

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Aislamiento, caracterización molecular y selección de bacterias
resistentes a cadmio como potenciales biorremediadores de
suelos cacaoteros contaminados**

TESIS

**Para optar el grado académico de Maestra en en Ciencias con
Mención en Biotecnología Molecular**

Autora: Br. Karol Noemi Vilchez Estrada

Tumbes, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Aislamiento, caracterización molecular y selección de bacterias
resistentes a cadmio como potenciales biorremediadores de
suelos cacaoteros contaminados**

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios (presidente)

Mg. John Henry Rimaycuna Ramírez (secretario)

PhD. Virna Alexia Cedeño Escobar (vocal)

Tumbes, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Aislamiento, caracterización molecular y selección de bacterias
resistentes a cadmio como potenciales biorremediadores de
suelos cacaoteros contaminados**

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido
y forma:**

Br. Vilchez Estrada Karol Noemi (autora)

PhD. Benoit Mathieu Diringer (asesor)
Código ORCID 0000-0001-6129-1751

M.Sc. Jean Carlos Silva Álvarez (co-asesor)

Tumbes, 2025

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes – Perú

"Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los veinti nueve días del mes de enero del dos mil veinticinco, siendo las diez horas y diez, en el aula N° 2 de la Escuela de Posgrado, se reunieron el jurado calificador de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes designado con RESOLUCIÓN No 0220-2022/UNTUMBES-EPG-D, del doce de mayo de dos mil veintitrés, **presidido** por el Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios (presidente) conformado por el Mg. John Henry Rimaycuna Ramírez (secretario), y de manera Virtual la Dra. Virna Alexia Cedeño Escobar Vocal, y el Dr. Benoit Mathieu Diringer (asesor).

Instalado el jurado, se procedió a la evaluación, deliberación y calificación del acto de la sustentación de la tesis titulada: **"AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y SELECCIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A CADMIO COMO POTENCIALES BIORREMIEDIADORES DE SUELOS CACAOTEROS CONTAMINADOS"**, presentado por la egresada: Karol Noemi Vilchez Estrada, para optar el grado académico de **MAESTRA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**.

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la correspondiente, deliberación el jurado, conforme a lo normado en el artículo N° 111 del Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes, declara a la sustentante **APROBADA** por unanimidad con el calificativo de **Muy Buena**.

Por lo anterior, la sustentante está expedita para iniciar los trámites correspondientes y conducentes a la obtención del grado académico de **Maestra en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular**, de conformidad con lo estipulado en la ley universitaria N° 30220, el estatuto, Reglamento General, Reglamento general de grados títulos y reglamento de tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

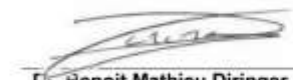
Siendo las 11:40, del mismo día, se dio por concluido la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia de público asistente.

Tumbes, 29 de enero de 2025


Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios
Presidente
DNI: 42450218
Código ORCID 0000-0002-7255-9087


Mg. John Henry Rimaycuna Ramírez
Secretario
DNI: 70047386
Código ORCID 0000-0002-2767-9733


Dra. Virna Alexia Cedeño Escobar
Vocal
Ci: 0911101095
Código ORCID 0000-0002-1031-667X


Dr. Benoit Mathieu Diringer
Asesor
DNI: 49091483
Código ORCID 0000-0001-6129-1751

C.c.
Jurado de Tesis (03)
Asesor
Interesado
Unidad de Investigación
Archivo (Director EPG)

Tesis KVE 2025.pdf

por Karol Noemi Vilchez Estrada



PhD. Benoit Mathieu Diringer
Asesor de investigación
Código ORCID 0000-0001-6129-1751

Fecha de entrega: 21-jun-2025 11:09a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2703422399

Nombre del archivo: Tesis_KVE_2025.pdf (1.72M)

Total de palabras: 15434

Total de caracteres: 90018

Tesis KVE 2025.pdf

INFORME DE ORIGINALIDAD

15 %	14 %	6 %	5 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	3 %
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1 %
3	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1 %
4	repositorio.ucm.edu.co Fuente de Internet	1 %
5	link.springer.com Fuente de Internet	<1 %
6	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
7	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1 %
8	aprenderly.com Fuente de Internet	<1 %
9	repositorio.unu.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
10	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
11	ri-ng.uaq.mx Fuente de Internet	<1 %
12	library.co Fuente de Internet	<1 %

13	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	< 1 %
14	scielo.sld.cu Fuente de Internet	< 1 %
15	idoc.pub Fuente de Internet	< 1 %
16	repositorioacademico.upc.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %
17	zagan.unizar.es Fuente de Internet	< 1 %
18	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %
19	ambiental.uaslp.mx Fuente de Internet	< 1 %
20	www.scipedia.com Fuente de Internet	< 1 %
21	assets.researchsquare.com Fuente de Internet	< 1 %
22	vdocumento.com Fuente de Internet	< 1 %
23	Submitted to Universidad Catolica de Avila Trabajo del estudiante	< 1 %
24	creativecommons.org Fuente de Internet	< 1 %
25	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %
26	Submitted to Universidad Miguel Hernandez Servicios Informaticos Trabajo del estudiante	< 1 %
27	revistas.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %

28	balcon.mag.gob.ec Fuente de Internet	<1 %
29	Aranda Rodríguez, Jesús. "Caracterización de los sistemas de captación de zinc y de hierro en <i>Streptococcus suis</i> : potencial antigénico y protector", Bellaterra : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2009 Fuente de Internet	<1 %
30	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1 %
31	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
32	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
33	orcid.org Fuente de Internet	<1 %
34	royalsocietypublishing.org Fuente de Internet	<1 %
35	www.colibri.udelar.edu.uy Fuente de Internet	<1 %
36	www.riaa.uaem.mx Fuente de Internet	<1 %
37	Aladid, Rubén López. "Rol de la microbiota en pacientes con bronquiectasias no asociadas a la fibrosis quística.", Universitat de Barