2007).



Figura 12. Curva de calibración con el método azul de molibdeno.

Tabla 19. Concentraciones de As (V) usadas para la curva de calibración por el método azul de molibdeno.

Nº	Concentración de As (V)	Concentración de As (V)
	$\mu\text{g ml}^{-1}$	mM
1	0.0	0.0000
2	0.1	0.0013
3	0.2	0.0027
4	0.3	0.0040
5	0.4	0.0053
6	0.5	0.0067
7	0.6	0.0080
8	0.7	0.0093
9	0.8	0.0106
10	0.9	0.0120

7.8.3 Determinación de As por Absorción Atómica

La cuantificación de arsénico total fue determinada por espectrometría de absorción atómica en el Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas (CIATEC), usando el equipo iCE 3000 Series (Figura 13) mediante flama, debido a la alta concentración de As de las muestras. Las muestras fueron diluidas 1:10 para su cuantificación y se realizó una curva estándar con concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 ppm con una solución de As (V) comercial estándar.



Figura 13. Cuantificación de As en el equipo iCE 3000 Espectrómetro de Absorción Atómica.

7.8.4 Determinación de As por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Las muestras se analizaron con un microscopio electrónico de barrido TM-1000 de Hitachi (Figura 14) operado a 15 KV con un detector de electrones retrodispersados. Los análisis elementales se hicieron con un dispositivo de espectroscopia de energía dispersiva (EDS) Oxford acoplado al microscopio, con un tiempo de conteo de 60 s. Los análisis fueron realizados en el Centro de Geociencias-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Juriquilla, Querétaro).



Figura 14. Determinación de As por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

VIII. RESULTADOS

8.1 Composición taxonómica de las comunidades microbianas de suelo MASE y SMI

EL suelo MASE presentó una mayor diversidad de bacterias en comparación con el suelo SMI, ya que el índice de Shannon se estimó en 7.06 y 6.12 respectivamente (Figura 4), mientras que el suelo SMI presentó una alta diversidad de hongos en comparación con el suelo MASE de acuerdo con el índice de Shannon estimado en 4.10 y 3.30 respectivamente (Figura 4). Se considera que los valores inferiores a dos representan baja diversidad, y los valores superiores a tres representan alta diversidad (Shannon 1948; Mora-Donjuán et al. 2017). Según el índice de Simpson, ambos suelos mostraron dominancia en el número de especies de bacterias, ya que este valor está cerca de la unidad (MASE = 0.98, SMI = 0.95; Figura 4), mientras que el índice estimado para las especies de hongos mostró una menor dominancia (MASE = 0.69, SMI = 0.85; Figura 4) (Simpson 1949).

En cuanto a la clasificación de las bacterias, las Proteobacterias, Acidobacterias y Actinobacterias fueron los phyla dominantes en los suelos MASE y SMI, representando más del 72.0% de la población total (Figura 15). El phylum Proteobacteria fue el más abundante en ambos suelos, comprendiendo 39.6% en MASE y 36.4% en SMI (Figura 15). Las Acidobacterias fueron las segundas más abundantes, con 11.6% en MASE y 24.2% en SMI. Las Actinobacterias se encontraron en mayor proporción en suelos MASE (19.0%) que en suelos SMI (14.2%).

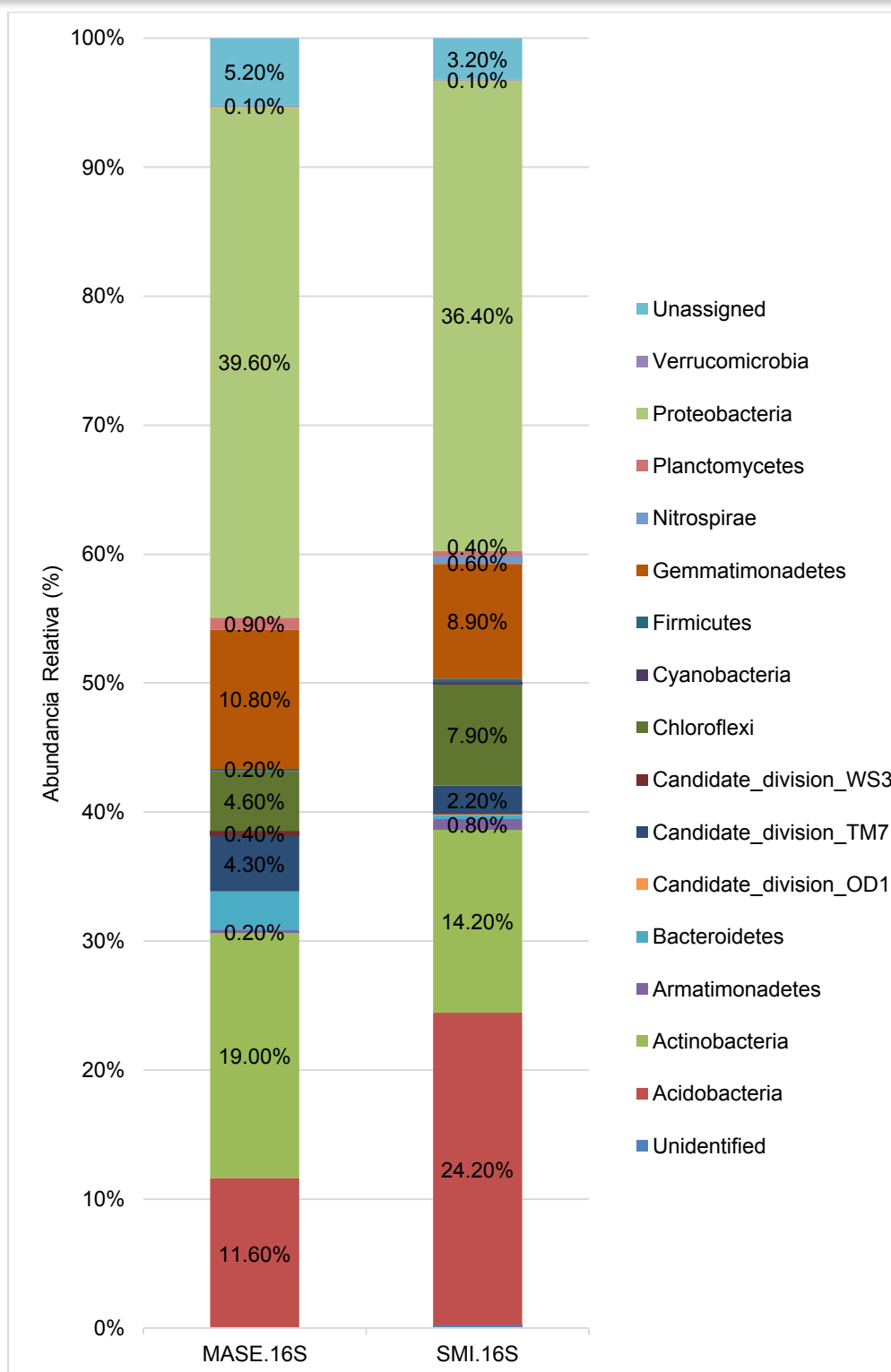


Figura 15. Abundancia relativa a nivel de phylum de las bacterias presentes en las muestras de suelo.

Al emplear el gen 16S rDNA, se identificaron un total de 197 géneros, 59 de estos se encontraron en ambos tipos de suelos, sin embargo, muchos solo fueron

identificados como géneros no cultivados o no identificados. La Figura 16 muestra 37 géneros de bacterias que se encontraron entre los más abundantes en ambos tipos de suelos (37% en MASE y 35.85% en SMI), destacando el género *Bradyrhizobium* y los organismos no cultivados dentro de la familia Rhodospirillaceae, cuya presencia fue mayor en los suelos MASE (6.59%) que en los suelos SMI (3.27%).

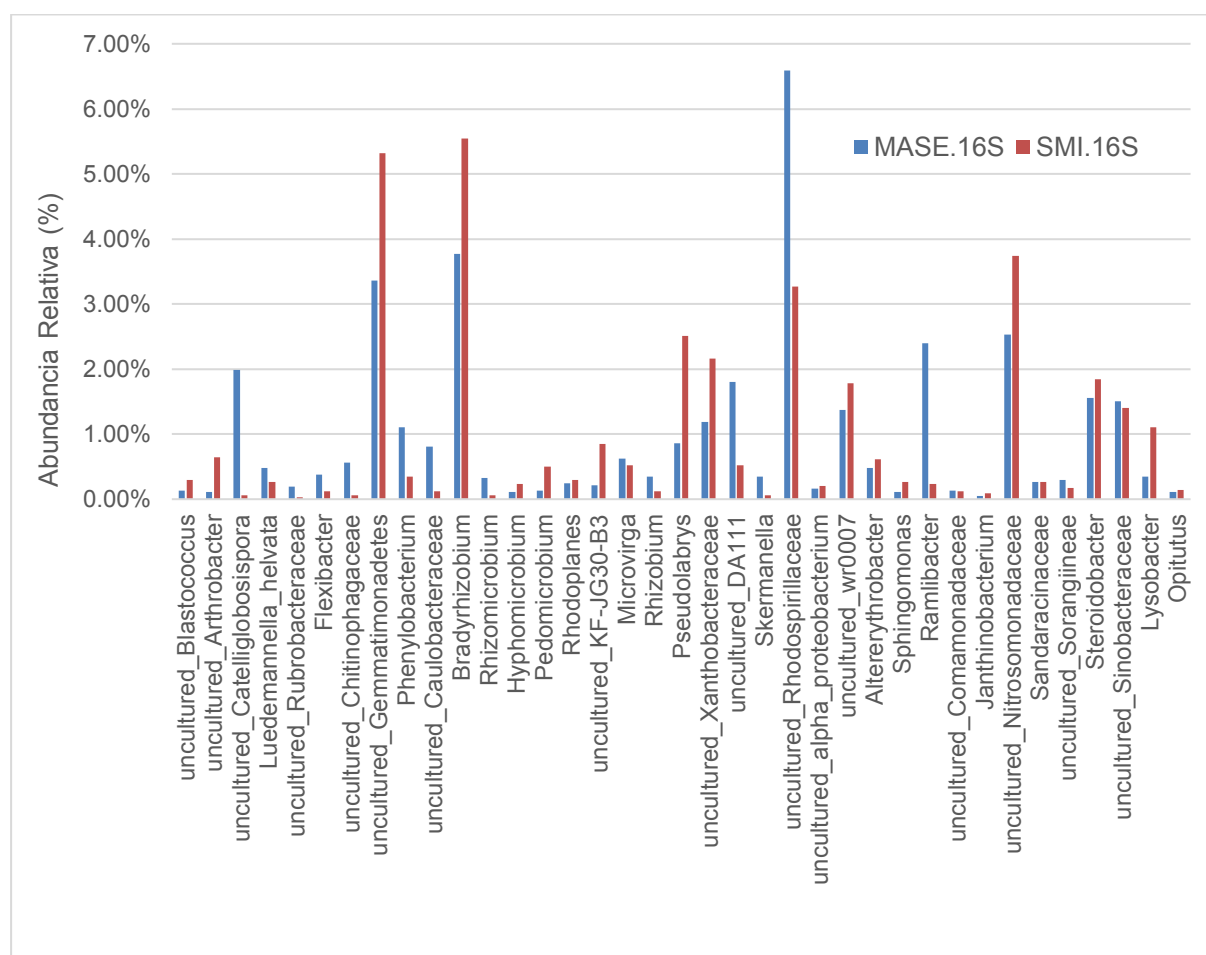


Figura 16. Abundancia relativa de los géneros dominantes de bacterias en ambas muestras de suelos. En el eje X, el género no cultivado se presentó con un guion bajo seguido por la familia o el phylum al que pertenecen.

En cuanto a los hongos, el phylum Ascomycota fue el más abundante en ambas muestras de suelo, representando el 26.5% de las secuencias totales (31.9% en MASE y 21.1% en SMI) (Figura 17). El phylum Glomeromycota solo se identificó en los suelos SMI con 11.6%, Basidiomycota se identificó con 3.2% de las secuencias

totales (0.6% en MASE y 5.8% en SMI), Zygomycota se encontró en 0.8% de las secuencias totales (0.5% en MASE y 1.1% en SMI). Por otro lado, el 63.1% de las secuencias en los suelos MASE y el 10.6% en los suelos SMI no fueron identificadas mientras que el 49.8% de las secuencias en SMI y el 3.8% en MASE se clasificaron como secuencias no asignadas (Figura 17).

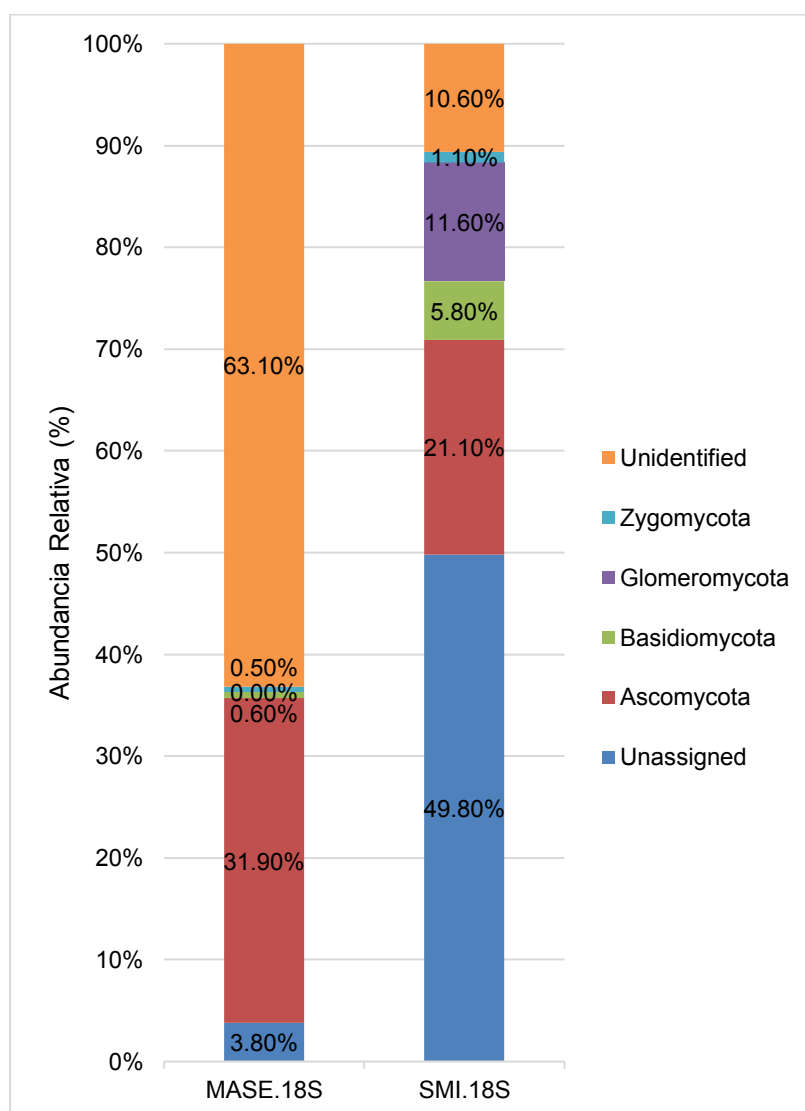


Figura 17. Abundancia relativa a nivel de phylum de los hongos de las muestras de suelo.

Mediante el uso de las secuencias del gen 18S rRNA, se obtuvieron un total de 71 géneros (López-Pérez et al. 2015), de los cuales 13 se encontraron en ambos tipos de suelos, pero muchos representan géneros no identificados. Se encontraron un total de 36 géneros de hongos entre los más abundantes en las muestras de suelo (19.5% en MASE y 27.0% en SMI) (Figura 18). Los géneros más abundantes en los

suelos MASE se presentan en la Figura 18 siendo el género *Mortierella* (0.49%) dentro del filo Zygomycota el único compartido dentro con SMI. Otros géneros en el suelo SMI se presentan también en la Figura 18.

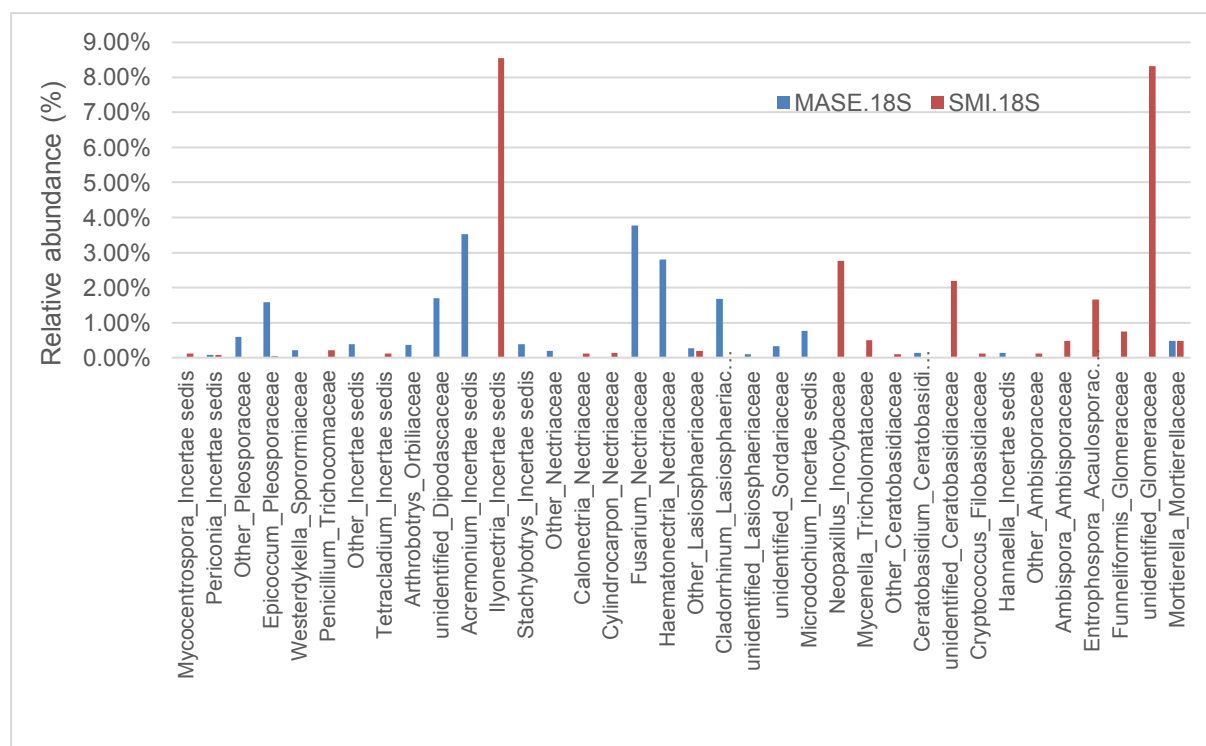


Figura 18. Abundancia relativa del género dominante de hongos en ambas muestras de suelos. En el eje X, el género no cultivado se presentó con un guion bajo seguido por la familia o el phylum al que pertenecen.

8.2 Identificación de organismos con potencial biotecnológico en el perfil de secuencias del 16S y 18S rDNA.

De las 380 cepas de bacterias identificadas en el perfil de secuencias del gen 16S rRNA del suelo MASE y SMI, 84 cepas corresponden con secuencias de bacterias que fueron aisladas de fuentes contaminadas y se encuentran dentro de los phyla Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteroidetes, Candidate_division_OD1, Candidate_division_TM7, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes y Proteobacteria (Figura 19).

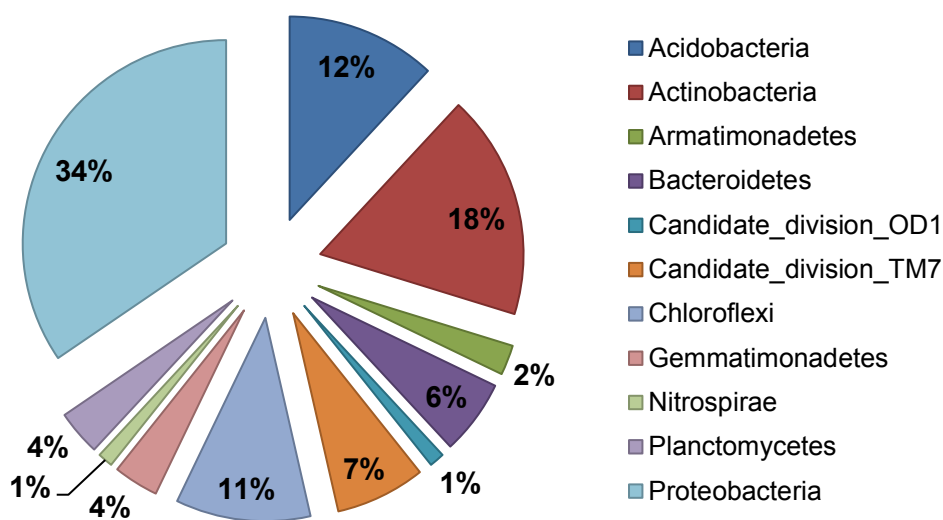


Figura 19. Cepas de bacterias identificadas en medios contaminados. El 100% corresponde a 84 cepas.

De las 110 cepas de hongos identificados solo 5 cepas se reportan como aisladas de fuentes contaminados y corresponden a los phyla Ascomycota (2 cepas), Basidiomycota (2 cepas) y Zygomycota (1 cepa).

8.3 Aislamiento y selección de microorganismos resistentes a As

8.3.1 Suelo MASE

Se obtuvieron 24 aislados de bacterias cuando se inoculó el suelo MASE en medio ESC-MASE, no se obtuvieron aislados de hongos. De estos, 18 aislados de bacterias fueron resistentes a 5 mM de As (III) (16 aislados; Tabla 20) y As (V) (14 aislados; Tabla 20). Sin embargo, su capacidad para oxidar o reducir As fue negativa con la reacción de AgNO_3 (Figura 20).

Tabla 20. Resultados de crecimiento de los aislados de bacterias de suelo agrícola MASE en 5 mM de As (III) y As (V) y su óxido-reducción.

Aislado (Bacteria)	ESC-MASE + 5 mM As (V)	ESC-MASE + 5 mM As (III)	Reducción As (V) a As (III)	Oxidación As (III) a As (V)
M1	+	+	-	◆
M2	+*	+*	-	◆
M3	+	+	◆	◆
M4	+	+*	◆	-
M5	-	+	-	◆
M6	-	-	-	-
M7	+*	+	◆	◆
M8	+*	+	-	◆
M9	+*	◆	-	-
M10	-	+*	-	-
M11	-	-	-	-
M12	+	+	-	◆
M13	-	+◆	-	-
M14	+	-	-	-
M15	+	+*	-	-
M16	-	-	-	-
M17	-	-	-	-
M18	+	+	◆	◆
M19	+	+	◆	-
M20	-	-	-	-
M21	+	+	-	-
M22	-	+*	-	-
M23	+	+*	-	◆
M24	-	-	-	-

*El crecimiento fue muy poco

◆Se observa un halo incoloro en As (III)

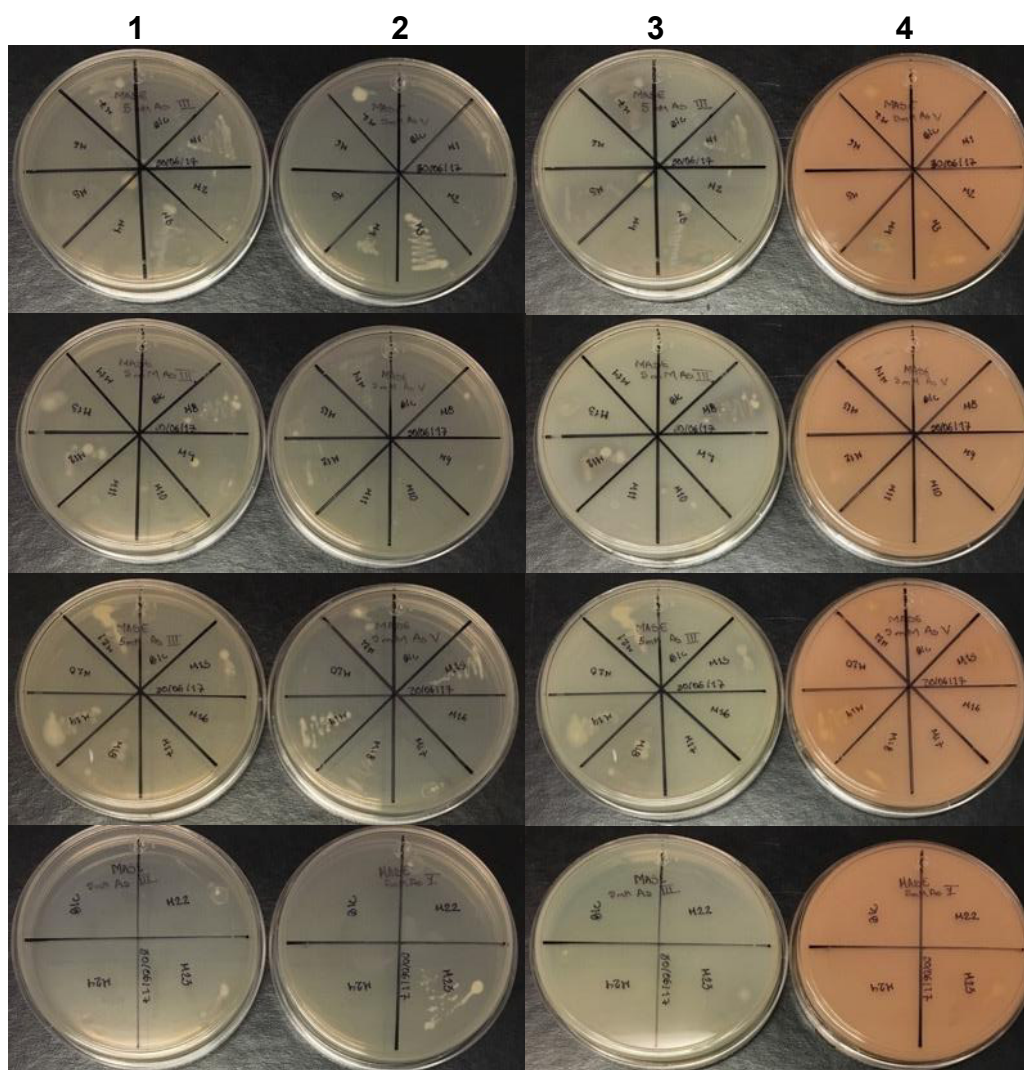


Figura 20. Detección de las bacterias oxido-reductoras de arsénico. Columna 1 ESC-MASE+As(III), columna 2 ESC-MASE+As(V), columna 3 ESC-MASE+As(III)+AgNO₃ y columna 4 ESC-MASE+As(V)+AgNO₃.

8.3.2 Suelo SMI

Se obtuvo un total de 71 aislados del suelo SMI. De los cuales 62 fueron bacterias y nueve hongos. La Figura 21 y la Tabla 21 muestran las principales características morfológicas de los microorganismos aislados. La mayoría resultaron ser bacilos con esporas bacterianas y presentaron un color blanco nacarado y aspecto cremoso. Aunque también se observaron colonias de color rojo claro, transparentes, café y amarillas.

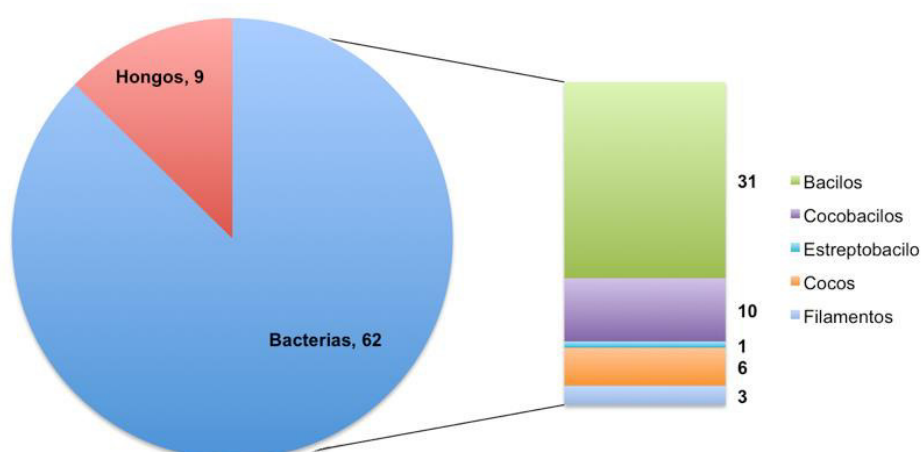
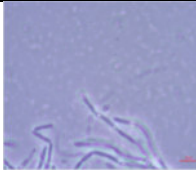
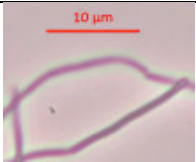
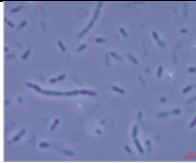

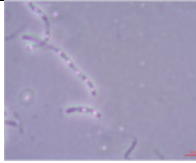
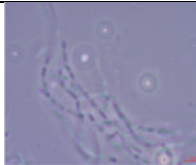

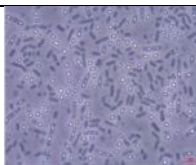
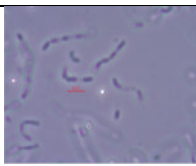



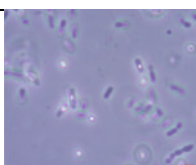
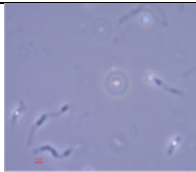
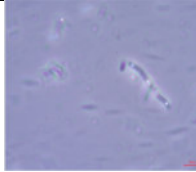

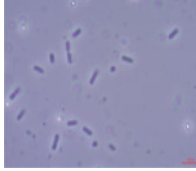
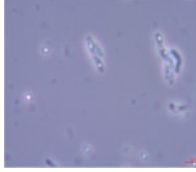




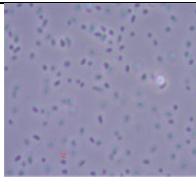
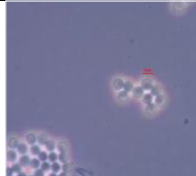
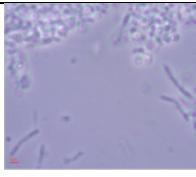
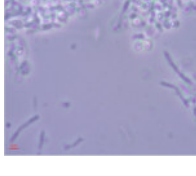



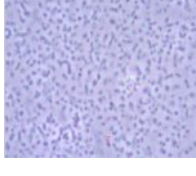
Figura 21. Clasificación de los aislados por morfología microscópica.

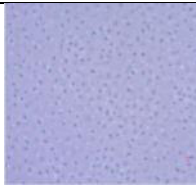
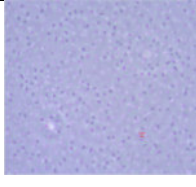
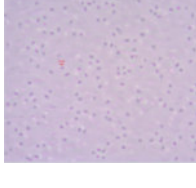
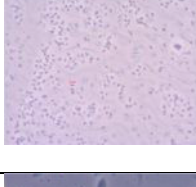
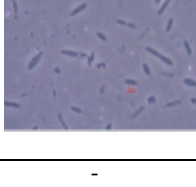
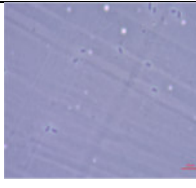
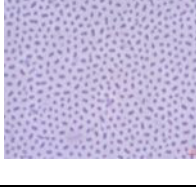
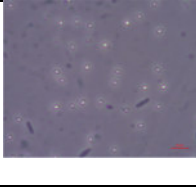
Tabla 21. Morfología de las colonias aisladas del suelo SMI

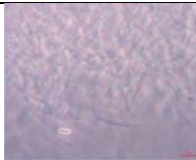


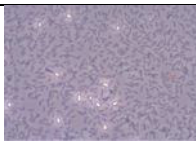

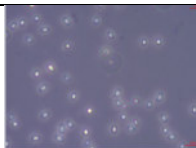
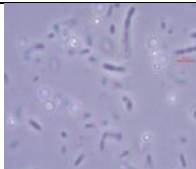
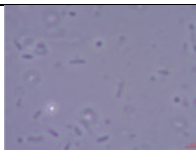
A i s l a d o	Hongo/ bacteria	Color	Forma	Elevación	Superficie	Bordes	Imagen 100x	Morfología microscópica
1	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos bordes rectos
2	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
3	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
4	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos

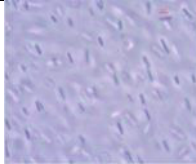
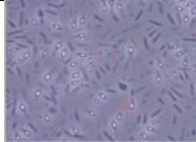

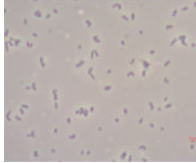

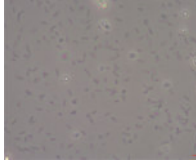

5	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
6	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
7	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
8	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
9	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
10	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Seca	Ondulado		Bacilos
11	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Brillante	Ondulado		Bacilos
12	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
13	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos


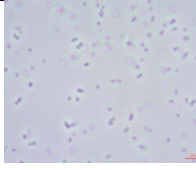
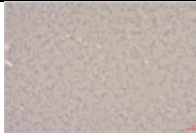
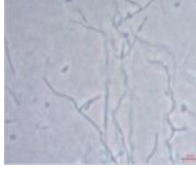
14	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
15	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
16	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
17	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Seca	Ondulado		Bacilos
18	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
19	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
20	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Estreptobacilo
21	Hongo	Micelio café, espora blanca	-	-	-	-	-	-
22	Hongo	Negro	-	-	-	-	-	-

23	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Brillante	Ondulado		Cocos
24	Hongo	Gris	-	-	-	-		Esporas
25	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Elevada	Superficial	Ondulado		Bacilos
26	Bacteria	Amarilla	Irregular	Convexa	Brillante	Ondulado		Bacilos
27	Bacteria	Blanco transparente	Puntiforme	Convexa	Brillante	Ondulado		Cocobacilos
28	Bacteria/ Levadura	Café	Circular	Convexa	Mate	Entero	-	-
29	Bacteria	Rojo claro	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Cocobacilos
30	Bacteria	Transparente	Puntiforme	Elevada	Brillante	Ondulado		Bacilos
31	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Brillante	Ondulado		Cocobacilos

32	Bacteria	Amarilla	Circular	Convexa	Brillante	Entero		Cocos
33	Bacteria	Amarilla	Circular	Convexa	Brillante	Entero		Cocos
34	Bacteria	Amarilla	Circular	Convexa	Brillante	Entero		Cocos
35	Bacteria	Amarilla	Circular	Convexa	Brillante	Entero		Cocobacilos
36	Bacteria	Transparente	Irregular	Convexa	Brillante	Entero		Bacilos bordes redondeados
37	Bacteria	-	-	-	-	-	-	-
38	Bacteria	Transparente	Irregular	Plana	Brillante	Ondulado		Cocobacilos
39	Bacteria	Blanco nacarado	Circular	Convexa	Cremosa	Entero		Cocos
40	Hongo	-	-	-	-	-	-	-
41	Hongo	-	-	-	-	-	-	-
42	Bacteria	Cremita	Puntiforme	Elevada	Cremosa	Ondulado		Bacilos bordes redondeados

43	Bacteria	Camel beige	Circular	Convexa	Brillante	Entero		Filamentos
44	Hongo	-	-	-	-	-		Esporas
45	Bacteria	Beige	Irregular	Elevada	Brillante	Ondulado		Bacilos
46	Bacteria	Beige	Puntiforme	Elevada	Brillante	Ondulado		Bacilos
47	Bacteria	Beige	Puntiforme	Elevada	Cremosa	Ondulado		Bacilos
48	Bacteria	Café	Circular	Convexa	Mate	Entero	-	-
49	Bacteria	Beige	Irregular	Elevada	Brillante	Ondulado		Esporas
50	Bacteria	Café	Circular	Convexa	Mate	Entero	-	-
51	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Elevada	Brillante	Ondulado		Bacilos
52	Bacteria	Transpare nte	Irregular	Convexa	Brillante	Entero		Bacilos y cocos
53	Levadur a	Café	Circular	Convexa	Mate	Entero	-	-

54	Bacteria	Transparente	Irregular	Convexa	Brillante	Entero		Bacilos
55	Bacteria	Café	Circular	Convexa	Mate	Entero	-	-
56	Bacteria	Camel beige	Circular	Convexa	Mate	Entero	-	-
57	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Brillante	Ondulado		Bacilos
58	Bacteria	Transparente	Puntiforme	Convexa	Brillante	Entero	-	-
59	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Convexa	Cremosa	Ondulado		Bacilos
60	Bacteria	Amarilla	Irregular	Convexa	Brillante	Entero		Cocobacilos
61	Bacteria	Coral	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Cocobacilos
62	Bacteria	Amarilla	Irregular	Convexa	Brillante	Entero		Bacilos
63	Bacteria	Blanco nacarado	Puntiforme	Plana	Brillante	Ondulado		Bacilos
64	Hongo	-	-	-	-	-	-	-

65	Bacteria	Camel beige	Circular	Convexa	Mate	Entero		Filamentos
66	Bacteria	Blanco nacarado	Irregular	Convexa	Cremosa	Ondulado		Cocobacilos
67	Hongo	-	-	-	-	-	-	-
68	Bacteria	-	-	-	-	-	-	-
69	Hongo	-	-	-	-	-	-	-
70	Bacteria	Amarilla	Irregular	Elevada	Brillante	Entero		Bacilos
71	Bacteria	Blanca	Puntiforme	Convexa	Seca	Ondulado		Filamentos

De los 71 aislados del suelo SMI, se trabajó con un total de 55 aislados de bacterias y 9 de hongos. De estos, 44 aislados de bacterias fueron capaces de crecer en As (V) 5 mM y 45 crecieron en As (III) 5 mM (Tabla 22). En este caso, 21 aislados de bacterias pudieron reducir As (V), sin embargo, no se detectó la oxidación de As (III) (Tabla 22 y Figura 22). Cabe destacar un halo incoloro que se observó en el medio de cultivo suplementado con 5 mM de As (III) en la reacción con AgNO_3 (Figura 22). Esto podría indicar que la oxidación química de As (III) está ocurriendo, a pesar de no mostrar la coloración típica, amarillo para As (III) y marrón rojizo para As (V) (Simeonova et al. 2004; Branco et al. 2009).

Tabla 22. Resultados de crecimiento de los aislados de bacterias de suelo SMI en 5 mM de As (III) y As (V) y su óxido-reducción.

Aislado (Bacteria)	ESC-SMI + 5 mM As (V)	ESC-SMI + 5 mM As (III)	Reducción As (V) a As (III)	Oxidación As (III) a As (V)
1	+	+	+	-♦
2	+*	+	+	-♦
3	+	+	+	-
4	+	+*	+	-
5	+	+	+	-♦
6	-	+*	-	-
7	+*	+*	+	-♦
8	+*	+	+	-♦
9	+*	+	+	-♦
10	+	+	+	-♦
11	+*	+*	-	-
12	+*	+	-	-♦
13	+*	+	+	-♦
14	+*	+	+	-
15	+	+*	+	-
16	+	+	+	-♦
17	-	+*	-	-
18	+*	-	-	-
19	-	+*	-	-
20	+	+	+	-♦
23	+	+*	-	-
25	-	+*	-	-
26	+	+*	-*	-
27	+	+*	-	-
28	+	-	-	-
29	+	+*	-	-
31	+	+*	-	-
32	+*	+*	-	-
33	+*	+*	-	-
34	+*	+*	-	-
35	+*	+*	-	-
36	-	-	-	-
38	+*	+*	-	-
39	+	+*	-	-
42	+*	+	-	-♦
43	+	-	-	-
45	+	+	-	-
46	+	+	+	-
47	+	+	+	-
48	+*	-	-	-
49	+*	+	+	-
51	+	+	+	-♦
52	+	+	-*	-
55	-	-	-	-
56	-	-	-	-
57	+*	+	-	-
58	+	+	+	-
59	+	+	+	-
60	+*	+	-	-
61	+	+	+	-
62	+	-	-	-
63	-	-	-	-
65	-	-	-	-
66	+	+	-*	-
71	-	-	-	-

*El crecimiento fue muy poco

♦Se observa un halo incoloro en As (III)

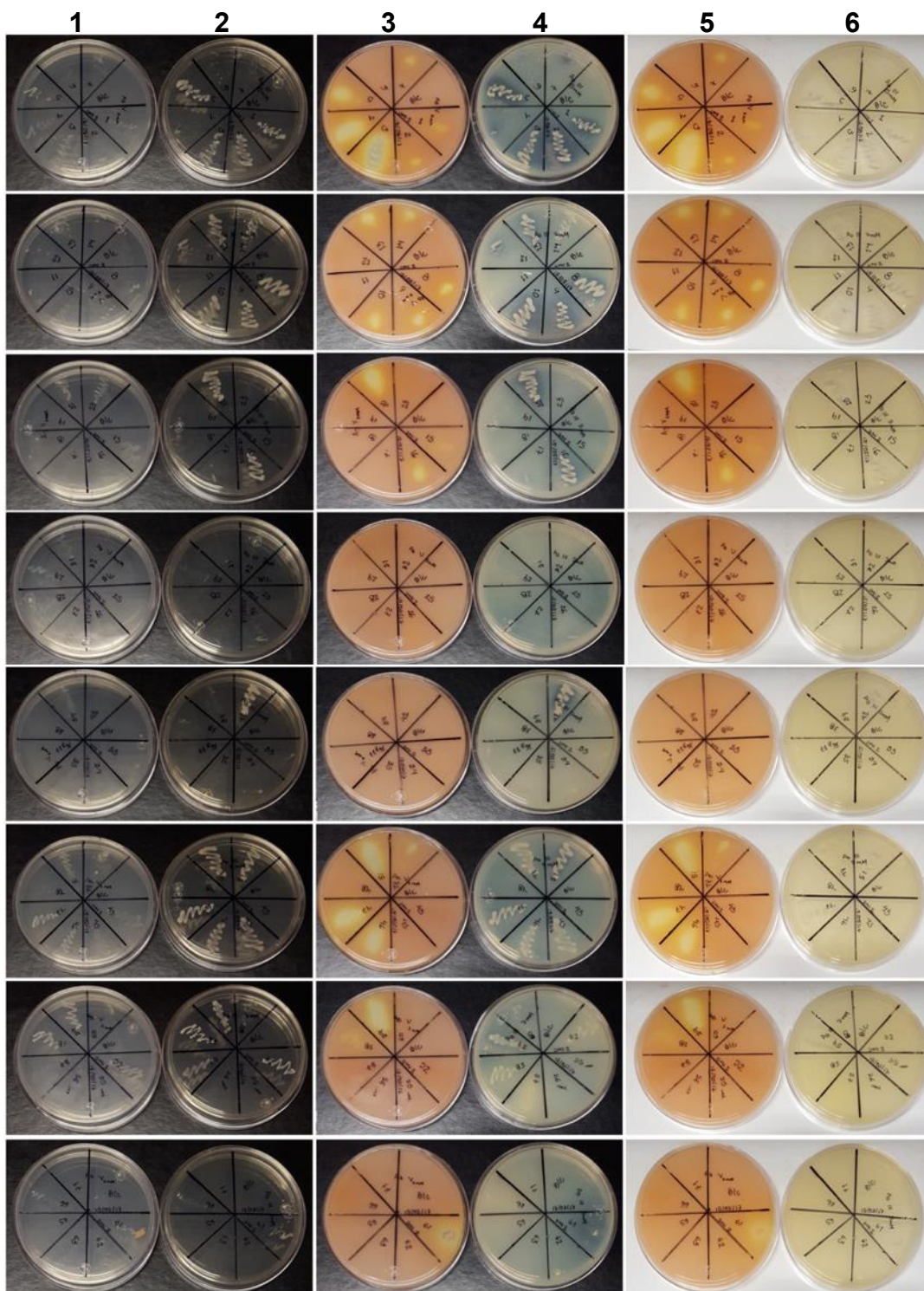


Figura 22. Detección de las bacterias óxido-reductoras de arsénico. Columna 1 ESC-SMI+As(V), columna 2 ESC-SMI+As(III), columna 3 y 5 ESC-SMI+As(V)+AgNO₃, columna 4 y 6 ESC-SMI+As(III)+AgNO₃.

La mayoría de los hongos aislados pueden crecer en concentraciones de sales de As 5 mM (Tabla 23), a excepción del aislado 40 que no se desarrolla en As (V) y los aislados 21, 22, 40 y 64 que no se desarrollan en As (III). No se detectó que los hongos fueran capaces de oxidar el As (III). Los aislados 44, 67 y 69 son capaces de reducir el As (V) (Figura 23 y 24).

Tabla 23. Resultados de crecimiento de los aislados de hongos en 5 mM de As (III) y As (V) y su oxido-reducción.

Aislado (Hongo)	ESC-SMI + 5 mM As (V)	ESC-SMI + 5 mM As (III)	Reducción As (V) a As (III)	Oxidación As (III) a As (V)
21	+	-	-	-
22	+*	-	-	-
24	+*	+	-	-
40	-	-	-	-
41	+	+	-	-
44	+	+	+	-
64	+	-	-	-
67	+	+	+	-
69	+	+	+	-

*El crecimiento fue muy poco

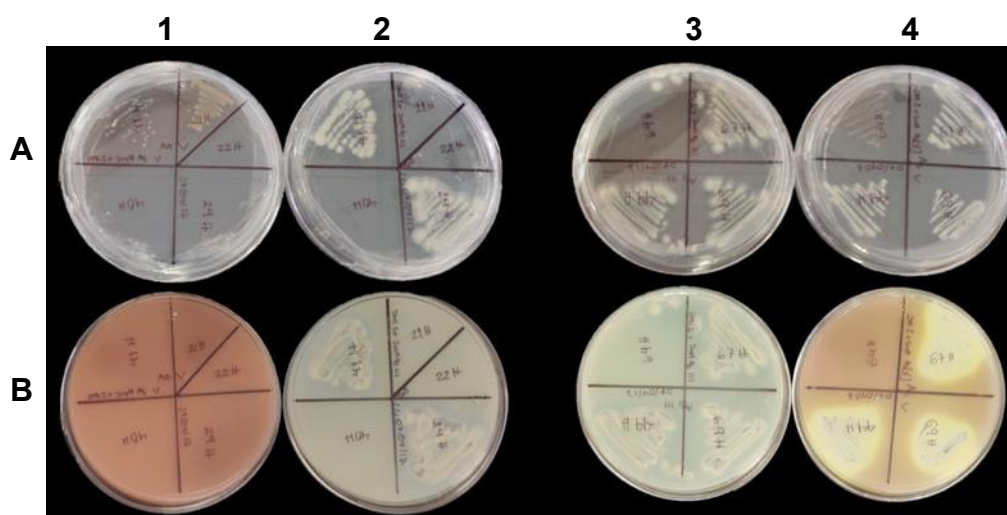


Figura 23. Detección de los hongos oxido-reductores de As. 1A y 4A tienen como medio de cultivo ESC-SMI+As(V), 2A y 3A ESC-SMI+As(III). 1B y 4B ESC-SMI+As(V)+AgNO₃, 2B y 3B ESC-SMI+As(III)+AgNO₃.

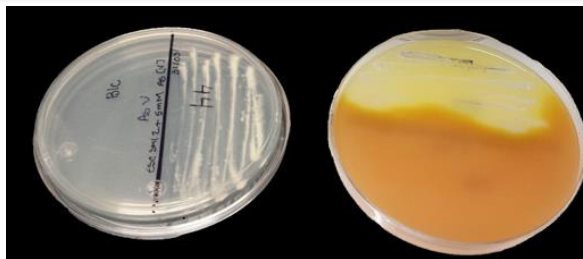


Figura 24. Prueba de reducción de As (V) del hongo 44 en medio de cultivo ESC-SMI+As(V)+AgNO₃ (figura derecha).

En la Figura 24 se puede observar que el hongo realizó la reducción de As (V) (color marrón) a As (III) (coloración amarilla), donde alcanzó un crecimiento favorable.

8.3.3 Prueba de tolerancia a diferentes concentraciones de As (III) y (V) de microorganismos aislados del suelo SMI

Los aislados de bacterias 2, 3, 5, 9, 10, 20, 46, 47, 49, 51, 59 y el hongo 44 se seleccionaron por su resistencia a As y su capacidad para reducir As (V) y fue probada su tolerancia a altas concentraciones de As (Tabla 24). Las bacterias presentaron un mejor crecimiento en As (V) incluso a concentraciones 30 mM, mientras que en As (III), solo los aislados 2, 9 y 20 crecieron a concentraciones 15 mM. En cambio, el hongo 44, presentó un desarrollo más favorable en As (III) (Figura 27), sin embargo, éste logró crecer en 30 mM de ambas sales (Tabla 24). No obstante, cuando el hongo creció en el medio enriquecido con As (III), su biomasa disminuyó en un 35.63% con respecto al medio sin As, mientras que cuando creció en el medio enriquecido con 5 mM de As (V), su biomasa disminuyó hasta en un 51.87%, con respecto al medio sin As a las 168 horas de crecimiento (Figura 25).

Tabla 24. Resistencia de microorganismos a diferentes concentraciones de sales de As.

Aislado	As (III)	As (III)	As (III)	As (V)	As (V)	As (V)
	10 mM	15 mM	30 mM	10 mM	15 mM	30 mM
2	+	+	-	+	+	+
3	+	*	-	+	+	+
5	+	*	-	+	+	+
9	+	+	-	+	+	+
10	+	*	-	+	+	+
20	+	+	-	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+
46	+	-	-	+	+	+
47	+	*	-	+	+	+
49	+	*	-	+	+	+
51	+	*	-	+	+	+
59	*	-	-	*	+	+

*Poco crecimiento

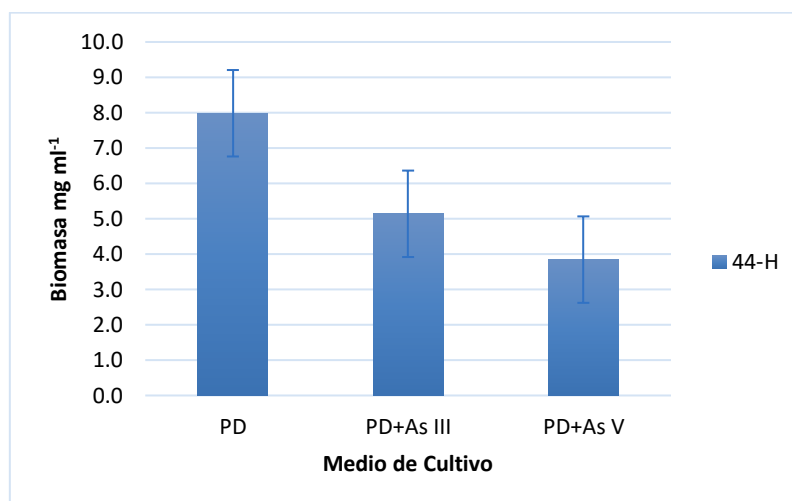


Figura 25. Biomasa de la cepa del hongo 44 en medio PD con y sin As. PD: medio papa dextrosa sin As; PD+AsIII: medio PD suplementado con 5 mM de As (III) y PD+AsV: medio PD más As (V) 5 mM.

8.4 Identificación molecular de los microorganismos resistentes a As

DNA de Bacterias. Se logró la extracción de DNA de buena calidad de los aislados de bacterias resistentes a As que se desarrollaron en el medio de cultivo LB (líquido), para evitar interferencias con restos de sólidos del suelo en el medio líquido ESC-SMI. Sin embargo, también se llevó a cabo la extracción de DNA de bacterias que crecieron en medio sólido ESC-SMI. Algunos de los geles se presentan en las Figuras 26 y 27.

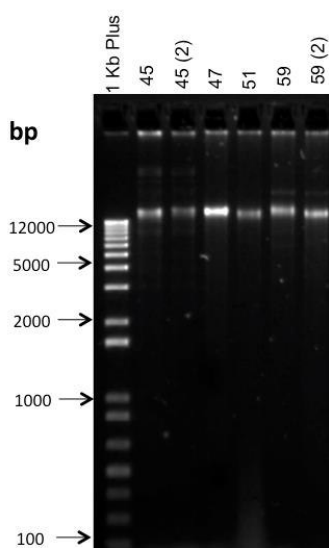


Figura 26. Extracción de DNA de bacterias (el número 2 en paréntesis significa duplicado).

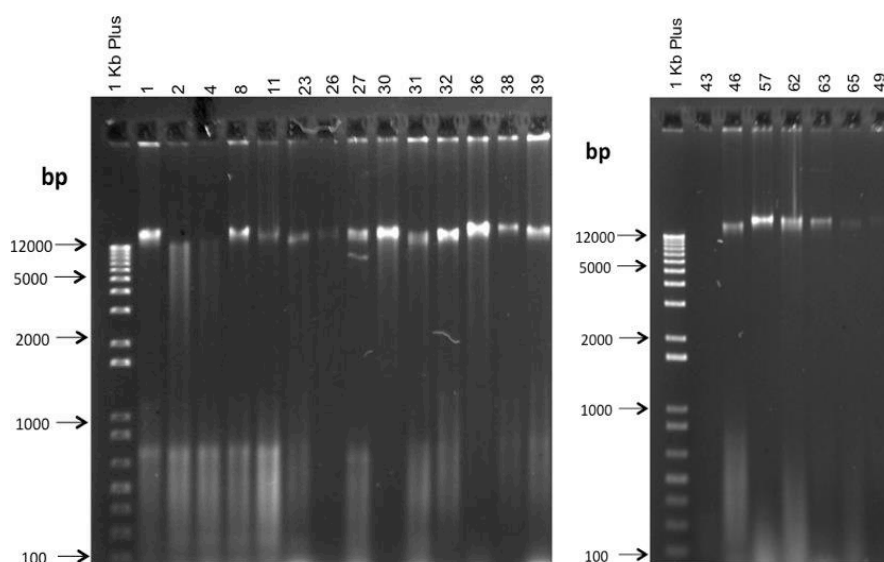


Figura 27. Extracción de DNA de bacterias aisladas del suelo SMI.

DNA de hongos. Se logró la extracción de DNA de buena calidad de los hongos de suelo SMI, se obtuvieron bandas superiores a las 12 Kb respecto al marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Figura 28 y 29). Para obtener el DNA los hongos fueron inoculados en medio de cultivo DAS.

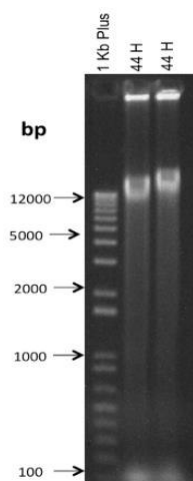


Figura 28. Extracción de DNA del hongo 44, aislado de suelo SMI.

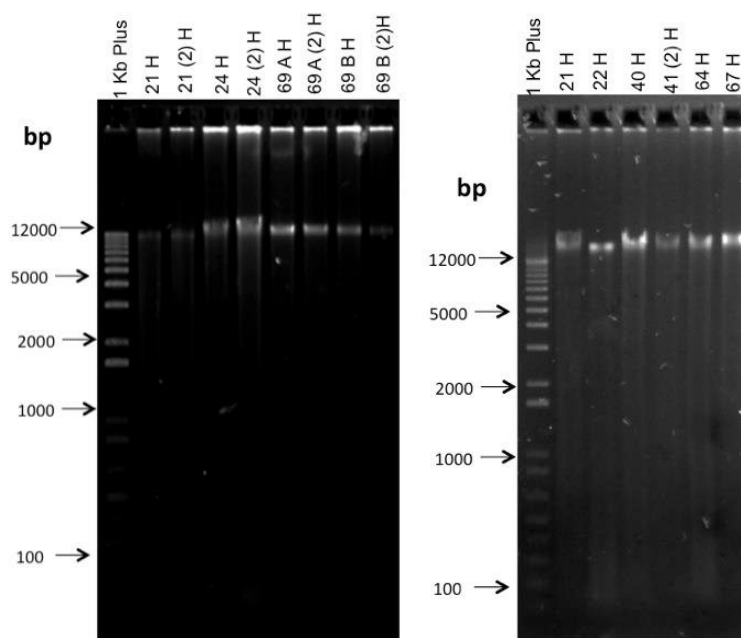


Figura 29. Extracción de DNA de hongos aislados del suelo SMI.

Amplificación del gen 16S rDNA e ITS. Del total de DNA extraído de las diferentes cepas de hongos y bacterias se logró la amplificación del gen 16S rDNA de 15 cepas de bacterias con un tamaño de aproximadamente 1500 pares de bases (algunos resultados se presentan en la Figura 30), que corresponde al tamaño del amplicón del gen 16S rDNA que originan los oligonucleótidos universales (Rodicio & Mendoza, 2004). También se logró la amplificación de 5 aislados de hongos con los ITS´s 4 y 5 con un tamaño de amplicón de aproximadamente 650 bp (Figura 30).

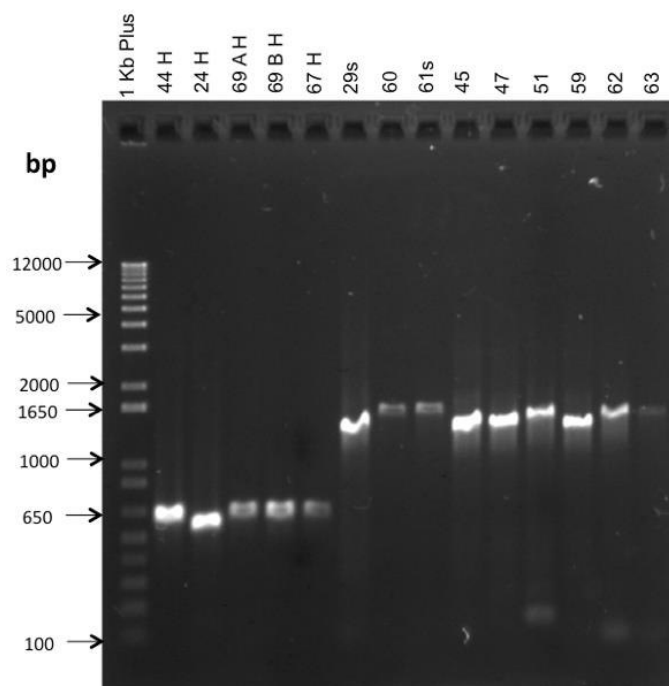


Figura 30. Amplificación por PCR de DNA de bacterias y hongos usando los oligonucleótidos ITS4 e ITS5 (carril 2-6) y los oligonucleótidos fDI y rP2 para el gen 16S rDNA (carril 7-15).

La amplificación de la región ITS con los cebadores específicos ITS4 e ITS5 evidenció gran homogeneidad para todas las muestras analizadas. El fragmento obtenido para todos los aislamientos tuvo un tamaño aproximado de 650 pares de bases (Figura 32). En un estudio realizado por Peteira et al. (2008) se encontró que los fragmentos obtenidos con los ITS4 e ITS5 tuvieron un tamaño aproximado de 850 pares de bases, sin embargo, se ha demostrado que una identificación precisa no siempre requiere la amplificación completa del gen (Rodicio & Mendoza 2004).

Alineamiento de secuencias. De acuerdo con la base de datos GenBank, las bacterias reductoras de As pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Williamsia* (Tabla 25 y 26). Los géneros *Sphingomonas* y *Nocardioides* mostraron resistencia a 5 mM de As; sin embargo, no pudieron reducirlo. Del mismo modo, el género *Lysobacter* fue resistente a 5 mM de As (III) y (V), pero no fue capaz de óxido-reducir el metaloide. De los nueve aislados de hongos obtenidos de las muestras de SMI, solo tres mostraron la capacidad de reducir As (V), todos identificados dentro del género *Penicillium* (Tabla 25 y 26).

Tabla 25. Identificación molecular de los microorganismos aislados.

Aislado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
24	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	*Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	-
44	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	*Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>rubens</i> (99%) Acceso LT558870.1
67	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	*Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>granulatum</i> (99%) AccesoDQ681334.1
69A	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	*Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>sp.</i> SC10 (99%) Acceso FJ647577.1
69B	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	*Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Chrysogenum</i> (100%) Acceso KP003823.1 <i>sp.</i> (99%) Acceso HQ317155.1
2	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	<i>simplex</i> (100%) Acceso KJ831621.1
3	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	<i>simplex</i> (99%) Acceso MG645295.1
6	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	-
9	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	<i>simplex</i> (99%) Acceso MG645295.1
20	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	<i>muralis</i> (100%) Acceso MG011540.1
29	Bacteria (100%)	Proteobacteria (100%)	Alphaproteobacteria (100%)	Sphingomonadales (94%)	Sphingomonadaceae (94%)	* <i>Sphingomonas</i> (86%)	<i>uncultured sp.</i> (99%) Acceso HM438587
45	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	<i>aryabhatai</i> (99%) Acceso MF109128
47	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (94%)	<i>Falsibacillus</i> (92%)	<i>Bacillus simplex</i> (99%) Acceso MF581431.1
49	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	<i>megaterium</i> (99%) Acceso MK544829.1
51	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	<i>sp.</i> (99%) Acceso MK110993.1
59	Bacteria (100%)	Firmicutes (100%)	Bacilli (100%)	Bacillales (100%)	Bacillaceae (100%)	<i>Bacillus</i> (100%)	<i>megaterium</i> (99%) Acceso KM374746.1
60	Bacteria (100%)	Actinobacteria (100%)	Actinobacteria (100%)	Actinomycetales (100%)	Nocardioidaceae (100%)	* <i>Nocardioides</i> (75%)	<i>sp.</i> (96%) Acceso KF964673
61	Bacteria (100%)	Actinobacteria (100%)	Actinobacteridae (100%)	Actinomycetales (100%)	Nocardiaceae (85%)	<i>Williamsia</i> (80%)	<i>sp.</i> (100%) Acceso KX900602
62	Bacteria (100%)	Proteobacteria (100%)	Gammaproteobacteria (100%)	Xanthomonadales (100%)	Xanthomonadaceae (100%)	* <i>Lysobacter</i> (94%)	<i>uncultured</i> (100%) Acceso LT795628
63	Bacteria (96%)	Actinobacteria (74%)	-	-	-	-	<i>uncultured</i> (87%) Acceso KC554531

* Similar al encontrado en la secuenciación del metagenoma del suelo MASE y SMI.

En la Tabla 26 se presentan los aislados de bacterias y hongos que fueron registrados en el banco de base de datos de NCBI, así como su número de acceso.

Tabla 26. Identidad de bacterias reductoras de As y aislados de hongos registrados en el banco de datos de NCBI.

Aislado	% Cobertura	E-valor	% Identidad	Secuencia más cercana	Número de Acceso Registrado	Identificación
2	99	0.0	99.93	HQ317155.1	MN498033	<i>Bacillus sp.</i>
3	99	0.0	100.00	KJ831621.1	MN498034	<i>Bacillus simplex</i>
9	100	0.0	98.72	MG645295.1	MN498035	<i>Bacillus simplex</i> strain LRV34
20	99	0.0	100.00	MG011540.1	MN498036	<i>Bacillus muralis</i> strain HIS3200905
47	100	0.0	99.86	MF581431.1	MN498037	<i>Bacillus simplex</i> strain Md1-25
49	100	0.0	99.93	MK544829.1	MN498038	<i>Bacillus megaterium</i> strain LB11
51	100	0.0	99.66	MK110993.1	MN498039	<i>Bacillus sp.</i> strain Whitaker B12
59	99	0.0	99.28	KM374746.1	MN498040	<i>Bacillus megaterium</i> strain 1S7
61	89	0.0	84.67	EU073114.1	MN498041	<i>Williamsia sp.</i> SY3
44	97	0.0	99.50	LT558870.1	MN493046	<i>Penicillium rubens</i>
67	99	0.0	99.02	DQ681334.1	MN493047	<i>Penicillium granulatum</i> isolate 732
69	99	0.0	99.65	MK267409.1	MN493048	<i>Penicillium chrysogenum</i> isolate E20332

8.5 Detección de los genes involucrados en la detoxificación y metabolismo del As en la célula microbiana

De los 21 aislados de bacterias que revelaron actividad reductora de As, ocho de ellos mostraron un crecimiento significativo en el medio ESC-SMI suplementado con As (aislados 1, 2, 3, 9, 47, 49, 51, 59). Estos aislamientos fueron seleccionados para explorar la presencia de los cinco genes relacionados con el metabolismo de As en bacterias (*aoxB*, *arsB*, *ACR3(1)*, *ACR3(2)* y *arrA*). A pesar de encontrar amplicones con el tamaño esperado de los genes en los aislados seleccionados (Figura 31, 32 y 33), solo el gen *arsB* fue identificado por su secuencia (Tabla 27). Este gen codifica para una proteína de transporte de arsenito y explica la capacidad de las bacterias para reducir As (V) (Achour et al. 2007). Los aislados 1, 2, 3, 47 y 59 pueden contener el gen *arrA* que codifica para una arsenato-reductasa (Figura 33), un elemento muy importante del sistema de reducción de arsénico microbiano con un amplicón de aproximadamente 330 pb (Mirza et al. 2017). Sin embargo, sus secuencias eran ambiguas y solo indicaban que el producto de PCR era parte del genoma de *Bacillus* (Tabla 28).

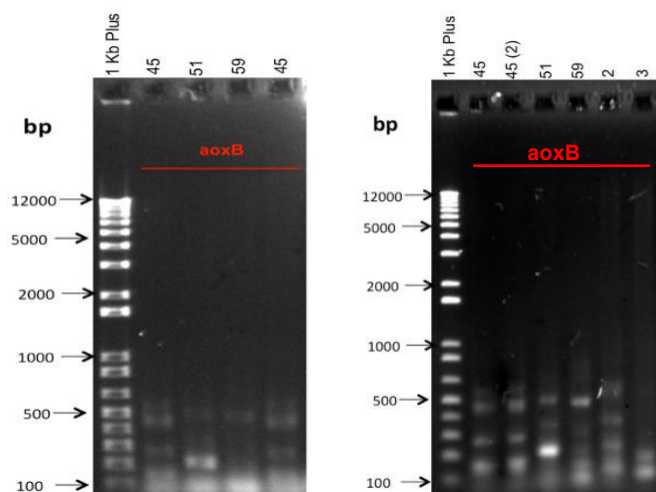


Figura 31. Amplificación por PCR del gen *aoxB* (500 bp) de las bacterias suelo SMI.

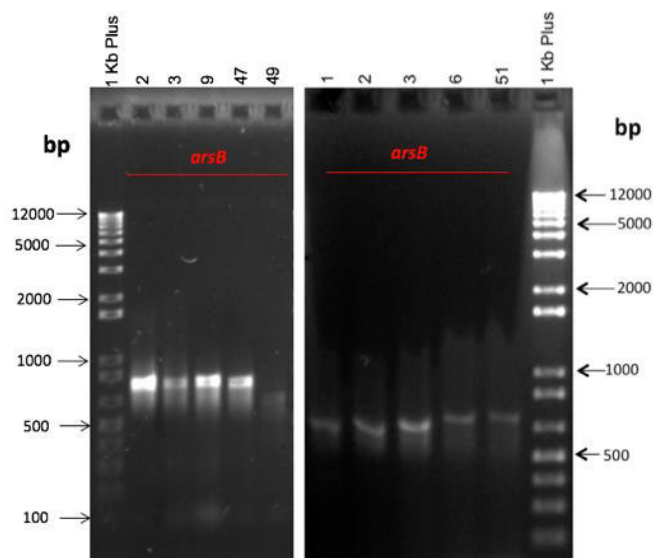


Figura 32. Amplificación por PCR del gen *arsB* (750 bp) de las bacterias de suelo SMI.

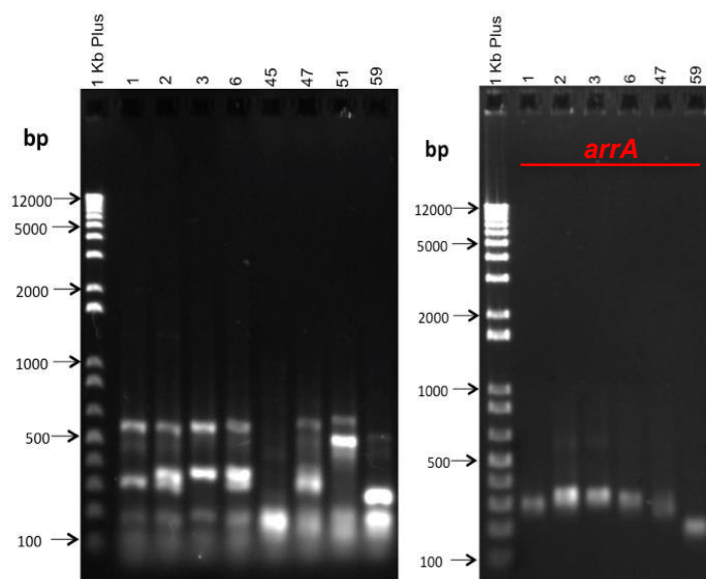


Figura 33. Amplificación por PCR del gen *arrA* de las bacterias de suelo SMI. Figura de la izquierda amplificaciones obtenidas. Figura de la derecha purificación de la banda de 330 bp.

Tabla 27. Identificación molecular del producto de PCR del gen *arsB*.

Aislado	Gen	Resultado en la plataforma de NCBI
1	<i>arsB</i>	<i>Bacillus</i> sp. A12 partial putative <i>arsB</i> gene for putative arsenite efflux pump, isolate A12. Acceso AM283009.1
2 (<i>B. sp</i>)	<i>arsB</i>	MULTISPECIES: arsenic transporter [<i>Bacillus</i>] (99% de identidad y 97% de cobertura) Acceso WP_095678232.1
3 (<i>B. simplex</i>)	<i>arsB</i>	MULTISPECIES: arsenical efflux pump membrane protein <i>ArsB</i> [<i>Bacillales</i>] (93% de identidad y 99% de cobertura) Acceso WP_062182597.1
9 (<i>B. simplex</i>)	<i>arsB</i>	arsenical efflux pump membrane protein <i>ArsB</i> [<i>Bacillus simplex</i>] (99% de identidad y 99% de cobertura) Acceso WP_063594304.1
47 (<i>B. simplex</i>)	<i>arsB</i>	arsenical efflux pump membrane protein <i>ArsB</i> [<i>Bacillus simplex</i>] (97% de identidad y 98% de cobertura) Acceso WP_063594304.1
49 (<i>B. megaterium</i>)	<i>arsB</i>	ABC transporter permease, partial [<i>Bacillus megaterium</i>] (98% de identidad y 61% de cobertura) Acceso RBN39773.1
51 (<i>B. sp</i>)	<i>arsB</i>	<i>Bacillus</i> sp. B05 partial putative <i>arsB</i> gene for putative arsenite efflux pump, isolate B05. Acceso AM283013.1

Tabla 28. Identificación molecular del producto de PCR del gen *arrA*.

Aislado	Gen	Resultado en la plataforma de NCBI
1	<i>arrA</i>	<i>Bacillus simplex</i> strain SH-B26, complete genome (88% de identidad y 46% de cobertura) Acceso CP011008.1
2 (<i>B. sp</i>)	<i>arrA</i>	MULTISPECIES: RNase adapter RapZ [<i>Bacillus</i>] (97% de identidad y 84% de cobertura) Acceso WP_056524506.1
3 (<i>B. simplex</i>)	<i>arrA</i>	-
47 (<i>B. simplex</i>)	<i>arrA</i>	-
59 (<i>B. megaterium</i>)	<i>arrA</i>	-

En la Tabla 29 se presenta el número de acceso registrado en el banco de datos de NCBI para el gen *arsB* que codifica la proteína de transporte de arsenito en las bacterias que pertenecen al género *Bacillus*: *B. sp* aislado 2 (No. MN535303), *B. simplex* aislado 3 (No. MN535304), *B. simplex* aislado 9 (No. MN535305), *B. simplex* aislado 47 (No. MN535306), y *B. megaterium* aislado 49 (No. MN535307).

Tabla 29. Identidad de los genes *arsB* registrados en el banco de datos de NCBI.

Aislado	Gen	% Cobertura	E-valor	% Identidad	Secuencia más cercana	Número de Acceso Registrado	Proteína codificada
2 (<i>B. sp</i>)	<i>arsB</i>	97	2e-139	98.74	WP_063577217.1	MN535303	arsenical efflux pump membrane protein ArsB [<i>Bacillus sp.</i> FJAT-20673]
3 (<i>B. simplex</i>)	<i>arsB</i>	99	2e-128	93.14	WP_06282597.1	MN535304	arsenical efflux pump membrane protein ArsB [Bacillales]
9 (<i>B. simplex</i>)	<i>arsB</i>	99	7e-137	99.02	WP_095396509.1	MN535305	arsenic transporter [<i>Bacillus simplex</i>]
47 (<i>B. simplex</i>)	<i>arsB</i>	98	3e-148	96.76	WP_095396509.1	MN535306	arsenic transporter [<i>Bacillus simplex</i>]
49 (<i>B. megaterium</i>)	<i>arsB</i>	61	9e-86	97.78	RBN39773.1	MN535307	ABC transporter permease, partial [<i>Bacillus megaterium</i>]

8.6 Exploración en el patrón de bandeado de proteínas en geles SDS-PAGE

Se exploró el patrón de bandeado de proteínas del hongo *Penicillium rubens* capaz de reducir el As (V) a As (III) y además que mostró un mejor crecimiento en medio de cultivo enriquecido con As (III) que con As (V) (Figura 34). Se observó que el patrón de bandeado muestra diferencias entre los 80-85 kDa para el carril 4 (una banda más marcada), los 25 kDa en el carril 4 (ausencia de la banda) y entre 15 a 20 kDa (ausencia de la banda en el carril 2).

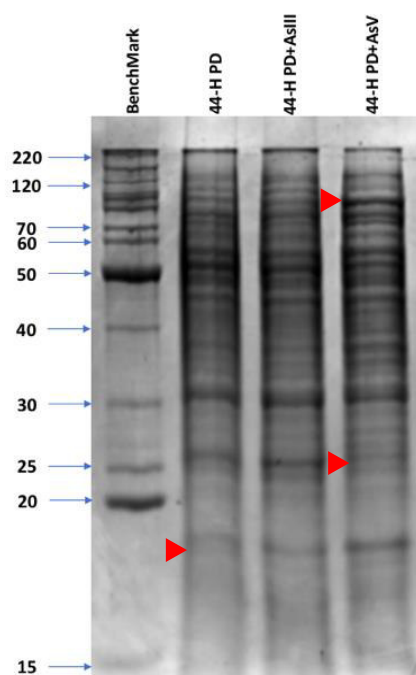


Figura 34. Gel SDS-PAGE del hongo *Penicillium rubens*, con una concentración de proteínas de 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Carril 1: marcador de proteínas BenchMark (kDa). Carril 2: crecimiento en medio PD (44-H PD). Carril 3: crecimiento en medio PD más 5 mM de As (III) (44-H PD+AsIII). Carril 4: crecimiento en medio PD más 5 mM de As (V) (44-H PD+AsV).

La banda marcada entre el peso de 80-85 kDa posiblemente corresponda a una proteína de membrana de la bomba de flujo arsenical (Acceso: KXG52481.1) con un peso de 81.37 kDa y correspondiente al organismo *Penicillium griseofulvum* (Banani et al. 2016). Las posibles proteínas que se encuentran entre los 15 y 20 kDa podrían corresponder a una arsenato reductasa, necesaria para la resistencia a As con un peso de 17.08 kDa (Acceso: CDO52751.1), también una proteína hipotética que corresponde a una arsenato reductasa y relacionada con una fosfatasa activa en

la división celular con un peso de 16.22 kDa (Acceso: KZN93060.1) reportada por Specht et al. (2014).

Cuando se realizó la extracción de proteínas del hongo *Penicillium rubens* a una concentración de 10 mM de As se obtuvo el patrón de bandeado de la Figura 35. Se observó una banda marcada a los 80 kDa en el carril 3 y 4, que no estuvo presente cuando el hongo creció sin As (Figura 35, carril 2). Esta banda podría estar relacionada con una proteína transportadora de expulsión de arsenito perteneciente al hongo *Metarhizium acridum* con un peso molecular de 82.93 kDa (Acceso: XP_007815226).

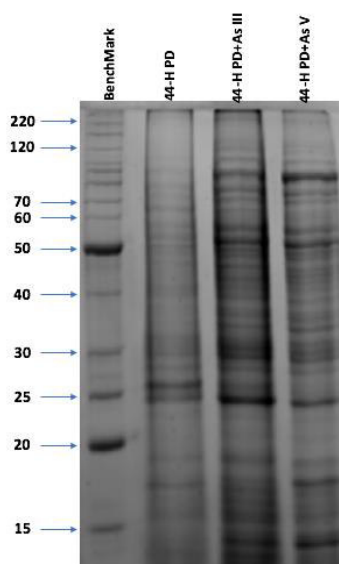


Figura 35. Gel SDS-PAGE del hongo *Penicillium rubens*, con una concentración de proteínas de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Carril 1: marcador de proteínas BenchMark (kDa). Carril 2: crecimiento en medio PD sin As. Carril 3: crecimiento en medio PD suplementado con 10 mM de As (III). Carril 4: crecimiento en medio PD suplementado con 10 mM de As (V).

La bacteria *Bacillus simplex* (aislado 47), también fue seleccionada para la extracción de proteínas en medio de cultivo ESC-SMI con y sin As. La bacteria mostró un mejor desarrollo en ESC-SMI sin As y en ESC-SMI enriquecido con As (V), por lo que en el carril 3 y 6 de la Figura 36, no se observó extracción de proteínas a las 48 y 72 horas ya que no hubo crecimiento de la bacteria.

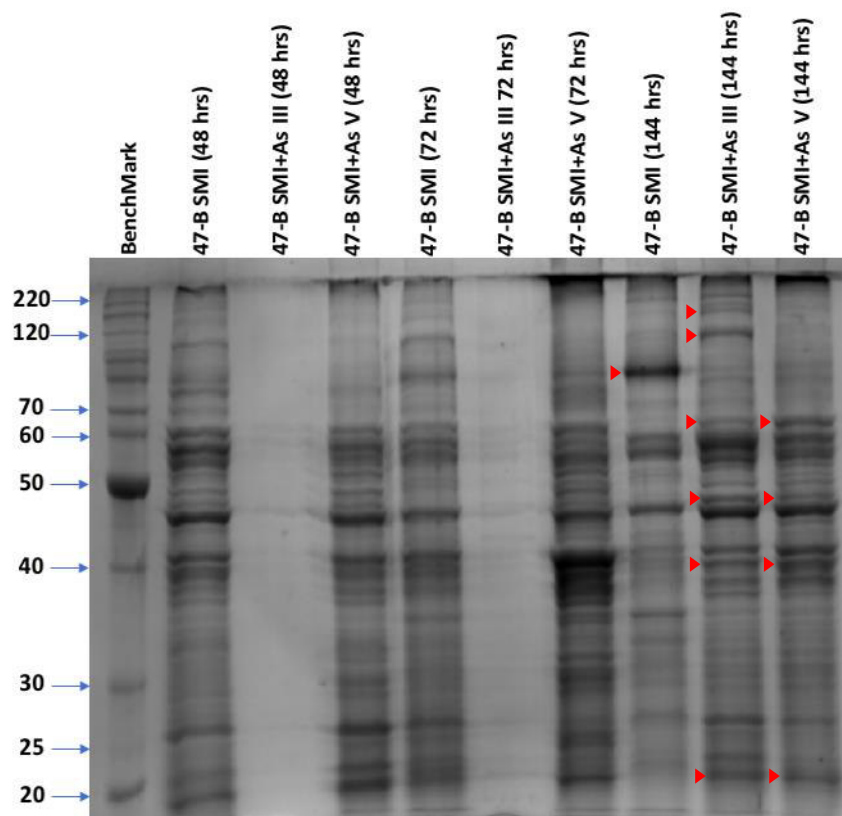


Figura 36. Gel SDS-PAGE de *Bacillus simplex* (aislado 47).

En el carril 9 y 10 de la Figura 36 se observó una banda de aproximadamente 39 kDa, que posiblemente corresponda a una proteína de resistencia a arsenito relacionada con el gen *arsB* (Acceso: EEN02445.1) y reportada en el organismo *Bacillus thuringiensis* IBL 4222 con un peso de 38.90 kDa y 350 aminoácidos (aa) de longitud (Zwick et al. 2012). Además, otra proteína con un peso de 39.09 kDa podría estar relacionada y posiblemente sea una proteína de unión a fosfato periplásmico de alta afinidad (Pfluding) ligada a arsenato (Acceso: 4F19_A; Elias et al. 2012). En 61.53 y 64.92 kDa se podría relacionar la banda observada en el carril 9 y 10 con un transportador de arsénico ABC ATPase (Acceso: KLN73343.1 y KEZ46966.1). Sin embargo, faltan más estudios (secuenciación de proteínas) para comprobar que estas proteínas estén relacionadas.

8.7 Cuantificación de As

En la cuantificación de As se probaron cuatro métodos para poder determinar la especie química de As (III o V), en el medio de cultivo donde se desarrollaban los

microorganismos y comprobar si eran óxido-reductores de As. En la cuantificación por cromatografía líquida (HPLC) se obtuvo que el suelo SMI con una profundidad de muestreo de 20 cm es el que presentó la mayor concentración tanto de As (III), así como de As (V) (Tabla 30). Mientras que para el medio de cultivo ESC-SMI suplementado con sales de As el método no fue el adecuado, ya que el medio de cultivo por el origen de sus componentes (jales mineros), reaccionaba y formaba cristales que no permitían su tratamiento.

Tabla 30. Concentración de As (III) y As (V) en el suelo MASE y SMI.

Muestra de suelo	As (V) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As (III) ($\mu\text{g L}^{-1}$)
MASE	2839	31.71
SMI (0-10 cm)	7184	49.95
SMI (0-20 cm)	16301	52.00

En la determinación de As (V) por el método con Azul de Molibdeno, se observó que el medio de cultivo ESC-SMI presentó interferencia con el fosfato (PO_4) cambiante del medio (ya que la concentración de PO_4 tiende a variar en el extracto de suelo), por lo que se usó un medio homogéneo en cuanto a su composición para la cuantificación de As (V) y fosfato (medio de cultivo PD). Se realizó un barrido para ubicar la longitud de onda a la que se absorbe la coloración de las muestras con el método azul de molibdeno, obteniéndose el pico dentro de la longitud de onda reportada por Tsang et al. (2007) aproximadamente a 845 nm. La curva de calibración (concentraciones de 0-0.9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ = 0-0.012 mM de As (V)) resultó tener una $R_2=0.9967$ muy cercana a 1, por lo que la calidad del modelo resultó buena. El medio de cultivo PD sin As y sin hongo (PD Blc) presentó una concentración promedio de 0.4495 mM (Tabla 31), que corresponde a la concentración de PO_4 en el medio, ya que éste no contiene As. Cuando al medio de cultivo PD sin As (PD+44H) se le agrega el microorganismo (*Penicillium rubens*) se observó una disminución en la concentración de fosfato (0.2339, 0.1826, 0.2149, 0.2473, 0.2244, 0.2092 mM; Tabla 31) que posiblemente el microorganismo este usando para su desarrollo.

Tabla 31. Cuantificación de As (V) y PO₄ en el sobrenadante del medio de cultivo PD donde creció *P. rubens*.

Muestra	Promedio absorbancia	Concentración obtenida (mM)	Factor dilución	Concentración mM (As (V)+ PO ₄)
Repetición 1				
Blanco (Blc) H2O	-0.0002	0.0001	1	0.0001
PD Blc	0.0077	0.0004	1000	0.4451
PD+44H 1	0.0022	0.0002	1000	0.2339
PD+44H 2	0.0008	0.0002	1000	0.1826
PD+AsV+44H 1	0.1148	0.0045	1000	4.5171
PD+AsV+44H 2	0.1283	0.0050	1000	5.0325
PD+AsIII+44H1	0.1190	0.0047	1000	4.6788
PD+AsIII+44H2	0.1251	0.0049	1000	4.9108
Repetición 2				
Blc H2O con KMnO ₄	0.0001	0.0002	1	0.0002
PD Blc	0.0080	0.0005	1000	0.4546
PD+44H 1	0.0017	0.0002	1000	0.2149
PD+44H 2	0.0025	0.0002	1000	0.2473
PD+AsV+44H 1	0.1169	0.0046	1000	4.5989
PD+AsV+44H 2	0.1463	0.0057	1000	5.7153
PD+AsIII+44H 1	0.1345	0.0053	1000	5.2684
PD+AsIII+44H 2	0.1345	0.0053	1000	5.2665
No se determina As (III) (El medio no es oxidado con KMnO₄)				
Blc H2O sin KMnO ₄	0.0090	0.0005	1	0.0005
PD Blc	0.0078	0.0004	1000	0.4489
PD+44H 1	0.0019	0.0002	1000	0.2244
PD+44H 2	0.0015	0.0002	1000	0.2092
PD+AsV+44H 1	0.0054	0.0004	1000	0.3557
PD+AsV+44H 2	0.0040	0.0003	1000	0.3024
PD+AsIII+44H 1	0.0052	0.0003	1000	0.3500
PD+AsIII+44H 2	0.0045	0.0003	1000	0.3233

Los números 1 y 2 representan los duplicados del experimento

En el caso del medio PD con 5 mM de As (V) (PD+AsV+44H), se obtuvo una concentración promedio de 4.9660 mM de AsV+PO₄, aproximadamente la misma concentración de As (V) que fue agregada al medio, y en algunos casos supera la concentración 5 mM que puede incluir la interferencia con fosfato (Tabla 31). Cuando el medio es enriquecido con As (III) y es oxidado por KMnO₄, todo el As del medio se convierte en As (V), por lo que se obtuvieron resultados similares en la cuantificación

de PD+AsIII+44H. Sin embargo, al no agregarle el KMnO_4 , lo que se cuantificó es solamente el As (V) y el PO_4 , y como se ha demostrado por el método cualitativo de la reacción con AgNO_3 el microorganismo reduce el As (V) a As (III), los resultados de la Tabla 31 indicaron que el PD+AsV+44H ya no contiene As (V), si no mas bien, la concentración obtenida de 0.3366 mM en promedio, corresponde al fosfato en el sobrenadante. A pesar de que este método resultó confiable, se usa en muy bajas concentraciones y la dilución 1 a 1000 no es la adecuada para un reporte científico.

En la cuantificación de As por Espectrometría de Absorción Atómica, se obtuvo que *B. simplex* (aislado 47) disminuyó el As total del medio, de una media de 5.554 mM a una media de 5.092 mM, lo cual fue altamente significativo ($p= 0.0007$) e indicó una disminución del 7.2% del As total en el medio a las 72 horas de la inoculación, con respecto al medio control no inoculado (ESC+AsIII) (Figura 37). Este aislado también demostró ser un reductor de As (V), identificado por la coloración amarilla en la reacción con AgNO_3 (Simeonova et al. 2004). También *B. simplex* disminuyó el As total de una media de 6.159 mM a una media de 5.510 mM, lo cual es altamente significativo ($p= 0.0014$) e indicó una disminución del 9.8% del As total en el medio a las 72 horas después de la inoculación, con respecto al medio no inoculado (ESC+AsV; Figura 37). El aislado 44 (*P. rubens*) no mostró disminución del As total en el medio con As (III), sin embargo, disminuyó el contenido total de As en el medio, de una media de 5.805 mM a una media de 5.144 mM, que es altamente significativo ($p = 0.0166$) e indicó una disminución del 12.1% del total de As a las 144 horas después de la inoculación, con respecto al medio control (ESC+AsV; Figura 37).

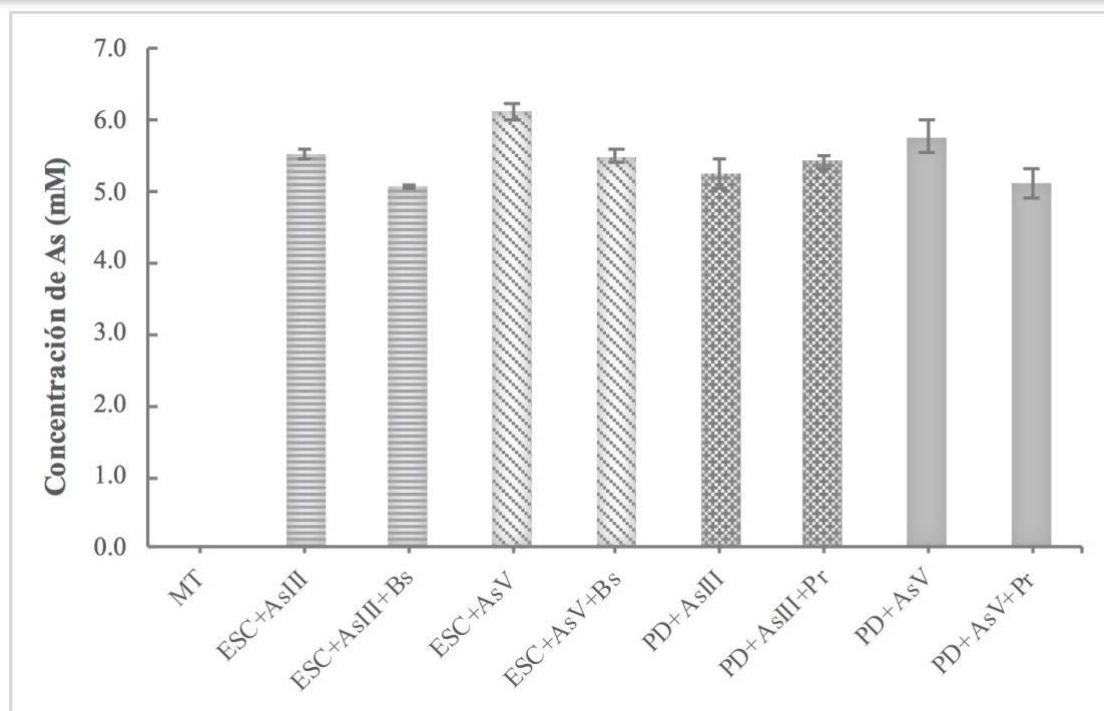


Figura 37. Cuantificación de As total en el sobrenadante del medio de cultivo, determinado por Espectrometría de Absorción Atómica. MT= medio de control sin As y sin microorganismos. EXSC+AsIII = medio con 5 mM de As (III) sin microorganismos. EXSC+AsIII+Bs = medio con 5 mM de As (III) *B. simplex*. EXSC+AsV = medio con 5 mM de As (V) sin microorganismos. EXSC+AsV+Bs = medio con 5 mM de As (V) y *B. simplex*. PD+AsIII = medio con 5 mM de As (III) sin microorganismos. PD+AsIII+Pr = medio con 5 mM de As (III) y *P. rubens*. PD+AsV= medio suplementado con 5 mM de As (V) sin microorganismos. PD+AsV+Pr = medio con 5 mM de As (V) y *P. rubens*.

Así mismo se realizó una exploración en la determinación de As por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Se identificaron los elementos químicos en el suelo SMI para detectar el As y los resultados se muestran en la Figura 38, sin embargo, por la cantidad de otros elementos más abundantes el As no se detectó en la muestra de suelo. Los elementos identificados en mayor abundancia fueron Fe y Al, seguidos de Si, Ca y finalmente Mg y S (Figura 38).

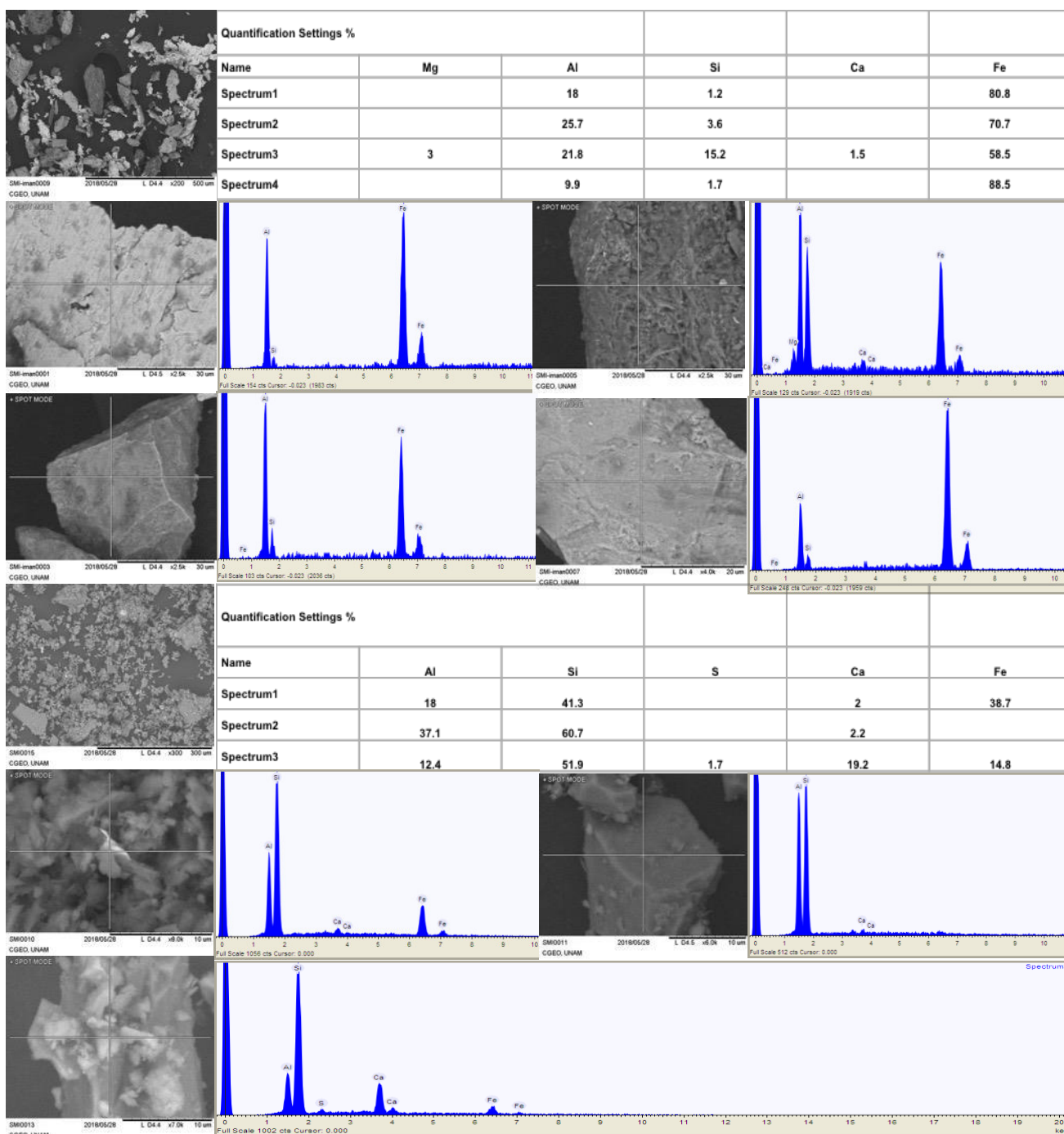


Figura 38. Identificación de elementos químicos en el suelo SMI por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

En la identificación de los elementos químicos en el medio de cultivo ESC-SMI suplementado con As (V) en una concentración 5 mM, se logró identificar al As en un porcentaje de abundancia del 21.5 al 27.5 % en la muestra, con respecto a los otros elementos identificados después de que los microorganismos inoculados crecieran en el medio (Figura 39). Sin embargo, este método solo fue exploratorio ya que proporciona el % de As con respecto a los elementos que componen lo que se observó y no una concentración ni especie química de As en sí.

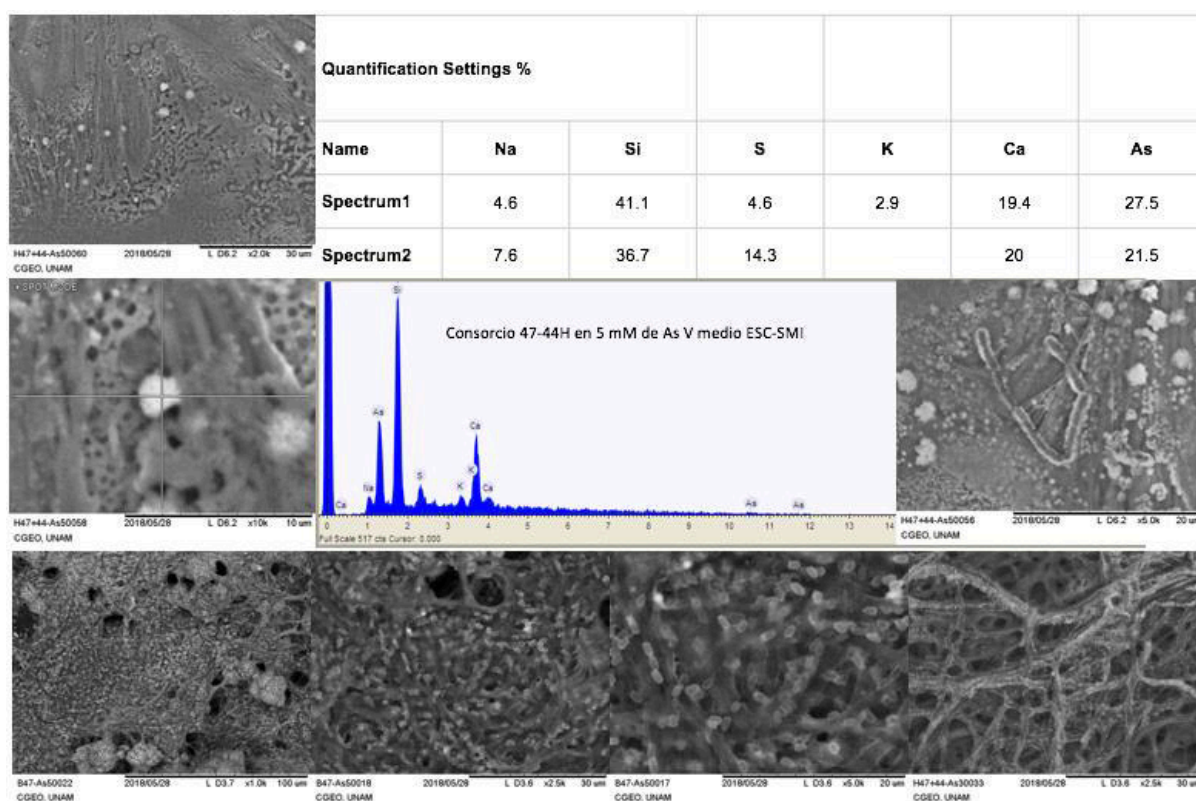


Figura 39. Identificación de elementos químicos en el medio de cultivo ESC+AsV inoculado con el consorcio *B. simplex* y *P. rubens* por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

IX. DISCUSIÓN

Desde la época colonial, Guanajuato ha sido económicamente importante para México por dos razones: la agricultura y la minería; y en ambas actividades económicas, el suelo es una fuente preponderante. Por lo tanto, la seguridad es primordial cuando se maneja este recurso natural, tanto para la industria alimentaria como para el manejo saludable de las fuentes mineras. La presencia de arsénico (As) en los suelos de Guanajuato se conoce desde hace mucho tiempo (Ramos-Arroyo et al. 2004), pero nunca se ha asociado a su microbioma. La resistencia de los microorganismos del suelo a elementos tóxicos como el As los ha hecho jugar un papel muy importante en la movilización, biotransformación y biodisponibilidad de diferentes especies de As (Cai et al. 2009; Mellado et al. 2011). El suelo SMI reportado en este trabajo presentó mayor contaminación por As que el suelo MASE. En el suelo MASE el pH ácido observado (6.1), podría considerarse aceptable para lograr una buena disponibilidad de macro y microelementos, sin presentar deficiencias de nutrientes esenciales en los cultivos. Sin embargo, el suelo SMI al mostrar un pH básico (8.1), indicaría deficiencias en la disponibilidad de P, Fe, Mn, Zn, Cu, Co, entre otros (Brady 1984; Nuñez 1985). Además, como fue observado por Ramos-Arroyo et al. (2006), en el suelo SMI, los valores básicos de pH podrían explicarse por la presencia de calcita en los jales de las minas, aumentando el pH en el suelo.

La importancia de la gran diversidad de microorganismos que se encuentran en los suelos está altamente relacionada con la capacidad del suelo para lidiar con elementos altamente contaminantes. En estudios previos (Campos et al. 2007; Cai et al. 2009), los microorganismos del suelo lograron oxidar o reducir las especies As en el medio, eliminando (al menos parcialmente) su toxicidad. Bacillos Gram negativos como *Pseudomonas alcaligenes* y *Wautersia solanacearum*, así como otros géneros de bacterias: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Comamonas*, *Rhodococcus* y *Stenotrophomonas* fueron capaces de tolerar altas concentraciones de As (8-20 mM). También se observó que la capacidad de estas bacterias para oxidar As (III), favorecía la colonización de otras especies no tolerantes a As, que son importantes en los ciclos biogeoquímicos.

Ambos tipos de suelo (MASE y SMI) estudiados en el presente trabajo, mostraron la presencia de Proteobacterias, Acidobacterias y Actinobacterias, phyla similares a los encontrados en suelos contaminados con Cd (Feng et al. 2018). En general, las Proteobacterias proporcionan algunas funciones básicas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos (Feng et al. 2018). En cuanto a las Acidobacterias, se han detectado en una amplia variedad de ambientes. De hecho, hay más de 3,000 secuencias en bases de datos públicas, mostrando ser abundantes en suelos y sedimentos con condiciones extremas o contaminadas (Barns et al. 2007). Existe una fuerte correlación entre la abundancia de Acidobacterias en el suelo y su pH, mostrando ser abundantes en suelos con un pH inferior a 6.0 y muy poco frecuentes en suelos con un pH superior a 6.5 (Sait et al. 2006). Sin embargo, encontramos abundancia de Actinobacterias a pH 6.4 para MASE y pH 8.1 para SMI, debido probablemente a la gran versatilidad de este phylum para adaptarse a diferentes ambientes. Es importante notar que, en el caso de los suelos SMI, contienen residuos de jales mineros que fueron sometidos a un proceso geoquímico que cambió el pH original del suelo. La oxidación de los sulfuros que generaron acidez, la neutralización y alcalinización por los carbonatos y la meteorización del suelo (Ramos-Arroyo et al. 2006), lo que quizás le dio tiempo a las Acidobacterias para adaptarse al suelo SMI y sea la razón por la cual se encontraron más Acidobacterias tolerantes a As en este estudio.

Por otra parte, las Actinobacterias se encontraron en mayor proporción en el suelo MASE (19.0%) que en el suelo SMI (14.2%) (Figura 15). La mayoría de estas bacterias juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica y renuevan las reservas de nutrientes en el suelo, además son fundamentales en la formación de humus (Battistuzzi y Hedges 2009). Puede ser que esta sea la razón por la cual las Actinobacterias fueron más abundantes en suelo MASE ya que mostró un mayor contenido de materia orgánica (8.41%) y nitrógeno (0.38%) en comparación con SMI (7.14 y 0.17%, respectivamente) (Tabla 5). De hecho, Porta et al. (2003) indicaron que una relación C/N óptima tiene un valor cercano a 10 (la C/N de MASE fue de 11.86) sugiriendo una buena relación entre mineralización y humificación, con tasas más altas de degradación de la materia orgánica. El género *Bradyrhizobium* fue uno de los más abundantes en ambas muestras de suelo, este género es conocido por su fijación simbiótica de nitrógeno en plantas (Kaneko et al. 2002). Su presencia

en el suelo agrícola podría estar relacionada con los cultivos y con la mejora de la nutrición de las plantas. Por otro lado, la presencia del género *Bradyrhizobium* en el suelo SMI también pudo estar relacionada con la vegetación nativa encontrada en el área muestreada, promoviendo su crecimiento (Corbera-Gorotiza y Nápoles-García 2013). Además, la familia Rhodospirillaceae se encontró en ambos suelos. Las llamadas bacterias púrpuras sin azufre, incluyen un total de 34 géneros, y algunas de ellas contienen varias bacterias diazotróficas asociadas a plantas con potencial para promover el crecimiento (Baldani et al. 2014).

Además, se identificaron dos géneros de bacterias As-reductores, *Bacillus* y *Williamsia*. El primero es muy diverso y algunas especies actúan como bioprotectores y también como promotores del crecimiento de las plantas, está ampliamente distribuido y su hábitat principal es el suelo (Orberá Ratón et al. 2005). En general, se sabe que las especies de *Bacillus* son buenas bacterias As-resistentes. Desde 1998 se encontró que son resistentes a As y que pueden reducirlo (Blum et al. 1998; Suresh et al. 2004) y absorben tanto As (III) como As (V) (Yang 2012). En cuanto a *Williamsia*, generalmente participan en el proceso de biodegradación y descomposición de suelos industriales contaminados (Keikha 2018). *Williamsia* es un género que se ha aislado de suelos contaminados con As y se clasificó como una nueva bacteria arsenito-resistente (Cai et al. 2009; Šimonovičová et al. 2016; Wu et al. 2018), pero no se han realizado estudios exhaustivos, lo que deja una amplia área de investigación para explorar. Estos géneros fueron encontrados en un estudio similar (Campos et al. 2007), sin embargo, algunos de estos aislamientos pueden representar nuevas cepas bacterianas resistentes a As. Además, la búsqueda de nuevas bacterias As-resistentes en un nicho ecológico específico de suelo contaminado siempre es relevante (Srivastava et al. 2013; Ghosh et al. 2018).

En general, los hongos son microorganismos abundantes en el suelo. Representan una gran proporción de la biomasa microbiana del suelo. Los principales grupos de hongos encontrados en los suelos estudiados son Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota. Dentro del phylum Ascomycota, los géneros más frecuentemente encontrados en el suelo son *Penicillium* y *Aspergillus* (Gondim-Porto 2013). Los hongos del género *Penicillium* son muy diversos y juegan un papel muy importante en la descomposición de la materia orgánica y la producción de enzimas (Visagie et al. 2014). Reportamos tres especies de este género en

presencia de As, especialmente *P. rubens* que creció en medio suplementado con As (III) a concentraciones 30 mM, a diferencia de las bacterias, que se desarrollan mejor en medio suplementado con As (V) y a menor concentración (Mellado et al. 2011). El phylum Glomeromycota que se encontró solo en suelo SMI forma micorrizas arbusculares (Schüßler et al. 2001). Su presencia en SMI puede estar relacionada con las plantas que crecen en el área muestreada.

La movilidad, la disponibilidad y la especiación de As son afectados por el metabolismo microbiano que participa en el ciclo biogeoquímico de este elemento. Entre las actividades microbianas, se ha encontrado que algunas cepas pueden oxidar arsenito o reducir arsenato. El operón *ars* constituye el esquema más importante y estudiado de tolerancia al As en microorganismos. Algunos genes involucrados son el gen *arsC*, que codifica para una arsenato-reductasa capaz de transformar As (V) en As (III), presente en bacterias que se han caracterizado en términos de su resistencia a As (Jackson et al. 2005). Cai et al. (2009) encontraron genes involucrados en la oxidación de As (III): el gen *aoxB* que codifica la subunidad mayor de una arsenito oxidasa, así como los genes que codifican diferentes proteínas transportadoras de arsenito en la célula microbiana (*arsB*, *ACR3(1)* y *ACR3(2)*), en bacterias aisladas de suelo altamente contaminado con As (20 mM). En este estudio se amplificó con éxito el gen *arsB* en los aislados de bacterias con la capacidad de reducir As (V), todo dentro del género *Bacillus* (*Bacillus sp.*, *B. simplex* y *B. megaterium*). Este gen confiere a las bacterias la capacidad de ser más resistentes a As, catalizando la extrusión de As (III) fuera de la célula (Mukhopadhyay y Rosen 2002). El aislado 47 (*B. simplex*) disminuyó el As total en un 7.2%; sin embargo, se considera una proporción baja ya que otra cepa de *Bacillus* pudo eliminar el 76.0% de As (V) a una concentración de 6 mM y el 56.0% se redujo a As (III) (Tripti et al. 2014).

En suelos contaminados con As, es común que los microorganismos desarrollen mecanismos para incorporar el metaloide en su metabolismo. Los suelos estudiados aquí proporcionan información importante sobre especies nativas de microorganismos resistentes a As. Por otro lado, un mayor contenido en materia orgánica y humedad en MASE, en comparación con el suelo SMI, puede contribuir a enriquecer el microbioma del suelo, lo que puede explicar la mayor diversidad de bacterias encontradas en el suelo agrícola, en comparación con el suelo minero.

En el suelo SMI (altamente contaminado por As), se encontró un mayor número de microorganismos resistentes a As, con la capacidad de transformar las especies químicas de As (reducción de As (V) a As (III)), en comparación con los microorganismos aislados del suelo MASE. Aunque el phylum Firmicutes se encontró en una proporción muy baja en el suelo SMI, estos fueron capaces de reducir As (V) a As (III). Por otro lado, el hongo *Penicillium* mostró la mayor capacidad para reducir el As (V) a As (III) y una fuerte resistencia a altas concentraciones de As (III) (> 30 mM).

Es importante notar que el origen de As en ambos tipos de suelos puede ser diferente. La meteorización de diferentes materiales parentales (rocas) en el área de captación de las minas comúnmente contribuye al contenido de As en los suelos SMI. Por el contrario, los suelos MASE provienen de la meteorización de rocas volcánicas, ricas en Na, Fe, Mg y óxidos de Fe-Ti (Nieto-Samaniego et al. 2012). Por lo tanto, el As encontrado en los suelos MASE está relacionado principalmente con el riego de agua subterránea de pozos profundos rica en As (Zanor et al. 2019). El origen del As en ambos tipos de suelos puede explicar la baja capacidad de las bacterias para procesarlo en suelos MASE, así como la alta capacidad de procesar As por hongos en los suelos SMI. En otras palabras, el microbioma en cada tipo de suelo es el resultado de la capacidad de diferentes microbiotas para sobrevivir en diferentes condiciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden contribuir a una mejor comprensión de los microbiomas de suelos contaminados con As. Además, un hongo (*Penicillium rubens*) mostró mayor capacidad para procesar As, en lugar de las bacterias, que son los microorganismos más comunes para degradar As en la naturaleza. Esta observación es importante ya que los hongos utilizan una vía metabólica diferente para tratar el As, y también se espera encontrar microorganismos con potencial biotecnológico en la restauración y biorremediación de suelos contaminados con As, en el futuro.

X. CONCLUSIONES

El suelo contaminado con arsénico logra que los microorganismos que viven en él desarrollen capacidades para incorporar el metaloide en su metabolismo, ya sea transformándolo por procesos redox como parte de su proceso respiratorio o metilándolo como mecanismo de desintoxicación. Aunque el suelo MASE tenía una mayor diversidad de bacterias en comparación con el suelo SMI, los aislados de bacterias de suelo MASE no presentaron la capacidad de óxido-reducir el As. Esto probablemente a que presentó una menor contaminación por As (15 mg kg^{-1}), a comparación del suelo SMI que contenía una alta concentración de As (39 mg kg^{-1}). Por otra parte, las bacterias y hongos aislados del suelo SMI mostraron la capacidad de reducir As (V) y ser resistentes a altas concentraciones de As (30 mM , más de dos mil mg L^{-1}), más de dos mil veces la dosis letal en humanos. Por lo tanto, se acepta la hipótesis de que los suelos contaminados con As tienen una menor diversidad microbiana, pero un mayor número y diversidad de microorganismos capaces de la biotransformación de este metaloide.

Aunque los microorganismos identificados en este estudio son similares a los reportados en informes previos, algunos de estos aislamientos pueden representar nuevas cepas resistentes a As. Además, la búsqueda de nuevos microorganismos arsénico-resistentes en un nicho ecológico específico de suelo contaminado siempre es relevante. En México existen muy pocos estudios relacionados con metagenómica de suelos agrícolas y mineros contaminados, que busquen microorganismos resistentes a elementos potencialmente tóxicos como el As. Por lo que este trabajo representa una contribución importante para comprender el comportamiento de comunidades microbianas nativas y el papel que podrían desempeñar en el procesamiento de As.

Perspectivas

1. Estudiar el hongo *P. rubens* que mostró la mayor capacidad para procesar As, ya que los hongos utilizan una vía metabólica diferente a las bacterias para tratar el As.
2. Realizar estudios de proteómica en el procesamiento de As por hongos y bacterias. El análisis y la secuenciación de las bandas de proteínas obtenidas (fingerprinting, MALDI), para confirmar su identidad.
3. Realizar una columna de Winogradsky para estudiar los microorganismos que intervienen en el ciclo biogeoquímico del As.
4. Aislar e identificar microorganismos con capacidad de oxidar el As (III).
5. Probar las bacterias y hongos aislados (consorcios) en la biorremediación de suelos contaminados con As.
6. Realizar un filtro biológico para la eliminación de As en agua.
7. Buscar un método viable para la cuantificación de altas concentraciones de las especies químicas de As (III y V).

XI. LITERATURA CITADA

- Achour, A. R., Bauda, P., & Billard, P. (2007). Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res Microbiol*, 158(2), 128-137.
- Alloway, B.J. (2012). *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability* (Third edition). *Environmental Pollution*, 22. doi: 10.1007/978-94-007-4470-7_2.
- Álvarez, M. D. (2010). El Suelo, Regulador Físicoquímico de Elementos Traza Para Las Plantas. En J. L. González Rebollar y A. Chueca Sancho (Eds.), *Características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas: Homenaje al Dr. Julio López Gorgé* (pp. 129-142). Granada: CSIC.
- Andreote, F.D., D.J. Jimenez, D. Chaves, A.C.F. Dias, D.M. Luvizotto, F. Dini-Andreote, et al. (2012). The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PLoS ONE* 7:E38600. doi:10.1371/journal.pone.0038600.
- ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2009). *Estudios de Caso en Medicina Ambiental (CSEM), La toxicidad del arsénico*. Recuperado de: https://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/arsenic/cambios_patogenicos.html. Consultado: 27 de mayo de 2019.
- Baldani J, Videira S, dos Santos Teixeira K, Reis V, Martínez de Oliveira A, Schwab S, de Souza EM, Pedraza RO, Divan Baldani VL, Hartmann A (2014) The Family Rhodospirillaceae. In: *The Prokaryotes* (ed) Rosenberg E, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. Springer Heidelberg, Berlin, pp 533–618.
- Balderas-Plata, M. Á., Cajuste, L. J., Lugo-de la Fuente, J. A., & Vázquez-Alarcón, A. (2003). Suelos agrícolas contaminados por metales pesados provenientes de depósitos de vehículos de desecho. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 449-459.
- Banani, H., Marcet-Houben, M., Ballester, A. R., Abbruscato, P., González-Candelas, L., Gabaldón, T., & Spadaro, D. (2016). Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. *BMC genomics*, 17(1), 19.
- Barns SM, Cain EC, Sommerville L, Kuske CR (2007) Acidobacteria Phylum Sequences in Uranium-Contaminated Subsurface Sediments Greatly Expand the Known Diversity within the Phylum. *Applied and environmental microbiology* 73:3113-6.

- Battistuzzi FU, Hedges SB (2009) A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. *Molecular Biology and Evolution* 26:335-343.
- Bento, F. M., Camargo, F. A., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource technology*, 96(9), 1049-1055.
- Blagodatskaya, E., & Kuzyakov, Y. (2013). Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. 67, 192–211.
- Blum JS, Bindi AB, Buzzelli J, Stolz JF, Oremland RS (1998) *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic | SpringerLink. *Archives of microbiology*, 171:19-30.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brady NC (1984) *The Nature and properties of Soils*. Macmillan Publishing Company, New York.
- Branco, R., Francisco, R., Chung, A. P., & Morais, P. V. (2009). Identification of an aox system that requires cytochrome c in the highly arsenic-resistant bacterium *Ochrobactrum tritici* SCII24. *Applied and environmental microbiology*, 75(15), 5141-5147.
- Bundschuh J, Giménez Forcada E, Guérèquiz R, et al. (2008) Fuentes geogénicas de arsénico y su liberación al medio ambiente. In: Bundschuh J, Pérez Carrera A, Litter M (eds) *Distribución del Arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana*. CYTED, Iberoarsen, pp 33–48.
- Cai, L., Liu, G., Rensing, C., & Wang, G. (2009). Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC microbiology*, 9(4), 1-11.
- Campos, V., Valenzuela, C., Alcorta, M., Escalante, G., & Mondaca, M. A. (2007). Aislamiento de bacterias resistentes a arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la quebrada camarones, Región Parinacota: Chile. *Gayana (Concepción)*, 71(2), 150-155.
- Carrillo-Chávez A, Morton-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solorzano H, Oesler G, García-Meza V, Hernández E, Morale P, Cienfuegos E (2003) Environmental geochemistry of the Guanajauto Mining District, Mexico. *Ore Geol. Rev.* 23:277–297.

- Cheng, F., Peng, X., Zhao, P., Yuan, J., Zhong, C., Cheng, Y., et al. (2013). Soil Microbial Biomass, Basal Respiration and Enzyme Activity of Main Forest Types in the Qinling Mountains, PLoS One, 8(6), e67353.
- Corbera Gorotiza J, Nápoles García MC (2013) Efecto de la inoculación conjunta Bradyrhizobium elkanii-hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya (Glycine max (L.) Merrill), cultivar INCASOY-27. Cultivos Tropicales 34:05-11.
- Coyne, M. S., & Rasskin, M. (2000). Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio.
- Cruz-Avalos, A. M., Bivián-Hernández, M. D. L. Á., Ibarra, J. E., Del Rincón-Castro, M. C. (2019). High Virulence of Mexican Entomopathogenic Fungi Against Fall Armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology*. 112(1), 99–107. <https://doi.org/10.1093/jee/toy343>.
- DeBruyn, J. M., Nixon, L. T., Fawaz, M. N., Johnson, A. M., & Radosevich, M. (2011). Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil. 77(17), 6295-6300.
- Delmont, T.O., P. Robe, S. Cecillon, I.M. Clark, F. Constancias, P. Simonet, et al. (2011). Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1315–1324. doi:10.1128/AEM.01526-10.
- Dueñas, A., Huarachi, R., Yapó, U., Apfata, P., & González, R. (2014). Bioacumulación de arsénico en *Chlorella Vulgaris* (Chlorophyta: Chlorellaceae) en efluente de Parque Industrial Río Seco (PIRS) y toxicidad aguda sobre *Daphnia Magna* (Crustacea: Daphniidae), Arequipa, Perú. *The Biologist*, 12(1), 9-22.
- Elias, M., Wellner, A., Goldin-Azulay, K., Chabriere, E., Vorholt, J. A., Erb, T. J., & Tawfik, D. S. (2012). The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments. *Nature*, 491(7422), 134.
- Eweis, J.B., S.J. Ergas, D.P. Chang y E.D. Schroeder 1998. Bioremediation principles. McGraw-Hill International Editions. 296 pp.
- Feng, G., Xie, T., Wang, X., Bai, J., Tang, L., Zhao, H., Wei, W., Wang, M. & Zhao, Y. (2018). Metagenomic analysis of microbial community and function involved in cd-contaminated soil. *BMC microbiology*, 18(1), 11.
- Ferrer, M. (2004). Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. *Actualidad SEM*, 38, 11-17.
- Fierer, N., C.L. Lauber, K.S. Ramirez, J. Zaneveld, M.A. Bradford, and R. Knight. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological

- analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J.* 6:1007–1017. doi:10.1038/ismej.2011.159.
- Galán, H. E., & Romero, B. A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Sociedad Española de Mineralogía*, 10.
- Gallardo, F. J. F., Sáenz, I. Z., & Castro, M. C. D. R. (2017). Análisis proteómico diferencial de la infección en larvas con el baculovirus sfnpv de *spodoptera frugiperda* (lepidóptera: noctuidae). *jóvenes en la ciencia*, 3(2), 2200-2204.
- Galperin, M. Y. (2013). Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiol Spectr*, 1(2), TBS-0015-2012-.
- Galvão, L. A. C., & Corey, G. (1987). Arsénico. *Serie Vigilancia*; 3.
- Ghosh PK, Maiti TK, Pramanik K, Ghosh SK, Mitra S, De TK (2018) The role of arsenic resistant *Bacillus aryabhatai* MCC3374 in promotion of rice seedlings growth and alleviation of arsenic phytotoxicity. *Chemosphere*, 211:407-419.
- Gilbert, J. A., Meyer, F., Field, D., Schriml, L. M., & Garrity, G. M. (2010). Metagenomics: A foundling finds its feet. *Stand Genomic Sci*, 3(2), 212-213.
- Gondim-Porto, C. (2013). Análisis microbiológico de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora urbana. *Universidad Complutense de Madrid, Madrid*.
- González, A., Cárdenas, M., & Restrepo, S. (2012). Metagenómica Revelación de Comunidades Microbianas. Hipótesis. *Apuntes Científicos Uniandinos. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias*, 12, 20-24.
- Gu, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhao, K., Xiang, Q., Yu, X., ... & Chen, Q. (2018). Genetic diversity and characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria isolated from *Pteris vittata*, an arsenic hyperaccumulator. *BMC microbiology*, 18(1), 42.
- Hanada, S. (2014). The phylum Chloroflexi, the family Chloroflexaceae, and the related phototrophic families Oscillochloridaceae and Roseiflexaceae. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, 515-532.
- Hernández, Velázquez, Orozco, & Santoyo. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (B. Aires)*, 79(2), 133-139.
- Inskeep, W. P., Macur, R. E., Hamamura, N., Warelow, T. P., Ward, S. A., & Santini, J. M. (2007). Detection, diversity and expression of aerobic

- bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental microbiology*, 9(4), 934-943.
- Jackson, C. R., Dugas, S. L., & Harrison, K. G. (2005). Enumeration and characterization of arsenate-resistant bacteria in arsenic free soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(12), 2319–2322.
- Janssen, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 72(3), 1719-1728.
- Jordán, L. A. (2005). Manual de Edafología. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla. Recuperado de https://www.google.com.mx/search?q=Jord%C3%A1n%2C+L.+A.+%282005%29.+Manual+de+Edafolog%C3%ADa&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b_ab&gfe_rd=cr&ei=2KFCV6rOF42RpgPn-5X4BA. Consultado: 29 de enero de 2016.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S (2002) Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research* 9:189-97.
- Kanokratana, P., T. Uengwetwanit, U. Rattanachomsri, B. Bunternngsook, T. Nimchua, S. Tangphatsornruang, et al. (2011). Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial community by metagenomic analysis. *Microb. Ecol.* 61:518–528. doi:10.1007/s00248-010-9766-7.
- Keikha M (2018) *Williamsia* spp. are emerging opportunistic bacteria. In: *New Microbes New Infect* 21:88-9.
- Kohlmeyer, J. (1977). New genera and species of higher fungi from the deep sea (1615-5315 m). *Rev. Mycol.* 41:189-206.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
- Lakshman, D. K., Natarajan, S. S., Lakshman, S., Garrett, W. M., & Dhar, A. K. (2008). Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia*, 100(6), 867-875.
- Latorre, S. M. O. (2014). Búsqueda de genes de resistencia a arsénico en el metagenoma microbiano de la Sabana de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Lindbo, D. L., Kozlowski, D. A., & Robinson, C. (2012, January). Know soil, know life. Madison, WI: Soil Science Society of America.

- López-Pérez, M. E. et al. (2015). Estudio geobiológico de suelos agrícolas, industrial y minero del Estado de Guanajuato, México. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.
- López-Pérez ME, Del Rincón-Castro MC, Muñoz-Torres C, Ruiz-Aguilar GM, Solís-Valdez S Zanor GA (2017) Evaluación de la contaminación por elementos traza en suelos agrícolas del suroeste de Guanajuato, México. *Acta Universitaria* 27:10-21.
- Medel, A., Ramos, S., Avelar, F. J., Godínez, L. A., & Rodríguez, F. (2008). Caracterización de Jales Mineros y evaluación de su peligrosidad con base en su potencial de lixiviación. *Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 35, 33-35.
- Mellado, C., Campos, V., & Mondaca, M. A. (2011). Distribución de genes de resistencia a arsénico en bacterias aisladas de sedimentos con concentraciones variables del metaloide. *Gayana (Concepción)*, 75(2), 131-137.
- Mirza, B. S., Sorensen, D. L., Dupont, R. R., & McLean, J. E. (2017). New arsenate reductase gene (arrA) PCR primers for diversity assessment and quantification in environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 83(4), e02725-16.
- Mora-Donjuán CA, Burbano-Vargas ON, Méndez-Osorio C, Castro-Rojas DF (2017) Evaluación de la biodiversidad y caracterización estructural de un Bosque de Encino (*Quercus L.*) en la Sierra Madre del Sur, México. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 14:68-75.
- Mukhopadhyay R, Rosen BP (2002) Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environmental health perspectives* 110:745-748.
- Myrold, D. D., Zeglin, L. H., & Jansson, J. K. (2014). The potential of metagenomic approaches for understanding soil microbial processes. *Soil Science Society of America Journal*, 78(1), 3-10.
- Müller, G. (1969) Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. *Geo J* 2,108– 118.
- Nieto-Samaniego AF, Ojeda-García AC, Alaniz-Álvarez SA, Xu S (2012) Geología de la región de Salamanca, Guanajuato, México. *Bol Soc Geol Mex* 64:411–425.
- Núñez SJ (1985) *Fundamentos de edafología*. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica.

- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2017). Arsénico. Recuperado de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>. Consultado: 24 de mayo de 2017.
- Orberá Ratón T, Pérez Portuondo I, Ferrer Salas D, Cortés Ramos N, González Giro Z (2005) Aislamiento de cepas del genero *Bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Química XVII*:189-95.
- Páez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V., & Cánovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*, 22(1), 117-130.
- Pérez-Martínez, I., & Romero, F. M. (2015). Uso de parámetros indirectos para la evaluación de la contaminación de suelos por metales pesados en una zona minera de San Luis Potosí, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 67(1), 1-12.
- Peteira, B., Toledo, V., & Martínez, B. (2008). Variabilidad molecular en aislamientos de *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan. *Revista de Protección Vegetal*, 23(3), 183-190.
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590.
- Porta J, López-Acevedo M, Roquero de Laburu C (2003) *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Sheelu, G., Gupta, S. M., Nath, B. N., & Rao, B. R. (2004). Buried in time: culturable fungi in a deep-sea sediment core from the Chagos Trench, Indian Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51(11), 1759-1768.
- Ramos-Arroyo YR, Prol-Ledesma RM, Siebe-Grabach CD (2004) Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del Distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. *Revista mexicana de ciencias geológicas* 21:268-284.
- Ramos-Arroyo, Y. R., & Siebe-Grabach, C. D. (2006). Estrategia para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de caso en el Distrito de Guanajuato, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 23(1), 54-74.
- Rangel-Montoya EA, Montañez Hernández LE, Luévanos Escareño MP, Luévanos Escareño MP, Balagurusamy N (2015) Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. *Terra Latinoamericana* 33:103-18.
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y

- aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 22(4), 238-245.
- Rodríguez R, Morales-Arredondo I, Rodríguez I (2016) Geological differentiation of groundwater threshold concentrations of arsenic, vanadium and fluorine in el bajío Guanajuatense, Mexico. *Geofis Int* 55-1:5–15.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., et al. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 66(6), 2541-2547.
- Rosen, B. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEMS Microbiology Letters* 529:86-92.
- Rudnick, R. L., & Gao, S. (2003). Composition of the Continental Crust. *Treatise on Geochemistry*, 3, 1-64.
- Sait M, Davis KE, Janssen PH (2006) Effect of pH on Isolation and Distribution of Members of Subdivision 1 of the Phylum Acidobacteria Occurring in Soil. *Applied and environmental microbiology* 72:1852-7.
- Saldaña-Robles A, Saldaña-Robles N, Saldaña-Robles A, Zanol GA, Ruiz-Aguilar GM, Gutiérrez-Vaca C (2018). Efecto del fósforo en la acumulación de arsénico en cebada (*Hordeum vulgare* L.) por riego con agua contaminada. *Agrociencia* 52-3: 407-418.
- Sangwan, N., P. Lata, V. Dwivedi, A. Singh, N. Niharika, J. Kaur, et al. (2012). Comparative metagenomic analysis of soil microbial communities across three hexachlorocyclohexane contamination levels. *PLoS ONE* 7(9):e46219. doi:10.1371/journal.pone.0046219.
- Schoch, C. L., Sung, G. H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., ... & Gueidan, C. (2009). The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic biology*, 58(2), 224-239.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research*, 105(12), 1413-1421.
- Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., Von Gunten, U., & Wehrli, B. (2010). Global water pollution and human health. *Annual review of environment and resources*, 35, 109-136.
- Selbmann, L., De Hoog, G. S., Mazzaglia, A., Friedmann, E. I., & Onofri, S. (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Stud Mycol*, 51(1), 1-32.

- SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2012). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Recuperado de:
http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/pdf/Cap0_docs_previos.pdf:382. Consultado: 30 de Marzo de 2016.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research* 105:1413-21.
- Shannon C (1948) *The mathematical theory of communication*. Press Urbana, University of Illinois.
- Shuhaimi, M., Ali, A. M., Saleh, N. M., & Yazid, A. M. (2001). Utilisation of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. *Biotechnology Letters*, 23(9), 731-733.
- Silver, S. & Phung, L.T. 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* 71:599-608.
- Simeonova, D. D., Liévremont, D., Lagarde, F., Muller, D. A., Groudeva, V. I., & Lett, M. C. (2004). Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 237(2), 249-253.
- Šimonovičová A, Peťková K, Jurkovič Ľ, Ferianc P, Vojtková H, Remenár M, Kraková L, Pangallo D, Hiller E, Čerňanský S (2016) Autochthonous Microbiota in Arsenic-Bearing Technosols from Zemianske Kostol'any (Slovakia) and Its Potential for Bioleaching and Biovolatilization of Arsenic. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227:1-17.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688.
- Somma, M., & Querci, M. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Extracción y purificación de ADN. European Commission JRC.
- Soro, V., Dutton, L. C., Sprague, S. V., Nobbs, A. H., Ireland, A. J., Sandy, J. R., et al. (2014). Axenic Culture of a Candidate Division TM7 Bacterium from the Human Oral Cavity and Biofilm Interactions with Other Oral Bacteria. *80(20)*, 6257.
- Specht, T., Dahlmann, T. A., Zadra, I., Kürnsteiner, H., & Kück, U. (2014). Complete sequencing and chromosome-scale genome assembly of the industrial progenitor strain P2niaD18 from the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Genome announcements*, 2(4), e00577-14.

- Srivastava S, Verma PC, Chaudhry V, Singh N, Abhilash PC, Kumar KV, SN (2013) Influence of inoculation of arsenic-resistant *Staphylococcus arlettae* on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.) Czern. Var. R-46. *Journal of hazardous materials* 262:1039-1047.
- Steven, B., L. Gallegos-Graves, S.R. Starkenburg, P.S. Chain, and C.R. Kuske. (2012). Targeted and shotgun metagenomic approaches provide different descriptions of dryland soil microbial communities in a manipulated field study. *Environ. Microbiol. Rep.* 4:248–256. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00328.x.
- Stewart, F.J., A.K. Sharma, J.A. Bryant, J.M. Eppley, and E.F. DeLong. (2011). Community transcriptomics reveals universal patterns of protein sequence conservation in natural microbial communities. *Genome Biol.* 12:R26. doi:10.1186/gb-2011-12-3-r26.
- Suresh K, Prabakaran SR, Sengupta S, Shivaji S (2004) *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. *Journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(4):1369-1375.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0: Molecular Biology and Evolution.
- Tarbut, E. J., & Lutgens, F. K. (2005). *Ciencias de la Tierra, una introducción a la geología física*. Pearson.
- Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. *Front Microbiol*, 2.
- Tripti, K., Sayantan, D., Shardendu, S., Singh, D. N., & Tripathi, A. K. (2014). Potential for the Uptake and Removal of Arsenic [As (V) and As (III)] and the Reduction of As (V) to As (III) by *Bacillus licheniformis* (DAS1) under Different Stresses. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 42(3), 238-248.
- Tsang, S., Phu, F., Baum, M. M., & Poskrebyshev, G. A. (2007). Determination of phosphate/arsenate by a modified molybdenum blue method and reduction of arsenate by $S_2O_4^{2-}$. *Talanta*, 71(4), 1560-1568.
- Uroz, S., P. Ioannidis, J. Lengelle, A. Cebron, E. Morin, M. Buée, and F. Martin. 2013. Functional assays and metagenomic analyses reveals differences between the microbial communities inhabiting the soil horizons of a Norway spruce plantation. *PLoS ONE* 8(2):e55929. doi:10.1371/journal.pone.0055929.

- Van Deuren, J., Z. Wang y J. Ledbetter 1997. Remediation technologies screening matrix and reference guide. Tercera edición. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Velasco, J. A., & Volke-Sepúlveda, T. L. (2003). El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*, 66, 41-53.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., et al. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* (Vol. 71, pp. 495-548).
- Vilgalys, R. (2005). Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. Duke University, USA. Internet address: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>.
- Visagie C, Houbraken J, Frisvad J, Hong SB, Klaassen C, Perrone G, Seifert K, Varga J, Yaguchi T, Samson R (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol* 78:343-71.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261-5267.
- Ward, N. L., Challacombe, J. F., Janssen, P. H., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Wu, M., et al. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol*, 75(7), 2046-2056.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Wertz, J. T., Kim, E., Breznak, J. A., Schmidt, T. M., & Rodrigues, J. L. M. (2012). Genomic and Physiological Characterization of the Verrucomicrobia Isolate *Diplosphaera colitermitum* gen. nov., sp. nov., Reveals Microaerophily and Nitrogen Fixation Genes. *Appl. Environ. Microbiol*, 78(5), 1544-1555.
- Weeger, W., Lievreumont, D., Perret, M., Lagarde, F., Hubert, J. C., Leroy, M., & Lett, M. C. (1999). Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometals*, 12(2), 141-149.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

- Wu D, Zhang Z, Gao Q, Ma Y (2018) Isolation and characterization of aerobic, culturable, arsenic-tolerant bacteria from lead–zinc mine tailing in southern China | SpringerLink. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34:177.
- Yang T, Chen ML, Liu LH, Wang JH, Dasgupta PK (2012) Iron(III) Modification of *Bacillus subtilis* Membranes Provides Record Sorption Capacity for Arsenic and Endows Unusual Selectivity for As(V). *Environmental science & technology* 46:2251-2256.
- Yergeau, E., H. Hogues, L.G. Whyte, and C.W. Greer. (2010). The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses. *ISME J.* 4:1206–1214. doi:10.1038/ismej.2010.41.
- Zanor GA, García MG, Venegas-Aguilera LE, Saldaña-Robles A, Saldaña-Robles N, Martínez-Jaime OA, Segoviano-Garfias JJN, Ramírez-Santoyo LF (2019) Sources and distribution of arsenic in agricultural soils of Central Mexico. *Journal of Soils and Sediments* 19-6: 2795-2808.
- Zapata, P., Rojas, D., Fernández, C., Ramírez, D., Restrepo, G., Orjuela, V., ... & Atehortúa, L. (2007). Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. *Revista EIA*, (7), 137-144.
- Zwick, M. E., Joseph, S. J., Didelot, X., Chen, P. E., Bishop-Lilly, K. A., Stewart, A. C., ... & Sozhamannan, S. (2012). Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome research*, 22(8), 1512-1524.

XII. ANEXOS

Tabla de abreviaturas

Tabla A.32. Abreviaturas usadas

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	NOTAS
A	Absorbancia	
Ag	Plata	
As	Arsénico	
As (III)	Arsenito	
As (V)	Arsenato	
ATP	Adenosin trifosfato	
Au	Oro	
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Pares de bases	
C/N	Relación carbono-nitrógeno	
CDM	Medio químico definido	Medio de cultivo
CHAPS	3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1- propanosulfato	
DA	Densidad aparente	
DAS	Agar Dextrosa Saboraud	Medio de cultivo
DNA	Ácido desoxirribonucleico	
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato	
DO	Densidad óptica	
DR	Densidad real	
DTT	Ditiotreitol	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	
EMBL	Laboratorio Europeo de Biología Molecular	
EPT	Elementos potencialmente tóxicos	
ESC	Extracto de suelo concentrado	Medio de cultivo
ESC-MASE	Extracto de suelo agrícola concentrado	Medio de cultivo
ESC-SMI	Extracto de suelo minero concentrado	Medio de cultivo
ET	Elementos traza	
HCl	Ácido clorhídrico	
HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento	High-performance liquid chromatography
ITS	Espaciadores internos transcritos	Internal transcribed spacer
kb	Kilobase	
LB	Luria Bertani	Medio de cultivo
MASE	Suelo agrícola	
mM	Milimolar	
MO	Materia orgánica	
mu g L-1	Miliunidades de gramo por litro	Miligramos por litro
N	Nitrógeno	
NaCl	Cloruro de Sodio	

NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometros	
Oligo F	Oligonucleótido directo	
Oligo R	Oligonucleótido reverso	
OTU	Unidades taxonómicas funcionales	
PD	Papa dextrosa	Medio de cultivo
PMBS	p- mercuribenzene sulfonic acid	
PPI550	Perdida por ignición a 550 °C	
PPI950	Perdida por ignición a 950 °C	
Ppm	partes por millón	
RDP	Proyecto de base de datos ribosomal	Ribosomal Database Project
RNA	Ácido ribonucleico	
SDS	Dodecilsulfato sódico	
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	
SMI	Suelo minero	
TAE	Tris, acetato y EDTA	Solución buffer
TCA	Ácido tricloroacético	
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano	Solución buffer
UTM	Sistema de coordenadas universal	Universal Transverse Mercator, UTM
V	Volts	
16S rDNA	DNA ribosomal 16S	
16S rRNA	ARN ribosomal 16S	
18S rDNA	DNA ribosomal 18S	
18S rRNA	ARN ribosomal 18S	

OTU's analizados del perfil de secuenciación parcial de los genes 16S y 18S rDNA

Los OTU's identificados de los datos del metagenoma realizado por López-Pérez et al. (2015) a los suelos MASE y SMI se presentan en las siguientes tablas, además de la fuente de aislamiento donde fue reportada la especie de la secuencia más cercana, siendo un total de 380 cepas de bacterias y 110 de hongos.

El porcentaje correspondiente a MASE.16S en las tablas, se calculó para el total de secuencias alineadas correspondientes a este suelo (3716), mientras que para SMI.16S corresponde a las 3425 lecturas alineadas a este suelo.

Tabla A.33. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rDNA para el phylum Acidobacteria.

Reino_Bacteria									
Phylum_Acidobacteria									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento
__Holophagae	__iii1-8	__uncultured_bacterium	-	-	JE833857	0.0	19.1	USA: NY	Suelo con elevado CO ₂
__DA023	__uncultured_bacterium	-	-	-	EU881177	0.6	0.0	China	Restauración natural de suelo
__Candidatus_Chloracidobacterium	__uncultured_bacterium	-	-	-	JN409005	1.4	0.0	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__RB41	__uncultured_bacterium	-	-	-	GU359062	1.5	0.0	USA	Sedimentos contaminados
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	HQ598411	0.5	0.3	Alemania	Suelo de bosque
__Candidatus_Chloracidobacterium	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	EU132123	0.5	0.0	Alemania	Suelos de pastizales
__RB41	-	-	-	-	AM935516	1.5	0.0	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	AY921656	0.4	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	FJ479406	0.3	0.6	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Candidatus_Chloracidobacterium	__uncultured_bacterium	-	-	-	HQ114079	0.6	0.0	USA	Sedimentos del subsuelo
__Candidatus_Chloracidobacterium	__uncultured_bacterium	-	-	-	HQ119865	0.9	0.0	USA: California	Pradera
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	HQ598601	0.0	1.3	Alemania	Suelo de bosque
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	FJ415700	0.0	0.8		Suelo alcalino-salino
__DA023	__uncultured_bacterium	-	-	-	AY921849	0.5	0.0	USA: Minnesota	Suelo de granja
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	HQ597735	0.4	0.8	Alemania	Suelo de pradera
-	-	-	-	-	EE019006	0.0	0.2	USA: California	Suelo arcillo-arenoso de campo plantado con tomate
__Holophagae	__iii1-8	__uncultured_bacterium	-	-	JN178541	0.6	0.0	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Holophagae	__iii1-8	__uncultured_bacterium	-	-	AB240251	0.1	0.0	China	Sedimento de río contaminado con nitrobenzeno
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	FJ479562	0.3	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Candidatus_Chloracidobacterium	__uncultured_bacterium	-	-	-	AB637077	0.1	0.0	Japan	Suelo
__Candidatus_Chloracidobacterium	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	JN409239	0.2	0.0	China: Dalian	Rizosfera (suelo- pepino)
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	HQ729781	0.2	0.1	Alemania	Suelo de bosque
__Order_Incertae_Sedis	__Family_Incertae_Sedis	__Bryobacter	-	-	EQ659853	0.1	0.0	Francia	Suelo contaminado por PHA
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	GU444070	0.2	0.0	China	Suelo tratado con paja de algodón
__Holophagae	__43F-1404R	__uncultured_bacterium	-	-	JF776909	0.0	0.2	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__DA023	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	HQ119116	0.0	0.1	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__DA023	__uncultured_bacterium	-	-	-	DQ906786	0.2	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola

__Holophagae	__iii1-8	-	-	-	EF516460	0.0	0.1	Norte de California	Suelo de pastizales
__32-21	__uncultured_Acidobacteria_bacterium	-	-	-	HQ597414	0.0	0.1	Alemania	Suelo de bosque
__11-24	-	-	-	-	HM186391	0.2	0.0	USA	Sedimentos del subsuelo
__Holophagae	__iii1-8	-	-	-	EU589269	0.0	0.1	China	Suelo con cultivo de arroz
__RB41	__uncultured_bacterium	-	-	-	HM062299	0.0	0.1	USA	Suelo agrícola
__DA023	__uncultured_bacterium	-	-	-	GU359092	0.1	0.0	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-pepino)
__DA023	__uncultured_bacterium	-	-	-	HQ118408	0.0	0.1	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__DA023	__uncultured_gamma_proteobacterium	-	-	-	GQ214096	0.0	0.1	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__DA023	__uncultured_bacterium	-	-	-	HQ864177	0.1	0.0		Superficie de suelo
__Candidatus_Solibacter	__uncultured_bacterium	-	-	-	AB240245	0.1	0.0		Suelo

Las secuencias sombreadas en amarillo (10 filas) en la tabla anterior concuerdan con microorganismos reportados en suelos contaminados pertenecientes al phylum Acidobacteria. Este phylum se caracteriza por ser heterótrofas versátiles, sus rasgos genómicos y de cultivo indican el uso de fuentes de carbono que abarcan desde azúcares simples hasta sustratos más complejos tales como hemicelulosa, celulosa y quitina. Parecen ser capaces de reducir nitratos y nitritos, pero no para fijación o desnitrificación de N₂ (Ward et al. 2009).

Tabla A.34. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Actinobacteria.

Reino_Bacteria									
Phylum_Actinobacteria									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificado	%MA SE.16 S	%S MI.1 6S	País	Fuente de aislamiento
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Hamadaea	__Hamadaea_tsunoeensis	-	DQ344631	2.4	0.0	Yunnan	Suelo de bosque
__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	__TM214	__uncultured_bacterium	-	HQ910294	0.0	1.6	Desierto Marte, USA	Suelo de desierto
__MB-A2-108	__uncultured_bacterium	-	-	-	HM186411	0.0	1.8	Arizona, USA	Suelo de mina de plomo-zinc abandonado
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardaceae	__Amycolatopsis	-	-	AY083603	1.4	0.0	Greece: Megas Gialos	Sedimento
__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	__TM214	__uncultured_bacterium	-	GQ263011	0.0	0.5	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Catelliglobospora	__uncultured_actinobacterium	-	JF319176	0.5	0.0	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-planta de Chile)
__MB-A2-108	__uncultured_bacterium	-	-	-	AY093463	0.0	0.5	Nankai near Japan	Sedimentos marinos
__Streptomycetales	__Streptomycetaceae	__Streptomyces	-	-	AB184845	0.0	0.4	Japan: Niigata	Suelo
__Frankiales	__Cryptosporangiaceae	__Cryptosporangium	-	-	HM186342	0.0	0.4	USA	Sedimentos del subsuelo
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__uncultured	-	-	EU289478	0.3	0.0	Islas Salomón	Raíz
__Candidatus_Chloracidobacterium	__uncultured_bacterium	-	-	-	HQ114079	0.6	0.0	USA	Sedimentos del subsuelo
__Micrococcales	__Micrococaceae	__Arthrobacter	__uncultured_soil_bacterium	-	AF423303	0.0	0.6	China	Drenaje de una mina de magnetita
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardaceae	__Pseudonocardia	__uncultured_bacterium	-	HM559046	0.0	0.3	India	Rizosfera
__Frankiales	-	-	-	-	EF018595	0.7	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera imperturbable
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Polymorphospora	__Polymorphosporarubra	-	AB223089	0.3	0.0		Raíces de los mangles
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Actinoplanes	-	-	AB546286	0.3	0.0	USA: Minnesota	Suelo de granja
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Actinaurispora	__Actinaurisporiasimensis	-	FJ478979	0.3	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Phytohabitans	-	-	EU133065	0.0	0.5	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar

__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	-	-	-	EU132756	0.0	0.3	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__Micrococcales	__Intrasporangiaceae	-	-	-	AB637319	0.3	0.0	Japan	Suelo
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Catelliglobospora	__uncultured_actinobacterium	-	AF171700	0.3	0.1	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-planta de Chile)
__Streptomyetales	__Streptomyetaceae	__Streptomyetes	-	-	HQ850405	0.2	0.2	China	Suelo
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Luedemannella	__uncultured_bacterium	-	FJ479416	0.9	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Catelliglobospora	__uncultured_actinobacterium	-	EU132691	0.6	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardiaceae	__Pseudonocardia	-	-	CP002593	0.5	0.0	USA	Lodos industriales
__Micrococcales	__Micrococaceae	__Arthrobacter	__uncultured_bacterium	-	FJ478756	0.2	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Actinoplanes	__Actinoplanes_ferugineus	-	AB037002	0.5	0.0		
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Actinoplanes	-	-	AB047491	0.5	0.0		
__Propionibacteriales	__Nocardioideaceae	__Kribbella	__uncultured_bacterium	-	FJ479456	0.4	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	__TM214	__uncultured_actinobacterium	-	JN409129	0.0	0.2	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-pepino)
__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	FJ479349	0.3	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	__OCS155_marine_group	__uncultured_actinobacterium	-	GQ263243	0.0	0.4	USA	Simulación de sitio con desechos
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Luedemannella	__Luedemannella_helvata	-	AB236959	0.5	0.0		Suelo
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Actinoplanes	-	-	EU132509	0.3	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__Thermoleophilina	__Gaiellales	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	EU132880	0.3	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	__TM214	-	-	JN409129	0.0	0.4	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-pepino)
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardiaceae	__Actinophytocola	-	-	DQ298375	0.0	0.4	India	Rizosfera
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardiaceae	__Pseudonocardia	__uncultured_bacterium	-	FJ478886	0.0	0.2	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	-	-	-	AB548617	0.1	0.0	Japan	Soil
__Propionibacteriales	__Propionibacteriaceae	__Microlunatus	-	-	FJ479564	0.5	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Streptomyetales	__Streptomyetaceae	-	-	-	FJ479078	0.1	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Thermoleophilina	__Solirubrobacterales	__288-2	__uncultured_bacterium	-	EU132054	0.0	0.4	USA: Oklahoma	Suelo de pradera preservada
__Propionibacteriales	__Nocardioideaceae	__Kribbella	-	-	HM368623	0.0	0.2	China	Suelo
__Streptosporangiales	__Thermomonosporaceae	__Actinoallomurus	-	-	AY234561	0.2	0.0	Australia	Suelo de pastizal
__Micrococcales	__Bogoriellaceae	__Georgenia	-	-	EU095256	0.0	0.1		
__Streptomyetales	__Streptomyetaceae	__Streptomyetes	__Streptomyces_uroaeiscabiei	-	HQ441817	0.0	0.2	Noruega	Aislado de patata
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	FJ479324	0.2	0.0	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Thermoleophilina	__Solirubrobacterales	-	-	-	EU132898	0.0	0.1	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__Thermoleophilina	__Solirubrobacterales	__480-2	__uncultured_bacterium	-	GQ264056	0.0	0.1	USA	Simulación de sitio con desechos
__Propionibacteriales	__Nocardioideaceae	__Nocardioideas	-	-	JN178379	0.0	0.1	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Hamadaea	-	-	EU335264	1.5	0.0		Horizonte de suelo
__Propionibacteriales	__Propionibacteriaceae	__Jiangella	-	-	EU741189	0.0	0.4	Costa Rica	Sedimento marino
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Planosporangium	__uncultured_bacterium	-	FJ478825	0.1	0.0	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardiaceae	__Lentzea	-	-	DQ291145	0.1	0.0		
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Actinoplanes	-	-	AB546286	0.3	0.0	Japan	Suelo
__Thermoleophilina	__Gaiellales	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	FJ478617	0.2	0.0	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Streptomyetales	__Streptomyetaceae	__Streptomyetes	-	-	AY029699	0.0	0.3		
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Luedemannella	__Luedemannella_helvata	-	AB236959	0.0	0.3		Suelo
__Streptomyetales	__Streptomyetaceae	__Streptomyetes	-	-	DQ000673	0.0	0.1	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Micrococcales	__Micrococaceae	__Arthrobacter	-	-	HM063926	0.1	0.0	Brasil	Suelo
__Streptomyetales	__Streptomyetaceae	__Streptomyetes	-	-	DQ442549	0.0	0.2		

__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Catelliglobospora	__uncultured_actinobacterium	-	JF319176	0.2	0.0	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-planta de Chile)
__Thermoleophilina	__Solirubrobacterales	__480-2	__uncultured_actinobacterium	-	EF019407	0.2	0.0	NY USA,	Suelo con elevado CO ₂
-	-	-	-	-	EU132723	0.1	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__Micrococcales	__Micrococaceae	__Arthrobacter	__uncultured_bacterium	-	DQ906911	0.2	0.0	Japan	Suelo con cultivo de arroz
__Propionibacteriales	__Nocardiodaceae	__Aeromicrobium	-	-	EF693740	0.0	0.2	Estonia	
__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	__OCS155_marine_group	__uncultured_actinobacterium	-	GQ263243	0.0	0.2	USA	Simulación de sitio con desechos
__Micrococcales	__uncultured	__uncultured_Terrabacter_s.p.	-	-	AY921880	0.2	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Catelliglobospora	__uncultured_actinobacterium	-	AY921740	0.3	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Thermoleophilina	__Gaiellales	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	FJ478760	0.2	0.0	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Planosporangium	__uncultured_bacterium	-	AY922063	0.1	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Thermoleophilina	__Solirubrobacterales	__480-2	__uncultured_Rubrobacteriaceae_bacterium	-	EF018727	0.2	0.0	NY USA	Suelo con elevado CO ₂
__Streptomycetales	__Streptomycetaceae	__Streptomyces	__Streptomyces_phaeochromogenes	-	EU594472	0.0	0.1		
__Micrococcales	__Intrasporangiaceae	__Tetrasphaera	-	-	AF125092	0.1	0.0		
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Catelliglobospora	__uncultured_actinobacterium	-	AY921739	0.1	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Actinoplanes	-	-	JN177915	0.2	0.0	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Corynebacteriales	__Mycobacteriaceae	__Mycobacterium	-	-	AJ748836	0.1	0.1	Finlandia	Agua
__Micrococcales	__Intrasporangiaceae	__Terrabacter	-	-	AF408996	0.1	0.0		
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardaceae	__Pseudonocardia	__uncultured_Pseudonocardia_sp.	-	AM935471	0.0	0.2	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Frankiales	__Geodermatophilaceae	__Blastococcus	__uncultured_Blastococcus.sp.	-	AM936376	0.1	0.3	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Streptosporangiales	__Streptosporangiaceae	__Streptosporangium	-	-	CP001814	0.2	0.0		Suelo
__Kineosporiales	__Kineosporiaceae	__Angustibacter	-	-	AB512285	0.0	0.2		
__Thermoleophilina	__Solirubrobacterales	__480-2	-	-	EU979046	0.0	0.1	USA	Sedimentos del subsuelo
__Acidimicrobia	__Acidimicrobiales	__OCS155_marine_group	__uncultured_bacterium	-	GQ263227	0.0	0.1	USA	Simulación de sitio con desechos
__Streptomycetales	__Streptomycetaceae	__Streptomyces	-	-	DQ008605	0.0	0.1	China	Suelo alcalino-salino contaminado con petróleo
__Micrococcales	__Micrococaceae	__Arthrobacter	__uncultured_soil_bacterium	-	DQ297991	0.1	0.0	USA	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Streptosporangiales	__Thermomonosporaceae	__Actinomadura	-	-	AB557595	0.0	0.1		Miel de abeja
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Actinoplanes	-	-	FJ790646	0.0	0.1	Italia	
__Thermoleophilina	__Gaiellales	__Gaiellaceae	__Gaiella	__uncultured_bacterium	FN811242	0.0	0.1	China	Campo de petróleo
__Micrococcales	__Intrasporangiaceae	__Tetrasphaera	-	-	AF125092	0.1	0.0		
__Propionibacteriales	__Nocardiodaceae	__Marmoricola	-	-	EU289436	0.0	0.2	China	Corteza del tallo
__Streptomycetales	__Streptomycetaceae	__Streptomyces	-	-	AB666472	0.0	0.1		Suelo
__Thermoleophilina	-	-	-	-	DQ297985	0.1	0.0	USA	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardaceae	-	-	-	EU274339	0.0	0.2	China	Soil
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardaceae	__Amycolatopsis	-	-	FJ830616	0.1	0.0		Plantas medicinales
__Pseudonocardiales	__Pseudonocardaceae	-	-	-	HM224440	0.0	0.1	China	Roca
__Propionibacteriales	__Nocardiodaceae	__Marmoricola	-	-	AY922162	0.1	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Streptosporangiales	__Thermomonosporaceae	__Actinomadura	-	-	JN989286	0.0	0.1	USA: Arizona	Suelo
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	-	-	-	AY922063	0.1	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Micromonosporales	__Micromonosporaceae	__Micromonospora	-	-	AY561829	0.1	0.0		Sedimento de mangle

Las secuencias sombreadas en amarillo (15 filas) en la tabla anterior concuerdan con microorganismos reportados en suelos contaminados pertenecientes al phylum Actinobacteria. Ventura et al. (2007) reporta que este phylum se caracteriza por ser Gram-positiva con un alto contenido de G+C en su DNA exhibiendo diversas propiedades fisiológicas y metabólicas como la producción de enzimas extracelulares y la formación de una amplia variedad de metabolitos secundarios, de los cuales muchos son potentes antibióticos. Además, desempeña un papel crucial en el reciclaje de biomateriales refractarios por la descomposición y formación de humus, lo que le proporciona características potenciales para biorremediación de suelos.

Tabla A.35. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Armatimonadetes.

Reino_Bacteria									
Phylum_Armatimonadetes									
Clase	Orden	Familia	Gen ero	Espe cie	Identifi cador	%MASE. 16S	%SML. 16S	Pais	Fuente de aislamiento
__uncultured_ba cterium	-	-	-	-	GQ3969 36	0.0	0.8	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Chthonomona detes	__Chthonomon adales	__uncultured_ba cterium	-	-	EU13499 4	0.1	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__uncultured_ba cterium	-	-	-	-	GQ2643 78	0.1	0.0	USA	Simulación de sitio con desechos

Tabla A.36. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el Phylum Bacteroidetes.

Reino_Bacteria									
Phylum_Bacteroidetes									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identifi cador	%MAS E.16S	%SML. 16S	Pais	Fuente de aislamiento
__Sphingob acteria	__Sphingoba cteriales	__Chitinoph agaceae	__Flavisoli bacter	-	JF4290 82	1.6	0.0	China	Suelo de la rizosfera rica en potasio
__Sphingob acteria	__Sphingoba cteriales	__Chitinoph agaceae	__uncultur ed	-	FJ9465 55	0.1	0.1	Noruega	deshielo ártico
__Cytophag ia	__Cytophaga les	__Cytophag aceae	__Flexibac ter	-	GQ214 104	0.1	0.0	China	Sedimentos que producen un depósito amarillo
__Sphingob acteria	__Sphingoba cteriales	__Chitinoph agaceae	__Flavisoli bacter	__uncultured_b acterium	AB2403 57	0.2	0.0	USA: Texas, San Antonio	Sitios urbanos
__Cytophag ia	__Cytophaga les	__Cytophag aceae	__Flexibac ter	-	HM186 197	0.0	0.1	USA	Sedimentos del subsuelo
__Sphingob acteria	__Sphingoba cteriales	__Chitinoph agaceae	__Ferrugin ibacter	__uncultured_b acterium	EF5403 93	0.0	0.1	NY USA,	Suelo con elevado CO ₂
__Cytophag ia	__Cytophaga les	__Cytophag aceae	__Flexibac ter	__uncultured_b acterium	FJ4786 65	0.1	0.0	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Sphingob acteria	__Sphingoba cteriales	__Chitinoph agaceae	__Chitinop haga	__Chitinophag a_filiformis	AB0780 49	0.2	0.0		
__Sphingob acteria	__Sphingoba cteriales	__Chitinoph agaceae	__uncultur ed	__uncultured_b acterium	EU1336 95	0.3	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__Cytophag ia	__Cytophaga les	__Cytophag aceae	__Flexibac ter	__uncultured_b acterium	JF7769 33	0.1	0.0	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Sphingob acteria	__Sphingoba cteriales	__Chitinoph agaceae	__Niastell a	-	AB5969 61	0.1	0.0	Japan	Lodos activados
__Sphingob acteria	__Sphingoba cteriales	__Chitinoph agaceae	__uncultur ed	__uncultured_b acterium	GQ495 413	0.2	0.0	Islandia	Flujo de lava

El Phylum Bacteroidetes se ha encontrado en suelo, océanos y agua fresca. Son considerados especialistas para la degradación de moléculas de alto peso molecular por ejemplo materia orgánica, proteínas y carbohidratos. La reciente secuenciación de genomas Bacteroidetes confirman la presencia de numerosas enzimas activas, sobre carbohidratos (Thomas et al. 2011). Las secuencias sombreadas en amarillo en la tabla anterior reportan microorganismos en condiciones extremas por lo que pueden ser candidatos a biorremediación de sitios contaminados.

Tabla A.37. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Candidate_division_OD1.

Reino_Bacteria									
Phylum_Candidate_division_OD1									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento
-	-	-	-	-	FQ659415	0.0	0.1	Francia	Suelo contaminado por PHA

No se cuenta hasta el momento con suficiente información para caracterizar el Phylum Candidate_division_OD1 sin embargo sus fuentes de aislamiento indican que posiblemente es un microorganismo resistente a la contaminación.

Tabla A.38. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Candidate_division_TM7.

Reino_Bacteria										
Phylum_Candidate_division_TM7										
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	HQ119656	0.6	0.0	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	HQ119510	1.4	0.0	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto	
__uncultured_candidate_division_TM7_bacterium	-	-	-	-	AM935434	0.7	0.1	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	EU135398	0.0	0.3	USA: Oklahoma	Suelo de pradera imperturbable	
__uncultured_soil_bacterium	-	-	-	-	DQ378237	0.0	0.6	Romania	Suelo contaminado con aceite	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	HQ264092	0.0	0.2		Espuma de lodos activados	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	AF443583	0.1	0.0		Bagaso en descomposición	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	JF935216	0.0	0.1	Papúa Nueva Guinea	Sedimentos de aguas termales	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	AF443588	0.1	0.0	USA: Nuevo Mexico	Suelo de matorral	
-	-	-	-	-	GU214151	0.3	0.0	Canada	Muestra tomada alrededor de una maquina de papel	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	JN038684	0.2	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada	
-	-	-	-	-	JN656764	0.1	0.0	USA: Colorado	Prado seco	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	EU800550	0.3	0.0	USA	Bahía	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	EF688335	0.1	0.0	Japan	Suelo	
-	-	-	-	-	JN217154	0.0	0.1		Suelo contaminado con hidrocarburos	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	DQ404638	0.0	0.1	USA	Sedimento contaminado	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	HQ190372	0.0	0.3	Estonia		
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	GU444078	0.1	0.0	China	Suelo con paja de algodón	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	HQ860485	0.2	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	AB510998	0.0	0.1	Japan	Suelo	
__uncultured_candidate_division_TM7_bacterium	-	-	-	-	AM936232	0.0	0.1	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos	
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	JQ287279	0.0	0.1			

El phylum Candidate_division_TM7 fue aislado por sucesivas rondas de enriquecimiento en medios de laboratorio. Las colonias de bacterias de este phylum se caracterizan por formar filamentos de

entre 20 a 200 micras de longitud en placas de agar con lo que podría crear biopelículas junto con otros phylum con potencial biotecnológico (Soro et al., 2014).

Tabla A.39. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Candidate_division_WS3.

Reino_Bacteria									
Phylum_Candidate_division_WS3									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SML.16S	Pais	Fuente de aislamiento
__uncultured_bacterium	-	-	-	-	EU131924	0.1	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada

Tabla A.40. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Chloroflexi.

Reino_Bacteria									
Phylum_Chloroflexi									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SML.16S	Pais	Fuente de aislamiento
__Gitt-GS-136	__uncultured_bacterium	-	-	-	GQ262975	0.0	2.2	China	Roca caliza
__P2-11E	__uncultured_bacterium	-	-	-	HM186231	0.0	2.3	Oklahoma, USA	Suelo de pradera preservada
__TK10	__uncultured_bacterium	-	-	-	EF020001	0.4	0.0	NY USA, Rhinelander WI free-air CO2 and O3 enrichment (FACE)	Suelo con elevado CO2
__Ktedonobacteria	__JG30-KF-AS9	__uncultured_bacterium	-	-	AB672175	0.3	0.0	Japan: Niigata	Suelo de un campo de arroz
__TK10	__uncultured_Chloroflexi_bacterium	-	-	-	AY395418	0.3	0.0		Suelo con pasto
__P2-11E	__uncultured_bacterium	-	-	-	HM186198	0.0	0.2	USA	Sedimentos del subsuelo
__KD4-96	__uncultured_bacterium	-	-	-	FJ479391	0.2	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Gitt-GS-136	__uncultured_bacterium	-	-	-	GQ263114	0.0	0.3	USA	Simulación de sitio con desechos
__P2-11E	__uncultured_bacterium	-	-	-	EF018686	0.0	0.6	NY USA, Rhinelander WI free-air CO2 and O3 enrichment (FACE)	Rizosfera bajo condiciones ambientales de CO2
__Anaerolineae	__Anaerolineales	__Anaerolineaceae	__uncultured	-	FJ478597	1.1	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__S085	__uncultured_bacterium	-	-	-	EU755078	0.0	0.2		Suelo contaminado con alquitrán de hulla
__P2-11E	__uncultured_bacterium	-	-	-	HM186231	0.0	0.5	USA	Sedimentos del subsuelo
__Chloroflexales	__Chloroflexaceae	__Roseiflexus	__uncultured_bacterium	-	EU133973	0.7	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__S085	__uncultured_bacterium	-	-	-	EU134192	0.1	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__KD4-96	-	-	-	-	EU132334	0.0	0.1	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__TK10	__uncultured_Chloroflexi_bacterium	-	-	-	JF319167	0.2	0.0	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-planta de chile)
__Gitt-GS-136	__uncultured_bacterium	-	-	-	JN178462	0.0	0.3	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Gitt-GS-136	__uncultured_bacterium	-	-	-	GQ263114	0.0	0.3	USA	Simulación de sitio con desechos
__P2-11E	__uncultured_bacterium	-	-	-	EF018686	0.0	0.3	NY USA	Suelo con elevado CO2
__Chloroflexales	__Chloroflexaceae	__Roseiflexus	__uncultured_bacterium	-	EU133973	0.1	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__TK10	__uncultured_bacterium	-	-	-	EU134243	0.1	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__TK10	-	-	-	-	EU134192	0.2	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__KD4-96	__uncultured_Anaerolineae_bacterium	-	-	-	AM935819	0.0	0.1	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos

__Ktedonobacteria	__C0119	__uncultured_bacterium	-	-	EF018867	0.2	0.0	NY USA,	Suelo con elevado CO ₂
__Anaerolineae	__Anaerolineales	__Anaerolineaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	FJ415693	0.2	0.0		Suelo de campo de soja
__Gitt-GS-136	__uncultured_bacterium	-	-	-	JN178462	0.1	0.0	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__P2-11E	__uncultured_bacterium	-	-	-	HM186770	0.1	0.0	USA	Sedimentos del subsuelo
__S085	__uncultured_bacterium	-	-	-	AF507693	0.0	0.1	USA: Arizona	Suelo de bosque

Chloroflexi es uno de los más grandes phyla que contienen bacterias con diversas características metabólicas. Este phylum incluye seis clases, Chloroflexi, Anaerolineae, Caldilineae, Ktedonobacteria, Dehalococcoidetia y Thermomicrobia. La morfología filamentosa es la característica típica de la mayoría de las clases: los organismos pertenecían a las clases Chloroflexi, Anaerolineae, Caldilineae y Ktedonobacteria son todas bacterias filamentosas multicelulares. De estas seis clases, solo la clase Chloroflexi consiste en bacterias fototróficas (Hanada, 2014).

Tabla A.41. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Cyanobacteria.

Reino_Bacteria									
Phylum_Cyanobacteria									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento
__Chloroplast	-	-	-	-	HQ664642	0.0	0.1	-	-

Tabla A.42. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Firmicutes.

Reino_Bacteria									
Phylum_Firmicutes									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento
__Erysipelotrichi	__Erysipelotrichales	__Erysipelotrichaceae	__Asterolepsma	__uncultured_bacterium	FJ984650	0.0	0.2		Micorrizas arbusculares
__Bacilli	__Bacillales	__Bacillaceae	__Bacillus	-	AJ316310	0.2	0.0	Alemania	Mural
__Erysipelotrichi	__Erysipelotrichales	__Erysipelotrichaceae	__Asterolepsma	__uncultured_bacterium	FJ984646	0.0	0.1		Micorrizas arbusculares

La amplitud de la cobertura genómica de los Firmicutes refleja la variedad de nichos ecológicos habitados por estos organismos. La capacidad de formar esporas le permite desafiar aspectos ambientales, tales como el calor, desecación, presencia de disolventes orgánicos, agentes oxidantes, irradiación UV, entre otros para sobrevivir y colonizar una amplia variedad de diversa hábitats (Galperin, 2013).

Tabla A.43. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Gemmatimonadetes.

Reino_Bacteria									
----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Phylum_Gemmatimonadetes									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MA SE.16 S	%S MI.1 6S	Pais	Fuente de aislamiento
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	EF516702	0.0	5.2	Norte de California	Suelo de pastizales
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	-	-	EU134844	4.1	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	EU134801	2.0	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de pradera preservado
__S0134_terrestrial_group	__uncultured_bacterium	-	-	-	HQ397505	0.0	1.3	India	Suelo agrícola
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__Gemmatimonas	__uncultured_bacterium	-	HQ397545	1.2	0.0	India	Suelo agrícola
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	-	-	AM935118	0.0	0.5	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__S0134_terrestrial_group	__uncultured_bacterium	-	-	-	DQ129378	0.0	0.7	USA: Texas, San Antonio	Sitios urbanos
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	EF516388	1.3	0.0	USA: California	Suelo de pastizales
__S0134_terrestrial_group	__uncultured_bacterium	-	-	-	FJ444732	0.0	0.2	Oklahoma, USA	Imperturbada pradera de hierba alta
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__Gemmatimonas	__uncultured_bacterium	-	EF020016	0.2	0.0	NY USA,	Rizosfera bajo condiciones ambientales de CO ₂
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__Gemmatimonas	__uncultured_Gemmatimonadetes_bacterium	-	AY922130	0.2	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	-	-	GQ472385	0.1	0.0	China	Sedimentos de lago
__AT425-EubC11_terrestrial_group	__uncultured_Gemmatimonadetes_bacterium	-	-	-	AY921705	0.2	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	-	-	-	EU134850	0.2	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera preservado
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	-	-	EF688378	0.3	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	__uncultured_Gemmatimonadetes_bacterium	-	FM209330	0.0	0.2	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-pepino)
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__Gemmatimonas	-	-	EF018787	0.2	0.0	NY USA,	Suelo con elevado CO ₂
__S0134_terrestrial_group	__uncultured_Gemmatimonadetes_bacterium	-	-	-	AY921664	0.0	0.1	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	__uncultured_Gemmatimonadetes_bacterium	-	AY921712	0.2	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	__uncultured_Gemmatimonadetes_bacterium	-	FJ444658	0.0	0.3	China	Rizosfera (suelo-planta de algodón)
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__Gemmatimonas	__uncultured_Gemmatimonadetes_bacterium	-	JN409187	0.2	0.0	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-pepino)
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	__uncultured_Gemmatimonadetes_bacterium	-	JN409257	0.0	0.1	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-pepino)
__S0134_terrestrial_group	__uncultured_bacterium	-	-	-	HQ119898	0.0	0.1	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	-	DQ125607	0.0	0.1	USA	Suelo contaminado con uranio
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	-	-	-	JN178136	0.1	0.0	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Gemmatimonadales	__Gemmatimonadaceae	__uncultured	-	-	HQ674929	0.1	0.0	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-pepino)

A pesar de su frecuencia y abundancia persistente en suelos, solamente un único representante de este phylum se ha aislado y caracterizado, *Gemmatimonas aurantiaca strain T-27*, un acumulador de polifosfato aislado de aguas residuales. El aislamiento de otras cuatro cepas se ha informado, sin embargo, ninguna de estas cepas se ha caracterizado hasta la fecha. El Phylum Gemmatimonadetes se ha encontrado en mayor proporción en suelos áridos, lo que sugiere una adaptación a ambientes de baja humedad (DeBruyn et al. 2011).

Tabla A.44. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Nitrospirae.

Reino_Bacteria									
Phylum_Nitrospirae									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SML.16S	País	Fuente de aislamiento
__Nitrospira	__Nitrospirales	__Nitrospiraceae	__Nitrospira	__uncultured_bacterium	AB619706	0.0	0.3	Japón	Lodos del sistema de oxidación de N ₂ O
__Nitrospira	__Nitrospirales	__Nitrospiraceae	__Nitrospira	-	JQ311906	0.0	0.4	USA	Suelo

Tabla A.45. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Planctomycetes.

Reino_Bacteria									
Phylum_Planctomycetes									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MAS E.16S	%SML.16S	País	Fuente de aislamiento
__Phycisphaerae	__WD2101_s oil_group	__uncultured_bacterium	-	-	FJ479202	0.3	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Phycisphaerae	__Phycisphaerales	__Phycisphaeraeaceae	__SM1A02	__uncultured_bacterium	JQ311880	0.0	0.2	Rusia: Avachinsky	Suelo de volcán
__Phycisphaerae	__WD2101_s oil_group	__uncultured_bacterium	-	-	EU135227	0.2	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__Phycisphaerae	__WD2101_s oil_group	__uncultured_bacterium	-	-	FJ479203	0.1	0.0	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Phycisphaerae	__WD2101_s oil_group	__uncultured_bacterium	-	-	JN178472	0.1	0.0	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Phycisphaerae	__WD2101_s oil_group	__uncultured_bacterium	-	-	GQ263727	0.1	0.0	USA	Simulación de sitio con desechos
__Phycisphaerae	__WD2101_s oil_group	__uncultured_bacterium	-	-	EF516953	0.0	0.1	USA: Norte de California	Suelo de pastizales
__Phycisphaerae	__WD2101_s oil_group	__uncultured_bacterium	-	-	FJ478985	0.0	0.1	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera

Tabla A.46. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Proteobacteria.

Reino_Bacteria									
Phylum_Proteobacteria									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MA SE.16S	%S ML.16S	País	Fuente de aislamiento
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Bradyrhizobiacae	__Bradyrhizobium	-	FJ71210	3.8	5.4	Montañas al este del mar mediterráneo	Sedimentos de un volcán submarino activo
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	FJ478925	6.6	2.5	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Betaproteobacteria	__Burkholderiales	__Comamonadaceae	__Ramilibacter	__uncultured_bacterium	AB608668	2.4	0.2	Japan: Tokyo	Suelo con cultivo de arroz
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	__uncultured_bacterium	-	AM935958	1.0	0.0	Oklahoma, USA	Suelo de pradera preservado
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Xanthomonadaceae	__Lysobacter	-	DQ249997	0.0	1.0	USA:Kartchner Caverns, AZ	Superficie de roca de una cueva de piedra caliza
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__wr0007	__uncultured_soil_bacterium	-	AB245349	1.4	1.8	Korea	Suelo del campo ginseng
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__uncultured	-	DQ125533	1.0	1.3	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__I-10	__uncultured_bacterium	-	FJ478966	0.0	0.9	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera sin disturbios
__Alphaproteobacteria	__Sphingomonadales	__Erythrobacteraceae	__Altererythrobaacter	__uncultured_bacterium	AJ863370	0.5	0.4	USA: Texas, San Antonio	Sitios urbanos
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__Pseudolabrys	__uncultured_bacterium	HQ120982	0.3	2.4	USA: California	Campo plantado con tomates

__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	__uncultured_bacterium	-	EU133479	0.3	0.3	Oklahoma, USA	Suelo de una pradera preservada
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__KF-JG30-B3	__uncultured_bacterium	-	FJ479506	0.2	0.6	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Betaproteobacteria	__Nitrosomonadales	__Nitrosomonadales	__uncultured	__uncultured_soil_bacterium	EF540370	1.6	0.6	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Bradyrhizobiales	__Bosea	-	JF824802	0.8	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Sinobacteraceae	__uncultured	-	EF019700	1.2	0.6	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Alphaproteobacteria	__Caulobacterales	__Caulobacteraceae	__Phenylobacterium	-	AY328814	0.9	0.2	Australia	Suelo de pastizal
__Betaproteobacteria	__Burkholderiales	__Comamonadaceae	__Variovorax	-	AB513921	0.3	0.0		Cultivo de suelo que degrada herbicida
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Hyphomicrobiales	__Hyphomicrobium	__uncultured_bacterium	JN178192	0.1	0.2	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Sinobacteraceae	__uncultured	-	AY921861	0.0	0.4	USA: Minnesota	Suelo de granja
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Xanthomonadales	__Rhodanobacter	__Frateuria	AB682159	0.8	0.0	China	Suelo de bosque
__Gamma proteobacteria	__Chromatiales	__Ectothiorhodospiraceae	__Thioalkalispira	__uncultured_Thiorhodospira_sp.	JN802218	0.0	0.5	China	Biofilm
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	-	-	-	FJ478956	0.0	0.7	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Betaproteobacteria	__Nitrosomonadales	__Nitrosomonadales	__uncultured	__uncultured_bacterium	JN177827	0.7	3.0	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Sinobacteraceae	__Steroidobacter	__uncultured_bacterium	FJ478755	1.6	1.7	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Hyphomicrobiales	__Devosia	__uncultured_bacterium	HQ120534	0.0	1.1	USA: California	Campo plantado con tomates
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__KCM-B-60	__uncultured_bacterium	-	EU133548	0.0	0.2	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__Gamma proteobacteria	__Pseudomonadales	-	-	-	HQ121173	0.6	0.0	USA: California	Campo plantado con tomates
__Alphaproteobacteria	__Caulobacterales	__Caulobacteraceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	HQ118983	0.8	0.1	USA: California	Suelo arcilloso de bosque de Eucalipto
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	-	-	-	EF019006	0.0	0.3	NY USA	Rizosfera bajo condiciones ambientales de CO2
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	__uncultured_bacterium	-	JN178090	0.2	0.0	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Betaproteobacteria	__Nitrosomonadales	__Nitrosomonadales	__uncultured	__uncultured_bacterium	GQ339147	0.0	0.2	USA	Simulación de sitio con desechos
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Sorangiineae	__Sandaracinaceae	__uncultured_soil_bacterium	FQ659210	0.2	0.0	China	Rizosfera (suelo-planta de algodón)
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	GQ500835	0.0	0.5	USA	Sedimentos de cueva con piedra caliza
__TA18	-	-	-	-	EF018831	0.2	0.0	NY USA,	Rizosfera bajo condiciones ambientales de CO2
__Betaproteobacteria	__SC-I-84	__uncultured_bacterium	-	-	EF516531	0.3	0.0	USA: California	Suelo de pastizales
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__Dongia	__uncultured_bacterium	EU589252	0.7	0.0	China	Suelo con cultivo de arroz
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__AKYG1088	-	-	FJ478629	0.6	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__KCM-B-60	__uncultured_bacterium	-	GQ500722	0.0	0.2	USA	Sedimentos clásticos de arena
__Alphaproteobacteria	__Rickettsiales	__SM2D12	__uncultured_bacterium	-	EU133268	0.0	0.3	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
-	-	-	-	-	FR675944	0.0	0.5	Italy	Arena Calamita ferromagnética
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Rhodobiaceae	__Rhodobium	__uncultured_bacterium	EU133318	0.0	0.5	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar

-	-	-	-	-	EU13 2765	0.2	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera sin perturbar
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Hyphomicrobiales	__Pedomicrobiom	__uncultured_alpha __proteobacterium	FM25 3668	0.1	0.4	Polonia	Biofilm
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__uncultured	-	EU26 6779	0.0	0.2	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Sorangiineae	__Phaselicytidaceae	__Phaselicystis	FQ65 8700	0.1	0.0	Francia	Suelo contaminado por PHA
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__wr0007	__uncultured_alpha __proteobacterium	-	AM93 5283	0.2	0.2	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Gammaproteobacteria	__Xanthomonadales	__Xanthomonadales	__Lysobacter	__uncultured_bacterium	AY18 6075	0.3	0.1	USA: Nuevo Mexico	Deposito de ferromanganeso
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__Pseudolabrys	__uncultured_bacterium	FJ93 6731	0.2	0.0	Rusia: Avachinsky	Lodo de volcan
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Family_Incertae_Sedis	__Rhizomicrobiom	-	AY23 4503	0.1	0.0		
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Nannocystineae	__Haliangiaceae	__Haliangium	HQ39 7519	0.1	0.0	India	Suelo agrícola
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	__uncultured_bacterium	-	EF01 9851	0.0	0.2	NY USA	Rizosfera bajo condiciones ambientales de CO ₂
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	-	-	-	FJ47 9181	0.2	0.0	Oklahoma, USA	Imperturbable pradera de hierba alta
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Sorangiineae	__uncultured	__uncultured_bacterium	EU13 4470	0.2	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera preservado
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Family_Incertae_Sedis	__Nordella	__uncultured_bacterium	EF01 9869	0.0	0.1	NY USA	Rizosfera bajo condiciones ambientales de CO ₂
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	HQ39 7503	0.0	0.1	India	Suelo agrícola
__Deltaproteobacteria	__Desulfobacterales	__Nitrospiraceae	__Candidatus_Entotheonella	__uncultured_bacterium	EU13 4805	0.2	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera preservado
__Betaproteobacteria	__Nitrospira	__Nitrospira	__Nitrospira	__uncultured_amm __oxidizing_bacterium	GU16 9055	1.2	0.0	Portugal	Agua sin sustancias húmicas
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__uncultured	__uncultured_Acet __obacteraceae_bacterium	AM93 5803	0.0	0.1	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Alphaproteobacteria	__Sphingomonadales	__Sphingomonadales	__Sphingomonas	-	JN86 9101	0.1	0.0	USA	Lago húmico
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Hyphomicrobiales	__Rhodoplanes	__uncultured_bacterium	AY92 1778	0.2	0.1	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	JN11 3077	0.0	0.1	USA	Lago
__Betaproteobacteria	__Burkholderiales	__Comamonadaceae	-	-	JF41 7758	0.2	0.0	Norte de California	Suelo de pastizales
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Methylobacteriaceae	__Microvirga	-	AM99 0457	0.5	0.5	USA: Washington	Suelos contaminados
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Hyphomicrobiales	__Rhodoplanes	-	HQ11 9628	0.0	0.2	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__TA18	-	-	-	-	JF83 3502	0.1	0.0	NY USA,	Suelo con elevado CO ₂
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__Dongia	__uncultured_bacterium	EF01 9306	0.1	0.0	NY USA,	Suelo con elevado CO ₂
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__Skermanella	__Azospirillum	AM74 3175	0.2	0.1		Enriquecimiento de N
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	-	-	GU98 3307	0.0	0.5		Rizosfera
__Betaproteobacteria	__Nitrospira	__Nitrospira	__uncultured	-	JN03 7974	0.1	0.0		Suelo alcalino-salino
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__KF-JG30-B3	__uncultured_bacterium	-	JQ31 1833	0.0	0.2	USA	Suelo
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Sorangiineae	__uncultured	__uncultured_bacterium	EU49 1164	0.1	0.1		Fondo marino
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	HQ11 8320	0.0	0.1	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__Gammaproteobacteria	__Xanthomonadales	-	-	-	FR66 7176	0.3	0.0	España: Tarragona, Santa Barbara	Suelo agrícola

__Betaproteobacteria	__SC-l-84	__uncultured_bacterium	-	-	HQ640586	0.2	0.0	Norte de California	Suelo de pastizales
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Family_Incertae_Sedis	__Rhizomicrobium	__uncultured_bacterium	HQ190312	0.2	0.1		Suelo
__Alphaproteobacteria	__Caulobacterales	__Caulobacteraceae	__Phenyllobacterium	__uncultured_bacterium	FQ659285	0.1	0.0	Francia	Suelo contaminado por PHA
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Rhizobiaceae	__Rhizobium	-	GQ397031	0.0	0.1		
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Sorangineae	__Sandaracinaceae	__uncultured_soil_bacterium	FQ658979	0.0	0.3	Francia	Suelo contaminado por PHA
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Sorangineae	__Sandaracinaceae	__uncultured_soil_bacterium	FQ659000	0.1	0.0	Francia	Suelo contaminado por PHA
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Xanthomonadales	__Rhodanobacter	__uncultured_bacterium	DQ125888	0.1	0.0	USA	Suelo contaminado con uranio
__Betaproteobacteria	__TRA3-20	__uncultured_bacterium	-	-	AY921995	0.1	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Nannocystineae	__Haliangiaceae	__Haliangium	AY921675	0.1	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	HM069081	0.2	0.0	NY USA	Suelo con elevado CO ₂
__Alphaproteobacteria	__Sphingomonadales	__JG34-KF-161	-	-	HM565050	0.0	0.4		Concreto
__Alphaproteobacteria	__Rickettsiales	__TK34	-	-	JN178342	0.0	0.2	México	Suelo salino-alcálico del antiguo Lago de Texcoco
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	__uncultured_bacterium	-	GU983309	0.2	0.0		Rizosfera
-	-	-	-	-	EF018500	0.0	0.1	NY USA	Suelo con elevado CO ₂
__Betaproteobacteria	__SC-l-84	__uncultured_bacterium	-	-	EF020270	0.2	0.0	NY USA	Suelo con elevado CO ₂
__Betaproteobacteria	__Nitrosomonadales	__Nitrosomonadales	__uncultured	-	EF018545	0.1	0.0	NY USA	Suelo con elevado CO ₂
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__uncultured	__uncultured_Rhodospirillaceae_bacterium	AM935394	0.0	0.1	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Rhizobiaceae	__Rhizobium	-	FJ595997	0.3	0.0	España	Rizosfera
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Xanthomonadales	__Xanthomonas	__uncultured_bacterium	HQ190467	0.2	0.0	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Hyphomicrobiales	__Pedomicrobium	__uncultured_bacterium	JF776953	0.1	0.1	Francia	Digestor anaerobio de aguas residuales
__Betaproteobacteria	__Burkholderiales	__Oxalobacteraceae	__Janthinobacterium	__uncultured_bacterium	AM991168	0.1	0.1	Suiza	Agua de manantial
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Nannocystineae	__Haliangiaceae	__Haliangium	FJ478973	0.2	0.0	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	-	-	HQ118932	0.1	0.0	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__Pseudolabrys	__uncultured_bacterium	HQ119644	0.3	0.0	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Cystobacterineae	__Cystobacteraceae	__Cystobacter	AB218222	0.2	0.0		
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Hyphomicrobiales	__Rhodomicrobium	__uncultured_bacterium	EU753663	0.0	0.1	España	Agua Dulce
__Alphaproteobacteria	__Sphingomonadales	__Sphingomonadales	__Sphingomonas	-	AF395032	0.0	0.1		Lago
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Sinobacteraceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	AY922064	0.1	0.2	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Betaproteobacteria	__Burkholderiales	__Comamonadaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	DQ327690	0.1	0.1		Biofilm
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	-	-	GU172176	0.1	0.0	Alemania	Suelo de bosque
__Betaproteobacteria	__TRA3-20	__uncultured_Aligenaceae_bacterium	-	-	AM935974	0.1	0.0	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Methylobacteriaceae	__Microvirga	-	FR687476	0.1	0.0		Suelo rojo
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__uncultured	-	FJ868764	0.0	0.2	Estonia	

-	-	-	-	-	HM066638	0.1	0.1	USA: Texas	
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Sinobacteraceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	GQ264145	0.0	0.1	USA	Simulación de sitio con desechos
__Alphaproteobacteria	__Caulobacterales	__Caulobacteraceae	__Phenylobacterium	-	DQ129331	0.0	0.2	USA: Texas, San Antonio	Sitios urbanos
-	-	-	-	-	EF020107	0.2	0.0	NY USA	Suelo con elevado CO ₂
__Betaproteobacteria	__SC-I-84	__uncultured_beta_proteobacterium	-	-	AY921788	0.1	0.0	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Bradyrhizobiacae	__uncultured	__uncultured_bacterium	GQ500847	0.2	0.0	Antarctica	Pilares de musgos acuáticos
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Xanthomonadales	__Thermomonas	__uncultured_bacterium	HQ190467	0.1	0.0	China	Campo de petróleo
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__uncultured	-	AY921875	0.0	0.1	USA: Minnesota	Suelo agrícola
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Bradyrhizobiacae	__Bradyrhizobium	-	AY039014	0.0	0.1	España	Suelos alcalinos
__Alphaproteobacteria	__Sphingomonadales	__Erythrobacteraceae	__Altererythrobaacter	__uncultured_bacterium	EF516627	0.0	0.2	Norte de California	Suelo de pastizales
__Alphaproteobacteria	__Rickettsiales	__uncultured	-	-	GQ480088	0.2	0.0		
__Betaproteobacteria	__SC-I-84	__uncultured_bacterium	-	-	HQ118386	0.0	0.2	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__Deltaproteobacteria	__GR-WP33-30	__uncultured_bacterium	-	-	GQ262941	0.0	0.1	USA	Simulación de sitio con desechos
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Sorangiineae	__uncultured	__uncultured_Polyangiaceae_bacterium	AM936555	0.0	0.1	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Alphaproteobacteria	__Caulobacterales	__Caulobacteraceae	__Caulobacter	__uncultured_bacterium	FJ592571	0.1	0.0	India	Sedimentos de carbonato
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Sinobacteraceae	__Steroidobacter	__uncultured_bacterium	AY493939	0.0	0.1		Suelo agrícola desierto
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	__uncultured_bacterium	-	EU133375	0.1	0.0	USA: Oklahoma	Suelo de pradera preservado
__Alphaproteobacteria	__Caulobacterales	__Caulobacteraceae	__Phenylobacterium	-	AB179499	0.1	0.0		Roca sedimentaria
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Methylobacteriaceae	-	-	HQ119278	0.1	0.0	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__DA111	__uncultured_alpha_proteobacterium	-	FM209092	0.0	0.1	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Alphaproteobacteria	__Rhodospirillales	__Rhodospirillaceae	__Skermanella	__uncultured_bacterium	AB240277	0.1	0.0		Mucosa del intestino humano
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Sinobacteraceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	FJ478844	0.1	0.1	Oklahoma, USA	5 cm superficiales de pradera
__Deltaproteobacteria	__Myxococcales	__Cystobacteriaceae	__uncultured	__uncultured_bacterium	EF018878	0.1	0.0	NY USA	Suelo con elevado CO ₂
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Xanthobacteraceae	__Pseudolabrys	-	HQ119071	0.0	0.1	USA	Suelo arcillo-arenoso bosque de Eucalipto
__Alphaproteobacteria	__Rhizobiales	__Hyphomicrobiales	__Rhodomicrobium	__uncultured_bacterium	HQ397500	0.0	0.1	India	Suelo agrícola
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Xanthomonadales	__Pseudoxanthomonas	__uncultured_bacterium	DQ984597	0.1	0.0	Francia	Suelo contaminado con hidrocarburos
__Gamma proteobacteria	__Xanthomonadales	__Sinobacteraceae	__uncultured	-	FJ444643	0.1	0.0	China	Rizosfera
__Alphaproteobacteria	__Sphingomonadales	__Sphingomonadales	__Sphingomonas	__uncultured_bacterium	GQ500887	0.0	0.1	USA	Cueva

El phylum Proteobacteria es uno de los principales grupos de bacterias. Se reportan 29 secuencias sombreadas en amarillo en la tabla anterior que corresponde a organismos de este phylum encontrados en sitios contaminados.

Tabla A.47. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 16S rRNA para el phylum Verrucomicrobia.

Reino_Bacteria									
Phylum_Verrucomicrobia									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento
__Opitutae	__Opitiales	__Opitutaceae	__Opitutus	__uncultured_Verrucomicrobia_bacterium	JN409228	0.1	0.0	China: Dalian city	Rizosfera (suelo-cultivo pepino)
__Opitutae	__Opitiales	__Opitutaceae	__Opitutus	__uncultured_bacterium	JN868982	0.0	0.1		Agua de Lago

La abundancia de Verrucomicrobia en muchos hábitats sugiere que tienen el potencial de ejercer un considerable impacto ecológico. Por ejemplo, las secuencias del gen 16S rDNA representan un porcentaje considerable de secuencias en bibliotecas de clones del suelo, con estimaciones de número de células totales que van desde 10^6 a 10^8 células por gramo (peso seco) de suelo, contribuyendo de ese modo hasta 0.2% del DNA total en el suelo. Por otra parte, el 16S rRNA de Verrucomicrobia comprende 2.2% a 10% de los rRNA totales extraídos de muestras de suelo, lo que implica que son metabólicamente miembros activos de las comunidades microbianas en suelos (Wertz et al. 2012).

De los datos del metagenoma realizado a los suelos MASE y SMI, el gen 18S rRNA reporta 43 OTU's sin asignar Reino para 9006 secuencias de ambos tipos de suelo (666 para MASE.18S y 8340 para SMI.18S) lo que corresponde al 26.4% del total de secuencias alineadas de ambos tipos de suelo. Mientras que para 35 OTU's asignados al Reino Fungi, pero sin asignar phylum se reportan 12680 secuencias (10909 para MASE.18S y 1771 para SMI.18S) lo que corresponde al 37.23% del total de secuencias alineadas de ambos suelos. Los phyla asignados de su secuencia más cercana se presentan en las siguientes tablas junto con la fuente de aislamiento reportada en la base de datos, el porcentaje correspondiente a MASE.18S en las tablas se calculó para el total de secuencias alineadas correspondientes a este suelo (17299), mientras que para SMI.18S corresponde a las 16770 lecturas alineadas a este suelo.

Tabla A.48. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 18S rRNA para el phylum Ascomycota.

Reino_Fungi									
Phylum_Ascomycota									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento
c_Sordario mycetes	o_Hypocreales	f_Incertae	sedis	g_llyonectria	JF735363	0.0	8.0	USA: Carolina del Norte	
c_unidentif ied	o_unidentif ied	f_unidentif ied	g_unidentif ied	s_unculture d	EF154351	7.1	0.0		Raíces
c_Leotiom ycetes	o_Helotiales	f_unidentif ied	g_unidentif ied	-	JN859275	0.0	5.2	Hungary: Tatarszentgyor gy	Raíz de planta
c_Sordario mycetes	o_Hypocreales	f_Nectriace ae	g_Haemat onectria	s_Haemato nectria	L36632	2.8	0.0		
c_Sordario mycetes	o_Sordariales	f_Lasiospha eriaceae	g_Cladorr hinum	s_Cladorrhi num	FN689667	1.5	0.0	Grecia	Rizosfera de plantas de tomate
c_Sordario mycetes	o_Hypocreales	-	-	-	HM162159	1.8	0.0	USA: Texas	Raíces de cesped
c_Eurotio mycetes	o_Chaetoth yriales	f_unidentif ied	g_unidentif ied	s_Chaetoth yriales	EU520629	0.0	2.6	Australia	Suelo
c_Sordario mycetes	o_Hypocreales	f_Nectriace ae	g_Fusariu m	-	HM162220	3.7	0.0	USA: Texas	Raíces de cesped
c_Sacchar omycetes	o_Saccharo mycetales	f_Dipodasca ceae	g_unidentif ied	-	JX915244	1.7	0.0		
c_Dothide omycetes	o_Pleospor ales	f_Pleospora ceae	g_Epicocc um	s_Epicoccu m	AM901690	1.6	0.0	Finlandia	Polvo

c__Sordario mycetes	o__Xylariales	f__Incertae	sedis	g__Microdochium	AF455402	0.8	0.0		
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__Incertae	sedis	g__Acremonium	AB540579	3.5	0.0	Japon	Lodos de una composta de estiercol de cerdo
c__unidentified	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__uncultured	AY833037	0.5	0.0		Micorrizas
-	-	-	-	-	KJ188727	0.4	0.0		
c__unidentified	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	-	GU174012	0.0	1.3	México	Muestra de raíz mixta
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__Pleosporaceae	-	-	HQ533146	0.5	0.0		Plantas Allium Coreas y Chinas
c__Sordario mycetes	o__Xylariales	f__unidentified	g__unidentified	-	KF385331	0.0	0.3		Vapor
c__unidentified	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__uncultured	EU489987	0.7	0.0	USA	Suelo de la sabana
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	-	-	-	FJ528715	0.0	0.4	Australia	Suelo
-	-	-	-	-	FN539075	0.3	0.2	USA: Nuevo México	Raíces
c__Orbiliomycetes	o__Orbiliales	f__Orbiliaceae	g__Arthrotrichytrids	-	AF106530	0.3	0.0		
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__Incertae	sedis	g__Ilyonectria	JX231150	0.0	0.2		Esquejes de planta
-	-	-	-	-	GU566296	0.5	0.0	República Checa	Rizosfera
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__Incertae	sedis	g__Ilyonectria	JF735358	0.0	0.3	Portugal	Muestra vegetal de 1.5 años con dedive
c__Sordario mycetes	o__Sordariales	-	-	-	JX489839	0.6	0.0	Austria	Suelo agrícola
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__unidentified	g__unidentified	-	HM535381	0.2	0.0	China	Aislado de octocoral
c__Sordario mycetes	o__Sordariales	f__Lasiosphaeriaceae	-	-	AY999116	0.2	0.0		
c__unidentified	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__uncultured	HM161996	0.1	0.0	USA: Texas	Raíces de césped
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__unidentified	g__unidentified	s__Hypocreales	JF300417	0.1	0.0	Suecia	Suelos de bosque boreal
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__Incertae	sedis	g__Mycocentrospora	JQ346814	0.0	0.1	China	Raíces de hierbas
c__Sordario mycetes	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__Sordario mycetes	HM162088	0.0	0.1	USA: Texas	Raíces de césped
c__Leotiomycetes	o__Helotiales	f__Incertae	sedis	g__Tetracladium	FN397382	0.0	0.1	Francia	Trufa creciendo en suelo
c__Eurotiumycetes	o__Chaetothyriales	f__unidentified	g__unidentified	s__Chaetothyriales	EF159517	0.0	0.3		Hojarasca
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	-	-	-	FJ439593	0.0	0.1	Reino Unido	Suelo contaminado artificialmente con plomo y pireno
c__Sordario mycetes	o__Sordariales	f__Lasiosphaeriaceae	g__Cladobotryales	-	FM955447	0.1	0.0	Egipto	Suelo del desierto
c__Sordario mycetes	o__Sordariales	f__Lasiosphaeriaceae	g__Zopfiella	-	KC507228	0.1	0.0		
c__Dothideomycetes	o__Incertae	sedis	f__Incertae	sedis	KF019246	0.0	0.1	China	Raíces y tallos
c__Sordario mycetes	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__Sordario mycetes	EU620151	0.1	0.0	Israel	Composta
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__Nectriaceae	g__Fusarium	s__Fusarium	KC222668	0.1	0.0	Australia	Bolsas de crecimiento interno de hifas
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__Nectriaceae	g__Cylindrocarpon	-	JF735302	0.0	0.1	Netherlands	Raíces
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__Nectriaceae	-	-	DQ420802	0.1	0.0	USA: Minnesota	Suelo
c__unidentified	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	-	GU566253	0.0	0.2	República Checa	Rizosfera
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__Incertae	sedis	g__Stachybotryids	HQ649938	0.4	0.0	España	Raíces
c__Sordario mycetes	o__Hypocreales	f__Nectriaceae	-	-	HQ897790	0.1	0.0		
c__Sordario mycetes	o__Sordariales	f__Lasiosphaeriaceae	-	-	HF947052	0.0	0.2	Grecia	Filósfera de plantas de pimienta
c__Dothideomycetes	o__Capnodiales	f__Mycosphaerellaceae	g__Cercospora	-	JX143580	0.1	0.0	Japon	Malas hierbas entre las rosas
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__Incertae	sedis	g__Periconia	JN859365	0.0	0.1	Hungría	Raíces de planta
c__Eurotiumycetes	o__Eurotiales	f__Trichocomaceae	g__Penicillium	-	GU724350	0.0	0.1		
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__Sporormiaceae	g__Westenyella	-	AB711978	0.2	0.0		Suelo rojo
c__Pezizomycetes	o__Pezizales	-	-	-	KF800600	0.0	0.1	USA	Aire interior
c__Leotiomycetes	o__Helotiales	f__unidentified	g__unidentified	s__Helotiales	JQ685242	0.0	0.1		Raíces
c__Sordario mycetes	o__Sordariales	f__Sordariaceae	g__unidentified	s__Sordariaceae	GU053852	0.3	0.0		Muestra de filtro de aire
c__unidentified	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__uncultured	FJ548831	0.1	0.0	China	Suelo geotermal
c__Sordario mycetes	o__Sordariales	f__Lasiosphaeriaceae	-	-	EF197088	0.0	0.0		

c__Dothideomycetes	o__Incertae	sedis	f__Pseudeurotiaceae	g__Pseudeurotium	GU934582	0.1	0.0	Lituania	Sistema de raíces
c__Sordarioomycetes	o__Hypocreales	f__Incertae	sedis	g__Ilyonectria	JF432984	0.0	0.0	Reino Unido	Rizosfera de oleginosa
c__Eurotiomycetes	o__Eurotiales	f__Trichocomaceae	g__Penicillium	s__Penicillium	JF439503	0.0	0.1	China	Montaña
c__unidentified	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__uncultured	EF434086	0.0	0.1	USA: Alaska	Horizontes de suelo húmico
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__Phaeosphaeriaceae	g__Ampelomyces	-	KF385301	0.0	0.0		Raíces
c__Incertae	sedis	o__Incertae	sedis	f__Incertae	AB161066	0.4	0.0		Pescado
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__Incertae	sedis	g__Periconia	JN859365	0.0	0.0	Hungary: Tatarszentgyorgy	Raíz de planta
c__Incertae	sedis	o__Incertae	sedis	f__Incertae	AY776169	0.1	0.0		
-	-	-	-	-	EU489889	0.0	0.0	USA	Suelo de la sabana
c__Eurotiomycetes	o__Chaetothyriales	f__unidentified	g__unidentified	s__Chaetothyriales	FN397279	0.0	0.0	Francia	Trufa creciendo en suelo
c__Sordarioomycetes	o__Sordariales	f__Lasiosphaeriaceae	g__unidentified	s__Lasiosphaeriaceae	GU055523	0.1	0.0	Austria	Suelo agrícola
c__Eurotiomycetes	o__Onygenales	f__Onygenaceae	g__Chrysosporium	-	AJ005368	0.0	0.1		
c__Saccharomycetes	o__Saccharomycetales	f__Incertae	sedis	g__Kodamaea	EF196811	0.0	0.0		Levaduras marinas
c__Sordarioomycetes	o__Xylariales	f__Amphisphaeriaceae	-	-	GU721879	0.0	0.1	USA	Polvo de la superficie
c__Incertae	sedis	o__Incertae	sedis	f__Incertae	GU053848	0.0	0.0		Muestra de filtro de aire
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__unidentified	g__unidentified	s__Pleosporales	HQ335297	0.0	0.0	Antártida	
c__Pezizomycetes	o__Pezizales	f__Pyrenomataceae	g__unidentified	s__Pyrenomataceae	EU826918	0.1	0.0		Suelos de Arroz
c__Eurotiomycetes	o__Eurotiales	f__Trichocomaceae	g__Aspergillus	s__Aspergillus	JX436463	0.0	0.0	España	
c__Sordarioomycetes	o__Incertae	sedis	f__Apiosporaceae	g__Arthrinium	KF144888	0.0	0.0	Netherlands	Cañas muertas
c__Dothideomycetes	o__Pleosporales	f__Pleosporaceae	-	-	DQ337380	0.0	0.0		
c__Sordarioomycetes	o__Hypocreales	-	-	-	JF449887	0.1	0.0	Austria	
c__Eurotiomycetes	o__Chaetothyriales	f__unidentified	g__unidentified	s__Chaetothyriales	DQ421065	0.0	0.1	USA	Suelo
c__Sordarioomycetes	o__Hypocreales	f__Nectriaceae	g__Calonectria	s__Calonectria	GQ280584	0.0	0.1		
c__Orbiliomycetes	o__Orbiliales	f__Orbiliaceae	g__Arthrobotrys	s__Arthrobotrys	HQ649929	0.1	0.0	España	Raíces
c__Sordarioomycetes	o__Sordariales	f__Lasiosphaeriaceae	g__Schizothecium	s__Schizothecium	NR_103589	0.1	0.0		
c__Eurotiomycetes	o__Chaetothyriales	f__unidentified	g__unidentified	s__Chaetothyriales	DQ421069	0.0	0.1	USA: Minnesota	Suelo

Ascomycota es el mayor phylum de los hongos y uno de los phyla de eucariotas más diversos y ubicuos. Sus especies se encuentran en numerosos nichos ecológicos y en prácticamente todos los ecosistemas terrestres y acuáticos, además se han aislado de algunos de los entornos más extremos de la Tierra, desde el interior de las rocas en las planicies congeladas de la Antártida hasta de maderas de aguas profundas y sedimentos (Kohlmeyer 1977; Schoch et al. 2009; Selbmann et al. 2005; Raghu Kumar et al. 2004).

Tabla A.49. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 18S rRNA para el phylum Basidiomycota.

Reino_Fungi									
Phylum_Basidiomycota									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MAS E.16S	%SMI. 16S	País	Fuente de aislamiento
c__Agaricomycetes	o__Cantharellales	f__Ceratobasidiaceae	g__unidentified	-	JQ247397	0.0	2.2	México	Suelo de matorral
c__Agaricomycetes	o__Agaricales	f__Inocybaceae	g__Neopaxillus	s__Neopaxillus	JN033223	0.0	2.8	Puerto Rico	Suelo arcilloso de bosque húmedo tropical
c__Agaricomycetes	o__Trechisporales	f__unidentified	g__unidentified	s__Trechisporales	GU054017	0.2	0.0		Filtro de aire marino
c__Agaricomycetes	o__Agaricales	f__Tricholomataceae	g__Mycenella	s__Mycenella	EF434028	0.0	0.5	USA	Horizonte húmico de suelo

c__Tremellomycetes	o__Filobasidiales	f__Filobasidiaceae	g__Cryptococcus	s__Cryptococcus	FN689678	0.0	0.1	Grecia	Rizosfera de plantas de tomate
c__Tremellomycetes	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__uncultured	JQ951590	0.0	0.1	Costa del Adriático oriental	Raíces de la vid
c__Tremellomycetes	o__Tremellales	f__Incertae	sedis	g__Hannaella	HQ631046	0.1	0.0		Campo
c__Agaricomycetes	o__Cantharellales	f__Ceratobasidiaceae	-	-	KF386035	0.0	0.1	Alemania	
c__Agaricomycetes	o__Agaricales	f__Psathyrellaceae	g__Coprinopsis	-	FJ548835	0.1	0.0	China	Suelo geotermal
c__Agaricomycetes	o__Cantharellales	f__Ceratobasidiaceae	g__Thanatephorus	s__Thanatephorus	JQ676878	0.0	0.0		
c__Agaricomycetes	o__Cantharellales	f__Ceratobasidiaceae	g__Ceratobasidium	s__Ceratobasidium	HM623615	0.1	0.0	China	
c__Agaricomycetes	o__Agaricales	f__Psathyrellaceae	-	-	KC191751	0.0	0.0		Rizosfera de algodón
c__Microbotryomycetes	o__Sporidiobolales	f__Incertae	sedis	g__Sporobolomyces	JX984698	0.0	0.0		Filtro de aire marino

Tabla A.50. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 18S rRNA para el phylum Glomeromycota.

Reino_Fungi									
Phylum_Glomeromycota									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento
c__Glomeromycetes	o__Glomerales	f__Glomeraceae	g__unidentified	s__uncultured	JF439112	0.0	8.3	China	
c__Glomeromycetes	o__Diversisporales	f__Acaulosporaceae	g__Entrophospora	s__Entrophospora	GU187858	0.0	0.8	Australia	Suelo
c__Glomeromycetes	o__Diversisporales	f__Acaulosporaceae	g__Entrophospora	s__Entrophospora	FN397325	0.0	0.8	Francia	Trufa creciendo en suelo
c__Glomeromycetes	o__Glomerales	f__Glomeraceae	g__Funneliformis	s__Funneliformis	X96843	0.0	0.7	Etiopía	Bosque seco
c__Glomeromycetes	o__Archaeosporales	f__Ambisporaceae	g__Ambispora	s__Ambispora	DQ400253	0.0	0.5	Alemania	Suelo
c__Glomeromycetes	o__Archaeosporales	-	-	-	JF439210	0.0	0.3	USA	Raíces
c__Glomeromycetes	o__Archaeosporales	f__Ambisporaceae	-	-	AJ567807	0.0	0.1	Alemania	Raíces
c__unidentified	o__unidentified	f__unidentified	g__unidentified	s__uncultured	HM162331	0.0	0.0	USA	Raíces de pasto
c__Glomeromycetes	o__Glomerales	f__Glomeraceae	g__Funneliformis	s__Funneliformis	JF439112	0.0	0.0	Peru	Rizosfera

El phylum Glomeromycota solo se encontró en SMI, estos hongos se caracterizan por ser organismos asexuales y simbioses obligados de plantas vasculares, de las cuales obtienen sus nutrientes orgánicos y forman micorrizas arbusculares (Schüßler et al. 2001).

Tabla A.51. Asignación taxonómica y fuente de aislamiento de la secuencia más cercana del gen 18S rRNA para el phylum Zygomycota.

Reino_Fungi									
Phylum_Zygomycota									
Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Identificador	%MASE.16S	%SMI.16S	País	Fuente de aislamiento
c__Incertae	sedis	o__Mortierellales	f__unidentified	g__unidentified	JX489813	0.0	0.5	China	Suelo con cultivo de pepino
c__Incertae	sedis	o__Mortierellales	f__Mortierellaceae	g__Mortierella	AB542097	0.4	0.0	Japón	Suelo
c__Incertae	sedis	o__Mortierellales	f__Mortierellaceae	g__Mortierella	KC222730	0.0	0.1	Australia	Suelo salino
c__Incertae	sedis	o__Mortierellales	f__Mortierellaceae	g__Mortierella	DQ420866	0.0	0.1	USA	Suelo
c__Incertae	sedis	o__Mortierellales	f__unidentified	g__unidentified	EU490044	0.0	0.1	USA	Suelo de la sabana

c_Incerta e	sedis	o_Mortierellal es	f_Mortierellace ae	g_Mortierell a	FN397316	0.0	0.2	Francia	Trufa creciendo en suelo
c_Incerta e	sedis	o_Mortierellal es	f_Mortierellace ae	g_Mortierell a	EU437426	0.1	0.0	Reino Unido	Suelo rico en Cd, Cu y Zn
c_Incerta e	sedis	o_Mortierellal es	f_Mortierellace ae	g_Mortierell a	HM240131	0.0	0.0	USA	Suelo de pradera

Representación en árbol filogenético de la diversidad taxonómica de especies de bacterias y hongos encontrados en los suelos MASE y SMI.

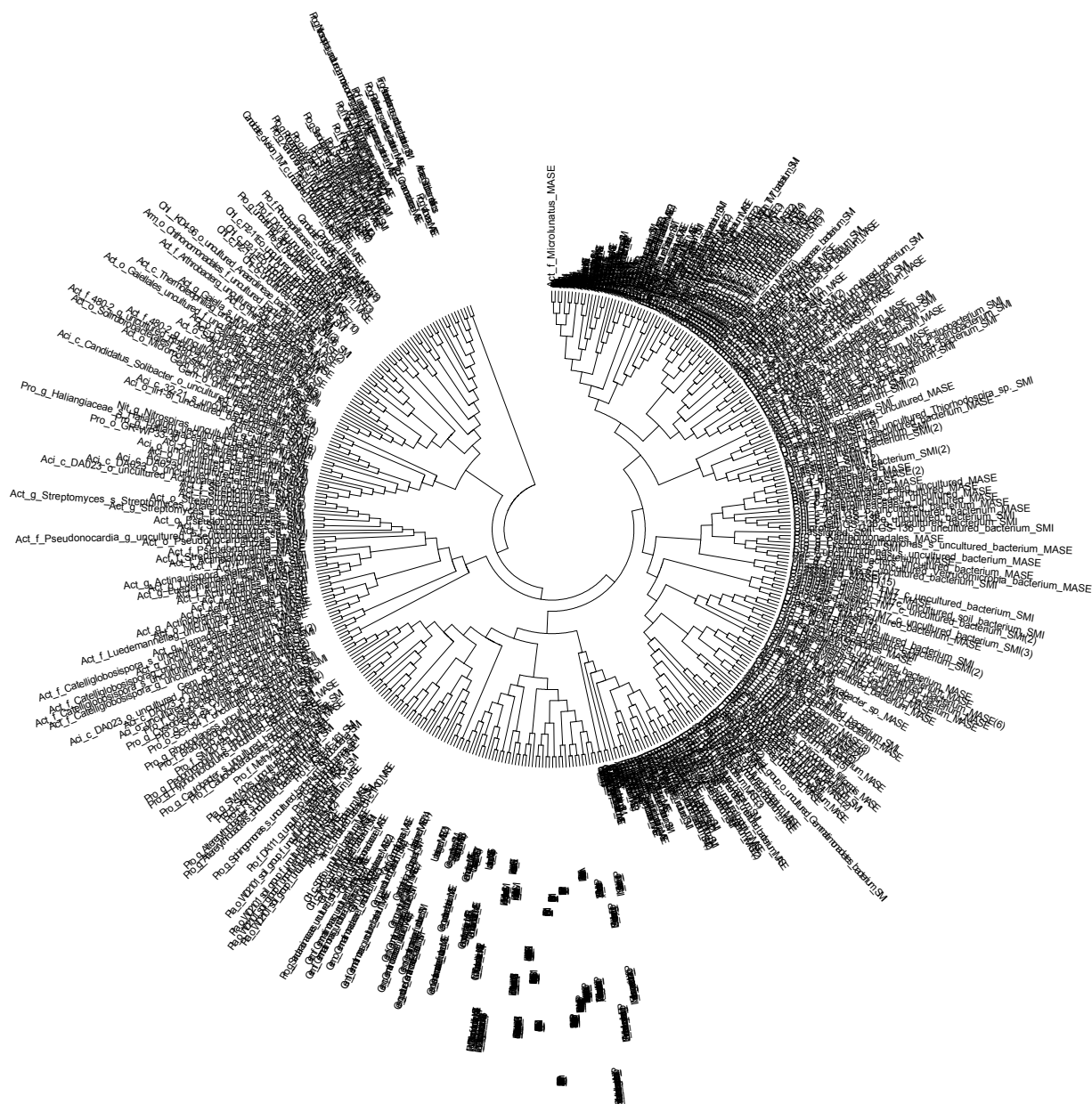


Figura A.40. Árbol filogenético del gen 16S rRNA del metagenoma de suelos MASE y SMI. Las secuencias fueron alineadas por ClustalW. El árbol filogenético fue construido por Neighbor-Joining. La secuencia 16S rRNA de *Sulfobolus metallicus* (Acceso: U40813.1) fue usada como grupo externo (out-group). Ver=Verrucomicrobia; Pro=Proteobacteria; Pla=Planctomycetes; Nit=Nitrospirae; Gem=Gemmatimonadetes; Fir=Firmicutes; Chl=Chloroflexi; Bac=Bacteroidetes; Arm=Armatimonadetes; Act=Actinobacteria; Aci=Acidobacteria. Las letras minúsculas p, c, o, f, g y s representan phylum, clase, orden, familia, género y especie respectivamente.

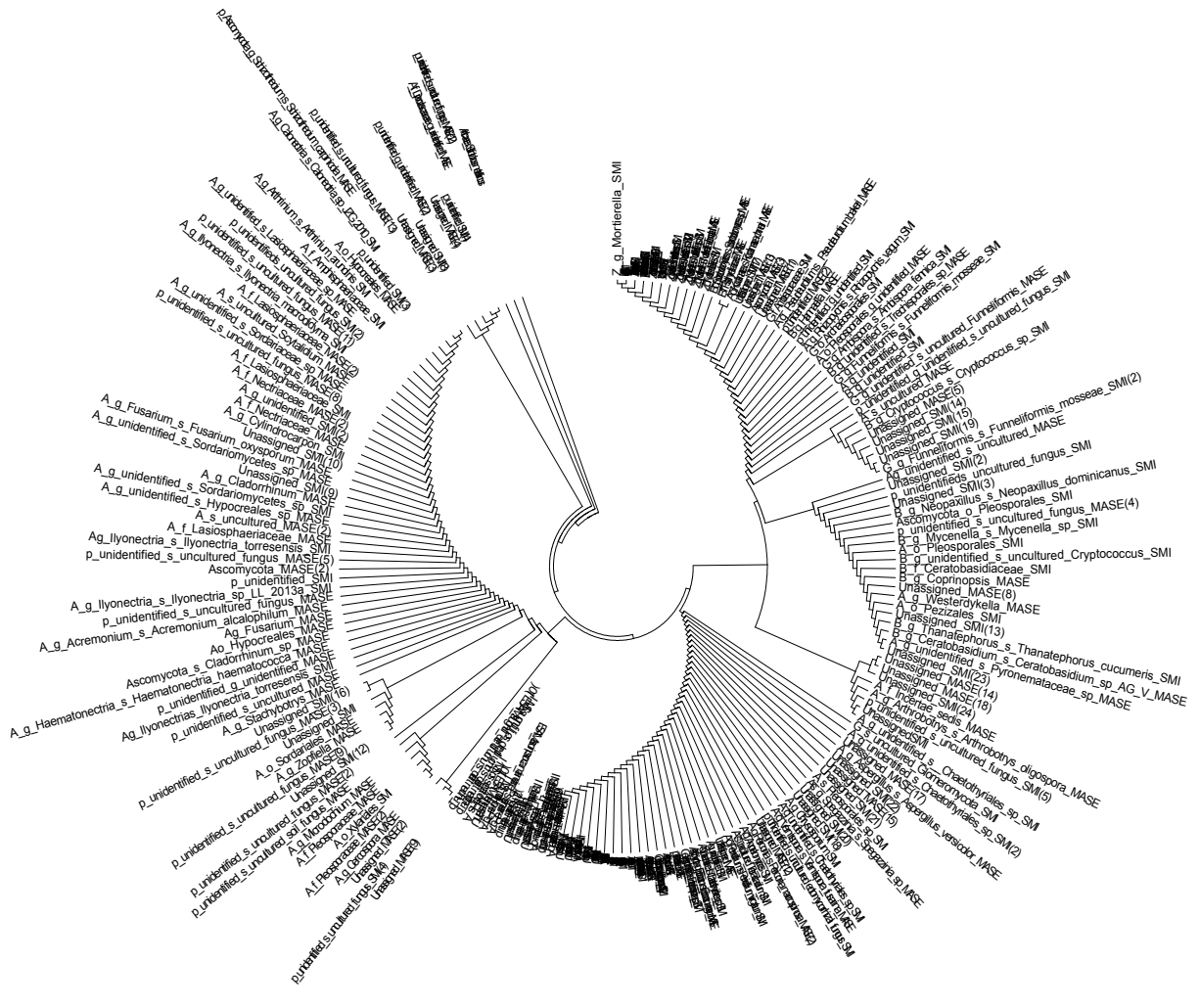


Figura A.41. Árbol filogenético del gen 18S rDNA del metagenoma de suelos MASE y SMI. Las secuencias fueron alineadas por Muscle. El árbol filogenético fue construido por Neighbor-Joining. La secuencia 16S rDNA de *Sulfolobus metallicus* fue usada como grupo externo (out-group). Las letras mayúsculas A, B, G y Z representan los phyla Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota y Zygomycota respectivamente. Las letras minúsculas p, c, o, f, g y s representan phylum, clase, orden, familia, género y especie respectivamente.

Tablas de secuencias

Tabla A.52. Secuencias obtenidas de la amplificación del gen rDNA 16s y los ITS´s 4 y 5 de los diferentes aislados.

Aislado	Secuencia directa	Secuencia reversa	Ensamblado
24 Hongo	<p>CCTATGCGACTGAGGAGACATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCA ACCTCCACCCTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCT TAACCTGGCCGCCGGGGGCTTACGCCCGGGCCCGCCGCCCGCA AGACACCCTCGAAGTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTAAAAATAA ATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTTGGTTCCGGCATCGATGAA GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATCAGTGAAT CATCGAGTCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCTGATTCCGGGGGGC ATGCGTGTCCGAGCGCTATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTGTG GGCCCCGTCTCCGATCC CGGGGACGGGCCGAAAGCAGCGCGGACCGCGTCCGGTCTC GAGCGTATGGGGCTTTGACCCGCTCTGTAGCCCGGGCCGGCGCTT GCCGATCAACCAAAATTTTATCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG ATACCCTGTAACCTAAGCATATCAAAAACCGCGAGAGAAAA</p>	<p>AGGCTGGACTACTGATCCGAGGTCACTGGATAAAAAATTTGGGT GATCGGCAAGCGCCGGCCGGCTACAGAGCGGGTGACAAAAGCC CCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCCTTCGG GCCCGTCCCCGGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCG TGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCGGA ATACCAGGGGGCAATGCGCTTCAAAAGACTCGATGATCACTG AATTTGCAATTCACATTACGATTCGCAATTCGCTGCGTCTTCATCG ATCGCGAAACCAAGAGATCGTGTGAAAGTTTAAATAATTTATA TTTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCTC GGCGGGCGGGCCCGGGGGCGTAAGCCCCCGCGGCCAGTT AAGCGGGCCCGCGGAAGCAACAGGTAATAAACACGGGTGG GAGGTTGAGCCAGAGGGCCCTCACTCGTAATGATCCTCCGCA GTTCACTACGAAACCTGTAGATTTTTTACTTCAAAAATGGG AAAC</p>	<p>TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCG AGGTCAACCTGATAAAAAATTTGGTTGATCGGCAA GGCCGGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAAGC CCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCCTTCGG CTGCTTTCCGGCCGTCCCGGGATCGGAGGAC GGGGCCCAACACAAGCCGTGCTGAGGGCAGCA ATGACGCTCGGACAGGATGCCCGCGAATACCA GGGGCGCAATGCGTTCAAAAGACTCGATGATTC ACTGAATTTGCAATTCACATTACGATTCGATTTCCG TGCTTCTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGT TGTTGAAAGTTTAAATAATTTATTTTCACTCAGAC TACAATCTCAGACAGATTCGAGGGTGTCTTGGC GGCGGGGGCCCGGGGGCGTAAGCCCCCGGGC GCCAGTTAAGCGGGCCCGCGGAAGCAACAGGTA AAATAAACACGGGTGGAGTTGGACCCAGAGGGC CCTCACTCGGTAATGATCCTCCGCAAGTCACTACG GAAACCTGTAGATTTTTACT</p>
44 Hongo	<p>CTTAAGCGACTGAGGAGACATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCA ACCTCCACCCTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCT TAACCTGGCCGCCGGGGGCTTACGCCCGGGCCCGCCCGCCGCA AGACACCCTCGAAGTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTAAAAATAA ATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTTGGTTCCGGCATCGATGAA GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATCAGTGAAT CATCGAGTCTTTAAACGCACATTGCGCCCGCTGATTCCGGGGGGC ATGCGTGTCCGAGCGTATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTGTG GGCCCCGTCTCCGATCCGGGGGACGGGCCGAAAGGACGCGCG GCACCCGCTCCGCTCGAGCGATGAGGGCTTTGACCCGCTCTG TAGGCCCGCCGGCGCTTCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTG ACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAAAC CCGGAAGAAAAGTTAGTTCCGCTCT</p>	<p>CAACTGGACTACTGATCCGAGGTCACTGGATAAAAAATTTGGGT TGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCTACAGAGCGGGTGACAAAAGC CCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCCTTCGG GGCCCGTCCCCGGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCC GTGCTTAGGGCAGCAATGACG CTCGGACAGGCATGCCCGGAAATACAGGGGGCGCAATGTGC GTTCAAGACTCGATGATCACTGAATTTGCAATTCACATTACGAT CGCATTCGCTGCTTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCG TTGTGAAAGTTTAAATAATTTATTTTCACTCAGACTACAATCTT CAGACAGAGTTGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGGGCCCGGG GGCTAAGCCCCCGCGGGCAGTTAAGCGGGCCCGCGGAAGCA ACAAGGTAATAAACACGGGTGGAGGTTGACCCAGAGGGCC CTCACTCGGTAATGATCCTTCGCGAGTTCACTACGAAACCTTG TTACATTTTTTACTTCAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGT AAC</p>	<p>CCCTTTTAAAAGTAAAAATGTAACAAGGTTTCCGTA GGTGAACCTCGGAAGGATCACTTACCGAGTGAGGG CCCTCTGGGTCCAAACCTCCACCGCTGTTTATTTT CCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCTTAACTGGCCG CCGGGGGGCTTACGCCCGGGCCCGCCCGCCG GAAGACACCCTCGAAGTCTGTCTGAAGATTGTAGT TGAGTAAAAATAAATTTTAAAACCTTCAACAAC GGATCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCA CGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATCAGT GAATCAGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCGCT GGTATTCCGGGGGCGTGCCTGCGGAGGTCATT GCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTGTTGGCCCG TCCTCCGATCCCGGGGACGGGCCGAAAGGGCAG CGCGCCACCGCTCCGCTCGTCCGAGCGTATGG GCTTTGACCCGCTCTGAGGCCGGCCGGCCCT TGCCGATCAACCAAAATTTTATCCAGTTGACCT GGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATAT CTAAAACCCGGA</p>
67 Hongo	<p>CTGATAGCGAATGAGGAGACATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGT CCAACCTCCACCCTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCG CCTTAAGTGGCCGCCGGGGGCTTACGCCCGGGCCCGCGCCCGC CGAAGACACCCTCGAAGTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGA ATAAATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTTGGTTCCGGCATCGA TGAAGAACGCAGGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATCAGT GAATCATGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTGATTCCGGGG GGCATGCTTCCGAGCGTATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGT GTTGGGCCCGCTCCGATCCGGGGACGGGCCGAAAGGCAAGC GGCGCACCCGCTCCGCTCGAGCGATGAGGGCTTTGACCCGCT TCTGTAGGCCGGCCGGCGCTTCCGATCAACCCAAATTTTATCCAG GTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAA TAAGCCGGAGGAA</p>	<p>CAAGCGTGTATACCTGATCCGAGGTCACTGGATAAAAAATTTG GGTGTGATCGCAAGCGCCGGCCGGCTACAGAGCGGGTGACAA AGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCCTT TCGGCCCGTCCCCGGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACACA GCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGA CGCTCGGACAGGCATGCCCGGAAATACAGGGGGCGCAATGT CGCTTCAAAGACTCGATGATCACTGAATTTGCAATTCACATTACG TATCGCATTCGCTGCTTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATC CGTTGTTGAAAGTTTAAATAATTTATTTTCACTCAGACTACAATC TTCAGACAGAGTTGAGGGTGTCTTCGGCGGGCCGGCCCGGG GGCGTAAGCCCCCGGGCGCA GTTAAGGCCGGCCCGGAAGCAACAGGTAATAAACACGGGT GGGAGTTGAGCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTCCG CAGGTTCACTACGAAACCTGTGATTTTTTACTTCCAAATTT GCGT</p>	<p>TTCTCCGGCTTATTGATAGCTTAAGTTCAGCGGG TATCCCTACTGATCCGAGGTCAACCTGATAAAAA TTTGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGGCTACA GAGCGGGTGACAAAAGCCCATACGCTCGAGGACCG GACGCGGTGCCCGCTGCCCTTTCGGCCCGCTCC CCCGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGC CGTCTTGAGGCGAAGTACGCTCGGACAGGCA TGCCCCCGGAATACAGGGGGCGCAATGTCGCTT CAAAGACTCGATGATTCAGTGAATTTGCAATTCACAT TACGATCGCATTCGCTGCTTTCATCGATGCC GGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAAATAAT TTATTTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAT TCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCCGGCCCGGGGG CGTAAGCCCCCGGGCGCAATTAAGGGCGGGCC GCCGAAGCAACAGGTAATAAACACGGGTGGGA GGTTGAGCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATG-TC- TYCKCAg9TTCACTACGAAACCTTTGATGATTT TTTACTTCCAAA</p>
69a Hongo	<p>TCGGTTAGGCTTATCGGAGACATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGT CCAACCTCCACCCTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCG</p>	<p>TAGCCGTTGCTCACTGATCCGAGGTCACTGGATAAAAAATTTGGG TTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCTACAGAGCGGGTGACAAAAG CCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCCTTC</p>	<p>CCTCCGGCTTATTGATAGCTTAAGTTCAGCGGGT ATCCCTACTGATCGAGGTCAACCTGGATAAAAAAT TTGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAG</p>

	<p>CCTTAACGTGGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGGCCCGC CGAAGACAC CCTCGAAGCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAATAATAAATTT TAAACCTTTCAACACCGATCTCTTGGTCCGGCATOGTAAGAAGC CAGCGAAATGGGATACGTAATGTGAATTGCAAACTCAGTGAATCATCGA GTCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTGGTATCCGGGGGGCATGCCT GTCCGAGCGTATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGGGGCC CGTCTCCGATCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGAC CGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCTCTGTAGGC CCGGCCGGCGCTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGTTGACCTC GGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCCGG AGGAATTTTTTAAAT</p>	<p>GGGCCCTGCCCGGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAAG CCGTGCTTGAGGGGACGAATGAC GCTCGGACAGCATGCCCGGGAATACAGGGGGCCGAATGTG CGTTCAAGACTCGATGATCACTGAATTTGCAATTCACATACGTA TCGCATTTGCTGGTCTTCTCATCGATGCCGGAACCAAGGATCC GTTGTGAAAGTTTTAAATTTATTTTCACTCAGACTACAATCT TCAGACAGAGTTGAGGGTCTTCCGGGGGGCGGGCCCGGGG GGTAAAGCCCCCGGGCCGAG TTAAGCGGGCCCGCGAAGCAACAAAGTAAATAAACACGGGTG GGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGTAATGATCCCTCCGC AGGTTACCTACGGAAACCTTGTACGATTTTACTTCCAAACG GTGTAATTTCCCT</p>	<p>AGCGGGTGACAAGCCCATACGCTCGAGGACCGG ACGCGGTGCCGCCCTGCTTTCCGGCCCGTCCC CGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACCAAGACCG TGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACGGCATG CCGCCGGAATACAGGGGGGCAATGCGGGTTCA AAGACTCGATGATCACTGAATTTGCAATTCACATTA CGTATCGATTTGCTGGTCTTCAATCGATGCCGG AACCAAGAGATCGGTTGTAAGTTTTAAATAATTT ATATTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAGTT GAGGGTGTCTTCCGGGGGGGGGGGGGGGGGG TAAGCCCCCGGGCCAGTTAAGCGGGGGGGGG CGAAGCAACAGGTAAATAAACACGGGTGGGAGG TTGGACCCAGGAGGCGCTCACTCGTAATGATCCTT CCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACGATTTT TTACTTC</p>
<p>69s Hongo</p>	<p>TCITTAAGCGTAAGTGAAGACATTACCAGTGAAGGCCCTCTGG GTCCAACCTCCACCCTGTTTATTTACCTTGTGCTTGGCGGGCC CGCCTTAAGTGGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGGCC GCCAAGACACCCTGAACCTGTCTGAAGATTGTAGTGTGAGTGA ATAATAATTTTAAACTTTCAACAAGGATCTCTGGTCCGGCATC GATGAAGAAGC AGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAACTCAGTGAATCATCGA GTCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTGGTATCCGGGGGGCATGCCT GTCCGAGCGTCAATGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGGGGCC CGTCTCCGATCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGAC CGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCTCTGTAGGC CCGGCCGGCGCTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGTTGACCTC GGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAG GAA</p>	<p>CCAACCTTGTAACCCCAATGATCGAGGTCACTGGATAAAAAAT TGGGTTGATCGCAAGCGCCGGCCGGCCACAGCGGGGTGAC AAAGCCCATACGCTCGAGACCGGACCGGTGCCGCCCTGCC TTCCGGCCCGTCCCGGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACAC AAGCGTGTGAGGGGACGAA TGACGCTCGGACAGCATGCCCGGAAATACAGGGGGCGCAA TGTGCGTTCAAGACTCGATGATCACTGAATTTGCAATTCACATTA CGTATCGATTTGCTGGTCTTCACTGATGCCGGAACCAAGAG ATCCGTTGTAAGTTTTAAATAATTTATTTTCACTCAGACTACA ATCTTCAGACAGGTTGAGGGTGTCTTCCGGGGGGGGGGGG GGGGGGGTAAGCCCGGGGGCCAGTTAAGCGGGGGGGGGGG AAGCAACAGGTAAATAAACACGGGTGGAGGTTGGACCCAGAG GGCCCTCACTCGTAATGATCCTTCCGAGGTTCACTACGGAA CCTGTTACGACTTTTACTCCAAAGGGGGGGTACGAAATAGACT AAAAACAAAAAACAAAAAGTTCTCACCTCCCGCCCGCTCT CCCCCCCCC</p>	<p>TTCTCCGCTTATTGATGTCTAAGTTACGCGGGT ATCCCTACCTGATCGAGGTCACTGGATAAAAAAT TTGGTTGATCGCAAGCGCCCGGGCCGATACAG AGCGGGTGACAAGCCCATACGCTCGAGGACCGG ACGCGGTGCCGCCCTGCTTTCCGGCCCGTCCC CGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACCAAGCGG TGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACGGCATG CCCCCGGAATACAGGGGGGCAATGCGGTTC AAGACTCGATGATCACTGAATTTGCAATTCACATTA CGTATCGATTTGCTGGTCTTCAATCGATGCCGG AACCAAGAGATCGGTTGTAAGTTTTAAATAATTT ATATTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAGTT GAGGGTGTCTTCCGGGGGGGGGGGGGGGGGG TAAGCCCCCGGGCCAGTTAAGCGGGGGGGGG CGAAGCAACAGGTAAATAAACACGGGTGGGAGG TTGGACCCAGGAGGCGCTCACTCGTAATGATCCTTC TCA</p>
<p>2 Bacteria</p>	<p>GGGAATACGGCGTACTATACATGCAAGTGCAGCGAATCGATGGGAG CTT GCTCCCTGAGATTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGCTGGCAACCT GCC TATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGT TC TTTTCTCGCATGAGAGAAGTGAAGACGGTTTACGCTGTCATTTATA G ATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGAGTGAATGGCTCACCAA GGC GACGATGCGTAGCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTG AGA CACGGCCAGACTCCTAOCGGGAGGACAGTGGGAACTTCCGCAA TGG ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAAGCAAGAAAGGCCCTCGG GTC GTAAGTTCTGTTTAGGGAAGAACAGTACCAGAGTAAGTCTGGT AC CTTGACGGTACTAACAGAAAGCCACGGCTAATACGTCGACGAG CCG CGTAATACGATAGTGGCAAGCGTTGCCGAAATATTGGCGTAAG CG CGCGCAGGTGTTCTTAAGTCTGATGTAAGGCCACCGCTCAACC GTG GAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAAGGAAAGTGG AAT TCCAAGTGTAGCGGTAAATGCGTAGAGATTGGAGGACACCAAGT CGG AAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACGACTGAGGCGGAAAGCGTGG GGA GCAACAGGATTAGTACCCCTGAGTCCACGCGGTAACGATGAGT CT AAGTGTAGAGGTTTCCGCCCTTAGTGTGACGCTAACGCAATTAAG CA CTCCGCTGGGGGATACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA CGG GGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGAAGCAACGCG AAG AACCTTACAGGCTTACATCCCTCTGACAACCTTAGAGATGGGCTT TC CCCTTGGGGGACAGAGTACAGGTTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC GTG TCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCGCAAGGAGGCAACCTTGTATCT AG TTGCCAGCATTAGTGGGACTTAAGGTGACTCGCGGTGACAAACC GG</p>	<p>ACATTTCTGTACACCTTAGCGGGTGGCTCCATGAAGTTACCT CACC GACTTCGGGTGTACAACTCTCGTGGTGTGACGGCGGTGTGTA CAAGG CCCGGAAAGCTATCCACCGGACGATGATCCGCGATTACTAGC GATTC CGGCTTATGACGGCGAGTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAAT GGCTT TATGGATTGCTTACCTTCCAGGTTTGCAGCCCTTTGTACCATC CATT GTAGCAGTGTGATAGCCAGGTCATAAGGGGATGATGATTTGAC GTCAT CCCCACCTTCTCCGGTGTGACCGGCACTCCTTAGAGTGGC CAACT GAATGCTGGCAACTAAGTCAAGGGTTCGGCTCGTTCCGGGACTT AACCC AACATCTCACGACAGCTGACGACAAACATGACCCACTGTCA CTCTG TCCCCGAAAGGGAAAGCCCTATCTAGGGTTGTCAGAGGATG CAAGA CCTGTAAGTGTCTCGGTTGCTTGAATTAACACATGCTCCA CCGC TTGTGGGGCCCGGTAATCTTTGAGTTTACGCTTGGCGCC GTAAT CCCCAGGGGAGTGTAAATCGTGTAGCTGACGACTAAAGGGG GAAAC CCTTAACTTACGACTATCCTTACGGCGTGGACTACCAGGTT ATCT AATCCTGTTGCTCCCGCTTCCGGCCCTAGTGTGATGACG ACCA GAAAGTGCCTTCGCACTGGTGTCTTCCAACTCTACGCAATT CACC GCTACACTGGAATCCACTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCA GTTT CCAATGACCTCCACGGTGTAGCGGTGGCTTTCACATCAGACTT AAGGA ACCACCTCGCGCGCTTACGCCCAATATCCGACAAACGCTTG CCACC TACGATTACCGCGGCTGTCGACAGTATGCGGCTGCTTTCT GGTTA GGTACCGTCAAGGACACGAGTACTCTGACTTGTGTTCTCCCT AAACA ACAGAACTTACAGCCGAAAGGCTTCTTCTTCAACGCGCGTGG CTCCG TCAGACTTGTCTTACGGGAAATTCCTACTGCTGCTCCCG TAGG</p>	<p>CGCGTGACTATACATGCAAGTGCAGGCAATCGAT GGGAGCTGCTCCCTGAGATTAGCGGGCAAGGGT GAGTAACACGTTGGGCAACTGCTATAAGACTGGG ATAACTCGGAAACCGGACTAATACCGGATACGT TCTTTCTCGCATGAGAGAAGTGAAGAGCGGTT ACGCTGTCACTTATAGTGGCGCCCGGGCATTA GCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTACCAAGGGCAGG ATCGGTAGCGGACTGAGAGGTTGATCGGCC- ACACTGGGACTGAGACCGGCC- AGACTCCTACGGGAGCAGCAGTAGGAAATC- TTCCGCAATGGCAAGGCTGACGGGACCAAGCC CGGTGAACGAAGAGGCTTCCGGTCTGAAGTCT TGTGTTAGGGAAGAACAGTACCAAGTAACTGCT GGTACTTGAAGTACCAAGGAGGACCGGCG TAACACTGCGGACGACCGCGGTAATGACTGAGT GGCAAGCGTTGCGGAAATTTGGCGTAAAGCG CGCGCAGGTGGTTCTTAAAGTCTGATGTGAAGCC CACGGCTCAACCGTGGAGGCTATTGAAACTGG GACTTGAAGTGCAGAAAGGAAAGTGAATTTCAA GTGTACCGGTGAAATCGTAGAATTTGAGGAAAC ACCAGTGGGAAAGGCGACTTCTGCTGTAAGTGA CACTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAACAGGAT TAGATACCTGTTAGTCCACGCGTAAACGATGAGT GCTAAGTGTAGAGGTTTCCGCCCTTAGTGTGCG AGTAACGCAATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACG CGCCCAAGGCTGAACTCAAGGAAATGACGGGGG CCCGCACAGCGGTGGAGCATGTTGTTAAATCGA AGCAACCGGAAAGCTTACGAGTCTTGACATCCT CTGACAACTAGAGATAGGCTTTCCCTTCCGGG GGACAGAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGCTGACG CTGCTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAAC GAGCGCAACCTTGTACTTATGTCAGACTCAGT TGGGCACTTAAAGTACTGCGGGTGAACAACCG AGGAAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC TTATGACCTGGGCTACACAGTGCATAATGAGTGG TACAAGGGCTGAAACTCGCAAGGTAAGCGAAT CCATAAAGCCATTCTC- AGTTCGGATTGACGGCTGCA- CTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGTACTGATACG GGATCAGCATCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCC TTGTACACCCCGCTCACACCAGGAGTTGTA ACACCCGAAAGTGGTGAAGTAACTTATGAGGCC AGCCGCTAAGGTGAC</p>

	<p>AGGAAGTGGGGTACGTCAAATCATGCCCCATTGACCTGGG CTA CACCCGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACTGCGAAGG GAA GCGAATCCCCTAAAGCCCTTCCATTTCGATTGCAAGGGTGAATCT CC CTGCTTAAACCAGGATCCCTATAAATCCGGAATCAATGCCCGGGG AA AAATTTCCGGCCGTGTACCAACGCCCCCCACCCCCAGATTGTT AC CCACCAACCCGGGAGAACCTCTGGACCCCGCCTAAGGCGAATGG GGG GGTGTGGTGGTGGGCGGGCACACAAA</p>	<p>AATCTGGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGGGGCCGATCACCCCTCT CAGGT CGGCTACGCATCGTCCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCACCTAG CTAAT GGCCCGCGGGCCCTCTATAATGAGACCCGTAACCCGCTTCCA TCTTT CCTCAAGGCGAAAAAGAACGTTCCCGGTTATAAATCCCGGTTTC CCGA AGTTATTCAGCTTTAAAGGCGGGTGGCCACCGTGTACTCC CCCG TTCCGCGTATTTCAGGGAGAAAGTTCCCCCTGAAATCCCTCC CCAC TTTCTGGTATTGGAAACCCCCC</p>	
3 Bacteria	<p>GGCAGGATGACGTCATGACTATACATGCAAGTCGAGCGAATCGATGG GAG CTTGCTCCCTGAGATTAGCGGGACGGGTGAGTAACAGCTGGGCAA CCT GCCTATAAGACTGGGATAACTTCGGAAACCGGAGCTAATACCGGATA CG TTCTTTCTCGCATGAGAGAAGTGGAAAGACGGTTTACGCTGTCACTT A TAGATGGCCCGCGGCATTAGCTAGTGGTGGTAAATGGCTCAC CAA GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTAGCCACACTGGG ACTG AGACACGCCCGACGCTCTACGGGAGGACGAGTGGGAATCTTCCG CAA TGGACGAAAGTGTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGAAGAGGCCCTT CGG GTCGTAAGTCTGTTGTAGGGAAGCAACAGTACAGAGTAACGCT GG TACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAATACGTCGCCAGC AG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATATTGGGCGT AAA GCGCGCGCAGGTGGTCTTAAGTCTGATGAAAGCCACGCTCA ACC GTGGAGGGTATTGAAACTGGGGAACTTGTAGTCAAGAGGAAAG TGG AATCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAGAACACCAG TG GCGAAGCGACTTTCTGCTGTAACGACTGAGCGCGAAAGCG TGG GGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCATAACGATGA GT GCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGCTGACGACTAACGCATT AA GCACTCCGCTGGGAGTACGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT TGA CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGAGCATGTGGTTAATCGAAGCAAC CGG AAGAACCTACAGGCTTACATCTCTGACAAACCTAGAGATAGGG CT TTCCCTTCGGGGGACAGAGTACAGGTTGTCATGTTGCTGCTCAG CTC GTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGAT CT TAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAACA AC CGAAGGAAGTGGGGTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG GG GCTACCACCTTGTACAAATGGAAGGTGACAAAGGGCTGCAAACTGG CAA GGTAAGCGAATCCATAAAGGCCCTTTCCAGTTCGATTGACGGTGG CA ATCCCTGGCTGAAACCGGAATCCCTTAAATCCGGGATAACCTTGC CC GCGGGGAATAATTTCTCGGGCCTTGGTAACACCGCCCCCTCACACCC ACA GAATTGTTAAACCCGAGCCGGGGGGGACCTTT</p>	<p>TTGGGCGTATCTGTGCATTAGGCGGGTGGCTCCATGAAGGTTA CCTCA CCGACTTGGGTGTTACAACACTCTCGTGGTGTACGGGCGGTGTG TACAA GGCCCGGSAACGTATTCACCCGCGCATGCTATCCGCGACTACTA GCGAT TCCGCTTCATGACGCGAGTGGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGA ATGGC TTATGGGATTGCTTACCTTCGACAGTTTTCAGCCCTTTGTACCA TCCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCGAGGTGATAAGGGCGCATGATGTTG ACGTC ATCCCCACCTTCTCCGTTTGTACCCGCGAGTCCACTTAGAGTG CCCAA CTGAATGCTGGCACTAAGTCAAGGGTTCGCTGCTGTCGGGAC TTAAC CCAACATCTCACGACAGGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT CACTC TGTCCCGCAAGGGAAAGCCCTATCTAGGGTGTGACAGGAT GTCAA GACCTGGTAAGGTTCTTCGCTGCTTCCGAATTAACCCACATGCTC CACC GCTTGTGCGGGCCCGGCTCAATTTCTTGTAGTTTACGCTTTCGCG CCGTA CTCCCCAGGGGAGTGTCTAATGCGTGTGCTGACGACTAAAGGG CGGAA ACCCCTAACACTTAGCACTCATGTTTACGGCGTGGACTACCAGG GTAT CTAATCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGATGATAC AGAC CAGAAGTGCCTTCGCGACTGTTTCCCAATCTCTACGAT TTCA CCGCTACACTGGAATCCACTTTCTCTCTGCACTCAAGTTCC CAGT TTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTTCCACATCAGAC TTAAG GAACCACCTGCGCGCTTACGCCCAATAATCCGGACAACGCT TGCCA CCTACGTATTACCGCGGCTGTCGACGATGATGACCGTGGCTTT CTGGT TAGTACCCTCAAGTACGAGCTTACTCTGTTACTGTTCTTCC CTAA CAACAGAACTTACGACCCGAAAGCCCTTTCGTTACGCGGGT TGCTC CGTCAGACTTTCGCTCATTGCGGAAAAATCCCTACTGCTGCTCC CGTA GGAATCTGGGCGTGTCTCAGTCCGAGTGGCCGATCACCCCTCT CAGGT CGGCTACGCATCGTCCCTTGGTGAACATTACCTCACCACCTAG CTAAT GGGCGCGGGCCCTATAAGTGGACAGCGGTAACCCGCTCT TTCCAT CTTCTCAATGCGGAAAAAAGGATTCGCCGGATTATACCTCC</p>	<p>TTAGGCGGCTGGCTCATGAAGGTTACCTCACCGA CTTGGGTTTACAACACTCTCGTGGTGTGACGGG GGTGTACAAAGGCCGGGAAGTATCCAGCGGG CATGCTGATCCGCGATTACTAGCATTCCCGCTCA TGC-AGGCGAGTTGC-AGGCTCAATCCGAACTG- AGAATGGCTTATGGGATTTCGCTTACCTTCGAGGT TTGACGCCCTTGTACA-TCCATTGTAGCAGGIGT- TAG- CCCAGTCCATAAGGGGATGATTGACGCTCATC CCCACCTTCCCGGTTTGTACCGGCGACTCACCTT AGAGTGCCCACTGAATGCTGGCACTAAGATCAAG GGTTGCGCTGTTGCGGACTTAAACCAACATCAAG CGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTC ACTCTGCCCCGAGGGGAAAGCCATCTCTAG GGTTGTGAGAGATGCAAGACCTGGTAAGGTTCTT CGCGTGTCTCGAATTAACCCACATGCTCCACGCT TGTGCGGGCCCCGCAATCTTTGAGTTTACGCT TTGCGCGCTACTCCCGAGGGGATGCTTAATG GTTAGCTGACAGCTAAGGGCGGAAACCTCTAA CACTTAGCACTCATGTTTACGGCGTGAACCTACCAG GGTATCTAATCCTGTTGCTCCCGCAGCTTTCGCGC CTCAGTGTGAGTACAGCCAGAAAGTGCCTTCG CACTGTTTCTCCAAATCTCTACGCTTTTCCAGC CTACACTTGAATCCACTTTCTCTCTGCACTCAA GTTCCCGATTTTCCAATGACCCCTCCAGGTTGAGCG GTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGAACCCCTCGC CGCGCTTACGCCAATAATCCGGAACAGCTTGC CACCTACGATTAACCGGGGCTGCTGGCAGTAGTTA GCCGTGCTTCTGTTAGTACCGTCAAGGATCA CGAGTTACTCTGCTGTTGTTCTTCCCTAACAAAG AACTTACGACCCGAGGCTTCTTCTGTTACCGGG CGTTGCTCCGTCAGACTTTCGCTATTGCGGAAAG- ATCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCG GTGCTCAGTCCAGTGTGGCGATCACCCCTCA GGTCCGCTACGATCGCTGCTGTTGAGGCCATTA CCTCACCACTAGCTAATGCGCGC- GGGCCATCTAAGTACAGCG-TAAACCGTC- TTCCATCTCTCTCATGCGAAGAAAGACGATCC GGTATTAGTCCGGTTTCCGAGTTATCCAGCTC TATAGGCAAGTTCCCGAGTGTACTCACCCGCTCG CCGCTAATCTCAGGAGGAAAGCTCCATGATTCG CTCGACTGCATGATAGTCA</p>
6 Bacteria	<p>TGCAGTGACGCAATCGASGGGAGCTTGTCCCTGAGATTAGCGGCG GACGGGTGAGTAACACGTTGGGCAACCTGCCTATAAGACTGGGATAAC TTGGGAAACCGGAGCTAATACGGATACGTTCTTTCTCGCATGAGA GAAGTGGAAAGCGTTTACGCTGTCACTTATAGATGGGCCCGGG CGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAATGGCTACCAAGGCGACGATGCG TAGCCGACTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC CACGACTCTACGGGAGGACGAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACG AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGAAGAGGCTTCCGGTCT GTAAGTCTGTTTGGGAAAGCAAGTACAGAGTAACTGCTGTT</p>	<p>CGGCTGGCTCATGAAGGTTACCTCACOSACTTCGGGTGTACAA ACTCTGTTGTGACGCGGGGCTGTGATCAAGGCCCGGGAAAGCT ATTACCGCGGCTGCTGATCGCGGATTACTAGCGATTCCGGCTT CATGCAGGGAGTTGACGCTGCAATCCGAACTGAGAATGGCTTT ATGGATTGCTTACCTTCCAGGTTTTCAGCCCTTTGTACCATCC ATTGTAGCACGTTGTAGCCAGGTGATAAGGGGATGATGATTT GACGTCATCCCGACTTCTCCGTTTGTACCGGAGTCACTCACTTA GAGTCCCACTGAATGCTGGCACTAAGATCAAGGGTTCGCGCTC GTTGCGGACTTAAACCAACTCAGCACAGGCTGACGACAA</p>	

	<p>ACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCAGGCTAAGTACGTGCCAGCA GCCCGGTAATACGTAGTGGCAACCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG TAAAGCGCGCGAGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTAAAGCCACCGG CTCAACCGTGGAGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAA AGGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGA GGAAACCCAGTGGCGAAGCGCACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGA GGCGGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATA</p>	<p>CCATGCACCACCTGTACTGTGTCCCGAAGGGGAAAGCCCTAT CTCTAGGG</p>	
9 Bacteria	<p>GGCAGATCCGTGATCATTATAAGCTGTGAGCGAATGACGGGAGCTT GC TCCCTGAGATTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGC CTA TAAGACTGGGATAACTTCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTT TT TTCTCGCATGAGAGAAGTGAAGAACGGTTTACCGTGTCACTATAG AT GGGCCCCGCGCGATTAGTGTGAGTGTGAGTAATGGCTCACCAAGG CGA CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG ACA CGGCCAGACTCTACGGGAGCGAGTAGGGAATCTCCGCAATG GAC GAAAGTCTGACGGAGCAACGCGGTGAACGAAAGGCCCTTCGGGT CGT AAAGTTCTGTTAGGGAAGCAAGTACCAGAGTAACTGCTGGTAC CT TGACGGTACCTAACGAAAGCCACGGCTAAGTACGTCGCGAGCAGCC GCG GTAATACGTAGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAAGCG CG CGCAGGTGGTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTG GA GGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAAGGAAAGTGA TTC CAAGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGAGATTGGAGAACCCAGTGGC GAA GGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACGACTGAGCGGAAAGCGTGGGG AGC AAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGT AA GTGTTAGAGGGTTCCGCGCTTGTAGTGTGACGATCAACGCAATAGCA CT CCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACG GGG GCCCGACAAAGCGGTGAGCATGTGGTTAATTCGAAAGCAACCGAA GAA CCTTACCAGGCTTACATCTCTGACAAACCTAGAGATAGGGCTTT CC CCTTCGGGGACAGAGTACAGGTTGGTGCATGGTTCGTCAGCTCG TGT CGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATGATCTTA GT TGCCAGCATTAGTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC GGA GGAAGGGGGGATGACGTAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG GCT ACCACCGTGGCTACAATGGAATGTTGTAAGGGGCTGCAAACTGGC AAA GGTAACCGAATCCCTTAAAGCATTCTCAATTCGATTGACAGGGTTG CA ATCCGCTTGGCTGAAACCGGAATCCCTATAAATCCCGGATACAC CT GGCGCCGGGGAATAAGTTTCCGGGGCTGTTAAC</p>	<p>CCTGGTGTTCAGCGACTGATGCGGCTGCGCTCCATGAAGT TACCT CACCAGCTTCGGGTGTACAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTG TGATC AAGGCCCGGAACTATTACCGCGGATGCTGATCCGCGATTAC TAGCG ATTCCGGCTCATGCAAGCGGATGCGAGCTGCAATCCGAACTGA GAATG GCTTTATGGGATTCGTTACCTTCGAGGTTTGACGCCCTTTGTAC CATC CATTGTAACACGTGTGATGCCAGGTGATAAGGGGACGATGATT TGACG TCATGCCACCTCCACAGGTTTGTACCCGCACTGTAAAACATC GACC AACAGAATGCTGAATCCTAAAACACGGGCCACACTGATGACCC AGCTC GCAAAACACCGAGGTATAGTAAGAAACACCAAGAACCTACT GACAG TCAGTACCAAGCTCGCTCAAAACCAAGGCAAGCAACCAACA ACCCA ACCAAGATGTCAAATAGC</p>	<p>AGGTTACCTCACGACTTCGGGTGTACAACCTCTC GTGGTGTGACGGGCGGTGTACAAGGCCCGGGA ACGTTATCCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTA GCG-ATTCGGCTT-CAKSCA- GGCGARTTGCARsCTGCAATCCGAA- TGAGAAATGGCTTAWGGGATTCGTTACCTTCGcCA GGTTGACAGCCcTTGTACCATTCATTGTAGCCcAC G- GKGTAGcCCAGGTCATAAGGGGgCATGATGATT GACGTCATCCCMCTTCCGTTTGTACCCGG CAgTCAMTTAGAGTCCCAACTGAATGCTGGCAAC TAAGATCAAGGTTGCGCTGTTGCGGACTTAACC CAACATCTCACGACAGGCTGACGACCAACTGCA CCACCTGTCACTGTGCCCCGAAGGGGAAAGCCG TATCTAGGGTTGTCAGGAGGATGCAAGGACTGG TAAGTCTTCCGTTGCTCGAATTAACACATG CTCCACCGCTTGGCGGCCCGCTCAATCTTTT AGTTACGCTTGGCGGCTACTCCCGAGCGGAG TGCTTAATGGTTAGCTGACGACTAAAGGCGGAA ACCTCTAACACTTAGCACTCATGTTTACGGCGTG GACTACAGGGTATCAATCCGTTTGTCCCCACG CTTTCCGCGCTCAGTGTACAGTACAGCCAGAAAGT CGCCTTCCGCTGTTCTCCAACTCTACG ATTTCCCGCTACACTTGAATCCACTTTCCCTTCT TGCACCTAAGTTCCCAAGTTTCCAAAGCCCTCAC GGTTGAGCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAA CCACCTGCGCGCTTTACGCCCAATAATCCGGA CAACGCTTGCACACTAGTATTACCGCGGCTGCTG GCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGTACCG TCAAGTACCAGAGTACTCTGTTCTGTTCTTCT CCTAACAAGAACTTACGACCCGAAGGCCCTTCT CGTTACGCGCGTGTGCTCCGTCAGACTTTCGTTCA TTGCGGAAGATCCCTACTGCTCCCGTAGGA GTCTGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGATC ACCTCTCAGTCCGCTACGATCGTCCGCTTGGT GAGCCATTACTACCAACTAGCTAATGCGCCGCG GGCCCATCTAAGTACAGCGTAAACCGCTTTTCC ATCTTCTCATGCGAAAGAAAGATATCCGGTAT TAGCTCCGGTTTCCGAAATGTTCCGACTTATAG GCAGTTGCCACGTTACTACCCGTCGCGCGC TAATCTCAGGGCAAGCTCCCGTCCGTTGCTCGA C</p>
20 Bacteria	<p>GGCGGGGAGGGATGACTATACATGCAAGTGCAGCGAATCGATGGGA GCT TGCTCCCTGAGATTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACC TGC CTATAAGACTGGGAATACTTCGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAAG TT CTTTTCTCGCATGAGAGAAGATGGAAAGACGGTTTACGCTGCACTTAT A GATGGGCCCGCGCGCATAGCTAGTGGTGTGAGTAATGGCTCACCA AGG CGACGATCGTAGCCGACTGAGAGGGTGTGATCGGCCACACTGGGACT GAG ACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTAGGGAATCTCCGCA ATG GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCTGAACGAAAGGCCCTTGG GGT</p>	<p>CCCATATTCTGTACACCTTAGCGGCTGGCTCCATGAAGGTTACCT CACC GACTTCGGGTGTACAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTA CAAGG CCCGGAAAGTATTCACCGCGGATGCTGATCCGCGATTACTAGC GATTC CGGCTTATGACGGGAGTGTGAGCGCTGCAATCCGAACTGAGAAT GGCTT TATGGATTGCTTACCTTCGAGGTTTGCAGCCCTTTGACCATC CATT GTAGCACGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCGATGATTTGAC GTCAT CCCCACTTCTCCGTTTGTACCCGGGAGTCACTTAGAGTGGC CAACT GAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTGTTGCGGGACTT AACCC</p>	<p>GTACACCTTAGCGGCTGGCTCCATGAAGGTTACCT CACCGACTTCGGGTGTACAACCTCTCGTGGTGTGA CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACATTTAC CGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCG GCTTATGCAAGCGGATGCGAGCTGCAATCCGAA CTGAGAAATGGCTTATGGGATTCGCTTACCTTCG- CAGGTTTGCAGCCCTTTGTACCA- TCCATTGTAGCACGIGT- TAGCCAGGTCATAAGGGCATGATGATTGACGTC ATCCCCACTTCCCGGTTTGTACCGGCACTGAC CTTAGAGTGCACCACTGAATGCTGGCAACTAGATC AAGGTTGCGCTGTTGCGGACTTAACCAACAT CTCACGACGAGCTGACGACAACTGACACCCATC GTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAAAGCCCTATCTC TAGGGTTGTCAGAGGATGCAAGACTGGTAAGGTT CTTCGGTGGCTTGAATTAACACCATGCTCCACC GCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCCTTGTGATTCA</p>

	<p>CGTAAAGTTCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAACCTGCTGG TA CCTTTCAGCGTACCTAACCGAAGGCCACGGCTAACCTACGTCGCCAGCA GCC GCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATATTGGGCGTAA GC GCGCGCAGGTGGTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAAC CGT GGAGGTTCAATGGAACCTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTG GAA TTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTG GC GAAGCGACTTTCTGCTGTAACCTGACACTGAGCGCGAAGCGGTG GGG AGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGT GC TAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTGTAGTGTGACGATCAACGATTAA GC ACTCCGCTGGGAGTACGGCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTG ACG GGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGGTGTAAATCGAAGCAACGC GAA GAACCTACCAGTCTTGACATCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCT TT CCCCCTCGGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCT CGT GTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCT TA GTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCGGTGACAAAC CG GAGGAAGTGGGGATGACGTAACATCATGCCCTTATGACCGGG GCT ACCACCGTGTACAATGGAAGGTACAAAGGGCTGCAAACTGGCAA AGG TAAGCGAATCCATAAAGCCATTCTAGTTCGATTGACAGCTGCAAT TC CCCTGCTGAAACCGGAATCGCTAGTAAATCGGGAATAACATGCCCGG GG GGATAACTTTTCGGGCTTGGTACCACGCGCGTTCACCCCAAGA AT TTTGAACCCCAAGTTCGGGAAGGAACCTTTCTTGAACCCGCCCC CA CGGGACAATGAAAGTTGGTGGCCCCCCC</p>	<p>AACATCTCACGACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCA CTCTG TCCCCCAAGGGGAAAGCCCTATCTAGGGTTGTGACAGAGATGT CAAGA CCTGGTAAGTCTTCCGCTGCTGCTTCCGAATTAACACATGCTCCA CCGC TTGTGCGGGCCCCGCAATCTTTGAGTTTACGCTTGCAGCGCC GTA CCCCAGGCGGAGTCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCG GAAAC CCTTAACACTTAGCACTATCTGTTACGGCGTGGACTACCAGGGT ATCT AATCTGTTTCTCCCAACGCTTTCGCGCTCAGTGTGATGACAG ACCA GAAAGTCGCCCTTCCGCACTGCTGTTCCCTCCAAATCTCTACGCAATT CACC GCTACACTTGAATCCACTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCGCCA GTTT CCAATGACCCCTCACGGTTGAGCGTGGGGTTTCCACATCAGACTT AAGGA ACCACCTGCGCGCTTACGCCCAATATCCGGACAACGCTTG CCACC TACGTATTACCGCGCTGCTGCACTGATGACCGTGGCTTTCT GGTTA GGTACCCTCAAGTACCAGCACTTACTCTGTTACTTGTCTTCCCT AACA ACAGAACTTACGACCCGAAGGCCCTTCTGTTACGCGCGGTG CTCCG TCAGACTTTCGTCATTGCCGAAAGATTCCCTACTGGCTGCCCTCC CGTA GGAAGTCTGGGGCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGGCCGATCAC CCTCTC AAGGTGCGTACGATCTGCTGCTTGGGTGAGCCATACCTTCA CCAAC TAAGCTAATGGGCCCGGGGCCCTCTATAAGTTGAAACCGTAA AACCG TCCCTTCCACTCTTCTCCCTGGCGAAAAAAGAGCTTCCCGGGT ATAA ACTCCCGGTTTCCGGAAGTTTCCCAAGTCTTTAAGGAAGGGT GTGC CCACAGGGTTATCACCCCGGTCGCGCGCTAATTCACAGGAG AAAAA TTCCCCCAATTCGCCCACTTGTGTGTTAAGGAACCGCCCA CGGT TTTTTTTTTGGGAACAGGAAAAAAGAA</p>	<p>GCCTTGGCGGCTACTCCAGCGGGAGTGTCTAA TGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCCTC TAACACTTAGCACTATCGTTTACGCGCTGGACTCG CAGGGTACTAATCTGTTTCCCGCAGCTTTCG CGCCTCAGTGCAGTTACAGACCAGAAAGTCCGCTT CGCCACTGGTTCCTCAAATCTACGATTTCA CCGCTACACTGGAATCCACTTCTCTTGCAGCT CAAGTCCCGAGTTTCAATGACCCCGCAGGTGGA GCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCACT GCGCGCGCTTACGCCAATAATCCGACACAACGC TTGCCACTACGATTACCGCGCTGCTGGCAGTA GTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGT ACCAGGACTTACTGTACTGTTTCTCCCTAACAA CAGAATCTACGCCCAAGGGCTTCTGTTGTCAGC CGGGTGTCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGTC- GGAAGATTCCCTACTG-CTGCCT-CCCCTAGGA- GTCTGGG-CCGT-GTCTCAGTCCAGTGG- CCGATCACCTCTC-AGTCCGCTACGATGCT- CGCCTT-GGTGAGCATTACCT-CACCAACTA- GCTAATGCC- GCGGGCCACTATAAGTACAGCGTAAACCGCTT TCCATCTCTCATGCGAGAAAGACGTATCCGG TATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTATCCAGCTTAT AGGCAGGTTGCCACGTTACTACCGCTCCCGC GCTAATCTCAGGGAGCAAGCTCCCATGCTGCTC GACTTGCATGATAG</p>
<p>29 Bacteria</p>	<p>CGAGAAGGGCAGTTGTCAAGAAATGGCTAGCCGTACGAGGCTTCG GTATCTAGTGGGCGACGGGTGCTAGCGCTGGGAATCTGCCCTCTG GGTCCGAAACAAGCTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATAATGACTTC GGTCCAAAGATTTATGCGCTGAGGATGAGCCGCGTAGGATTAGCTTG TTGGTGGGTAAGACTCACCAGCGGACGATCCTTACGCTGCTGAG AGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACG GGAGCGACGAGTGGGAATATTGGACAATGGCGGAAAGCGCTGATCCA GCAATGCCCGTGAAGTATGAAGGCTTGGGTTGTAAGCTCTTTTA CCCGGATGATAATGACAGTACGGGGAATAAGCCCGGCTAATC CGTCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGGCTAGCGTTGTTCCGAA TTACTGGGCTAAGCGCAGTAGGGGCTTTGTAAGTTATAGGTGAA AGCCAGGGCTCAACCCCGAATTGCTTTAAGACTGCATCGCTGAA TTGTGAGAGGTAAGTGAATCCGAGTGTAGAGTGAATTCGTAGA TATTCGGAAGAACCGAGTGGCGAAGCGGACTTACTGGACACATATTG ACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTATACCCCTG GTAGTCCAGCCGTAACGATGACTAGCTGTCGGGGCGCTTGGC GTTTCGTTGGCGAGCTAACCGGTTAAGTCACTCCGCTGGGAGTAC GGCCGCAAGTTAAACTCAAAGAAATGACGGGGCTGCACAAGC GGCGGAGCATGTTGTTAATCGAAGCAACGCGCAAACTTACCCAGC GTTTGATAGTGGAGACGGTTTCTGGAGACAGATTCCCTTCCCTACGG GACCTACACACAGGTGCTGATGCTGTGTCAGCTGAGTGTGAG ATGTTGGGTTTGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTGCTTTTGTGTTGG CTACCAATTTAGTGGGCACTTAAAGAACTGGCCGGGTGATTAG CCCGGAAGCAACGAGGATGATGTTCAAAGTCCCTCCATGGAACCG TTAGCCCGCTGGGACTTACACTTGTACTACATGTACGGGACAG GGGCCAGATCTCCGGAAGTGAACAATTTCTAAAAATGCCGGTCCCT ACAATCTCGGAACATTGTGACT</p>	<p>CACCCGCTCGGAAATCAGAGCCGAGATCCATGCTACCCTTGGCG GTTAGCAGTAGCGCTTCCGGGTGAAACCACTCCATGTTGTGAC GGGAGTGTGTACAGGCGCTGGGAACGTATTCACCGTGCATGCT GATCCAGACTTACGCTGATTCGCGCTTATGCTGCTGAGTGTGAG AGAACATCCGAACCTGAGCGGCTTTTGGGATTTGCTCACTCTC CGGATTTGCTGCCACTGTCACCGCCATTGTAGCAGTGTGATG CCGAGCGGTAAGGGCCATGAGGACTTGCAGTCACTCCCACTTC CTCCGGTTATCACCGGAGTCTTTTAGAGTGCACAAATAATGG TAGCAACTAAGACGAGGGTTCGCTGCTTGGCGGACTTAACCCA ACATCTACGACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCGTGTG TAGGTCGCGTAAGGAAGGAACTGTGCTCCAGAAACCGTCTACC ATGTCAAACGCTGGTAAGTTCGCGGCTTGTGCAATTAACCA CATGCTCCACCGCTGTGACGGCCCGCAATTTCTTGTGATTTT AACCTTGGCGGCTACTCCCGAGCGGATGACTTAACGGTTAGC TGGCCACCAGAAAGCGCAAGCGCCGACAGCTAGTCACTCATG TTACGGCTGGACTACCAGGATTAATCACTGTTGCTCCCGC GCTTTCGCACTCAGCGTCAATATGTCGCAAGTAAAGTCCGCTCCG CACTGGTGTCTCCGAATATCTACGAAATTCACCTTACACTCGG AATTCACCTTACCTCCACAATCAAGCGATGCACTTAAGGCG AATTCGGGGTTGAGCCCTGGGCTTTCACCTTAACTTACAAGCC GCCTACGTGCGCTTACGCCAGTAATCCGAACAACGCTAGGCC CCTCCGATTACCGCGGCTGCTGCGCAGGATGAGCCGGGCTTA TTCTCCCGTACTGCTATTATCATCCCGGGTAAAGAGCTTTACA CCCTAAGGCTTCACTACGCGGCAATGCTGATCAGGCTTT CGCCATTGTCCAAATTTCCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCT GGCCGGGCTCAGTCCAGTGTGGCTGATCACTCTCAAACAG CTAAGGATGCTCCCTTGTGAGCTTTAACCACCAAGCAATC CTACCGGGCTCATCTCAGCGGAAAAATTTGGACCGAAGTCC TTATCCGGGATTAACAGTCTGTTCCACTGTTGCCAACCAGGAG CAATTCACGGGTTACCCCTGGCCCCCTAAACCAAGTCC TTCCATTCATGTTAGCTGGCCCCGGCTTTGTCGGAGCTGGA ACAACCTACAAGGGCCGCGCGCTGTGCAAGATTCTGCTGTT</p>	<p>CGAGAGCTTCGGTATCTAGTGGCGCACGGGTGCGT AGCGCTGGGAATCGCCCTTGGTCCGAAACAC AGTTGGAACGACTGTAATACCGGATAATGACTTC GGTCCAAAGATTTATGCGCTGAGGATGAGCCCGG TAGGATTAGCTTGTGGTGGGTAAGACTCACC GGCGAGACTCTAGCTGCTGAGAGGATGATCA GCCACACTGGGACTGAGACAGCGCCAGCTCCTA CGGGAGGACAGTGGGGAATATTGACAATGGCC GAAAGCTGATCCAGCAATGCCCGTGTGATGAT AGGCCCTAGGGTTGAAAGCTTTTACCGGATG ATAATGACAGTACCGGAGAATAAGCCCGGCTAA CTCCGTGCCAGCAGCGGTAATACGGAGGGGG CTAGCGTTGTCGGAATTAAGGCTAAAGCCAC GTAGGGCGCTTGTAAAGTAKAGGTGAAAGCCAG GGCTCAACCCCGAATTGCTTTAAGACTGATCGC TTGAATTGTGAGAGGTAAGTGAATCCGAGTGTG GAGGTGAAATCTGATGATTTCCGGAAGAACACACT GGCAAGGCGACTTACTGGACACATATTGACGCTG AGGTGCCAAAGCGT</p>

		GGCGTGGCCCTGCGAGTGGAGTCCGTTGGCTGTTTATTTCGTAT ATTG	
<p>45 Bacteria</p>	<p>TTGGCATGGGGCAGCTATACATGCAAGTCGAGCGAGCTGATTAGTAG CTTGCTTCTATGACGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTTGGCA ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGAAACCGAAGCTAATACCG GATAGGACTTCTTCCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCT ATCACTTACAGATGGGCCCGGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAAC GGCTCACCAAGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGC CACACTGGGACTGAGACAGGCCAGACTCCTACGGGAGCGACGAGT AGGGAATCTTCGCAATGGCAAGAACTGACGGAGCAACCGCGGT GAGTATGAGGCTTTCGGGT CGTAAACTCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACGCTCG TACCTTGACGGTACCTAACGAAAGCCACGGCTAAGTACGTCGACG ACCGCGGTATACGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGC GTAAGCGCGCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGAAAGCCACCG GCTCAACCGTGGAGGTCATTGAAACTGGGGAATGAGTGCAGAA GAGAAAGCGGAATCCACGCTGAGCGGTGAAATCGTAGAGATGTG GAGGAACCAAGTGGCAAGCGGCTTTTGGTCTGTAACGACGCT GAGCGCGAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCGTGGTAGT CCACGCGTAAACGATGAGTGC TAAGTGTAGAGGTTTCCGCCCTTATGCTGACGATCAACGATTAA GCACCTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAGGAAT TGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAAG ACCGCAAGAACTTACAGGTTTACATCTCTGACAACTCTAGAG ATAGAGCGTTCCCTTCGGGGCAGAGTGCAGGTGGTGCATGGTT GTCTGCACTGCTGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGC GCAACCTTGTACTAGTGCACGATCAGTTGGGCACTAAGGTT ACTGCCGTGACAACCGGAGGAAAGTGGGATGACGCTCAATCATC ATGCCCTTACGACTGGGCTACCGCTGACATGATGGTACAAA GGGCTGAAAACCGCAGGTCAACCACTCCCTAAAACCTTTTCAGTTC GGATGAGGCTGACCTCCCTACTGAACTGGAATCCCTAAAATCCCG GATAACATGCCCGTGGAAACTTTCCCGGCTTGGTACACCCCGCG CGCACCCCAAAATTTGTACCCGAAACCGGGGAAACCTAAGGA TCACCTCAGGAGCGATTGGAATGTATTGTGGGATATATATCCCC CTATAGTACGGGTTTTTATAGAATATGAAAAGGCTAAAAA AAAAAGGATTTATACCTTTTACGGTATGTTTTGGCGGTGGGTTTTGGC CTTAATGGGGACGGGAAAGGAAATGGGTTGGCAAGGGGTTGGG GGTGGGAGAGGGGGGCCCGCA</p>	<p>GCGGAATCTGATCAGCTGAGGTTGATCTATGACGTTACATGCATA CTCTACCAGCTTCGGGTGTAACAACTCTCGTGGTGTGACGGGG GTGTGTACAAGGCCGGAACTTACCGCGGCATGCTGATCC GCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGAGGGGAGTTGCAGCCTA CAATCCGAACTGAGAATGGTTTTATGGATTGGCTGACCTGCAG GTCTTGACAGCCCTTTGACATCCATTGTAGCACGTGTGAGGCCA GGTCAAGGGGCATGATGATTGACGTCACTCCACCTTCTCC GGTTTGCACCCGCGACTTAGAGTGCCCACTGAATGCTGG CAACTAAGATCAAGGGTTCGCTCGTTGGGGACTTAAACCAACA TCTCACGACGAGCTGACGACAACATGCACCACCTGCTACTCT GTCCCCGAGGGGAACGCTTATCTAGAGTTGTGAGAGGATG TCAAGACTGGTAAAGTTCTCGGCTTGTGAAATTAACCAACA GCTCCACCGTGTGGGGGCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTCAG TCTTGACCGCTACTCCCGAGCGGAGTCTAATGCGTTAGCTG CAGCACTAAAGGGCGAAACCTCAACACTTAGCACTCATCGTT ACGGCTGGACTACCAGGATCTAATCCCTGTTTCTCCCGCAGC TTTCCGCCCTCAGCGTCACTACAGA CCTAAAGCGCCCTTCGCCACTGGTTCCTCCACATCTCTACGCA TTTCCCGCTACAGCTGGAATTCGGCTTCTCTGCACTCAAG TTCCCCAGTTTCAATGACCTCCACGGTTGAGCGGTGGGCTTTC ACATCAGACTTAAAGAACCGCTGCGGGCGTTTACGCCCAATAAT TCCGGATAACGCTGACACTAGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC GTAGTTAGCCGCTGGCTTCTGG TTAGGTACCGTCAAGGTACAGCACTACTCTGCTGTTGTTCTTC CCTAACAACAGATTTTACAGCCCAAGCGCTTCACTACACCGC GCGTTGCTCGTCAAGCTTTGCTCCATTGGGGAAGTTCCTCACTG CTGCCCTCCGAGGACTGCGGCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGC CGATCACCTCTCAGCTCGCTATGATCGTTGCTTGGTGGACCC GTACTCCCAACTAGTAAAT GCACCGGGCCCATCTGTAATGAAAGCAAAACATCTTTCATTC TTCTCATGAAGGGAAGATCTCTACGGGATTAACCTCGGTTTC CAAAATTTACCGCTTAAAGGAGTTGGCCAGGTTTATCACCCG TCCGCGCTAAGCTAATAAAAAGATTCTAACAATGCTCCACTTGA GATTAAGACCCCTCGCTTTCGCGCCCGCAAAAAAACAACA TCAATTAAAAAATTTTCCCTTCCGCTCCAAAAA AAAAAAACTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTGGGGTGGGTTGGTTTTAATTTTTTTTTTTTTAATAAATAAAT TGAAAAATAAAA</p>	<p>GCTTGCTTATGACGTTAGCGGGCAGCGGTTGAG TAACAGTGGCAACTCGCTGTAAGACTGGGATA CTTCCGGAAACCGAAGCTAATACCGGATGAGTCTT CTCCTTACGGGATGATTGAAAGATGTTTTCGGC TATCACTACAGATGGGCCCGGTCATTAGCTAG TTGGTGGTAAACGGTCAACGAGCAACGATGCA TAGCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACACTGGGA CTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGCGAGCA TAGGGGAATCTTCGCAATGGAACGAAAGTCTGACG GAGCAACGCCGTGAGTGAAGGCTTTCGGGT CGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAG AGTAACTGCTGATCTGACGCTACCTAACAGAA AGCCACGGCTACTAGTCCAGCAGCGCGGTAA TACGTAGGTGCAAGCGTATCCGGAATATTGGGC GTAAGCGCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCACCGCTCAACCGTGAAGGCTTATGGA AACTGGGAACTGAGTGCAGAAAGAAAGCGGTA ATTCCACGTGTAGCGGTAATGCGTAGAGATGTG GAGGAACACCGTGGCGAAGCGGCTTTTGGTCT GTAACGACGCTGAGCGCGAAAGCGTGGGAGCA AACAGGATGATACCTCGTGTGCAACCGCTAAA CACTGAGTGTAGGTTAGAGGTTTTCGGCTTT AGTCTGCACTTAACGATTAAGCACTCCCGCTGG GGAGTACCGTGCAGACGCTGAACTCAAGGAAT GACGGGGCCCGCAAGCGTGGGATGATGTTG TAAATCGAAGCAACCGGAAAGCACTTACAGGCT TGACCTCTGCAACTAGAGATAGAGCGTTCC CTCTGGGGACAGAGTGCAGGTTGCGATGTT GTGCTGAGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTAATG CCGCAACGAGCGCAACCTTGTACTTGTAGTCCAG CATTCAGTGGGCACTAAGGTGACTGCGGCTGA CAAAACGGGAAAGTGGGAGTGCATCAATCAT CATGCGCTTATGACTGGGCT CACGTGCTCAAGTGTGTAACAAGGGCTGCAAR ACCGGAGGTCAA-CCAATCCC- TAAACCACTCTCAGTTCGAGTGTAGGCTGCAACT GCCTACATGAAGTGAATGCTAGTATCGCGGAT CAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCGCTGT ACACCCCGCTCAGCAGCAGAGTGTGTAACA</p>
<p>47 Bacteria</p>	<p>GGGATTACGGTATGACTATACATGCAAGTCGAGCGAATGACGGGA GCT TGCTCCCTGAGATTAGCGGGGACGGGTGAGTAACGTTGGCAACC TGC CTATAAGACTGGGATAACTTCGGAAACCGGACTAATACCGGATACG TT CTTTCTCGCATGAGAGAAGTGAAGACGTTTTACGCTGCACTTAT A GATGGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGTAAATGGCTCACCA AGG CGACGATGCTAGCCGACTGAGAGGTTGATCGGCCACTGGGACT GAG ACACGGCCGAGACTCCTACGGGAGGCAAGTGAAGAACTTCCGCA ATG GACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGCTGAACGAAGAGGCTTCG GGT CGTAAAGTCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTACAGAGTAACGCTGG TA CCTTGACGCTAACCAAGAGCCACGCTAATACGTCGACGCA GCC CGGTAATACGAGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATATTGGGGTAAA GC GCGCGCAGTGGTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAAC CGT GGAGGTCATTGAAACTGGGAACTGAGTGCAGAAAGGAAAGTG GAA TTCAAAGTGTAGCGGTGAAATGCTGAGAGATTTGAGAGAACCCAGTG GC GAAGCGACTTTCTGCTGTAAGTACGACTGAGGCGCAAGCGGTG GGG AGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAGCGCTAAACGATGAGT GC TAAGTGTAGAGGTTTCCGCCCTTATGCTGACGATCAACGATTAA GC ACTCCGCTGGGAGTACGGCGCAAGCTGAAACTCAAGGAATTG ACG</p>	<p>CGAGGTATCATGTAACATTAGCGGCTGGCTCCATGAAGTTACC TCACG GACTTCGGGTGTACAACCTCTGTTGGTGTGACGGGGGTTGTGA CAAGG CCCGGGAACGATTCACCGCGCATGCTGATCCGCTACTAGC GATTC CGGCTTACGACGGGATGCAAGCCTGCAATCGAAGTGAAGT GGCTT TATGGATTGCTTACCTTCGACGGTTTGCAGCCCTTGTACCATC CATT GTAGCAGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGATGATGATTGAC GTCAT CCCCACCTTCCCGGTTTTCACCGGCGAGTCACTTAGAGTGC CAACT GAATGCTGCAACTAAGTAAAGGTTGGCTGCTTGGCGGACTT AAACC AACATCTCAGCACAGGACTGACGACAACATGCACCACCTGTCA CTCTG TCCCCGAGGGGAAAGCCCTATCTAGGTTGTGACAGAGTGT CAAGA CCTGGTAAGGTTCTCGCGTTCGCTTCAATTAACACATGCTCCA CCGC TTGTGGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTACGCTTGGCGC GTACT CCCCAGGGGAGTGTCTAATGCTGTTAGTGCAGCACTAAAGGGC GAAAC CCTTCAACTTAGCCTATCTGTTAAGGCTGGACTACCAGGTT ATCT AATCTGTTTCTCCACGCTTTCGCGCTCAGTGTGATGATGACG ACCA GAAAGTCCCTTCGCACTGTTGCTTCCCAATCTCAGCAATT CACC GCTACACTGGAATCCACTTCTCTCTGCACTCAAGTCCCCA GTTT CCAATGACCTCCAGGTTGAGCGTGGGCTTTCACATCAGACT AAGGA</p>	<p>TTAGGCGGCTGCTCATGAAGTTACCTCACGCA CTTCCGGTGTACAACCTCTCGTGGTGTGACGGC GGTGTGACAAGGCCGGGAAGCTTACCCAGCGG CATGCTGATCCGCTACTAGCAGTTCGGCTTCA TGCA-GCCGAGTGCAGCTGCAAT-CCGAAGT- AGAAATGCTTATGGGATTCGCTTACCTTCCG- AGTTTGCAGCCC-TTGTACCAT- CCATTGTAGCACGTTG-TAG- CCAGGTGATGAAGGGGATGATTTGACGCTCATC CCCACTTCTCCGGTTTGTACCGCGGCTCACTT AGAGTGGCAACTGAATGCTGGCAACTAAGTAAAG GGTGTGCTGTTGCGGGCACTAACCAACATCTCA CGACACGAGCTGACGACAACATGCACCTGTG ACTCTGTCCCGAAGGGGAAAGCCCTACTCTG GGTTGTGACAGGATGCAAGACCTGGTAAGTGTCT CGCGTGTCTGAAATTAACACCATGCTCCACCGCT TGTGGGGCCCCGCAATCTTTGAGTTTACGCC TTGCGGCGTACTCCCGAGCGGAGTGTCTAATG GTTAGCTGACGACTAAGGGCGGAAACCTCTAA CACTTAGCACTCATGTTTACCGGCTGACTACCA GGTATCTAATCTGTTTGTCCCGACGCTTTCGCG CTCAGTGTGATGACAGCAGAAAGTGCCTTCCG CACTGTTGCTTCCCAATCTCTACGCTATCAACC CTACACTTGAATCCACTTCTCTCTGCACTCAA GTTCCCAAGTTTCCAAAGACCTCCACGGTTGAGCC GTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGAAACCTCCG CGCGCTTACGCCAATAATTCGGCAACCGCTTGC CACCTACGATTAACCGCGCTGCTGGCAGCTAGT GCCGTGCTTCTGTTAGTACGCTCAAGTACCA CGAGTTACTCTGTTGTTCTTCCCAACAAGC AACTTACGACCCGAAAGGCTTCTGTTGCTGCGG CGTTGCTCGTACAGTTTGTCCATTTGGGAAGAT TCCCTACTGCTGCTCCGAGGAGTCTGGCGGT GTCTCAGTCCAGTGTGGCGATCACCCTCAGC TCCGCTACGACTGCTGCTTGGTGARCCATTACCT CACCACCTAGCTAATG- CGCCCGGGCCACTCTAATGATGACGCGTAAACC</p>

	<p>GGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGC GAA GAACCTTACCAGGCTTGCATCCTCTGACAAACCCTAGAGATAGGGCT TT CCCTTCGGGGACAGAGTACAGGTTGATGGTGTGTCAGCT CGT GTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCT TA GTTGCCAGCATTGATTGGGCACTAAAGTGACTGCGGGTACAAAC CG GAGGAAGTGGGGATGACGCTAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG GGC TACCACCGGGTACAATGGAAGGTACAAGGGGTTGCAAACTGGC AAA GGTAACCAATCCATTAAAGCCCTTTTCCAGTTGGAATTGCAGGCTG CA ACTTCCCTTGTGAAACCGGAATTCCTAATAAATCCGGGATACAACTG G CCGCGGGGAATAAGTTTCCCGGGCTTTGTAACACCGCCCGGTCA CCA CAGGAAATTTGTTAACCCCAATCGCGGGGAAACCTCTCTTGAAA AC CCCCCTTAGGGGGCAATAGGGTTGGGTGGGT</p>	<p>ACCACCTGCGCGCTTTACGCCAAATAATCCGGACAACGCTTG CCACC TACGTATTACCGGGCTGCTGGACAGTAGTAGCCGTGGCTTTCT GGTTA GGTACCCTCAAGGTACCAGGACTTACTGTGACTGTTCTCCCT AACA ACAGAACCTTACGACCCGAAGGCCCTTCTGTTACGCGGGCGTTG CTCCG TCAGACTTTGTCATTGCGGAAAAATCCCTACTGCTGCCCTCCGT AGGA GTCTGGCGGGTCTCAGTCCAGTGTGGCGGATCACCCCTCTCAG GTCCGG CTACGCATGTCGCTTGGTGAACCAATACCTCACCACTAGCTAA TGGC CCCGCGGGCCATCTATAAATGACAGGTAAACCGTCTTTCCATCT TCTT CCTGGCAAGAAAAAGCACTATCCGGGATTAACCTCCCGTTTCCCG GAAAT TACCAAGCTTTAAGCCGGTTGCCCGGGTTTTCCCGCGGGC CCGGC TTAATCAAGGGGAAGAACTCTCCGTATATCTCCCACTTTAGTTA TTA GGACGCCCGCTG</p>	<p>GTCTTTCATCTTCTCTCATGCGAGAAAAAGCAAGTAT CCGGTATTAGCTCCGGTTCCCGAAGTTATCCCACT CTTATAGGCAGGTGCCCAAGCTTACTCACCCGCTC CGCCGTAATCTCAGGGAGCAAGCTCCCGTCGATT CGCTCAGCTGCATGATATGATCAT</p>
<p>49 Bacteria</p>	<p>GGTCTATTAACTCGGGACTGTACAAGCAAGTGCAGCGAATGATTA GA AGCTTCTCTATGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAAACAGTGGG CAA CCTGCCTGAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGAAGCTAATACCGG AT AGGATCTTCTCTCATGAGAGATGATTGAAAGATGTTTCCGGCTATCA C TTACAGATGGGCCCGGTTGACTAGTTGGTGGGTAACGGCT CAC CAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGCCACACTG GGA CTGAGACACGCCAGACTCTACGGGAGGACAGTGGGAAATCTT CCG CAATGGACGAAAGTCTGACGGGCAACCGCGGTGAGTATGAAAGGC TTT CGGGTCTGAAACTCTGTGTTAGGGAAGAACAGTACGAGAGTAAT GC TCGTACTTGACGTTACCTAACGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC AG CAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGG CGT AAAGCCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGCTGATGAAAGCCACGGC TCA ACCGTGGAGGTCATTGAAACTGGGAACTGATGCAAGAAGAA AAG CGGAATCCACGTTAGCGGTGAAATCGGTAGAGATGTTGGGAACA CCA GTGGCAAGGCGGCTTTTGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCAAAA GCG TGGGGAGCAACAGGATAGTACCCTGGTATCCACCGCTAAACG ATG AGTGCTAAGTGTAGAGGTTTCCGCCCTTAGTCTGACGCTAACGC AT TAAGCATCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGTAACTCAAAG AAT TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGC AAC GCGAAGAACCCTACCAGTCTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATA GA GCGTCCCTTCGCGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGTTGTCGT CAG CTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC TTG ATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT GA CAAACCGAAGGAGGTTGGGGATGACGCTAAATCATCATGCCCTT TAT GACCTGGGGCTACCCACCTGGCTACAATGGGATGTTACAAGGGGCT GCA AGAACCAGGAGTCAAGCCCTTCCATAAAAACCTTTCTCAGTTC CG GATTGTAAGCTGGCAATCCGCTAACTGAAAGCTGGAATCGCTTAG TA ATCCGCGGATACCACTTCCCGCGGGGAAATCTTTCCCGGGGCTT GG</p>	<p>GTGAGGACTCCGTTGGTGGCATTATCGAACTTAGCTCCTTACG GTTAC TCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGTGTGACGGGCGG TGTGT ACAAGGCCGGAAAGTATCACCGGGCATGCTGATCCGCGATT ACTAG CGATTCCAGCTTACGTAGCGAGTGCAGCTACAATCCGAAT GAGAA TGGTTTTAGGGATTGCTTGGCTGACCTCGCGGTTGTCAGCCCTTGT ACCA TCCATTGTAGCACGTGTGATGCCAGGTGATAAGGGGCATGATGA TTTGA CGTCATCCCACTTCCCTCCGGTTTGTACCGCGAGTCACTTAGA GTGC CCAACCTGAATGCTGGCACTAAGATCAAGGGTTGGCTCGTTGGC GGACT TAACCAACATCTCAGCACAGGCTGACGACAACCATGCACCAC CTGTC ACTCTGTCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTAGAGTTGTCAGA GGATG TCAAGACTGGTAAAGTCTTCCGCTTGTCTGAAATAAACCAT GCTC CACCCTGTGCGGGCCCGCTTACGCTTCCCTTGTGATTTAGTCTTG CGAC CGTACTCCCGAGGCGAGTCTTAACTCGGTAGCTGCAGCACTAA AGGGC GAAACCCCTCAACACTAGCACTCATCTTTACGGCGTGGACTAC CAGG GTATCTAATCTGTTGCTCCCGAGCTTTCCGCTCAGCGTCCAG TTAC AGACAAAAAGCGCTTCCGCACTGGTGTCTCCACATCTCTAC GCAT TTCACCGCTACAGTGGAAATTCGCTTTTCTCTCTGCACTCAAGT TCCC CAGTTTCCAATGACCTCCAGGTTGAGCCGTTGGGCTTCCACATC AGACT TAAGAACCCTGCGCGCGCTTACGCCCAATAATCCGGATAA CGCTT GCCACCTACGATTACCAGGCTGCTGGCAGTATTAGCCGTGG CTTTC TGGTTAGTACCCTAAGTACAAGCAGTACTCTGCTACTGTTTC TTCC CTAACACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCACTACACGCGG CGTT GCTCCGTACAGCTTCTGCTCATTGCGGAAAAATCCCTACTGCTGCC TCCC GTAGGAATCTGGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCAC CTCTC AGGTCCGCTATGATCGTTGCTTGGGGGCGGTTACCTCACCA CTAGC TAATGCCCCCGGGGCCATCTGTAAAGGAATACCCAAAACCATC TTTCA ATCCATCCCATGAAAGGAAAAAACCTATCCGGGATTAACCTTC GGTT TCCCAAAATTTACCGCCTA</p>	<p>CTAGCTCCTACGGTTACTCACCGACTTCGGGGTGT TACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA AGGCCCCGGAAAGTATCCACCGCGCATCGTGTATC CGG-ATTACTA-GCGATTCC-AGCTT- CATGTAGGCGAGTGC-AGCTT-ACAATCCG- AACTGAGAA-TGGTTTT-ATGGGA-TTGGCTGACCT- CGCGT-CTTGCAG-CCCTTTGACCATCC- ATTGTAGC-ACGTGTGTAG-CCAGGTGATAA- GGGGCATGATGATTGACGCTATCCCC-ACCTTCC- TCCGGTTGTCAAC- GGCAGTCACTTAGAGTCCCACTAAATGCTGGCA ACTAAGATCAAGGGTTGCGCTGTTGCGGGACTTAA - CCCAACATCTCACGACAGAGTGCAGCAACCAT GCACCACCTGCACTCTGTCOCCCGAAGGGGAACG CTCTATCTAGAGTTGTCAGAGGATGCAAGACT GGTAAGTCTTCCGCTGCTCGAATTAACCCACA TGCTCACCGCTTGTGGGGCCCGGCTCAATTCCTT TGAGTTTCACTTTCGACCGTACTCCCGAGCGG AGTGTAAATCGTGTAGTGCAGCACTAAAGGGCG GAAACCCCTCAACACTTAGCACTCATGTTACGGC GTGGACTCACGGGATCTAATCTGTTTCCOCC ACGCTTTCGCGCTCAGCGTCAAGTACAGACAAAA AGCCGCTTCCGCACTGGTTCCTCCACATCTCTA CGCATTTACCGCTACAGTGAATTCGCCCTTTCT CTTCTGCACTCAAGTCCCGAGTTTCAATGACCT CCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTACATCAGACTTAA GAAACCGCTGCGCGGCTTACGCCCAATAATCC GGATAACGCTTCCGCACTAGTATCCCGCGCTG CTGGCACGTAGTAGCCGTGGCTTTCTGTTAGTGA CCGCTAAGGTACRAGGAGTACTCTCGTACTGTTTC TTCCCTAACACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCT CATCACTACCGCGGCTTGTCTGCTGAGACTTTCTG CATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCGATG GAGTCT- GGCCGCTGTCTAGTCCGAGTGGCCGATCACCC TCTCAGTCCGCTATGATCGTTGCTTGGTGGAGCC GTTACTTCAACACTAGCTAATGACCGC- GGGCCATCTGTAA- GTGATAGCCGAAACCATCTTCAATC- ATCTCCATGAA-GGAGAAGATCTATCCGG- TATTAGCTT- CGGTTCCCGAAGTTATCCAGCTTACAGCCAGGT TGCCCACGTGTTACTACCCGCTCCGCGCTAACGT CATAGAAGCAAGCTTCTAATCAGTTGCTGCGAC</p>

	<p>TAACCAACGCCGCCGGTTCCTCCGCCAGAGAATTTGTAACCCCGGA AA TTGGTGG</p>		
<p>51 Bacteria</p>	<p>CCCGGAGGGGGTATGCATGACATATGGGGTTAATCCACATCGATGT TGCTGACCTTCCGAATGCACCGGCAGTGGCCTCTGCATCCGTCATC TATCAGAAGTCTGTAACAAGGTAGCCGTAGGAAACCGGAGCTAATACCG GATACGTTCTTTTCCGCATGAGAGAAGATGGAAGACGGTTACGCT GTCACTTATAGATGGCCCGCGCCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAT GGCTACCAA GGGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGG ACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGACGATGGGAATCT TCCGCAATGGACGAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGAAGA AGGCCCTCGGGTCTGAAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAG AGTAACCTGGTACCTTACGGGTACCTAACCGAAGGCCACGGCTAA CTACGTGCCAGCAGCCGGGTAATAGCTAGTGGCAAGCGTTGTCG GAATTAATGGCGCTAAACGGCCGCGAGTGGTTCCTAAGTCTGATGT GAAAGCCACCGTCAACCGTGGAGGCTAATGAAACTGGGGAAC TGAGTCGACAAGGAAAGTGG AATTCGAAGTGTAGCGGTGAAATGCTGAGAGATTTGGAGGAACCCAG TGGCGAAGCGCAGCTTTCTGGTCTGTAAGTCACTGAGGCGCGAAAG CTGGGGGCAAAACAGATGATAGTACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA CGATGAGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTATGCTGACGCT AACGCAATTAAGCAGTCCCGCTGGGAGTACGGCCCAAGGCTGAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT AATTCGAAGCAAGCGC AAGAACCTTACAGGCTTGTACATCTTGCACACCCAGAGATAGGG CTTTCCCTTCCGGGGACAGAGTACAGAGTGGTGCATGGTTGTCGT AGCTCGTGTGTGAGATGTTGGTAAAGTCCCGCAAGAGCGCAAC CTTGATCTTATGGCAGCATTAGTGGGACTTAAGGTGACTGCC GGTGCACAAACCGGAGGAGTGGGATGACGTCAAACTCATCGCC CTTATGACCTGGGCTACCCCGTCTACAATGGATGGTACAAGGGCT GCAAACCTGCCAAGTAAAGCAATCCATAAAGCCATTTTTCAGTTCGG ATTGACAGGCTCAACTGCTGCTGATGAAACCGGAATCCCTAATAATCC CGGATAAACCAGTGGCCCGG GAATAACTTCCCGGGCTTGTAAACCCCGCCGGTGAACCCAAAGAT TTGTAACCCCGGAATCGGGGAGGAACTTATGGGACACCCCTCAT GGGGGACATATTGGGGTGTAGTCAATCAATCAATGAAGGCTTCTAT AACTTCGGCCGCTAACCGAGCCGACTAAATTAAGAAACCGCCCTT TTTTTCCCGCCCGCTACCGGAATTTGAAAGGTTATAACCCCTT</p>	<p>CCCGATAAAGGAGCAGAGGCCACTGCGGGTGGATCCGAATGTC ACAACATCGATGGATGTAACCCCATATGCCATGCCAATGAACC ATCGATCAGCTGAGCCAGGATCAAACTCTGCGATGCTGATCCGGG ATTACTAGCATTCCGGCTTATCGCAGCGAGTTGCAGCCTGCAA TCCGAACGTGAGATGGCTATATGGGATTCGTTACCTTCGAGGTT TGACGCCCTTTGACCATCTGATGACGCTGTGATGCGGAGTT CATAAGGGGATGATGATTTGAOCTATCCCACTTCCTCCGGTT TGTCACCGCGCATCTCTAGAGTGGCCAACTGAATGCTGCAAC TAAGATCAAGGTTGCGCTGTTGCGGGACTTAACCAACATCTC ACGACACGAGCTGACGACAACCTGACCACTGTCACTGTCTGTC CCGAAAGGGGAAAGCCCTATCTCTAGGTTGTCAGAGGATGCA GACCTGGTAAGTTCTTCGGTGTCTGCAATTAACCAACATGCTC CACCCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCCT CGCGCCCTACTCCCAGCGGAGTCTAATGCTGTAGCTGAC CACTAAAGGGCGAAACCTTCAACACTTACGACTCATCGTTTACG CGCTGGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTTCTCCCAAGCTTTC CGCCTCAGTGTGATACAGCCAGAAAGTGCCTTCCGCACTG GTGTTCTCCAACTCTACGCATTTCCCGCTACACTTGGAAITC CACTTCTCTCTGCACTCAAGTCCCAAGTTTCAAGTACCCCTC CAGGTTGAGCGCTGGCTTTCACATCAGACTAAGGAACCACT CGGCGGCTTACCGCCAAATAATCCGGCAACGCTTGCACCTA CGTATTACCGGGCTGCTGACAGTGTAGCCGTGGCTTTCTGG TTAGGTACCGTCAAGTACAGCAGTACTCTGCTACTGTTCTTC CCTAACACAGAATTTACAGCCGGAAGGCTTCTGTTCAACGCG CCGTTGCTCGTCAAGCTTTCGCTATTGGGGAAGTCCCTACTC GTGCTCCCGTAGGACTGCGCCGTGCTCAGTCCAGTGTGGC CGATCACCCCTCTCAGGTCGG CTACGCATGTCGCCCTGTGGTAGCCATTACTCACCACACTAGCTAA TGGCCCGCGGGCCCTTCTTAATTTAGACAGCGTAAACGCTTCTC CATCTTCTCATGGCAGAAAAGCCGATATCCGGGTTTAACTCCCG GTTTCCAAATAATCCCGCTTAAAGCGGGTGGCCACTGGTT TATCAACCGTGGGGCGCTAATTTACGGGAGGACAGCTCCCTCGA TTCTCGCAGATTTCTGTTATAGGACCGCCGATGTTCTCTTTTGG GTTGAGTGGACGAATATATCTAAAAAACCCTCCCGGAACAAA CCAAAAAATAAATAAATTC</p>	<p>GAAACCGGAGCTAATCCCGATACGTTCTTTCTG CATGAGAGAAGTGAAGAACGGTTTACGCTGTAC TTATAGATGGCCCGCGGCGCATAGCTAGTTGGT GAGTAAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC GACCTGAGAGGGTATCGCCACACTGGAGCTGAG ACACGCCCGAGACTCTACGGGAGCAGCAGTAGG GAATCTTCGCAATGGCAAAAGTCTGACGGAGCA ACGCCCGCGAAGCAAGAGGGCTTCGGGTGCTAA AGTCTGTGTTAGGGAAGAAGTACAGAGTAA CTGCTGTGACTGACGACTAACCAGAAAGCA CGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAGT AGGTGCAAGCGTGTGCGGAATATTGGGCGTAA AGCCGCCCGAGTGGTTCCTTAACTGATGTGAA AGCCACCGCTCAACCGTGGAGGCTATTGAAAC TGGGGAACCTGAGTGCAGAAAGGAAAGTGAAT CCAAGTGTAGCGGTGAAATCGTGAAGATTGGAG GAACACAGTGGCGAAGGCGACTTCTGCTGCTGA ACTGACACTGAGGCGGAAAGCTCGGAGGACAA AGGATAGTACCTGTTAGTCCAGCGTAAACGA TGAGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGT GCTGACGCTAACGATTAAGCCTCGCCGCGGGA GTACGCCCGCAAGCTCAAAAGAAITGAC GGGGCCCGCAAGCGGTGGAGATGTGGTTTAA TTCGAAGCAACCGAAGAACCCTACAGGCTTGGC ATCTCTGACAAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTC CGGGGACAGAGTACAGTGTGATGTTGCTG TGAGTGTGTGTGATGATGGTAAAGTAAAGT AACGAGGCAACCGTACTTATGTTAGTCCAGCATT AGTTGGGCACTAAGTGTGCTGCGGAGCAAC CGGAGGAAAGTGGGATGACGTCAAACTCATGTC CCCTTATGACCTGGCTACMCMGTCTACAATGG ATGTCACAAAGGGCTGCAAACTGCAAAAGTAAAG GAATCCATAGWCCATTCTCAGTTCGGATGACGG CTGC</p>
<p>59 Bacteria</p>	<p>GTGCAGTGGGGTGTATATGCACTGAGCGAAGCTGATCTAGTA GCTTGGCTTATGACGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAAACGCTGGGC AACCTGCCCTGATAGACTGGGTAACCTTCCGGAAACCGAAGTAAACC GGATAGGATCTTCTCCTATGAGGAGATGTTGAAAGTGGTTCCGG TATCACTACAGATGGCCCGCGGTGCTAGTGTGGTGAAGTAA CGGCTACCAAG GCAACGATGATAGCGACCTGAGAGGGTATGCGCCACACTGGGAC TGAGACAGCCCGCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGAAGGAATCTC CGCAATGGCAAGACTGACGGAGCAACCGCGCTGAGTGTGAAG GCTTTCGGG TCGTAACACTGTTGTTAGGGAAGCAAGTACAAGGAACTGCTT GTACCTTGACGGTACTAACCGAAGGCCAGCGCTAACTACGTGCCAG CAGCCCGGTAATACGTAGTGGCAAGGTTATCCGGAATATTGGG CGTAAAGCGCGCAGCGGGTCTTAAAGTCTGATGTGAAGCCCA GGCTCAACCGTGGAGGTTCTTGAAGTGGGAACTTGAAGTGCAGA AGAGAAAGCGGAATCCAGCTGTAGCGGTGAAATGCGTGAAGATGT GGAGGAACACAGTGGCGAAGCGGCTTTTGGTCTGTAACGTGACG TGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTATG TCCACCGCTAAACGATGAGT CTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTATGCTGCACTAACCGATTA AGCACTCCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGCTGAACTCAAGGAA TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGAGCATGTGGTTAATTCGAAG CAACCGGAAGAACCTTACAGGCTTGTACATCTCTGACAACCTAGA GATAGAGCGTTCCTTCCGGGGACAGAGTGAACGTTGGTGCATGGT TGCTGCTCAGCTGGTGTGAGATGTTGGTAAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCTTGTACTTGTAGTCCAGCATTAAAGTGGGCACTTAAGGTG ACTGCCGTGACAACCGGAGGAGGTGGGATGACGTCAAACTATC ATGCCCTTATGACCTGGCTACCAGTCTACAATGGATGGTACAAA GGCTTCAAAACCGCGAGGTCAAGCCAACTCCCTTAAACCTTTTCCAT TTGGATGGAGGCTGACACTCCCGCACTGAACTGGAATCCCTAGAA TCCCGGATAACAGTCCCGGGGAAAAATTTCCCGGGCTCTGTAACCC GCCCTTCAACCGCGAAGTTTGTACCCCGCACTCGTGGGAAACGGA AGGGATGCCCGAGTGGCCAAAGTTTGGCTTGTATAGCAAGCCCG GCCAAGAAAGACTAGCTAAAGGGCCGACCCCTTTTAAATAAAAA AAAAAATAAAGCGCGCCCGCCGACCCCGCTGTTGGTGA GGGCTTAAAGTTAAACCAACCGCGCGGCCCGCGGATGGGACTTGG CTTTGGAAGCCGAA</p>	<p>CGGAAATCTGAGCCAGCTGACGGTGTGATCTAGCAGCTTACATGC ATACCTCCAGCTCTCGGGTGTAAACACTCTCGTGAAGTGTGACG GGCGGTGTGTAAGCCCGGGGAAAGCTTACCGCGCGCATGCT GATCCCGGATTAAGCTAGCTTCCAGCTTATGAGGCGAGTGTGA GCTACAATCCGAAGTGAAGTGGTTTATGGGATGGCTTGAACCT CGCGGTCTGACGCCCTTGTACCATCTGATGACAGCTGTGTA GCCAGGCTATAAGGGGATGATGATTTGACGTCACTCCCAACT CTCCCGTTTGCAGCGCAGTCACTTGAAGTGGCCAAATAAT GCTGGCAACTAAGTCAAGGTTGCGCTGTTGCGGACTTAAC CAACTCTCACGACAGCTGACGACCAACCTGACCAACCTGTC ACTGTGCTCCCGAAGGGAAAGCTCTACTCTAGATGTGTCAGA GGATG TCAAGACCTGGTAAAGTCTTCCGGTGTCTGAAATTAACCAAT GCTCCACCGCTTGTGGGGCCCGGCTCAATCTTGAAGTTCAG TCTTGGACCGTACTCCCGAGCGGAGTGTCTAATGCTGATGCT CAGCACTAAGGGCGGAAACCTTAAACACTTAGCACTATCGTT ACGGCGTGAATACAGGATTAATCTGTTGCTCCCGCAGC TTTCCGCGCTAGCCTCAGTTC AGACAAAAAAGCGCTTCCGCACTGGTGTCTCCACACTCTAC GCAATTCACCGCTACAGCGAATCCCGCTTTTCTTCTGCACT AAGTCCCGAGTTTCAATGACCTCCAGGTTGAGCGGTGGGCT TTCACATCAGACTAAGAAACCGCCTGCGGCGCTTTACGCCCAAT AATTCGGATAACGCTT GCCACCTACGATTAACCGCGCTGCTGCACTGATGACCGTGG CTTCTGTTGTTAGTACCGTCAAGTACAAGCAGTACTCTTGTACT TGTTCTCCCTAAACAGAGTTTTTACGACCGAAAGCCTTCACTA CTACCGCGCTGCTGCTGCTAGACTTTGCTCATTGCGGAAGAT TCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGCCGTGCTCACTGTC CAGTGTGGCCGATCACCTCTCA GGTGGCTATGATGCTTGTGTTGGTGAACCGTACCTCCCAAC TAGCTAATGGCCCGCGGCTCTGTAATTTGTAAGCAACAAAC CATCTTTCAACCTCTCCCGTGAAGGGAAAAAATCTTCCGGGTT TAGCTCGGTTTCCAAAAATCCCGATTTAAAGGGGGGTTGCC CCCGTGTTTTCAACCGCTCTCCCGTAAAGTCTTATAAAGACTCT TAAATTTGCTGCGCATGGTGTG TTTAAAGACTGCCCTTTTTCGCCGACCAAGCAATCATATT ATGCATAAATTCAAAAAACCCTCCCGGATCAATAAACCAATAA</p>	<p>GTGCAGCTCCAATCCGAAATGAAAGGTTTTAAG GGATTGGCTGACCTCGGGTTTACGACCCCTTGT ACCATCCATTGTAGCAGCTGTGAGCCAGGCTATAA GGGGCATGATGATTGACGCTATCCCGCCCTTCTC CGTGTGTGACCGGAGTCAAGTATAGAGTCCCGCA CTTAATGCTGCAACTAAGTCAAGGGTTCGCGCTG TTGCGGACTTACCAACTCTCACGACAGCAAGT GACGCAACACTGACAGCTGTCACTGTGTCGCC GAAGGGGAACGCTCTACTCTAGATGTGTCAGAGG ATGTCAGACTGTAAGTCTTCTCGGCTGCTGTCG AATTAACCACTGCTCCAGCGTGTGCGGGCCCG CGTCAATCTTGTAGTTTACTGCTGCGACCGTCA TCCCGAGCGGAGTGTAAATGCTGTAGTGCAGC ACTAAAGGGCGGAAACCTTCAACACTTAGCACTA TGTTTGGCGGTGAGTACCAAGGATGATCAATCT GTTTGTCCCGACTTGGCGCTCAGCGTCAAGT ACAGACAAAAAGCGCCTTCCCGCACTGGTTCCT CCACATCTCAGCACTTCCAGCGTACAGCTGGAAT TCCGCTTTTCTTCTGCACTCAAGTCCCGCAATTT CAATGACCTCCAGCGTGTGAGCGTGGGCTTTAC ATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGGGGCTTTACCG CCAATAATCCGATAACGCTTGCACACTAGATATT ACCGCGCTGCTGGCAGTGTAGCCGTGGCTTT CTGTTAGTACCGTCAAGTACAAGCTTACTCT GTACTGTTCTTCCCTAACACAGAGTTTTACGACC CGAAAGCCTTCACTACCGCGCTTGCCTCGT CAGACTTTCCTCATTGCGGAAGATTCCTACTGCT GCTCCCGTAGGACTGGGCGGTGCTCAGTCC AGTGTGGCCGATCACCTCTCAGCTGCGCTAGCA TCTGCTGTTGGTGGCGTACTCACCAGTACG TAATGACCGCGGGCCACTGTAAGTATAGCGC AAACCTTCTTAATCACTCCCACTGAAGGAGAAGA TCTATCCGGTATTAGTCTGGTTTCCGAAAGTAT CCAGTCTACAGCGAGTGGCCAGCTTACTCA CCGCTCCCGCTCAAGCTATAGAAAGCAAGCTACTA</p>

<p>60 Bacteria</p>	<p>GGGAATGTGCCGGGGTCTTAAACAGTGCAGTCGAGCGGAGTAGCCG TAGGGGTACTCGACCGCGCAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAATCTG CCCCGTGGCTTTGGGATAGCCACCAGAAACGGTATTAAACCGGATAC GACCACCTTCTGCATGGGATGGTGGAAAGTTTTTCGGCCAGGGAT GTCTCGCGGGCTATCAGCTATGATGGTGGTAAATGGCTCACATG GCTTCGACGGGTAGCGGCTGAGAGGGTGACCGGTACACTGGGA CTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACAGTGGGGAATATT GGACAATGGCGGAAGCTGATCCAGCAACGCCGCTGAGGGATGA CGGCCCTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTG ACGGTACCTGACAGAAAGACCCGGCCACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGTGGAGCGTTGTCGGGAATATTGGGCGTAAAG GGCTCGTAGGGGCTGTGCGGCTGGGAGTGAAACCAGTGCCTTAA CACCTGGCTGCTTATACGGGCAGACTAGAGGTATTACGGGGAGAA CGGAATCTCGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACAGGAGGAACA CCGGTGGCAAGCGGTTCTCTGGGAATATCTGCAGCTGAGGAGCG AAAGTGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACACCCG TAAACCTTGGCGCTAGTGTGGGTCATTCCACGGATTCCTGGCC GCAGCTAACGCATTAAGCGCCCTGGGGAGTACGGCCGACGGCTA AAAGCCGCTCAATCGAATGGGGTCAACCGACCCAGTAAATCGGATC TATTCGATGCAGCGAAGAACTACCTGGTGTACTACCCCTGCGGCT CAGAGATGGGCTCTTGGGGTGTACGGTGTGCTGGCTGTGCCAC TGCTGTGATGATGGGTAACTCCGACGAGCCAACTCGTTCAT TTGCCACACGTATTGGGGGATCATAGAAATCCGGGCTACTCGAA GAAGGGGGGATGACTCCAGTCTTCTGCCCTATGTACGGGCTTCGCG TGCTACTGGCGGCAATGGCTGCGATTCAGGGGGAACAATCCA AAAGCCGCTCAATCGAATGGGGTCAACCGACCCAGTAAATCGGATC CTTAAATCCAAACCCCTGGGGAACTCCCGGCTTAAACCC GCCTTACATAAAATCGAAACCTAACCGGGCCAACTTGGAAAGGA CCCCAAGGGCGGAATGCAACAATAAAAGGCTGATTCTGCTCTTTT TTATATTCTTTATTTTCTTCTTCTGCTGTTTCTC</p>	<p>ATAAAAAAAAAACCCGCCCCCTTTTTTTTTTTTCCATTT CCCCCAAAGGGGC</p> <p>GGGATTTTACGGACCGACTTGGAGTCCGTCGGAAGGTGAT AGGGTCCCGGCTTCGGGTGTTCGCGACTTTCGTGAGTGAACGGG CGGTGTGTACAAGCGCCGGAACTTACCGCAGCGTGTCTGA TCTGGATTAAGTACGAGTCCGACTTATGGGTCGAGTGCAGA CCCCAATCCGAAGTACGAGCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCCTT ACGGGATCGACGCCCTTTTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAG CCCTGGACATAAGGGGCATGACTTACGCTCATCCCACTTC CTCCGAGTTGACCCCGGAGTCTCTATGAGTCCCACTTACG TGCTGGCAACATAGAAGCGGGTTCGGCTCGTTGCGGACTTAA CCAACATCTCAGACACGAGTACGACAGCCATGCACCCTGT ACACCCCAAAAGAGCCCTTCTGAGCGCGCAGGGTGTATGT CAAACCCAGGTAGTCTTCTCGGTTGATCGAATTAATCCGATG CTCCCGGCTTGTGCGGCCCTCGCAATCTTTGAGTTTATG CTTGGCGGCTACTCCCAAGCGGGGCGTAAATGCGTTAGCTG CGCCAGCGAATCCGTGGAATG GACCCCAACACTAGCGCCCACTTTACGGTGGACTACACGGG TATCTAATCTGTTCGCTCCCACTTTCGCTCCAGCGTCAAG ATATCCAGAGAACCCTTCCGACCGGTTGCTCTGATAT TGCGCATTTACCGCTACACAGGAAATCGGTTCCCTGAATACC TCTAGTCTGCCGTATCGAAGCAGCCAGGTGTAGCACTGGTTT CACTCGACGCGACAGCCGCG TAGACCCCTTACGCCATAATGGACAAGCTGCACCTACGTAT TACCGCGCTGCTGGCAGTATTGCGCGGCTTCTTGGCGGTA CGTCACTGCGCTGTGCTGTAAGAGGTTACACCGAAGCCGTC ATCTCAGCGGGTGTGATCAGCTTCCGATTTGCATATTTCCA CTGCTGCCCGTAGAATCTGGCCCTGCTCAGTCCAGGTGACGGG CACCTCTCAGCGGGTACCGTCAAACCTGGTGGCATTACTCCA TCAGCTGAAGCGCCGAGCAATCTGGCAAAACTTCCCGCTCC TGCGAAAGCGGTACCGGATATCAGCTTCCGGGCTTCCAAAGCC GGGAATTTCCCGTTTTCCCGTTCCCTCGGAACCCCAAGGCC TTCCCTCACTGAATGTTAAACCCCGCTTCCCGGGCCGGGAAA TTAAAGTGTGGCTGTTGCTGCGCGCTTACACTCTGCTGCTGT CGTGTGTGTTTGGTCTGTTTTGTTTTTCTTTTGTGCG</p>	<p>ACGTGAGTAATGCCCTGGCTTTGGATAGCCAC CGGAACGGTGAATAACCGGATACGACCCTTCT CGCATGGATGTTGGTGAAGTTTTTGGCCACGG GATGTGCTCGCGGCTATCAGCTATGATGGTGAAG TAATGGCTCACATGCTTGCAGCGGTAGCCGGC TGAGGGGTGACCGGTCACACTGGGACTGAGACAC GGCCAGACTCTCAGGGAGGACAGTGGGGAAT ATTGACAATGGGGGAAGCTGATCCAGCAACG CGCGTAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCT CTTTCAGCGGACGAAGCGCAAGTACGGTACCT GCAGAAAGACCGCCCACTACGTCCAGCAGCA CGCGTAATACGTAGGTGCGAGGGTGTGCGGAA TTATTTGGCGTAAAGGCTGTAGGGCTGTGCG CGTGGGATGAAACAGGCTGTTAAACCTGGC TTGCTTATACGGGCAAGTACGAGTATTACGGG AGAACGGAAATCTGTTGTAAGCGTGAATCGCA GATACGAGGAAGAACCGGTCGGCAAGCGGTTCT TCTGGAAATCTGACGCTGAGGAGCGAAGGT CGCGTAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCT CACCGTAAAGTGGCGCTAGGTGTTGGGTTCCAT TCCACGGATTCGCTGCCGACGTAACGCAATTAAG CCGCCCTGGGAGTACGGCCGACGGCTAAACTCA AGGAATTGACGGGGGCCGCAACCGCGGGAGCT GGGATTTATCTGATGACGCGAAGAACTTACTCTG GTTGACTACCCCTGCGCTCAGAGATGGGCTTCTT GGGGTACGGTGGTCTGGCTGCTGCCACTCGTG TCTGAGATGTTGGTAACTCCGACGAGCGCAACC TGCTCATGTTGCCACAGTATGGGGGATCATAG AAATGCCGGGCTACGAAAGCGGGGATGACTC CAGTCTTCTGCCCTATGTCAGGGCTTCCGCTGCTA CATGGCCGACATGCTGCGATCCGTAGGGGAA CAATCCAAAGCCGCTCAATCGAATGGGCTGCA TCGACCCATGAATCGGATCTTAAATCCAAACCCA CCCTGGGGAAACCTCCCGGCTTAA</p>
<p>61 Bacteria</p>	<p>CGAAAGGGGGAAGCGTATTACATGCAAGTGAACGATGATGCCG TATGCTGGTGGATTAGTGGCGACCGGTTAGTAACACGTGGGTATC TGCCCAACCTTTGGGATAAGCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGAT AGTACCTGCTCTGCTCATGGGGTGGTGGAAAGCTCCGCGGTTGG GATGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTTACCA AGCGGACGACGGGTAGCGGCTGAGAGGGGACCGGCCACACTGG ACTGAGACACGGCCCGACAGCTCTACGGGAGGACAGTGGGGAATA TTGCACAATGGCGCAAGCTGATGACGCGACCGCGTGGGGATG ACGGCCTTCGGGTGTAAACCTTCTTACCAGGGACGAAGCGTGAAT GACGGTACTGGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGGTGGAGCGTTGTCGGAATTAAGGGGTAA GAGTTCGTAGCGGTTGTCGCGTCTGCTGAAACTTGGGCTTAA CTTAAAGCGTGGCGGATACGGGCAAGCTTGAAGTACAGGGGAG ACTGGAATCTCGTGTAGCGGTGAAATCGCAGATACAGGAGGAA CACCGGTGGCAAGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGACGCT GAGGAACGAAAGCGTGGTAGCGAACAAGGATTAGATACCTGGTATG CCACGCTGTAACGGTGGTACTAGTGGTGGTCTTTTACGGGAT CCGTGCGGTAGCTAACGATTAAGTACCCGCTGGGAGTACGGCC GCAAGGCTAAACTCAAAGGAATGACGGGGCCCGCAACGGCGG GAGCATGTGATTAATCATGACCAACGGAAGAACTTACCTGGGTTT GACATACACGAAAGCGGACAGATGTCGCCGCCCTGTGGTGGT GTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTGAGTGTGCTGATGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGTTGGTCCAGCACGT TATGTTGGGACCTCGCAGGAACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAG GTGGGATGACGTCAGTCAATCATGCCCTTATGTCAGGGCTTCCCA CTTGTACAATGGCCGGTCAAAGGGCTGCGATCCGCTGAGGTGGAG CGAATCCCTTAAAGCGGCTCGAGTTCGATGCGGGTGTGCAACCG ACCCCGGAAATCCGAAATCCCTAATAATCCAAATCAACAACCTCGC GGGAATACITTCGCGGGCTGTAAACACCCGCTGTCCCTCAAGAA TTGGGAAACCCTAACCCGGGGTCAACCCCTGGGGAGGAGCC CCAGGGGGGATGGGCTTGGGACAAATCCCAAGGTTAGCTTA ATTATTTAGATAGATGATATGACTTAATATACTTAAGCTA TATTATCTACAGTATTCACTGATTATATACATTTATCTGCTC</p>	<p>GGCACTAACCCCTTACAAAGCGGCTCCCAACCAAGAGGGATT TACCCCGGCTCCGGGGTTCACCTTTCATCAGTGCAGGGGG GGGTGAACAAGCGCCGGAAGCTATCCCGGACCGTGTCTAATC TGCAATTAACCGACTTCAACTTCCGGGGTCAAATGTCAAACCC CGATCAAACCTAAACCGGTTTTAAGGAATCCCTCCCGCTCAGCG TATCCAGCCCTGTACCGGCG ATTGAACCATGTTGAAGCCCTGAACATAAGGGGATGGAACTTG ACGCTTCCCACTTCCCAAGTTAAACCCGGCAGTCTCTGCA AGTCCCACTTAACTGCTGCAACACAGGCAAGGGTTCGCTG CGTTGCGGAATTAACCAACATCTCAACAACAAGCTAACAACAG CCATGCAACAACCGGTACCAACCAAGGGGGGCAACTTCTGCTG CCGCTTCTGGGGAATGTCAA CCAGGTAAGGTTCTCCGTTGCATCAAAATTTCCACATGCTCC GCCGCTTTCGGGGCCCGCTCAATCTTAAAGTTAAAGCCTTG CGCCGCTACTCCCGAGCGGGGAACTTATGGTGTACTACGGAA CGGATCCCGTGAAGAAAGCCCACTTGAAGCCACCGTTTAA CCGGGAATACAGGGAATCTAATCCGGTCTGCTACCCACGCTT CTTCTCACCCTCAGTACTACCAAAACCCGCTTCCGCGCGG GTTCTCTTAATCTGCGCTTACCGCTACACCGAATTCAGT CTCCCTGAAGACTCAGTCTGCCGATTCGCCAAGCTTAAAGTAA CCCCAAGTTTCAACAACAACCGCAACCGCTCAACTTAAACCCA GAATTCGACACGCTCGACCTACTATTACGGCGCTGTCGACGA ATTGGCCGGCTTCTCAGGTACGCTCAGCTTCTGCTGCGGGA AAAAGTTTACACCGAAGCGCTCATCTCAGCGGGTCTCGATC AGGTGCCCATGGGCAATTTCAATGCTGCTCCTGATGATCTGG CCGCTCAATCCAGGGGGCGGCTCCCTTACGCCCTACCGTCTC CCTTGTAGGCATACCAACAGCTGATGCGGGGCTTCCAA CGCGGATTTTCAACCCCTGCAAGCGGTTCCGATAAACCAGT TCCAGTTATCAAGTTGGGCAATC CCCCGTTATCCCGTTGCCAAATCCAGGAATGGAATTTTCAT TGAGTTAAACCCCGTTCCTCAACAAGAACTAAAGGGGT GGTGTGTGTTGCTGTTTTAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTG GTGTTGCGGGGCTCTGTTTTGTTT</p>	<p>-</p>
<p>62 Bacteria</p>	<p>TGCATAACGCTCGTATAGTGCAGTGTACAGGTAGCCGTTGAGCGT ACACTTGGCGGCGAGCGCGGACCGGTTGAGGAATGCTGCGAATCT GCCTTTTTGGGGGATAACGTAGGAAACTACGCTAATACCCGATA CGACCTAC</p>	<p>TGAGTACGCGACGACTATGATGATCCTGTACAGGATCAAACTCA CAGTCTTCTGTGCAACAACCTCCATGGTGTGACGGCGGATG TGTACAAGCCCGGGAAGTATTACCGCAGCAATGCTGATCTGC GATTACTAGCGATTCGACTTATGAGTGCAGTGCAGACTCCAA</p>	<p>TTCTGGATTTGGTCCCGCTCGCGGGATGTCAGCC CTCTGCTTCCCGATTGATGATGCTGGGTAGCCCT GGCCGTAAGGCCATGATGACTGACGCTATCCCG ACCTTCTCCGGTTGTCACCGCGGCTCTCTTAGA</p>

<p>2 Bacterial/ Gen <i>oxzB</i></p>	<p>ACGGACTGCCATCCATCACGTTTTTGAAGCTTTGACCAAAAGCCGA ATCGTGCCAATGGACTTGTGTTTAAAAAACTGCAGGCAAACTCCCT TTCTTCAAGCTTGTGCGCAGCTGAAAGGCTGGCTAATACCACGCCC TTTTTCATTTTTTTATCATAATGGAGATCCCTCCGAAATCATGTTA GTCCTTCAGCTGCCATGGTATGAACCATTTTATCCTCCCTACCTTAG TGACAGGCTATCCCTGAGTCTCAAGCACGGCTAATGGCGTTCCCCC CCCGTCTGCCCTGTTTCAACATGGC</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>51 Bacterial/ Gen AC3R (1)</p>	<p>TCGTAAACCAGCGAGTGGATGCTTCAATCTTAGCCATAATATCCGCT TGGGACGAATCAGCTGGAGCTTCTGCATATAAATCTTAAAACTCCAA GACGGAAACCATGAATATGTCAGAAATGGCGTGGCGCCGATGGC ATGGTACCCTGTCAGGAGGCGACATCTTTGAGGAATCGAACGAAAA GGCTTCGCTTAAAGAAAAACGTTAGAAATCAAAAAGAAAGAAATCGG GGCCATGGAATAAAGAGTATGATGATGCTGCTGTTGAGACATCC TGCAAAAATCATCCCGATGCTGGATCAGGTAAAAAAATGAGCTGGC ATCGCCGG</p>	<p>CCGTTTTTCTCTTCCATCATTTTCTCTCTTGTGCAAGCGGACA GACTTTTCGTTGATGCTCAAAGATGCTCCCTCCGGAAGCGGG GACGGTGGGATCAGCCCCCTTCCATTTACCAGCTGGGTTTTGGG GCCAGGCCCTAATTTTTTGAACAAAGGCAGAAATGTTCCGGAG GATCGTCACAAGGGGAGCGGCTTTCTGGATTGAAAAATATCCCAAT GAGGGTTTTTAAATCCGAACGCCAAAGTTCAITGACTTTTGTGA CCCCTTCCATGATTAACCGCTCACCCCTTCCCCACGGGACGC CGTATCAACAAGCGGATGGCAATTTGGCCCTCATCGGAAGAGG TGGCATTCTCCATTTATCCAGGTAGGGGGGTTGACCTCCCG GAAAATCCGCTTATGATCTGTTCTTTAGCGGTTCAAGGCGATTCT TGATCAAACTCGGAGATGATGCTATATACTTTTCCAGGGATG TGCAGAGGTGGCAATCCTCAACGACTTTTCACTCCCAACCTT ATCGATTGCTCATGAGCTCAATGATATCCCTTGGGAACACACCC CAGAAAATGACCATCTCATATTTCCCTGAATTCAGTGAGCGCT CAATGCATG</p>	<p>-</p>
<p>1 Bacterial/Gen <i>arsB</i></p>	<p>TTTTTTGAATGGGCACTTTCCATATGGCAAGAGGCGCAAGGAAA TGGAGTAAGGATGTTGTGAATGTGAGCATTCCCGAAACCTTAGTTT GGTTTTCTCCAAATGACCGAACCCCTCCATCTTAACTCCTATTGTA TTGGCCATGGTTCGAAACTTGAAGGTGGAAGAAAGAAATGATCTCCCA TTATATCGCAAGTGGTTTTATGCGGACACTACTTTCTCCGCTTGT GGTAAATAAATGGTCAACATTGTTACTGGTACTTTTTGAAATCGGG TTTTTGAATTTGCTCTAGAATGATCATCCCAACCTGCTTTCATTATTA TCAACATCCTGATATATATTTGACTTTTTACATATCATTCCAAAAAT ATGATATGTTCAACGAAGAAACCTTCCATGCCATCCTGATGAAAAATG TTCCGCTTTTTGGGACTGTTAGGTGTTCTGCTGGATGGCTATTTTTA TCAGTGAATTTTTACCTTTCCCGAACCCCTCTTTTCCCGCCCTTTG TCCCCTGATCTCCCTCCCTTGTATGGGGAGGAGAAATCCCGCGGG GTCAAAACAAAACCTGATATAAAAAGGCCAACCTGGGTCATCGTCT TTTTCTCCATTGGTATGGAACCGGGGGGGCCCC</p>	<p>CTGGACTTCTTACGCCAAGGAAAAAATCCGACCTGACTG GATGATGATACCGGAATGTTGAAAAATTTTTGTTAAAAATACCCA CCCCACAACCCCTAAAAATCCCGACGGCGGAAACATTTTTCC CATTTCGAATGGGATGACTGGCTTCTCCATTGAGCCCTATCATA ATTCTCCGAATGCTTCTTGAAGTACAATAATACAGGATGCG TTGCTGCTAATGAAAAAGGTTGGGAACGATCATTCTAGAGGCAAA CTCAATAAACCCGATATCAAAAAGTACGAGAAACATGTTGACCA GATTACTACCACAAGCGTAAGGATGATGAGCCGCCATAAAC CCCTCGCGATGATAAATGGGAAGATCATTCTCTTCCACTTCCAG TTTGAACCATCCCATACAATCGGATTAAGATGAGAGCTGCTC CGTCTTTTGGGAAAGCGGACTATGGCTCCGGAATGGTCA CATAACAAACATTCTTACTCCATTCTTTGGCCGCTTGGCCAT ATGTAAGGCTGCCATCAAGAAACCAATTTTCACTTAAATCAA AGAAATAATGATAATAGCAATGAAACGCCACCTTTGCGTCCCAAG CGATGTTCCACCAA</p>	<p>-</p>
<p>2 Bacterial/ Gen <i>arsB</i></p>	<p>TGCATGGGATCTGCTTATCATTATTTCTTATTAGATGAAATG TTTTCTTGAATGGCAGCCCTGCATATGGCTAGAGCCGCTAAGGAA AT GGAGTAAGGATGTTGTGATGTGAGCATTCTCGGTCCTTAGTCGCT GC GTTCTTTGCAATGACGGAGCCGCTCTCATTTTAACTCCGATTGTTTG G CGATGGTTCGAAACTGAAGTTAGAAGAAAAATGATCTTCCATTTAT C ATCGCGAGTGGTTTTATGCGACACTACATCCTTACCCTTGTGGTA AG TAATCTGGTCAACATTGTTCTGCTGACTTTTTGATATCGGGTTATG AGTTGCGATCTAGAATGATCGTTCCCAACCTGTTTTTATTAGCAGCAAG C ATCCTGGTATATTTGACTTACGAAAGAGCATCCGAAAGAAATTAG A TATGGCCCAATGAAGAGCCAGTGCATGCCATTGGGATGTGAAAT GT TTCCGCTGCTGGGATTGTTTAGCGCTTCTGTTGGTAGCTACTTTAT C AGTGAATTTTTGAACATCTCCTGATCCATCATTGACAGGTGTTATCGCA T ATTCTCTGTTTATGGCAAGCAGGATCCAGCTGTTAATACCAAGACC G TTGTAAAGGCGCACCATGGCGGATGTTGTTTTTCCATTGGGATGT AC CTGGGGGTAAACAGCCCGGGAAATAAAAAATAGATATGTGAA</p>	<p>AAGGTAGGGGGAAGCAATACGATGCTGCGCTTTACAACG GTCTT GGTATTACAGCTGGACTGCTTCCGATAAACAAGAAATATG GCGA TAACACCTGCAATGATGGATACAGGAATGTTCAAAAATCCTACTGAT AAAA TAGCCTACCAACAGAATGCCATAAACAATCCAGACAGGCGAAAC ATTTT CACATCCCGAATGGCATCGACTGGCTTCTCAATGGCCATATCA TAAT TCTTCCGAAATGCTTCTTGAAGTACAATAATACAGGATGCTT GCT GCTAATGAAAAAGGTTGGGAACGATCATTCTAGATGCGAACTCAA TAAA CCCGATATCAAAAAGTACGAGAAACAATGTTGACCATTACTT ACCA CAAGCGGTAAAGATGATGCTGCTGCAATAAACCCACTCGCGATGA TAAAT GGAAAGATCATTCTCTCTTAACTCAAGTTTCAAGCATGCGCA ATAC AATCGGAGTTAAATGAGAGCGGCTCCGCTATTGCAAGAACGC AGCGA CTAGAGCACCGAGAATGCTCACATACACAACATCCTTACTCCATT TCCC TTAGCCGCTAGCCATATGCAAGGCTGCCATTCAAGAAACCAA TTTC ATCTAAAATCAAGAAATAGATAATAGCAATGAACGCCAACGTC GCGT TCCAGACGTGTTTCCCCACAAAAAGGGGCTGAAACTGACCC TGAGG CTCTTAAGCATGGTGCAGCAACAAGATTAGACCCGCTCGGAGA CTACG CCTATATACATAGTTGCTATGTGTACAGAAGTCCACCCCTTGT GCTT GCCTTACCAGGATTAATCCACTCCACCTTAGCAGACTAAC</p>	<p>CGGGCTTGTACCCTCAGGTACATCCCAATGGA GAAAAACACAATCGCCATGGGCGCCTTTTACAAC GGTCTTGGATTWACAGCTGGACTTCTGCTTCCCAT AAACAAGAAAGATGCGGATAACACCTGCAATGAT GGATACAGGAATGTTAAAAATCAGTATAAART GCCTACCAACAGAAYGCTAAAAACATCCAGACAG GCGAAACATTTTACATCCGGAATGSCATGACTGG CTTCTCAATTGGGCCATATCATAATCTTCCGAATG CTTCTTCTGAAGTACAATAATACAGGATGCTTG CTGCTAATGAAAAAGGTTGGGAACGATCATTCTAG AKGCGAATCAATAAACCCGATATCAAAAAGTCAAG CAGAAACAATGTTGACGATTACTTACCACAAGCG GTAAGGATGATGTCYGAATAAACCCACTGCGCA TGATAAATGGAAGATCATTCTCTTCACTTCAA GTTTGAACCATCGCAAWACAATCGGGATTAATAA GAGAGCGGCTCCGCTATTGCAAGAAAGCAGCGCA CTAGRGCACCGAAGTCTCACATACACAACATCC TTACTCCATTTCCCTTRGCGCTTAGCCATATGCA GGGCTGCCATCAAGAAACCAATTTTCACTTAA TCAAGAAATAATGATAAAGCAATGAACGCCAACGT CGGCTTCCAGACGTG</p>

<p>3 Bacterial/ Gen <i>arsB</i></p>	<p>TCGGGGCCCGTTCTGGTGAATATCATGTATCGCAGCATATATTAGA TG AGATTGGATTTTTGAATGGCAGCAGCTGCATATGGCTAGGGCGGCTA AA GGAAATGGAGTAAGGATGTTTGTCTATGTAAGTATTCTGGTGCCTGTG T GGCTGCCTTTTTGCACACGATGGAGCAGCCCTTATCCTTACACCGAT TG TATTAGCAATGGTTCGTGCCCTTAAAGTTTAGTGATAAAATGATTTTTCCA TTATCATAGCTAGTGGTTTTATTGCCGATACAACCTCTTACCTTTAGT GTAAGTAACTCTGTAACATTGTGTCGCGAGACTTTTTCAATATCAGT T TTATCGAGTTTGCATCAAGAATGATCGTACCAGACCTTTGCACTGGT T CAAGTATCTGGTTTTATATCTGTTTTTCCGTAAGAGCATTCCGAAAA A TTATGATGATCACAATAAAAAACCATTAGAAGCCATTAAAGACCAAA AGATGTTTCGGTTATCTGGATTGACTAGGAATTTTACTTATTGGTTAT TTGCAAGTGAATTTATTAGAGTACCCGTTTCCATTATTGCAAGCATTG T CGCTATTTTCTCCATGATGGCAAGAAAAAGTTCAGCAATTAACACC A AAACAGTTATCAAGGTGCACCATGGCAATCGTGTCTTCAATTGG C ATGTACCTGGTGTACCCGGCCGGA</p>	<p>AAGGATGGAGGATACAAAAAAGGATCATGCAAGCCACTATATGAT AACT GTTTTGGTGTAACTGCTGAACCTTTCTTGCCATCATGAGGAAGA AAAT AGGCCAATAACGCTGCAATAATGAAACGGTACTCTAATAAATCA CTTG CAAAAACCAATAAGTAAAACTTCTAGTACAATCCAAGATAACCGA AAC ATCTTTTGGCTTTAATGGCTTCTAATGGTTTTTAAATTTGTGATACA TC ATAATTTTCCGGAATGCTCTACGGAAAAACAGATATAAAAAACAAGA TAC TTGCAACAGTGCAGAAAGGCTGCTGACGATCATTCTTGATGCAAAA CTCG ATAAAACTGATATTGAAAAAGTCTGCGACACAATGTTTACAAGATT ACT TACCCTAAAGTAAAGAGTTGTATCGGCAATAAAAAACCACTAGCT ATGA TAAATGAAAAAATCATTATACACTAACTTAAAGGCAGAACCAATT GCT AATACTATCGGTGTAAGGATAAGGGCTGCTCCATCGTTTCAAAAA AGGC AGCCACAAGAGCACCAAGAATACTACATAGACAACATCTTACT CCAT TTCCTTAGCCGCCCTAGCCATATGCAAGTGTGCCCATCAAAAA TCCA ATCTCATATAATAGAGAAATATGATAATGGCTATGAATGCTAA TGT TGCATTCCAGACGATGTTCCACAACCCGGGAC</p>	<p>TTTTGGTGAATGCTGAACTTTCTTGGCATCAT GAGGAAGAAAAAGCGACAATGCGCTGCAATAATGGA AACGGTACTCTAATAAATCACTTCAAATAACCCA ATAAGTAAATCTAGTACAATCCAAGATAACCGGA ACATCTTTTGGCTTTAATGGCTTCTAATGGTTTTTTA ATTTGTGATACATAATTTTTCGGAATGCTCTTAC GGAAAAACAGATATAAAAAACAGACTTGAACAAA GTGCAAGAGGCTGCTGACGATCATTCTGTAGCA ACTCGATAAACTGATATTGAAAAAGTCTGCGGACA CAATGTTTACAAGATTACTACCCTAAAGGTAAAGA GGTTGATCGGCAATAAAACCACTAGCTATGATAA TGGAAAAATCATTATACATAAACTTAAAGGCAGCA ACCATTGCTAATCAWATCGGTGTAAGGATAAGGGCT GCTCCATGTTGCAAAAAAGCGAGCCACAAGAGCA CCAAGAACTACTACATAGACAACATCTTACTCCAT TTCCCTTAGCCGCCCTAGCCATATGCAAGTGTGCC ATCAAAAAATCAATCTCATATAATA</p>
<p>6 Bacterial/ Gen <i>arsB</i></p>	<p>CCTCTTAATGGCCACCCTGCATATGGCAAGACCGCCAAAGGAAAT GGAGTGGGATGTTGGGTATGAGCATTCTCGAACTTAGTCGCTT CGTTCCTCCCAACAACGGAGCCCTTCACTTAACTCCATTGGATT GGCCATGGTTCGAAACTTGAAGTTAGAAAAGAGATGATCTCCATTT ATCATCCCGAGTGGTTTTATTGCCAACTACAACCTACCCTGGGG GTAAGAAATCTGGTCAACTTGGTTCTGCTGACTTTTTGATATCGGG TTATTGAGTCCATCTAGAATGAACGATCCCAACCTGTTTTCAATAA CCAGCCGCTGGGATATATTGACTTCAAAGAGCATTCCGAAAAAT TATGACATGCTCTCTGGGGGGAGGGAGCGATGCCATCTTGATGT GAAAAATGTTTCGCTGACTGGGATTGTTTTACGCATTCTGCTGGTAG GCTACTTTATCAGTGCATATGAACCTTCTGTATCCATCATGACAG TGTTATCGCCATACTCTTCTGTTATGGGGAGTGGAACTACTATA AAATACCAAGCCGTAGTAAAAAGCACACCATGCGCGATTGTGCTT CTCCATTGGGATGTAACATAAGTGGTG</p>	<p>CGCCACAGATGGGGTCTTCTCCCTTAAAAAAGAATAATATGGGG ATTAACCTGCAATGATGGATCCAGGAATGTTCAAAAAATCACTGAC AAAGTAGCCTACCTACAATAATGGCTAATAAACAATCCCTGACAGCGA AACATTTTACATCCCAAGGGATCCACTGCTTCTCAATTTAG ACCTATCATAATCTTCGGAATGCTCTTCTGAAATACAAATATAAT ACCAGGATGCTGCTACTAATGAAACAGGTTGGGAACGATCCTTC TCGATCGGAACCTAATAAACCAGATATAAAAAAGTACAGCAAAAC AATGTCGACGATTACTTACCACAAGCGGTAAAGGGTGTAGTGTCT GGCATAAACCCACTCGCGATGATAAATGGGAAGATCATTCTCTCT CTAACTTCTAGTACCAAAACCCGCGCCATACCATCGGAGTTAAAT GAGCGGGCTCCGCTGTTTGGCAAAAAAGCGCGACTAAGGTCC GAGAATGCTCCCATACCAACCTCCTTTCTCCCTTTCTCCCTGGCC CGCTTCTGGCTATGCAAGGGTCCCAATCAAGAACTAATTTTC ATCCCAATCAAGAAAAAATGGTAATAGCAATGAACGCCCACTTT GCCTCCAGAAAAATAGTCCCCCAAAA</p>	<p>-</p>
<p>9 Bacterial/ Gen <i>arsB</i></p>	<p>TCGGGTGAGATTCCTCGCCATTATCTGACTGGCTGATATTTAGATG A GATTGGATTTTTGAATGGCAGCTCTACATATGGCTAGGGCAGCTAA AG GAAATGGAGTAAGGATGTTTGTATGTAAGTATTCTGGTGCCTTGT G GCTGCTTTTTTGCACACGACGGAGCAGCTCTTATCCTTACACOGATAG T ATTAGCAATGGTCCGCTTAAAGTTTAGTGATAAAATGATTTTCCCA T TTATCATAGCTAGTGGTTTTATTGCCGATACCACCTCTACCTTTAGTG GTAAGTAACTAGTAAACATCGTTCGCGAGACTTCTCAATACAGTT T TGCCGAGTTTGCATCAAGAATGATCGTACCAGACCTTTTTGCACTGGTT G CAAGTATCTGGTTTTATATCTATTTTTTTCGTAAGCAATCCGAAAAAT TATGATGATCAACAACCTTAAAAACAGTGAAGCCATTCAAGACCCCTA A GATGTTTCGGTTGCTTGGATTGCTTAGGAATTTTACTTATAGGTTATT TTCAAGTGAATTTATTGGAGTACCTGTATCCATTATTGCAAGCATTGT C GCTATTTTCTCATGATGCTGAGAGGAGTCCAGCAGTCAACACC AA AACAGTATTAAGGGCCACCATGGGCAATGGTGTCTTCTCAATTGG CA TGATCTGTGTGTAACGGCCGGGACTGCACGTTGCCGACGGGAAAA ACC GTGTTCTATACCTGGATACTCACCCCTAGTCTATCAGTCTTATCGTAG A GC</p>	<p>AAAAGTGGGTTAAAAAAGGATCATGCAAGCCACCATTATAAC TGTT TTGGTGTGACTGCTGACTCCTCTAGCCATCATGAGGAAGAAAA TAGC GACAATGCTGCAATAATGGATACAGGACTTCAATAAATCACTT GAAA AATAACCTATAAGTAAATCTAGAACAACTCAAGACAACCGAAA CATC TTAGGGTCTGTAATGGCTTCCACTGGTTTTTAAAGTGTGATACATC ATA ATTTTTTGGAAATGCTTTTACGAAAAAATAGATATAAAACCAAGATAC TTG CAACCAGTGCAAAAAGGCTGGTACGATCATTCTGTAGCAAACTC GGCA AAACTGATATTGAAGAAGTCTGCGGACACGATGTTTACTAGATTAC TTAC CACTAAAGGTAGAGAAGTGGTATCGGCAATAAAAAACCACTAGCTATG ATAA ATGGGAAAAATCTTTTACTACTAACTTAAAGGGCGGAACCAATTGC TAAT ACTATCGGTGTAAGGATAAGAGCTGCTCCGCTGTTGCAAAAAAAG CAGC CACAAAGACCAAGAATACTTACATAGACAACATCTTACTCCA TTTT CTTTAGCTGCCCTAGCCATATGAGAGCTGCCCATCAAAAAATCC AATC TCATCTAAAATAAGAGAAATATGATAATGGCTATGAATGCTAATGT TGC ATTTCCAGACGATGTTTCCCAACCAAAAAAGGGGGAACCCCTA ACCGT GGGGAATAACGCATTAAGCACCCCTGTATGATCATCGCCGTATAC GACGA CGCCTCAACGATGAGTGTCTACTCCTTTAGTGGCGTCAACACACT CCAT</p>	<p>AGATGAGATTGGATTTTTGAATGGCAGCTCTACA TATGGCTAGGGCAGCTAAAGGAAATGGAGTAAGGA TGTTTGTCTATGTAAGTATTCTGGTGCCTTGTGGC TGCTTTTTTTCGAAACGACGGAGCAGCTTTATCTTC ACCCGATAGTATTAGAATGTTGCGCCCTTAAAG TTAGTGAATAAATGATTTCCCATTTATCATAGCTA GTGGTTTTATTGCCGATACCCTTCTACTCTTTAGT GGTAAGTAACTAGTAAACATCGTGTCCGAGACTT CTTCAATATCAGTTTTGCGGATTTGCATCAAGAATG ATCGTACCAGACCTTTTGCATGTTGCAAGTATC TTGGTTTTATATCTTTTTTTCGTAAGCAATCCGAA AAATATGATGATCACAACCTAAAAACAGTGGAA GCCATTCAAGACCTAAGATGTTTCGGTGTCTTGG ATTGTTCTAGGAATTTACTTATAGGTTATTTTCAAG TGAATTTATGGAGTACCTGTATCCATTATTGCAAGC ATTGCTGCTATTTCTTCCATGATGCTGAGGAAGGA GTCCAGCAGTCAACCAAAAAACAGTTATAA</p>

<p>47 Bacterial/ Gen <i>arsB</i></p>	<p>GAGTTTGGCTCTATTTATTTTTCATTATAGCTCTTATTTAGATGAGA TTGGATTTTTGAATGGGCAGCTCTACATATGGCTAGGGCGCTAAAG GA AATGGAGTAAGGATGTTGTCTATGTAATATCTTGGTGCCTTGTGG C TGCTTTTTTGCAAAACGACGAGCAGCTCTTATCCTTACACCGATTGTA T TAGCAATGGTTCGCGCCTTACAGTTAGTGATAAAATGATTTTCCCAIT T ATCATTGCTAGTGGTTTATTTGCGGATACCACCTTCTTACCCTTAGTGG T AAGTAATCTGTAACATAGTGTCCGACAGCTTCTCAATACAGTTTT G CCGAGTTTGCATCAAGAATGATCGTACCAGACCTTTTTGCACCTGGTTG CA AGTATCTGGTTTTATATCTATTTTTCCGTAAGCATTCCGAAAAATTA TGATGTATCACAACTAAAAACCAAGTGAAGCCATTCAAGACCTTAAG A TGTTTTCGTGTCTGGATTGACTAGGAATTTTACTTATAGTTATTTT TCAAGTGAATTTATGAGTACTCTGATCCATTATGACAGCATTGTCT C TATTTTCTCCTATAATGGCTAGAAGGAGTCCAGCAGTCAACACCAA A CAGTTATAAAGGCGCACCATGGCAATCGTGTCTTCTCAATGGCAT G TACCTGGTGTGTACGGCTTGAAGGACCAAAACCCAA</p>	<p>AAAGTTGGGGAAAACTAGTAATGATCATGCATGACACCTTTATA ACTG TTTTGGTGTGACTGCTGACTCCTCTAGCCATTATGAGGAAGAA AATA GAGACAATGCCTGCAATAATGGATACAGGACTCCAATAAATTCAC TTGA AAAAAACCATAAGTAAATTCCTAGTACAATCCAAGACAACCGAA ACA TCTTAAGTCTTGAATGGCTTCCACTGGTTTTTAAAGTTGTGATACA TCA TAATTTTTCGGAATGCTTTACGGAAAAATAGATATAAAACCAAGAT ACT TGCAACCAAGTCAAAAAGGCTGCTGACGATCATTCTGTGCAAAC TCGG CAAAACTGATATTGAAGAAGTCTGGGACACACTATGTTTACAAGATT ACTT ACCATAAAGGTAGAGAAGTGGTATCGGCAATAAAACCACTAGCAA TGAT AAATGGGAAAACTATTTTACTAACTGTAAGCGCGCAACCACT GCTA ATACTATCGGTGAAGGATAAGAGCTGCTCGTGTGCAAAAA AGCA GCCACAAGACCAAGAATACTTACATAGACAACCACTTACTC CATT TCTTTTAGCCGCCCTAGCCATATGTAGAGCTGCCATTCAAAAAAT CCAA TCTCATCTAAAAAGAGAAATAATGATAATGGTATGATGCTAAT GTT GCATTCCAGCAGGTTTTCCACACAAAACGGAAGGAAATTTGTT TTGG</p>	<p>GTGTGGGAACTGCTGGAATGCAACATTAGCATT CATAGCCATTATCATTATTTCTCTTATTTAGATGAGA TTGGATTTTTGAATGGGCAGCTCTACATATGGCTA GGGCGGCTAAAGGAAATGGAGTAAGGATGTTGTG TATGTAAGTATTCTGTGCTCTTGTGGCTGCTTTTT TTGCAACGACGAGCAGCTTATCCTTACACCGA TAGTATTAGCAATGGTTCGCGCCTTACAGTTTAGTG ATAAAATGATTTTCCCAATTTATCATGCTAGTGGTTTT ATTGCCGATACCCTTCTACTCTTATGTTGGTAAGTA ATCTGTAAACATAGTGTCCGACAGCTTCTCAATAT CAGTTTTCCGAGTTTGCATCAAGATGATCGTACC AGACCTTTTTGCACGTGTTGCAAGTATCTTGGTTTTA TATCTATTTTCCGTAAGAAGCATTCCGAAAAATATG ATGTATCACAACTAAAAACCAAGTGAAGCCATT AAGACCTTAAGATGTTTGGTGTCTTGGATTGACT AGGAATTTTACTTATAGTTATTTTCAAGTGAATTTA TTGGAGTACCTGTATCCATTATGACAGGCTGTCT CTATTTCTCCTCATAATGGCTAGAAGGAGTCCAG CAGTCAACCAACCAAGCATTATAAAGCGCACCAT GGGCAATCGTGTCTTCCAAATGCAATGACTCCG TGGTGACGCGCTGGAAGGAC</p>
<p>49 Bacterial/ Gen <i>arsB</i></p>	<p>TCGGTGGCTGTAGAAGTGGTGGGATGGCTGAGGGAATAGCGCA TGG AACGCTTAAAGACCTTCAAGAAGAAATTCACATGCGCAATGCTACTCT G ATGAAATTTATTTGAATTAACAAGGAAGAGGCTATGAGTAAGATTG A TGCAATTGAAGCAACGGTTTCAGCAGTATTTAGTGGATGAAGAAG AT ATACAAAATATATCTTAAATGACCACATTAATAGTGAATTTTGGG ATTGGCGTTTGGCTACTATTAACAACAGTGGTGGTACATTAACAC C TGGCTTCCCTCGGCTGATGATTGCGATACTTATGGGATTGATTTA A CCATGGGTCAAAATCAACGTTTTTAAACAGCCTGATTTAGCTTTTTA TCTCCTTTGGAGACGAAGCTGCAGCCTTATTTAAAAATCTTTTTGGT T TACCCTTACGATTCAGCTTATATTTATTTGCAACTGGTGCAGCAG CACCTCTCACGTAAGGTAATGATGATTTACTTCAACGTTTTTTTTG TTTTCTGCTTACTACTCTTGAAGTTGTAACCTAGGGATGACCT GGTGGTACCGGCTGATGGCCAAAAAGCCAAACGGTTTACACAAA AA</p>	<p>TAAAAAATTTTTCTCCTCGTTGCGTACAACAAAAATCCACCA CAT AGTTTGGAGTAAGATCATGACTTACCTTACGTGAAGAAGTGTCTGC TGCA CCAGTTGCCAATAATAAAATATAAGCTGAATCTAAAGTAAACC AAAA AGATTTTTTAAAAAGGCTGCAGCTTCTCCTCAAGGAAGTAAA AAGA CTAAATCAGTGTGTTTTAAACGTTTTGAATTTGACCCATGGTTAAA ATC AATCCCAATAAGTATCGCAATCACTACAGCCGAAGGAACGCAAGT GTTAA TGATCAACACCCTGTTGATAATGATAGGCCAAACCGCCAAATCGCA AAAA TAACTACTAATTAATGGTTCATTAAGATATTTTTGTATATCTTC TT ACATCCACTAAATCTGCTGAACCGTGTCCATAATGCATCAAT CTT ACTCATAGCCTTCTCCTTTGTAATTAATATAAATTTTCAATCAAGA GTA GCATTGCGCATCTGAATTTCTTCTGAAGGCTTTAAGCGTTCCTT GCGC TCTTACTCTCCGTTATGTAATAACAAATTTTTCGACGTCGCGTT CCA GACGATGTCCACCAATGTGAAGAGCTGCCATTCAAGGAAC CAATT</p>	<p>TTTTGGCCATCAGCCGGTACACCACAGGTACATC CCTAAGTTTCACACTTTCAAGATGAGTAATAGCAGAA AAAAACAAAAACGTTTGAAGTAAGATCATGCTTAC CTTTACGTGAAGAGTGTCTGCTGCACCAGTTGCM ATAAATAAATAAAGCTGAATCGTAAAGTAAACCA AAAAAGTTTTTAAAAAGGCTGCAGCTTCTGCTCC AAAGGAATAAAGACTAATCAGGCTGTTTTAAAA ACGTTGAATTTGACCCATGTTAAAAATCAATCCCAT AAGTATCGCAATCACTACAGCCGAAGGAAGCGAR GTGTTAATGTACTCAACCCTGTTGATAATAGTAGG CCAAACCGCCATCGCAAAAAATTAACACTAATTTA GTGTCATTAAAGATATTTTTGTATAWCTTCTTACA TCCACTAAATACTGCTGAACCGTCTTCCATAATG CATCAATCTTACTCATAGCTTCTCCTTTGTTAATT CAATAAATTTTCAAGAGTAGCATTTGGGATSTG AAATTTCTTGAAGTCTTTAAGCGTCTCCTGCGCT CTTACTTCCGTTATGTAATAACAAATTTATCGC AGTCCGCTTCCAGCAGTGTCCACCAATGTGAA GAGC</p>
<p>51 Bacterial/ Gen <i>arsB</i></p>	<p>AGGATTCATTTTTGAATGGGCACACTCCCGTATGAGGGAGAGCCCGC CAGGAAAAAGGAGTAAGGATGTTTGTCTATGAAAATATCCTGGTGTCT CTTGTGGCTGCTTTTTTGGCAATGACGGGCGCCCTTATCCTTACA CGATCTTATTAACAATGTTTCGGGCTTGAATTTTATGATAAAATGA TTTTCCCTTTTTTCAATGCCAGTGGGTTCAATGGCGATACAACTCACT TCTTTTTGTGGTGAATCTTGAATATTGATCCGCCACTTTTTCA ATATCAGTTTTGCGGAGTTTGCCTCAAGAATGATCGTACCGGACATCTT TGGTCTTATAGCAAGCATTGGTTTTATCTATTTTTCCGAAAAAGCA TACCAAAAAATACGATGATTTACAGCTTAAAAACCAAGCGGAAGCCAT TCAAGACCAAGGATGTTAGGCTGTCTGATCGTATTAGGAATATT GCTGGTGGTTATTTGCCAGTGAATCATTGGGGTCTGATATCCAAT CATTGGCAGCATTGTCGCCACTTCTTCTCATGATGGGTAGAAAAAG AATCCAGCGAGTCAACCAAAAACCGTTTTTCAAAAGCGCAC</p>	<p>TGTTGTTGACCGCTGGACTCCTTCTCCCCATCATGAGGAAGAAA ATGGGCACAATGCCTGCAATGATGGATACCGGAACCCCTGAAAT TCAGTGGGAAAAATACCACCAGCCATTTCTAATACCATCCAGG GCAGCCTAAACATCCTGTGGTCTTGAATGGCTTCCGCTGTTTTTT AAGCTGTAATACATCGTAATTTTTCGGTATGCTTTTCCGAAAAAAA AATAAAAAACCAAAATGCTGTATAAGTGCAAGATGTCGGGTAC CATCATTTTGGGCAAACTCCGCAAACTGAAATGAAAAATCT GCCGATACAATTTTACAAGTTACTCCCCCTCAAGGAAGTGAGG TTGTAACCGCAATGAACCCACTGGCGATGATAAAGGGAATCAT TTATCACTAAATTTCAAGGCCGAACCATGCTAATACGATCGGT GTAAGGATAAGGGCGCCCTGTCTTCTCCAAAAACAGCTTAAA AACCCCGGATCTTTCATAACCAACATCTTTTCTTCCCTTTTCC CTTGGGGGCTTCCGCGCTATGAGGGGCTGCCATTTCAAAAAAT CCCTATCTCCGCCCAATAAACCAATGATGATGATCGCCATGAA AGGCAATGTTGCGTTCACCACTGTTCCCAACCAAA</p>	<p>-</p>
<p>1 Bacterial/ Gen <i>arsA</i></p>	<p>TTGGGGGGGCTCGCTACGCCCTGCGAGGGCAGAGATTGTGCG CAGTCGTGAGATGAAGCATGAATTCATTACCGACTCTGCGGACCGG GTAAAAATTTGCGCTGATGGAGTGTCAATAGCATTTGGGGCCCTTGG GACCTCACTGACTTCTGTTACTGTTATTTGCCAGAAATATCTCGTGT CCTCCGAGAAATGGGGCTCATTGTGCTCTTCTTCAATTTTCTGGTC CTTCTATACTTACTTGCCTGGGGAGCTTCGGAGGATTTTTAGCT A</p>	<p>GTTGGGGGGGCTCGCTACGCCCTGCGAGGGCAGAGATTGT CGCCAGTGTGACGATGAAGCATGAATTCATTACCGACTCTGCGG GACCGGGTAAAAATTTGCGCTGATGGAGTGTCAATAGCATTTGG GGGCTTTGGACCTCACTGACTTCTGTTACTGTTATTTGCCAGA AATATCTCGTGTCTCCGAGAAATGGGGCTCATTGTGCTCTTCT TTTCAATTTCTGGTCTTCTATACTTACTTGCCTTGGGAGCTT CGGAGGATTTTTAGCTAA</p>	<p>-</p>

<p>2 Bacteria/ Gen <i>arrA</i></p>	<p>GAAGGGGGGGTCTCTGTGAGAGTAGGACGCCCAAGCCATTTGA</p>	<p>AACCTAAGTTGCTTCTCATATAATATGGATTTGGCAGGAACC GTACATCAAAACACAAGGTCGGCATCTATCGGCAGACCATGCTTGA ACCCGAACGACATGACATTGACTGTAAAACCGACACTTTTATCG</p>	<p>-</p>
<p>3 Bacteria/ Gen <i>arrA</i></p>	<p>CGTGAGAATTTCTGGGAGTTTCATGGGGTAACCATCATGATTTGG GTGGGAGAGTGCCCGACACCTGGGGGAGAAAATCCCGTAGCCTACTG ATCTCTATGGTGTGCCATCAGCTTCTATGACGTCCACCAGGAAGGGG CCCGAGCCTGGTTTTGCTTACTCCTCGGACACTTGGGGTACAGGC TGGGCTGCATCACTAAAGATGGGATCCTCGCTCATTCTGCCTCCGGCC TGCACTCCCCAGTTCGGGGCCCTCTGGGCACCCAGGCAGCTCC TGTTGGATTGGATAGCTA</p>	<p>AACTGACTTGCATGAGTCATATAATATGGATTTGGCAGGAACCGT ACATCAAAACACAAGGTCGGCATCTATCGGCAGACCATGCTTGAAC CCGAACGACATGACATTGACTGTAAAACCGACACTTTTATCGGCAC AAATCTTCTACCTCATTCTCCACCACCGGGGACAGTTCTCTGG GCTTGTCCAAAGCTCATCTGATCTCAGCCGCGCTCTGTACAGCC CCTTCTCTCACTCCCCAAAACCGGACCCCTCTGGGCACCCCA GGCAGCTCCTGTTGGATTAATAGCTAA</p>	<p>-</p>
<p>6 Bacteria/ Gen <i>arrA</i></p>	<p>GTGGGGGGGTTCTCTGTATAGAGAGCCGCCACCCATTTGAGGA GACCGTGATCAGGCTGGGGTTTTTGGACGCCACCTCCTGCTTCTC TGGGTATGCCATCTCCTCTTTGGGCTCCCATGGGCAGCGCCCGGT GTGTGCCTTTCCCTGGCTCTTGACCTCTGACTCCTGGGGTGCCT GCACGCCCTCCTGTGACGAGAACCCACTTCCACCCTTCTCTTA GCATCCAGAAACCACTACTAGTAACTGCACCTTATAGTTAAGGAGG GATGCCACAACCTAGAAAAGATAATATTTTTTATT</p>	<p>ACCTGACTCTCATGAGTCATATAATATGGATTTGGCAGGAACCGTA CATCAAAACACAAGGTCGGCATCTATCGGCAGACCATGCTTGAACC CGAACGACATGACATTGACTGTAAAACCGACACTTTTATCGGCAGA AAACTCCGAAGCGAATTTCTCCCTCAATTGCGCGGTTTCAGTTGG GAAGTATTACAGATCCCTCCCTGCATTCCTCACTTATCCATCCG GTCCCGTTCATTTAAATGCCTTCCACTGCAGGGCCCACTGGAGC AATGAGGTCGAAGCAAAAGCTAAC</p>	<p>-</p>
<p>47 Bacteria/ Gen <i>arrA</i></p>	<p>CGGGTTGGGAGTTCCTGTGAGAGTAGGACGCCCAAGCCATTTGA AAGATTTTCTACGGGTGGTCTTTTTTGTATTGCGATATTTTTCAGGTT CTGGGAGGAGGGACGTGAACCTTATTTATCTCTTGTGGTGTGGTTT TTTCATACCTGGCAACTACTGTTACCTGCCGAATATCATGGTGATAT GACCTCAAGGGGGCAGGGTAAGCATCTTTCTTTCGTTTTCTTAAACC TCTATTACTTTGCTTACTTGGTATTCTTGACAAATTTGTTGTCTAGC CGGGACAGGGGGCTAT</p>	<p>GAATTAAGTTTCGATTCCTGCTCCGATTTTCTCTGATGTGAC CGAATTACGAGGCTTGTTTTATTAACATATGATGTTGAACTCGGC ATCTGGACTTGACGTAAGTCTGCGCCGCTATATGAACAACACTTTAT CTTGTTCACGACTATATCTCCTTCTATTTATTTTCTTTACCGCTA TACTACGAGCCCTGGCAGAAATCAACATTGCTCGACTGATTAATAC CATGCCGGTCTTACCGAAGAGTACTCTTGTGCGGCATACC CGTTTTTGGCATATTGTGTGACAGAC</p>	<p>-</p>
<p>59 Bacteria/ Gen <i>arrA</i></p>	<p>GGTAAGGCCTCTGGCGCACTCAGCATGATGGAGCAGGACATTTGATT TTGATTTTATATCATCGCGGGTGGAGCAGGGATTTATTGGCCGTGG ATGGTGGTTTTGTGAGCTGGACGATTGACAGGCCGATAAATTTCTCC ACGGCGAGTCTGTTGATTGATGAGTGTCTGTGAGGCACGTCTAC GAGGGTGGCGCCTTATGACATTGCCCGTCTGCGTGAGACGATGTGG TTTAAAGAACGTAGAGGAAGACATGTTCCGGGTTGATT</p>	<p>GCCCGGCCACTGTTGAGATTACTGCTCACAATGACTCCCATCGT GCGATCAATGGCACTTCTTGCAGCAGATAATTGAGTACGACGCTCT CGGCAGTCTTTTCTTGTCCATCATGCTGAGTACGCCCTTTTAGCT GCCCTCAATTCGGCGCAGATGGCGTGTGA</p>	<p>-</p>

Artículo Científico

Microbiomes in Agricultural and Mining Soils Contaminated with Arsenic in Guanajuato, Mexico

María Elena López-Pérez¹, Adriana Saldaña-Robles^{1,2}, Gabriela Ana Zanor^{1,3}, Jorge E. Ibarra⁴, and María Cristina Del Rincón-Castro^{1,5*}

Posgrado en Biociencias¹, Departamento de Ingeniería Agrícola², Departamento de Ciencias Ambientales³, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV-Unidad Irapuato⁴, Departamento de Alimentos⁵, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Irapuato, Guanajuato, México. Km. 9.0 Carr. Irapuato-León. Irapuato, Gto. 36500.

*Corresponding author: María Cristina Del Rincón-Castro, e-mail: cdelrincon@ugto.mx

ORCID María Elena López Pérez: 0000-0001-9800-9932

ORCID Adriana Saldaña Robles: 0000-0001-8871-1621

ORCID Gabriela Ana Zanor: 0000-0002-2694-3571

ORCID Jorge E. Ibarra: 0000-0002-1013-8260

ORCID María Cristina Del Rincón Castro: 0000-0002-3749-7351

Abstract

In this report, physical and chemical properties, and total arsenic (As) concentrations were analyzed in agricultural (MASE) and mining soils (SMI) in the State of Guanajuato, México. Additionally, a metagenomic analysis of both types of soils was the bases for the identification and selection of bacteria and fungi resistant to As. The SMI soil showed higher concentration of As (39 mg kg⁻¹) as compared to MASE soil (15 mg kg⁻¹). The metagenome showed a total of 175,240 reads from both soils. MASE soil showed higher diversity of bacteria while the SMI soil showed higher diversity of fungi. 16S rRNA analysis showed that the phylum Proteobacteria showed the highest proportion (39.6% in MASE and 36.4% in SMI) and Acidobacteria was the second most representative (24.2% in SMI and 11.6% in MASE). 18S rRNA analysis, showed that the phylum Glomeromycota was found only in the SMI soils (11.6%), while Ascomycota was the most abundant, followed by Basidiomycota, and Zygomycota, in both soils. Genera *Bacillus* and *Penicillium* were able to grow in As concentrations as high as 5 and 10 mM, reduced As (V) to As (III), and removed As at 9.8% and 12.1% rates, respectively. When *aoxB*, *arsB*, *ACR3(1)*, *ACR3(2)*, and *arrA* genes were explored, only the *arsB* gene was identified in *Bacillus sp.*, *B. simplex*, and *B. megaterium*. In general, SMI soils showed more microorganisms resistant to As than MASE soils. Bacteria and fungi selected in this work may show potential to be used as bioremediation agents in As contaminated soils.

Key words: agricultural soil, mining soil, arsenic, bacteria, biodiversity, fungi.

Introduction

In the State of Guanajuato, Mexico, the agricultural land occupies 969,000 hectares that generate 8.69 million tons, mainly of barley, corn, sorghum, alfalfa, broccoli, and wheat. This represents a market of approximately 42 billion USD and Guanajuato occupies the ninth position in Mexican agricultural production (www.inegi.org.mx/temas/agricultura/). However, economic development associated to population growth has caused a serious impact on soil resources. The state of Guanajuato has a mining exploitation history since the XVI century (mostly for Au and Ag extraction). Carrillo-Chávez et al. (2003) indicated that historic mine tailings are dispersed around the Guanajuato city and widespread in the hydrological basin, but nowadays they are mostly covered by vegetation, urbanization or dispersed by erosion.

Arsenic (As) pollution in the State of Guanajuato has gained more attention in the last years. Several studies performed in the region indicated high contents of As in groundwaters used for irrigation, which are above the accepted world standard limits, with a mean of 0.33 mg L⁻¹ (Rodríguez et al. 2016), an accumulation in soils with a range of 1.0 to 14.0 mg/kg (López-Pérez et al. 2017; Zanor et al. 2019) and in crops with a mean of 14.1 mg kg⁻¹ in barley (Saldaña-Robles et al. 2018), as As can accumulate in soil and be transferred into the food chain (Lu et al. 2010).

As is a trace element present in different ecosystems. Average As concentration in world-wide soils ranges from 0.2 to 40 mg kg⁻¹ (Bundschuh et al. 2008). Chronic exposure to As represents a risk to the environment and human health because it has been classified as one of the most toxic and carcinogenic metalloids known (Gu et al. 2018). This metalloid is mainly found in soil as its inorganic forms (arsenite, As (III) and arsenate, As (V)), and it can be transformed by redox processes to an organic form. Some microorganisms play a fundamental role in the incorporation of As in their metabolism through oxide-reduction reactions, enzymatic transformation, methylation, chelation, exclusion, and immobilization (Cai et al. 2009; Rangel-Montoya et al. 2015).

Being the microorganisms the most active elements of soil, they can respond quickly to anthropogenic pressures, and can become indicators of soil health and quality. Studies involved in the composition of the soil microbial community help to explore the potential risks associated to its pollution and provide information on possible remediation strategies (Feng et al. 2018). For example, the bacterium *Bacillus licheniformis* (strain DAS1) is able to remove 100% of As (V) at a concentration of 3 mM, with the release of 42% of As (III) into the culture medium (Tripti et al. 2014). Fungi of

the genera *Rhizopus*, *Neocosmospora*, *Penicillium*, and *Aspergillus* isolated from soils contaminated with As (9.45–15.63 mg kg⁻¹), were able to remove between 10.92% and 61.58% of the metalloid (Srivastava et al. 2011). An initial step in As metabolism is the enzymatic reduction of As (V) to As (III) by the arsenate reductase (*ArsC* in prokaryotes and *Acr2p* in eukaryotes) (Mukhopadhyay and Rosen 2002). Genes coding for arsenite transport proteins, such as *arsB*, *ACR3(1)*, and *ACR3(2)* are found in bacteria resistant to As. These genes are commonly found in bacterial isolates from soil highly contaminated with As (Cai et al. 2009).

Detailed studies on microbial communities in soils that control the biogeochemical cycle of As in natural systems are challenging due to the extreme diversity of the microbiome and the fact that not all microorganisms can be isolated in the laboratory. Metagenomics offer an unprecedented opportunity to examine the adaptation of microbial communities to environmental toxicity factors (Das et al. 2017). In this work, the microbial community, at the metagenomic level, is reported to obtain a broad description of the microbial diversity in soils of Guanajuato, Mexico for the first time. Due to their heavily and historical anthropogenic use, two types of soil with high As content were studied: one of agricultural origin (MASE) and one of mining origin (SMI). As-resistant bacteria and fungi were identified and characterized for their ability to transform As. This information is relevant not only to know As-resistant microorganisms, but it gives a clear representation of the microbial diversity in highly different soils.

Materials and methods

Soil sample collection. A total 15 agricultural soil samples were obtained at the following location (UTM units): 2285086.96 m N by 265924.63 m E, at 1726 m a.s.l., which subsequently were pooled to form a single sample (here on called MASE), close by to the city of Irapuato, in an asparagus crop field. In this area, soils are classified as vertisols, with high content of clay minerals (smectite group), a good water retention, and high content of organic matter. In the case of soils of mining origin, a total of 5 sub-samples were taken at the following location: 2324859.63 m N by 264345.89 m E, at 1995 m a.s.l., within the perimeter of the city of Guanajuato. Sub-samples were pooled, too, here on called SMI sample. MASE and SMI soil samples were previously characterized (López-Pérez et al. 2017). Soils were sampled following the Mexican norms: NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF 2002), NMX-AA-132-SCFI-2006 (SCFI 2006) and NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (DOF 2007), and stored at -80°C for further use.

Physical and chemical analyses of soils. The physical and chemical characterization of MASE and SMI soils were analyzed by triplicate following the methodology required by the Mexican Norm NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF 2002). The physical and chemical properties determined were moisture (M), textural class (T), bulk density (BD), real density (RD), total porosity (TP), pH, organic content (OC), total nitrogen (TN), and C/N ratio. Total concentration of As was determined according to the method 6010C recommended by EPA (2001), using Optical Emission Spectrometry with Inductively Coupled Plasma Thermo iCAP 6500 Duo. The geoaccumulation index (I_{geo}) of soil samples was analyzed based on the index proposed elsewhere (Müller 1969; Loska et al. 2004), to evaluate the level of As contamination. Comparison of variables from soil samples was analyzed by Tukey's honestly significant difference (HDS) method, using the Statgraphics Centurion XV.II software.

Total DNA extraction from soils and metagenomic sequencing. Total DNA was extracted from three 0.3 g sub-samples, of each soil type using the MoBio PowerSoil® DNA Isolation Kit as described by the manufacturer (Fierer et al. 2012). Purified DNA was sent to Macrogen Inc., (Korea) for sequencing and analysis. Primers 27F, 518R, and ITS1-F, ITS4-R (Table 1) were used to amplify the 16S rDNA gene and the internally transcribed spacers (ITS region), from bacteria and fungi, respectively. Data processing was performed using the Roche 454 GS FLX (3.0 v) software (<http://technical-support.roche.com>). DNA was pre-processed and clustered as follows: 1) short reads were filtered out and extra-long tails were trimmed. Filtered reads were clustered at 100% identity using CD-HIT-DUP (<http://weizhongli-lab.org/cd-hit-otu/>); 2) chimeric reads were identified and secondary clusters were recruited into primary clusters; 3) noise sequences in clusters were removed and the remaining representative reads from non-chimeric clusters were clustered using a greedy algorithm into operational taxonomic units (OTUs) at a user-specified OTU cutoff (97% ID at species level). Taxonomic assignment and microbiome diversity were analyzed as follows: 1) representative sequences were used from each OTU to assign its taxonomy, using the software QIIME-UCLUST (<http://qiime.org>). Sample libraries were downloaded from the service provider (Macrogen); and 2) to verify significant differences between community structures (bacteria vs. fungi), the community richness and diversity (Alpha diversity) was estimated on each sample by the service provider.

Isolation of As-resistant microorganisms. MASE and SMI samples supplemented or not supplemented with arsenic salts (NaAsO₂, HAsNa₂O₄) at 5 mM were serially diluted under sterile conditions, and plated on EXSC medium (500 g L⁻¹ sterilized and filtered soil, 1 g L⁻¹ yeast extract, 2 g L⁻¹ glucose, 18 g L⁻¹ bacteriological agar), incubating for 24 to 48 h (bacteria) or for 72 h or more (fungi) at 28±2°C.

Detection of the As oxidation-reduction. Microorganisms (bacteria or fungi) selected as previously described, were grown in EXSC medium supplemented with arsenic salts during 48 h (bacteria) or 4 to 6 days (fungi) at 28±2°C. Once colonies were observed, a solution of 0.1 M AgNO₃ was used to cover the plates. Development of brownish-red or yellow color indicates the presence of As(V) or As (III), respectively (Simeonova et al. 2004).

Molecular identification of As-resistant bacteria.

Bacterial DNA was extracted from selected single colonies as described earlier (Shuhaimi et al. 2001). This DNA was used as template to amplify the 16S rRNA gene, using primers shown in Table 1. The PCR conditions used were: 95°C for 5 min, 30 cycles 95°C for 40 s, 50 to 60°C for 1 min (depending on the template DNA), 72°C for 1 min, and a final amplification at 72°C for 10 min. Amplicons were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and visualized in a Bio-Rad Gel Doc EZ Imager. The amplified 16S rDNA were sequenced using the Pyrosequencing method by Macrogen Inc., (Korea), and were assembled using the Seqman software (version 3.0). Once the contigs were obtained, they were subjected to a BLASTn analysis, using the GenBank database (Wang et al. 2007).

Molecular identification of As-resistant fungi.

Fungal DNA was extracted according to Cruz-Avalos et al. (2019). The DNA was used as a template to amplify the ITSs using primers shown in Table 1. PCR reactions were carried out as follows: 94°C for 4 min, 30 cycles of 95°C for 40 s, 50 to 65°C for 1 min (depending on the template DNA), 72°C for 40 s, and a final step at 72°C for 10 min (Habtegebriel et al. 2016). Amplicons were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and visualized in a Bio Rad Gel Doc EZ Imager. Amplified ITSs were sequenced using the Pyrosequencing method by Macrogen Inc., (Korea) and analyzed in the same way as bacterial sequences.

Identification of genes involved in the transformation of As. The identification of *aoxB*, *arsB*, *ACR3(1)*, *ACR3(2)* and *arrA* genes in the bacterial isolates was carried out using the primers described in Table 1, and according to conditions reported previously (Achour et al. 2007; Inskip et al. 2007; Mirza et al. 2017). Amplicons were sequenced by Pyrosequencing at Macrogen Inc., (Korea) and analyzed in the same way as bacterial sequences.

Quantification of As in culture media. Quantification of total As in the supernatant of selected microorganisms in culture medium was determined by Atomic Absorption Spectrometry, using the Thermo Scientific™ iCETM 3000 Series by flame. Samples were diluted 1:10 for the quantification, and a standard curve was obtained with the following concentrations of As (V): 10, 20, 30, 40 and 50 ppm. All analyses were performed by triplicate and the values were calculated in mM concentrations. The standard deviations were calculated using the Statgraphics Centurion XV.II software.

Results

Soil physical and chemical parameters. Physicochemical properties of both soil sample types were determined, and estimated parameters are shown in Table 2. The MASE soil presented higher moisture (6.74%) as compared to the SMI soil (1.47%). Statistical difference was observed in the BD values, despite both types of soils ranged between 1.00 and 1.19 g cm⁻³, which are typical values for soils rich in clay minerals with clayed texture, and good infiltration and aeration capacity (Sumner 1999). According to the Mexican norm NOM-021-SEMARNAT-2000, pH in the MASE soil was moderately acidic (pH= 6.4). Conversely, in SMI soil pH was moderately alkaline (pH 8.1). TN content reached a value of 0.38% for MASE, which was significantly different to the value of 0.17% for SMI. Something similar was observed with C/N ratios as a higher value was recorded for SMI (25.69), as compared with MASE soil (11.86).

According to the Mexican standard NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, total As content in MASE soil (15 mg kg⁻¹) and in SMI soil (39 mg kg⁻¹) were below and above the limit value, respectively, for soils used in agriculture, urbanization and commerce (22 mg kg⁻¹). According to Igeo values, MASE soil corresponds to the category of “moderately contaminated” (level 2) by As, while the SMI soil belongs to the category of “moderate to heavily contaminated” (level 3).

Assembly of metagenomic reads. The number of reads obtained from the sequencing of the MASE and SMI soils was 175240, with approximately 76 million bp and an average reading length of 434 bp. A total of 7,141 sequences from the 16S rRNA gene were aligned to the SILVA database (Quast et al. 2013) and 34,059 sequences from the 18S rRNA gene of both samples were aligned to the NCBI database (Benson et al. 2007). The sequences recognized a total of 254 operational taxonomic units (OTUs) with the 16S rRNA gene for MASE and 206 OTUs for SMI; while for the 18S rRNA gene, 98 and 110 OTUs were obtained for each soil, respectively.

The MASE soils presented a higher bacterial diversity than SMI soil as the Shannon index was estimated at 7.06 and 6.12, respectively; while the SMI soil presented a high fungal diversity than MASE soil with Shannon’s indices estimated at 4.10 and 3.30, respectively. It is considered that values lower than two represent low diversity, and values greater than three represent high diversity (Shannon 1948; Mora-Donjuán et al. 2017). According to the Simpson index, both soils showed dominance in the number of bacterial species, as this value is close to the unit (MASE = 0.98, SMI = 0.95), whereas the estimated index for fungal species showed a lower dominance of species (MASE = 0.69, SMI = 0.85) (Simpson 1949).

Taxonomic composition of the microbial communities. In terms of bacterial composition of the microbiomes, Proteobacteria, Acidobacteria, and Actinobacteria were the dominant phyla in MASE and SMI soils, representing more than 72% of the total population (Fig. 1). The phylum Proteobacteria was the most abundant in both microbiomes, comprising 39.6% in MASE and 36.4% in SMI (Fig. 1). Acidobacteria were the second most abundant, with 11.6% in

MASE and 24.2% in SMI microbiomes. Actinobacteria were found in higher proportion in MASE soils (19.0%) than in SMI soils (14.2%).

By employing the 16S rDNA gene, a total of 197 genera were identified, 59 of these were found in both types of soils; however, many were only identified as uncultured or unidentified genera. Table 3 shows 37 bacterial genera that were among the most abundant in both type of samples (37% in MASE and 35.85% in SMI), highlighting the genus *Bradyrhizobium*, and uncultured organisms within the family Rhodospirillaceae, whose presence was higher in the MASE soils (6.59%) than in the SMI soils (3.27%).

In terms of fungi, the phylum Ascomycota was the most abundant in both soil samples, representing 26.5% of the total sequences (31.9% in MASE and 21.1% in SMI) (Fig. 2). The phylum Glomeromycota was only identified in the SMI soils with 11.6%, Basidiomycota was identified with 3.2% of the total sequences (0.6% in MASE and 5.8% in SMI), Zygomycota was found in 0.8% of the total sequences (0.5% in MASE and 1.1% in SMI). On the other hand, 63.1% of the fungal sequences in the MASE soils and 10.6% in the SMI soils, were not classified or unidentified, while 49.8% of the sequences in SMI and 3.8% in MASE, were classified as unassigned sequences (Fig. 2).

By using the 18S rRNA gene sequences, a total of 71 genera were obtained, from which 13 were found in both type of soils, but many represent unidentified genera. A total of 36 fungal genera were found within the most abundant in the soil samples (19.5% in MASE and 27.0% in SMI) (Table 4). The most abundant genera in MASE soils are listed in Table 4, being the genus *Mortierella* (0.49%) within the phylum Zygomycota the only one shared within the SMI microbiome. Other genera in SMI soils are listed in Table 4.

Selection of microorganisms resistant to As. When MASE soil extracts were inoculated on EXSC medium, only 24 bacterial species were able to grow, and none of the fungal species. From these, 18 bacterial isolates were resistant to 5 mM of As (III) (16 isolates) and As (V) (14 isolates). However, their ability to oxidize or reduce As, as shown by the AgNO₃ reaction, was negative. On the other hand, a total of 55 bacterial and 9 fungal isolates were able to grow in the EXSC medium from the SMI samples. From the bacterial isolates, 44 were able to grow on 5 mM As (V) and 45 grew on As (III) 5 mM. In this case, 21 bacterial isolates were able to reduce As; however, oxidation of As (III) was not detected. Noteworthy is a colorless halo that was observed in the culture medium supplemented with 5 mM of As (III) in the reaction with AgNO₃. This might indicate that the chemical oxidation of As (III) is occurring, in spite of not showing the typical coloration, yellow, for As (III) and reddish-brown for As (V) (Simeonova et al. 2004; Branco et al. 2009).

According to the GenBank database, the As-reducing bacteria belong to the genera *Bacillus* and *Williamsia* (Table 5). Genera *Sphingomonas* and *Nocardioides* showed resistance to 5 mM of As; however they were unable to reduce it. Similarly, the genus *Lysobacter* was equally resistant to 5 mM of As (III) and (V), but was unable to oxidize-reducing. From the nine fungal isolates obtained from the SMI samples, only three showed the ability to reduce As (V), all identified within the genus *Penicillium* (Table 5).

Detection of genes involved in the detoxification and metabolism of As in the microbial cell. From the 21 bacterial isolates showing reduction activity of As, five of them displayed a significant growth in the EXSC medium supplemented with As. These isolates were selected to explore the presence of the five genes related to the As metabolism in bacteria, mentioned above. In spite of finding amplicons with the expected size of the five genes in the five selected isolates, only the *arsB* gene was identified by its sequence. This gene codes for the arsenite transport protein and explains the ability of the five isolates to reduce As (V). All five isolates belong to the genus *Bacillus*, and their identification by their 16S rDNA sequence was: *Bacillus sp* isolate 2, *B. simplex* isolate 3, *B. simplex* isolate 9, *B. simplex* isolate 47, and *B. megaterium* isolate 49. The isolates 2, 3, and 47 may contain the gene *arrA* which codes for the arsenic reductase, a very important element of the microbial arsenic reduction system with an amplicon of approximately 330 bp. However, their sequences were ambiguous and only indicated that the PCR product was part of the *Bacillus* genome as reported by (Mirza et al. 2017).

Effect of two selected microorganisms on total As in the culture medium. *B. simplex* isolate 47 was able to decrease the total As of the medium, from a mean of 5.554 mM to a mean of 5.092 mM, which is highly significant ($p=0.0007$) and indicates a 7.2% decrease of total As in the medium 72 hours after being inoculated, with respect to the uninoculated control medium (EXSC+AsIII), (Fig. 3). This isolate also proved to be a reducer of As (V), identified by the yellow coloration in the reaction with AgNO₃ (Simeonova et al. 2004). It decreased the total As from a mean of 6.159 mM to a mean of 5.510 mM, which is highly significant ($p=0.0014$) and indicates a 9.8% decrease of total As in the medium 72 hours after being inoculated, with respect to the uninoculated control medium (EXSC+AsV). Isolate 44 (*P. rubens*), showed no decrease of total As in the medium with As (III); however, it decreased the total content of As in the medium, from a mean of 5.805 mM to a mean of 5.144 mM, which is highly significant ($p=0.0166$) and indicates a 12.1% decrease of total As 144 hours after being inoculated, with respect to the control medium (EXSC+AsV), (Fig. 3).

Discussion

Since colonial times, Guanajuato has been economically important to Mexico for two reasons: agriculture and mining industry; and in both economic activities, soil is a preponderant source. Therefore, safety is paramount when handling this natural resource, either for the food industry as well as for the healthy handling of mining sources. The presence of arsenic (As) in Guanajuato's soils has been known since a long time (Ramos-Arroyo et al. 2004), but it has never been associated to its microbiome. Resistance of soil microorganisms to toxic elements such as As has made them play a very important role in the mobilization, biotransformation, and bioavailability of different species of As (Cai et al.

2009; Mellado et al. 2011). The SMI soils reported here were more contaminated with As than MASE soils. In MASE soils, the acid pH (6.1) observed could be considered acceptable to achieve good availability of macro and microelements, and no deficiencies of essential nutrients in crops are observed. However, the SMI soils showed a basic pH (8.1), indicating deficiencies in the availability of P, Fe, Mn, Zn, Cu, Co, among others (Brady 1984; Nuñez 1985). Conversely, as it was observed by Ramos-Arroyo et al. (2004), in SMI soils, the basic pH values could be explained for the presence of calcite in the mine tailings, increasing the pH in the soil.

The importance of the great diversity of microorganisms found in soils is highly related to the soil's ability to deal with highly contaminating elements. In previous studies (Campos et al. 2007; Cai et al. 2009), soil microorganisms were able to oxidize or reduce As species in the medium, eliminating (at least partially) its toxicity. Gram negative bacilli such as *Pseudomonas alcaligenes* and *Wautersia solanacearum*, as well as other bacterial genera such as *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas*, were found to be able to tolerate high concentrations of As (8-20 mM). They also observed that the ability of these bacteria to oxidize As (III) would favor the colonization of other species not tolerant to As, which are important in biogeochemical cycles.

Both soil types (MASE and SMI) studied here showed the presence of Proteobacteria, Acidobacteria, and Actinobacteria, similar to those found previously in Cd-contaminated soils (Feng et al. 2018). In general, Proteobacteria provide some basic functions related to biogeochemical cycles (Feng et al. 2018). As for Acidobacteria, they have been detected in a wide variety of environments. In fact, there are more than 3,000 sequences in public databases, shown to be abundant in soils and sediments with the ability to resist extreme conditions (Barns et al. 2007). There is a strong correlation between the abundance of Acidobacteria in soil and its pH, as they are more abundant in soils with pH lower than 6.0, and very uncommon in soils with pH higher than 6.5 (Sait et al. 2006). However, we found abundant Actinobacteria at pH 6.4 for MASE and pH 8.1 for SMI, probably due to the great versatility of this phylum to adapt to different environments. It is important to notice that, in the case of SMI soils, they contain traces of mine tailing, which were subjected to a geochemical process that changed the original pH of the soil. In spite of the oxidation of sulfides that generated acidity, neutralization and alkalization by carbonates and soil weathering followed (Ramos-Arroyo and Siebe-Grabach 2006), which perhaps gave the Acidobacteria time to adapt to the SMI soils. Perhaps, that is the reason why more Acidobacteria resistant to As were found in this report.

On the other hand, Actinobacteria were found in a higher proportion in MASE soils (19.0%) than in SMI soils (14.2%). Most of these bacteria play an important role in the decomposition of organic matter and they renew the reserves of nutrients in the soil and are fundamental in the formation of humus (Battistuzzi and Hedges 2009). May be that is the reason why Actinobacteria were more abundant in MASE soils as they showed higher organic matter content (8.41%) and TN (0.38%) as compared to SMI soils (7.14 and 0.17%, respectively) (Fig. 1). In fact, Porta et al. (2003) indicate that an optimum C/N ratio with a value close to 10 (MASE C/N ratio was 11.86) suggests a good relationship between mineralization and humification, with higher rates of organic matter degradation.

The genus *Bradyrhizobium* was one of the most abundant in both soil samples, this genus is known for its symbiotic nitrogen fixation in plants (Kaneko et al. 2002). Its presence in the agricultural soil could be related to the presence of crops and its relationship with the improvement of plant nutrition. On the other hand, the presence of the genus *Bradyrhizobium* in the SMI soils may also be related to the native vegetation found in the sampled area, promoting their growth (Corbera-Gorotiza and Nápoles-García 2013). Also, the Family Rhodospirillaceae was found in both soils. The so-called purple non-sulfur bacteria, include a total of 34 genera, and some of them contain several diazotrophic, plant-associated bacteria with growth-promoting potential (Baldani et al. 2014).

Besides, two As-reducers bacterial genera, *Bacillus* and *Williamsia* were identified. The first one is highly diverse and some species act as bio-protectants as well as plant-growth promoters, it is widely distributed and their main habitat is the soil (Orberá Ratón et al. 2005). In general, *Bacillus* species have been known to be good As-resistant bacteria. Since 1998 they were found to resistant As and can reduce it (Blum et al. 1998; Suresh et al. 2004) and absorb both As (III) and As (V) (Yang 2012). As for *Williamsia*, it usually participates in the biodegradation process and decomposition of contaminated industrial soils (Keikha 2018). *Williamsia* is a genus that has been isolated from As contaminated soils and classified as novel arsenite-resistant bacteria (Cai et al. 2009; Šimonovičová et al. 2016; Wu et al. 2018), but no extensive studies have been done which leaves a wide research area to explore. We found the above-mentioned bacterial genera in both types of soils, similar to a previous report (Campos et al. 2007); however, some of these isolates may represent new bacterial strains resistant to As. Also, the search for newer potent As-resistant bacteria in a specific ecological niche of contaminated soil is always relevant (Srivastava et al. 2013; Ghosh et al. 2018).

In general, fungi are abundant microorganisms in soil. They represent a large proportion of the soil's microbial biomass. The main groups of fungi found in the studied soils are Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota, and Basidiomycota. Within the Phylum Ascomycota the most frequently found genera in soil are *Penicillium* and *Aspergillus* (Gondim-Porto 2013). Fungi within the genus *Penicillium* are very diverse and play an important role in the decomposition of organic matter and the production of enzymes (Visagie et al. 2014). We report three species of this genus in the presence of As, especially *P. rubens* which grew in medium supplemented with As (III) at concentrations higher than 10 mM, contrary to the bacteria, which develop best in medium supplemented with As (V), and at lower concentration (Mellado et al. 2011). The Phylum Glomeromycota found only in the SMI soils form arbuscular mycorrhizae (Schüßler et al. 2001). Its presence in SMI soils may be related to the plants growing in the sampled area.

The mobility, availability, and speciation of As are affected by the microbial metabolism that participates in the biogeochemical cycle of this element. Among the microbial activities, some strains have been found to be able of oxidizing arsenite or reducing arsenate. The *ars* operon constitutes the most important and studied scheme of arsenic tolerance in microorganisms. Some genes involved are the *arsC* gene, for the arsenate reductase capable of transforming

As (V) to As (III), present in bacteria that have been characterized in terms of their resistance to As (Jackson et al. 2005). Cai et al. (2009) found genes involved in the oxidation of As (III): the *aoxB* gene that codes for the major subunit of the arsenite oxidase, as well as the genes that code for different arsenite transporting proteins in the microbial cell (*arsB*, *ACR3 (1)* and *ACR3 (2)*), found in bacteria isolated from soil highly contaminated with As (20 mM). We successfully amplified the *arsB* gene in the bacterial isolates with the ability to reduce As (V), all within the genus *Bacillus* (*Bacillus sp.*, *B. simplex* and *B. megaterium*). This gene confers the bacteria the ability to be more resistant to As, catalyzing the extrusion of As (III) outside the cell (Mukhopadhyay and Rosen 2002). The *B. simplex* isolate 47 was able to decrease the total As by 7.2%; however, is considered a low proportion as another *Bacillus* strain, was able to remove 76.0% of As (V) at a concentration of 6 mM and 56.0% was reduced to As (III) (Tripti et al. 2014).

In soils contaminated with As, it is common that microorganisms develop mechanisms to incorporate the metalloids into their metabolism. The soils studied here provide important information on native species of microorganisms resistant to As. On the other hand, a higher content in organic matter and moisture in MASE, in contrast with SMI soils, may contribute to its richest microbiome, which may explain that a greater diversity of bacteria was found in these soils, as compared to the mining soils.

In the SMI soils (highly contaminated by As), a greater number of As-resistant microorganisms were found, with the ability to transform the chemical species of As (reduction of As (V) to As (III)), as compared to microorganisms isolated from MASE soils. Although the phylum Firmicutes was found in a very low proportion in the SMI soil, they were able to reduce As (V) to As (III). On the other hand, the fungus *Penicillium* showed the greatest ability to reduce the As (V) to As (III) and a strong resistance to high concentrations of As (III) (> 10 mM).

It is important to notice that the origin of As in both types of soils may be different. Weathering of different parent material (rocks) in the catchment area of mines commonly contributes to the As content of SMI soils. Conversely, MASE soils come from weathering of volcanic rocks, rich on Na, Fe, Mg, and Fe-Ti oxides (Nieto-Samaniego et al. 2012). Therefore, As found in MASE soils is mostly related to irrigation with As-rich groundwater from deep boreholes (Zanor et al. 2019). The origin of As in both types of soils may explain the low ability of bacteria to process it on MASE soils, as well as the high ability to process As by fungi in SMI soils. In other words, the microbiome in each type of soil is the result of the ability of different microbiota to survive under different conditions.

The results obtained in this work can contribute to a better understanding of the microbiomes of soils contaminated with As. Furthermore, a fungus showed the highest ability to process As, rather than a bacterium, which are most common microorganisms to degrade As in nature. This observation is important as fungi uses a different metabolic pathway to deal with As, and also to look forward to find microorganisms with biotechnological potential in the restoration and bioremediation of As-contaminated soils, in the future.

Acknowledgments. MELP was supported by a fellowship (365607) from CONACYT (Mexico) during the development of this project.

Declarations

Funding: This work was partially supported by the University of Guanajuato annual allocation.

Conflict of interest/Competing interests: Authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: This work does not involve any study with human participants or animals.

Consent to participate: All authors consent to participate

Consent for publication: All authors consent for publication of this paper

Availability of data and material: Not applicable

Code availability: Not applicable

Authors' contributions MELP and MCDRC conceived the study. MELP, GAZ, and ASR performed the research. MELP and MCDRC analyzed data and wrote MS, JEI interpreted and analyzed the data, structured and wrote the MS. All authors read and approved the manuscript.

References

- Achour AR, Bauda P, Billard P (2007) Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res Microbiol* 158:128-137 doi: 10.1016/j.resmic.2006.11.006
- Baldani J, Videira S, dos Santos Teixeira K, Reis V, Martínez de Oliveira A, Schwab S, de Souza EM, Pedraza RO, Divan Baldani VL, Hartmann A (2014) The Family Rhodospirillaceae. In: *The Prokaryotes* (ed) Rosenberg E, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. Springer Heidelberg, Berlin, pp 533–618
- Barns SM, Cain EC, Sommerville L, Kuske CR (2007) Acidobacteria Phylum Sequences in Uranium-Contaminated Subsurface Sediments Greatly Expand the Known Diversity within the Phylum. *Applied and environmental microbiology* 73:3113-6
- Battistuzzi FU, Hedges SB (2009) A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. *Molecular Biology and Evolution* 26:335-343
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2007) GenBank. *Nucleic Acids Res* 35:D21-5
- Blum JS, Bindi AB, Buzzelli J, Stolz JF, Oremland RS (1998) *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic | SpringerLink. *Archives of microbiology*, 171:19-30
- Brady NC (1984) *The Nature and properties of Soils*. Macmillan Publishing Company, New York

- Branco R, Francisco R, Chung AP, Morais PV (2009) Identification of an aox System That Requires Cytochrome c in the Highly Arsenic-Resistant Bacterium *Ochrobactrum tritici* SCII24. *Applied and environmental microbiology* 75:5141-5147
- Bundschuh J, Giménez Forcada E, Guèrèquiz R, et al. (2008) Fuentes geogénicas de arsénico y su liberación al medio ambiente. In: Bundschuh J, Pérez Carrera A, Litter M (eds) *Distribución del Arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana*. CYTED, Iberoarsen, pp 33–48
- Cai L, Liu G, Rensing C, Wang G (2009) Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology* 9:1-11
- Campos V, Valenzuela C, Alcorta M, Escalante G, Monsaca MA (2007) Aislamiento de Bacterias Resistentes a Arsénico desde Muestras de Rocas Volcánicas de la Quebrada Camarones, Región Parinacota: Chile. *Gayana (Concepc)* 71:150-5
- Carrillo-Chávez A, Morton-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solorzano H, Oesler G, García-Meza V, Hernández E, Morale P, Cienfuegos E (2003) Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico. *Ore Geol. Rev.* 23:277–297
- Corbera Gorotiza J, Nápoles García MC (2013) Efecto de la inoculación conjunta *Bradyrhizobium elkanii*-hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivar INCASOY-27. *Cultivos Tropicales* 34:05-11
- Cruz-Avalos AM, Bivián-Hernández MDLÁ, Ibarra JE, Del Rincón-Castro MC (2019) High Virulence of Mexican Entomopathogenic Fungi Against Fall Armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 112:99-107
- Das S, Bora SS, Yadav R, Barooah M (2017) A metagenomic approach to decipher the indigenous microbial communities of arsenic contaminated groundwater of Assam. *Genomics data* 12:89-96
- DOF (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis: Diario Oficial de la Federación (DOF)
- DOF (2007) Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio: Diario Oficial de la Federación (DOF)
- EPA (2001) Trace elements in water, solids, and biosolids by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry Revision 5.0. US Environmental Protection Agency, Washington DC
- Feng G, Xie T, Wang X, Bai J, Tang L, Zhao H, Wei W, Wang M, Zhao Y (2018) Metagenomic analysis of microbial community and function involved in Cd-contaminated soil. *BMC Microbiol* 18:11
- Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA, Knight R (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *Isme j* 6:1007-17
- Gardes M, Bruns D (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118 doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- Ghosh PK, Maiti TK, Pramanik K, Ghosh SK, Mitra S, De TK (2018) The role of arsenic resistant *Bacillus aryabhatai* MCC3374 in promotion of rice seedlings growth and alleviation of arsenic phytotoxicity. *Chemosphere*, 211:407-419
- Gondim-Porto C (2013) Análisis microbiológico de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora urbana. Universidad Complutense de Madrid, Madrid
- Gu Y, Wang Y, Sun Y, Zhao K, Xiang Q, Yu X, Zhang X, Chen Q (2018) Genetic diversity and characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria isolated from *Pteris vittata*, an arsenic hyperaccumulator. *BMC Microbiology* 18:42
- Habtegebriel B, Getu E, Dawd M, Seyoum E, Atnafu G, Khamis F, Hilbur Y, Ekesi S, Larsson MC (2016) Molecular characterization and evaluation of indigenous entomopathogenic fungal isolates against *Sorghum Chafer*, *Pachnoda interrupta* (Olivier) in Ethiopia. *Journal of Entomology and Nematology* 8:34-45
- Inskeep WP, Macur RE, Hamamura N, Warelow TP, Ward SA, & Santini JM (2007) Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental microbiology* 9:934-943
- Jackson CR, Dugas SL, Harrison KG (2005) Enumeration and characterization of arsenate-resistant bacteria in arsenic free soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37:2319–2322
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S (2002) Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research* 9:189-97
- Keikha M (2018) *Williamsia spp.* are emerging opportunistic bacteria. In: *New Microbes New Infect* 21:88-9
- Loska K, Wiechula D, Korus I (2004) Metal contamination of farming soils affected by industry. *Environ Int*, 30:159-65
- Lu Y, Dong F, Deacon C, Chen HJ, Raab A, Meharg AA (2010) Arsenic accumulation and phosphorus status in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars surveyed from fields in South China. *Environmental Pollution* 158:1536-1541
- López-Pérez ME, Del Rincón-Castro MC, Muñoz-Torres C, Ruiz-Aguilar GM, Solís-Valdez S Zano GA (2017) Evaluación de la contaminación por elementos traza en suelos agrícolas del suroeste de Guanajuato, México. *Acta Universitaria* 27:10-21
- Mellado C, Campos V, Mondaca MA (2011) Distribución de genes de resistencia a arsénico en bacterias aisladas de sedimentos con concentraciones variables del metaloide. *Gayana (Concepc)* 75:131-7
- Mirza BS, Sorensen DL, Dupont RR, McLean JE (2017) New Arsenate Reductase Gene (arrA) PCR Primers for Diversity Assessment and Quantification in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol* 83:e02725-16

- Mora-Donjuán CA, Burbano-Vargas ON, Méndez-Osorio C, Castro-Rojas DF (2017) Evaluación de la biodiversidad y caracterización estructural de un Bosque de Encino (*Quercus L.*) en la Sierra Madre del Sur, México. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 14:68-75
- Mukhopadhyay R, Rosen BP (2002) Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environmental health perspectives* 110:745-748
- Müller G (1969) Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. *Geojournal* 2:108-118
- Nieto-Samaniego AF, Ojeda-García AC, Alaniz-Álvarez SA, Xu S (2012) Geología de la región de Salamanca, Guanajuato, México. *Bol Soc Geol Mex* 64:411-425
- Núñez SJ (1985) Fundamentos de edafología. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica
- Orberá Ratón T, Pérez Portuondo I, Ferrer Salas D, Cortés Ramos N, González Giro Z (2005) Aislamiento de cepas del genero *Bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Química XVII*:189-95
- Porta J, López-Acevedo M, Roquero de Laburu C (2003) Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Madrid: Mundi-Prensa
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41:590-6
- Ramos-Arroyo YR, Prol-Ledesma RM, Siebe-Grabach CD (2004) Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del Distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. *Revista mexicana de ciencias geológicas* 21:268-284
- Ramos-Arroyo YR, Siebe-Grabach CD (2006) Estrategia para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de caso en el Distrito de Guanajuato, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas* 23:54-74
- Rangel-Montoya EA, Montañez Hernández LE, Luévanos Escareño MP, Luévanos Escareño MP, Balagurusamy N (2015) Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. *Terra Latinoamericana* 33:103-18
- Rodríguez R, Morales-Arredondo I, Rodríguez I (2016) Geological differentiation of groundwater threshold concentrations of arsenic, vanadium and fluorine in el bajo Guanajuatense, Mexico. *Geofis Int* 55-1:5-15
- Sait M, Davis KE, Janssen PH (2006) Effect of pH on Isolation and Distribution of Members of Subdivision I of the Phylum Acidobacteria Occurring in Soil. *Applied and environmental microbiology* 72:1852-7
- Saldaña-Robles A, Saldaña-Robles N, Saldaña-Robles A, Zanor GA, Ruiz-Aguilar GM, Gutiérrez-Vaca C (2018). Efecto del fósforo en la acumulación de arsénico en cebada (*Hordeum vulgare L.*) por riego con agua contaminada. *Agrociencia* 52-3: 407-418
- SCFI (2006) Norma Mexicana NMX-AA-132-SCFI-2006. Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SCFI)
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research* 105:1413-21
- Shannon C (1948) The mathematical theory of communication. Press Urbana, University of Illinois
- Shuhaimi M, Ali AM, Saleh NM, Yazid AM (2001) Utilisation of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. *Biotechnology Letters* 23:731-736
- Simeonova DD, Lievremon D, Lagarde F, Muller DA, Groudeva VI, Lett MC (2004) Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 237:249-53
- Šimonovičová A, Peřková K, Jurkovič L, Ferianc P, Vojtková H, Remenár M, Kraková L, Pangallo D, Hiller E, Čerňanský S (2016) Autochthonous Microbiota in Arsenic-Bearing Technosols from Zemianske Kostol'any (Slovakia) and Its Potential for Bioleaching and Biovolatilization of Arsenic. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227:1-17
- Simpson EH (1949) Measurement of Diversity. *Nature* 163:688
- Srivastava PK, Vaish A, Dwivedi S, Chakrabarty D, Singh N, Tripathi RD (2011) Biological removal of arsenic pollution by soil fungi. *Sci Total Environ* 409:2430-42
- Srivastava S, Verma PC, Chaudhry V, Singh N, Abhilash PC, Kumar KV, SN (2013) Influence of inoculation of arsenic-resistant *Staphylococcus arlettae* on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.) Czern. Var. R-46. *Journal of hazardous materials* 262:1039-1047
- Sumner ME (1999) Handbook of soil science. CRC Press Boca Ratón, Florida
- Suresh K, Prabakaran SR, Sengupta S, Shivaji S (2004) *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. *Journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(4):1369-1375
- Tripti K, Sayantan D, Shardendu S, Singh DN, Tripathi AK (2014) Potential for the Uptake and Removal of Arsenic [As (V) and As (III)] and the Reduction of As (V) to As (III) by *Bacillus licheniformis* (DAS1) under Different Stresses. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 42:238-48
- Visagie C, Houbaken J, Frisvad J, Hong SB, Klaassen C, Perrone G, Seifert K, Varga J, Yaguchi T, Samson R (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol* 78:343-71
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261-7
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703

White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA GD, Sninsky JJ & White TJ (ed) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego, CA., pp 315-322

Wu D, Zhang Z, Gao Q, Ma Y (2018) Isolation and characterization of aerobic, culturable, arsenic-tolerant bacteria from lead-zinc mine tailing in southern China | SpringerLink. World Journal of Microbiology and Biotechnology 34:177

Yang T, Chen ML, Liu LH, Wang JH, Dasgupta PK (2012) Iron(III) Modification of *Bacillus subtilis* Membranes Provides Record Sorption Capacity for Arsenic and Endows Unusual Selectivity for As(V). Environmental science & technology 46:2251-2256

Yoo JY et al. (2016) 16S rRNA gene-based metagenomic analysis reveals differences in bacteria-derived extracellular vesicles in the urine of pregnant and non-pregnant women. Exp Mol Med 48:e208- doi: 10.1038/emmm.2015.110

Zanor GA, García MG, Venegas-Aguilera LE, Saldaña-Robles A, Saldaña-Robles N, Martínez-Jaime OA, Segoviano-Garfias JJN, Ramírez-Santoyo LF (2019) Sources and distribution of arsenic in agricultural soils of Central Mexico. Journal of Soils and Sediments 19-6: 2795-2808

Figure Captions

Fig. 1 Relative abundance at phylum level of bacteria in soil samples. MASE.16S: DNA samples from agricultural soil analyzed with the 16S rDNA gene sequences; SMI.16S: DNA samples from mine tailings soil analyzed with the 16S rDNA gene sequences.

Fig. 2. Relative abundance at Phylum level of fungi from the soil samples. MASE.18S = sample of DNA from agricultural soil analyzed with the 18S rDNA gene; SMI.18S = sample of DNA from mine tailings soil analyzed with the 18S rDNA gene.

Fig. 3. Quantification of total As in the supernatant of the culture medium, determined by Atomic Absorption Spectrometry. MT= control medium without As and without microorganisms. EXSC+AsIII=medium supplemented with 5 mM of As (III) without microorganisms. EXSC+AsIII+Bs=medium with 5 mM of As (III) and the isolated 47 inoculated. EXSC+AsV=medium supplemented with 5 mM of As (V) without microorganisms. EXSC+AsV+Bs=medium with 5 mM of As (V) and the isolated 47 inoculated. PD+AsIII=medium supplemented with 5 mM of As (III) without microorganisms. PD+AsIII+Pr=medium with 5 mM of As (III) and the isolated 44 inoculated. PD+AsV = medium supplemented with 5 mM of As (V) without microorganisms. PD+AsV+Pr=medium with 5 mM of As (V) and the isolated 44 inoculated.

Table 1 Primers used to amplify different sequences for the identification of bacteria, fungi, and genes related to As transformations.

Gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Reference
16S rDNA	27F	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	Yoo et al. 2016
	518R	WTTACCGCGGCTGCTGG	
ITS	1F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	Gardes and Bruns 1993
	4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
16S rDNA	fD1	CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg et al. 1991
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
ITS	ITS5-F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Habtegebriel et al. 2016
	ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
aoxB	1F	GTSGBBTGYGGMTAYCABGYCTA	Inskeep et al. 2007
	1R	TTGTASGCBGGNCGRTTRTGRAT	
arsB	darsB1F	GGTGTGGAACATCGTCTGGAAYGCNAC	Achour et al. 2007
	darsB1R	CAGGCCGTACACCACCAGRTACATNCC	
ACR3(1)	dacr1F	GCCATCGGCCTGATCGTNATGATGTAYCC	Achour et al. 2007
	dacr1R	CGGCGATGGCCAGCTCYAAYTTYTT	
ACR3(2)	dacr5F	TGATCTGGGTCATGATCTTCCCVATGMTGVT	Achour et al. 2007
	dacr4R	CGGCCACGGCCAGYTCRAARAARTT	
arrA	CVF1	CACAGCGCCATCTGCGCCGA	Mirza et al. 2017
	CVR1	CCGACGAACTCCYTGYTCCA	

Table 2 Physicochemical properties in MASE and SMI soil samples.

Sample	Texture class	Sand %	Loam %	Clay %	M %	BD g cm ⁻³	RD g cm ⁻³	TP %	pH	OC %	TN %	C/N	As mg kg ⁻¹	Class of I _{geo}
MASE	Clay	13.64 _a	25.6 _a	60.76 _a	6.74 _a	1.07 _a	1.97 _a	45.50 _a	6.40 _a	8.41 _a	0.38 _a	11.86 _a	15	2
SMI	Loam	39.03 _b	34.19 _a	26.79 _b	1.47 _b	1.00 _b	2.30 _b	56.72 _b	8.10 _b	7.14 _b	0.17 _b	25.69 _b	39	3

MASE = agricultural soil; SMI = mining soil; M = moisture; BD = bulk density; RD = real density; TP = total porosity; OC = organic content; TN = total nitrogen; C/N = carbon-nitrogen ratio. Means (n=3) for the variables are shown. Values with different letters are statistically different (p < 0.05).

Table 3. Abundance of different taxonomic levels of bacteria found in MASE and SMI soils.

Phylum	Family	Genus	MASE (%)	SMI (%)
Proteobacteria	Rhodospirillaceae	uncultured	6.59	3.27
Proteobacteria	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	3.77	5.55
Gemmatimonadetes	uncultured	uncultured	3.36	5.31
Proteobacteria	Nitrosomonadaceae	uncultured	2.53	3.74
Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Ramlibacter</i>	2.4	0.23
Actinobacteria	Catelliglobospora	uncultured	1.99	0.06
Proteobacteria	DA111	uncultured	1.8	0.53
Proteobacteria	Sinobacteraceae	<i>Steroidobacter</i>	1.56	1.84
Proteobacteria	Sinobacteraceae	uncultured	1.51	1.4
Proteobacteria	wr0007	uncultured	1.37	1.78
Proteobacteria	Xanthobacteraceae	uncultured	1.18	2.16
Proteobacteria	Caulobacteraceae	<i>Phenylobacterium</i>	1.1	0.35
Proteobacteria	Xanthobacteraceae	<i>Pseudolabrys</i>	0.86	2.51
Proteobacteria	Caulobacteraceae	uncultured	0.81	0.12
Proteobacteria	Methylobacteriaceae	<i>Microvirga</i>	0.62	0.53
Bacteroidetes	Chitinophagaceae	uncultured	0.57	0.06
Proteobacteria	Erythrobacteraceae	<i>Altererythrobacter</i>	0.48	0.61
Actinobacteria	Luedemannella	<i>Luedemannella</i>	0.48	0.26
Bacteroidetes	Cytophagaceae	<i>Flexibacter</i>	0.38	0.12
Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Lysobacter</i>	0.35	1.11
Proteobacteria	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	0.35	0.12
Proteobacteria	Rhodospirillaceae	<i>Skermanella</i>	0.35	0.06
Proteobacteria	Incertae_Sedis	<i>Rhizomicrobium</i>	0.32	0.06
Proteobacteria	Sorangineae	uncultured	0.3	0.18
Proteobacteria	Sorangineae	<i>Sandaracinaceae</i>	0.27	0.26
Proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	<i>Rhodoplanes</i>	0.24	0.29
Proteobacteria	KF-JG30-B3	uncultured	0.22	0.85
Actinobacteria	480-2	uncultured	0.19	0.03
Proteobacteria	wr0007	uncultured	0.16	0.2

Proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	<i>Pedomicrobium</i>	0.13	0.5
Actinobacteria	Blastococcus	uncultured	0.13	0.29
Proteobacteria	Comamonadaceae	uncultured	0.13	0.12
Actinobacteria	Arthrobacter	uncultured	0.11	0.64
Proteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	0.11	0.26
Proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	<i>Hyphomicrobium</i>	0.11	0.23
Verrucomicrobia	Opitutaceae	<i>Opitutus</i>	0.11	0.15
Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Janthinobacterium</i>	0.05	0.09

Table 4. Abundance of different taxonomic levels of fungi found in MASE and SMI soils.

Phylum	Family	Genus	MASE (%)	SMI (%)
Ascomycota	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	3.77	
Ascomycota	Incertae sedis	<i>Acremonium</i>	3.51	
Ascomycota	Nectriaceae	<i>Haematonectria</i>	2.80	
Ascomycota	Dipodascaceae	Unidentified	1.70	
Ascomycota	Lasiosphaeriaceae	<i>Cladorrhinum</i>	1.68	
Ascomycota	Pleosporaceae	<i>Epicoccum</i>	1.59	0.04
Ascomycota	Incertae sedis	<i>Microdochium</i>	0.76	
Ascomycota	Pleosporaceae	Other	0.60	
Zygomycota	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>	0.49	0.47
Ascomycota	Incertae sedis	Other	0.39	
Ascomycota	Incertae sedis	<i>Stachybotrys</i>	0.39	
Ascomycota	Orbiliaceae	<i>Arthrobotrys</i>	0.36	
Ascomycota	Sordariaceae	Unidentified	0.33	
Ascomycota	Lasiosphaeriaceae	Other	0.26	0.19
Ascomycota	Sporormiaceae	<i>Westerdykella</i>	0.21	
Ascomycota	Nectriaceae	Other	0.19	
Basidiomycota	Incertae sedis	<i>Hannaella</i>	0.14	
Basidiomycota	Ceratobasidiaceae	<i>Ceratobasidium</i>	0.13	
Ascomycota	Lasiosphaeriaceae	Unidentified	0.10	
Ascomycota	Incertae sedis	<i>Ilyonectria</i>		8.54
Glomeromycota	Glomeraceae	Unidentified		8.32
Basidiomycota	Inocybaceae	<i>Neopaxillus</i>		2.76
Basidiomycota	Ceratobasidiaceae	Unidentified		2.18
Glomeromycota	Acaulosporaceae	<i>Entrophospora</i>		1.65
Glomeromycota	Glomeraceae	<i>Funneliformis</i>		0.75
Basidiomycota	Tricholomataceae	<i>Mycenella</i>		0.49
Glomeromycota	Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>		0.48
Ascomycota	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>		0.21
Ascomycota	Nectriaceae	<i>Cylindrocarpon</i>		0.14
Basidiomycota	Filobasidiaceae	<i>Cryptococcus</i>		0.13

Ascomycota	Incertae sedis	<i>Tetracladium</i>	0.13
Ascomycota	Incertae sedis	<i>Mycocentrospora</i>	0.11
Ascomycota	Nectriaceae	<i>Calonectria</i>	0.11
Glomeromycota	Ambisporaceae	Other	0.11
Basidiomycota	Ceratobasidiaceae	Other	0.10
Ascomycota	Incertae sedis	<i>Periconia</i>	0.08

Table 5. Identity of As-reducing bacteria and fungus isolates according to their similarity to the NCBI reference sequences.

Isolate	% Coverage	E-value	% Identity	Closest sequence	Accession number	Identification
2	99	0.0	99.93	HQ317155.1	MN498033	<i>Bacillus sp.</i>
3	99	0.0	100.00	KJ831621.1	MN498034	<i>Bacillus simplex</i>
9	100	0.0	98.72	MG645295.1	MN498035	<i>Bacillus simplex</i> strain LRV34
20	99	0.0	100.00	MG011540.1	MN498036	<i>Bacillus muralis</i> strain HIS3200905
47	100	0.0	99.86	MF581431.1	MN498037	<i>Bacillus simplex</i> strain Md1-25
49	100	0.0	99.93	MK544829.1	MN498038	<i>Bacillus megaterium</i> strain LB11
51	100	0.0	99.66	MK110993.1	MN498039	<i>Bacillus sp.</i> strain Whitaker B12
59	99	0.0	99.28	KM374746.1	MN498040	<i>Bacillus megaterium</i> strain 1S7
61	89	0.0	84.67	EU073114.1	MN498041	<i>Williamsia sp.</i> SY3
44	97	0.0	99.50	LT558870.1	MN493046	<i>Penicillium rubens</i>
67	99	0.0	99.02	DQ681334.1	MN493047	<i>Penicillium granulatum</i> isolate 732
69	99	0.0	99.65	MK267409.1	MN493048	<i>Penicillium chrysogenum</i> isolate E20332

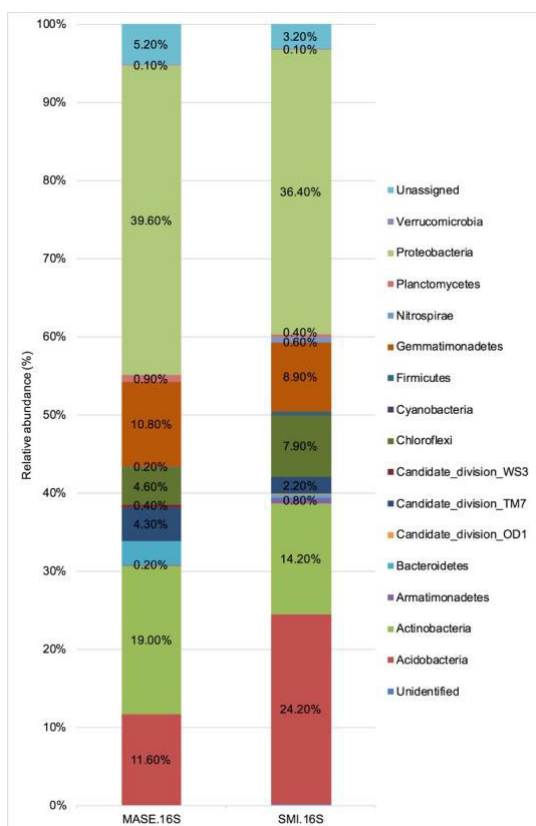


Fig. 1

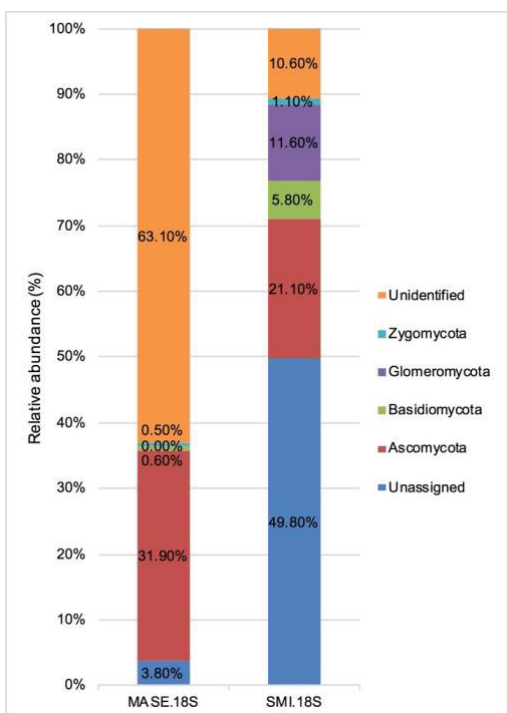


Fig. 2

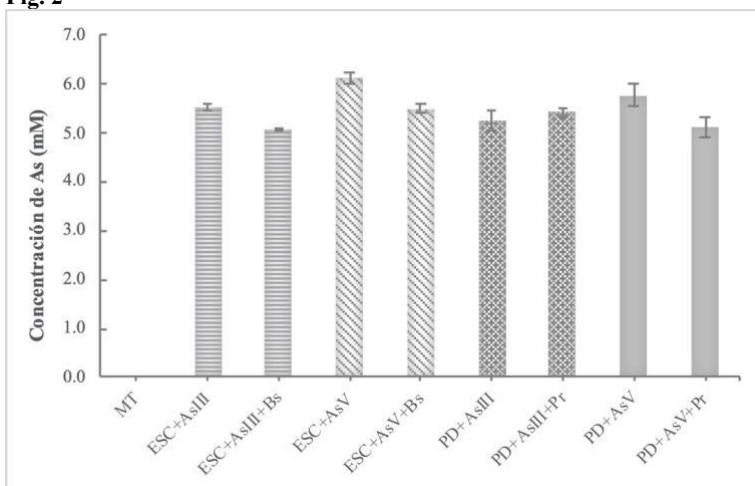


Fig. 3

CVU

CURRICULUM VITAE



DATOS PERSONALES:

NOMBRE: María Elena López Pérez.

CORREO: elenalopez2110@gmail.com, me.lopezperez@ugto.mx

CEL: 4626022051

FORMACIÓN ACADÉMICA:

2004-2007 TÍTULO y CÉDULA 5534662 de Técnico en Biotecnología del Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Guanajuato (CECYTEG).

2007-2011 Constancia Oficial del Octavo Nivel del Idioma Inglés en el Centro de Educación Continua Irapuato, concluido el programa del curso, de acuerdo con el plan de estudios vigente en el departamento de Lenguas de la Universidad de Guanajuato.

2008-2012 TÍTULO y CÉDULA PROFESIONAL **8317794** de **Licenciatura en INGENIERÍA AMBIENTAL** (Uso eficiente de Suelo y Agua) de la División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato.

2013-2015 TÍTULO y CÉDULA PROFESIONAL **11509384** de la **Maestría en Biociencias** de la División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato.

2015-2019 Certificado de **Doctorado en Biociencias** de la División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato.

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS:

2008-2009 Reconocimiento al Mérito Universitario como Alumno Destacado por alto Aprovechamiento Académico de la Universidad de Guanajuato.

2009-2010 Reconocimiento al Mérito Universitario como Alumno Destacado por alto Aprovechamiento Académico de la Universidad de Guanajuato.

2010-2011 Reconocimiento al Mérito Universitario como Alumno Destacado por alto Aprovechamiento Académico de la Universidad de Guanajuato.

2011-2012 Reconocimiento al Mérito Universitario en la Modalidad de Alumno Destacado por alto Aprovechamiento Académico y TRAYECTORIA ACADÉMICA de la Universidad de Guanajuato.

2015-2016 Reconocimiento al Mérito Universitario en la Modalidad de Alumno Destacado por alto Aprovechamiento Académico dentro del Programa de Doctorado en Biociencias de la Universidad de Guanajuato.

2016-2017 Reconocimiento al Mérito Universitario en la Modalidad de Alumno Destacado por alto Aprovechamiento Académico dentro del Programa de Doctorado en Biociencias de la Universidad de Guanajuato.

2018-2019 Reconocimiento al Mérito Universitario en la Modalidad de Alumno Destacado por alto Aprovechamiento Académico dentro del Programa de Doctorado en Biociencias de la Universidad de Guanajuato.

EXPERIENCIA LABORAL:

2006_ Prácticas profesionales en la modalidad EMPRESA, en la EMPRESA PRODUCTOS LÁCTEOS BLANQUITA. Realizando el control y análisis del queso, crema y leche.

2012_ Servicio Social Profesional en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), perteneciente a JAPAMI (Junta de Agua Potable, Drenaje, Alcantarillado y Saneamiento del Municipio de Irapuato, Gto.), en la cual realicé Análisis Físicoquímicos y Espectrofotométricos de Agua Potable y Agua Residual, así como la operación y monitoreo del influente y efluente de la PTAR.

2012_ Docente Suplente de Inglés I y III en el Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Guanajuato (CECYTEG).

2012_ Docente en la cátedra de Física del Curso Propedéutico de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

2013_ Docente en la cátedra de Física I de los programas de Lic. en Ingeniería en Alimentos y Mecánico Agrícola de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

2013_ Docente en la cátedra de Administración Ambiental (ISO 14001) del programa de Lic. en Ingeniería Ambiental de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

2014_ Docente en la cátedra de Administración Ambiental (ISO 14001) del programa de Lic. en Ingeniería Ambiental de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

2015_ Organizador durante el XXVI Curso Nacional de Control Biológico y talleres de Control Biológico en la ciudad de León, Gto. del 2 al 4 de noviembre del 2015.

2015_ Organizador durante el XXXVIII Congreso Nacional de Control Biológico en la ciudad de León, Gto. del 5 al 6 de noviembre del 2015.

2015-2016_ Docente en la cátedra de Química I del programa de Lic. en Ingeniería Mecánico Agrícola de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

2016_ Docente en la cátedra de Álgebra Lineal del programa de Lic. en Ingeniería en Alimentos de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

2017_ Organizador durante la semana del XXVIII Curso Nacional de Control Biológico y el XL Congreso Nacional de Control Biológico realizado los días 12 al 17 de noviembre en la ciudad de Mérida, Yucatán.

2018_ Organizador durante la semana del XXIX Curso Nacional de Control Biológico y el XLI Congreso Nacional de Control Biológico realizado los días 5 al 9 de noviembre en la ciudad de Puerto Vallarta, Jalisco.

2018-2019_ Co-Directora de Tesis en Licenciatura de Ingeniería en Alimentos con el Tema "ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PRESENTES EN LA LECHUGA (*Lactuca sativa*).

2019_ Docente en la cátedra de Química R. del programa de Lic. en Ingeniería Ambiental y Energías Renovables de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

2019_ Docente en la cátedra de Balance de Materia y Energía del programa de Lic. en Ingeniería Ambiental y Energías Renovables de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

2020_ Docente en las cátedras de Balance de Materia y Energía, Microbiología, Bioquímica Análisis de Parámetros Ambientales y Recursos Naturales y Sustentabilidad del programa de Lic. en Ingeniería Ambiental y Energías Renovables de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida.

PARTICIPACIONES Y ASISTENCIAS:

2009_ Asistencia al Foro Regional "Innovaciones Tecnológicas en la Gestión Integral de Residuos Sólidos"

2010_ Asistencia al Foro Regional "Tecnologías en la Agroindustria del siglo XXI"

2011_ Expositor de Materiales Reciclables, durante el 3er. Encuentro Regional rumbo al 9no. Foro Nacional Universitario sobre "El Imaginario del Agua" de Espacio Acuoso.

2011_ Participación en el 17° Verano de la Investigación Científica de la Universidad de Guanajuato, con el Tema "Caracterización de microorganismos fotosintéticos (Consortios Algas-Bacterias) acumuladores de ácidos grasos con potencial para la producción de Biodiésel"

2011_ Asistencia al Seminario "Conceptos Generales a la Propiedad Industrial y Búsquedas Técnicas en Innovación Tecnológica"

2011_ Asistencia al X Congreso Internacional y XVI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales.

2012_ Participación en 3er VERANO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA EN EMPRESAS Y DEPENDENCIAS GUBERNAMENTALES de la Universidad de Guanajuato, con el tema "Monitoreo y evaluación de la planta de tratamiento de aguas residuales con el proceso de lagunas de oxidación facultativas".

2013_ Participación en el curso-taller "Retos Actuales de la Docencia", dirigido a docentes tutores, e impartido en la División de Ciencias de la Vida, con una duración de 20 horas.

2014_ Participación en el curso-taller Proteómica y Espectrometría de Masas: Herramientas y aplicaciones, Universidad de Guanajuato.

2014_ Asistencia al SEGUNDO ENCUENTRO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA, Soluciones para un mundo mejor, llevado a cabo en Santiago de Querétaro el 21 de febrero.

2014_ Participación en la elaboración del examen "Física I" para la evaluación intermedia de los programas de las Licenciaturas en Ingeniería Ambiental, Ingeniería en Alimentos, Ingeniería en Energías Renovables e Ingeniería Mecánica Agrícola.

2014_ Presentación poster con el tema "Articulating the Relationship Between Teaching and Research Toward a New Culture of Water", en el International Annual Meeting (American Society of Agronomy) llevado a cabo en la ciudad de Long Beach, California del 2 al 5 de noviembre.

2015_ Asistente al curso-taller "Análisis bioinformático de Transcriptomas (RNA-Seq) llevado a cabo en la ciudad de Querétaro del 18 al 21 de marzo.

2015_ Participación en el XII Participación de la Mujer en la Ciencia con el tema “CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y DE ELEMENTOS TRAZA EN SUELOS AGRÍCOLAS, DEL ESTADO DE GUANAJUATO, MÉXICO” en la ciudad de León del 13-15 de mayo.

2015_ Presentación poster con el Tema “Metagenomic and Comparative Analysis in Agricultural and Mining Soils in Guanajuato, México” en 7th Annual Argonne Soil Metagenomics Meeting en la ciudad de Naperville, Illinois del 21 al 23 de octubre.

2016_ Participación durante el I Congreso de Investigación del Campus Irapuato Salamanca, con el Tema “Identificación molecular de bacterias y hongos resistentes a altas concentraciones de arsénico aislados de suelo superficial minero” efectuada el 8 y 9 de septiembre del 2016.

2016_ Participación durante el marco de la 23 Semana Nacional de Ciencia Tecnología y la Semana Tecnológica 2016, con el Tema “Contaminación de Suelos y su Biorremediación”.

2017_ Asistencia al foro “USO DE LA INGENIERÍA GENÉTICA EN LA AGRICULTURA” realizado por la Secretaría de Desarrollo Agroalimentario y Rural de Guanajuato, el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato y la Academia Mexicana de Entomología Aplicada A.C.

2017_ Ponente en el Taller “Identificación y Caracterización Molecular de Agentes de Control Biológico” durante la semana XXVIII Curso Nacional de Control Biológico y el XL Congreso Nacional de Control Biológico realizado los días 12 al 17 de noviembre en la ciudad de Mérida, Yucatán.

2018_ Asistencia en el “Taller de Aplicación, Producción Masiva y Aplicación de Hongos Entomopatógenos” desarrollado en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, en Tecomán Colima.

2018_ Participación en el 2º Congreso Internacional de Ingeniería Ambiental León 2018, como ponencia oral con el Tema “Potencial para la transformación de las especies químicas de arsénico y los genes involucrados de bacterias y hongos aislados de suelo superficial minero”.

2018_ Participación en el 7^{mo} Simposio Nacional Y 1^{ER} Internacional de Ingeniería Química Y Bioquímica Aplicada como ponencia oral con el Tema “POTENCIAL REDUCTOR DE As(V) a As(III) DE UNA CEPA DEL HONGO *Penicillium rubens*”.

2019_ Participación en el curso “Diseño de Oligonucleótidos, Sondas y Estandarización de Ensayos para PCR y PCR Tiempo Real” realizado por ADN SINTETICO SAPI DE CV (T4OLIGO).

2019_ Participación en la impartición del Taller “Patología de Insectos” llevado a cabo en el 1^{er} Simposio de Ingenierías y Finne 2019” en el Instituto Tecnológico Superior de Abasolo.

2019_ Participación como conferencista con el Tema “Metagenómica, gen 16S rRNA e ITS: herramientas para la identificación de microorganismos con potencial biotecnológico en la restauración de sitios contaminados” llevado a cabo en el 1^{er} Simposio de Ingenierías y Finne 2019” en el Instituto Tecnológico Superior de Abasolo.

2019_ Participación como conferencista con el Tema “El tratamiento de Aguas Residuales” en el Instituto Colombres durante el ciclo escolar 2019-2020.

ARTÍCULOS PUBLICADOS:

2017_ Evaluación de la contaminación por elementos traza en suelos agrícolas del suroeste de Guanajuato, México.

Cita: López-Pérez, M. E., Del Rincón-Castro, M. C., Muñoz-Torres, C., Ruiz-Aguilar, G. M. L., Solís- Valdez, S., & Zanol, G. A. (2017). Evaluación de la contaminación por elementos traza en suelos agrícolas del suroeste de Guanajuato, México. *Acta Universitaria*, 27(6), 3-12. doi: 10.15174/ au.2017.1386

2018_ Mejoramiento de las propiedades físicas y químicas de un suelo agrícola mezclado con lombricompostas de dos efluentes de biodigestor.

Cita: Zanol, G. A., López-Pérez, M. E., Martínez-Yáñez, R., Ramírez-Santoyo, L. F., Gutiérrez-Vargas, S., & León-Galván, M. (2018). Mejoramiento de las propiedades físicas y químicas de un suelo agrícola mezclado con lombricompostas de dos efluentes de biodigestor. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 19(4).

2018_ Identificación de bacterias y hongos de importancia biotecnológica en la resistencia a arsénico.

Cita: Rodríguez-Arredondo, A. N., López-Pérez, M. E., & Del Rincón-Castro, M. C. (2018). Identificación de bacterias y hongos de importancia biotecnológica en la resistencia a arsénico. *Jóvenes en la ciencia*, 4(1), 23-27.

2020_ Microbiomes in Agricultural and Mining Soils Contaminated with Arsenic in Guanajuato, Mexico.

Cita: Aceptado por la revista Archives of Microbiology, por publicar.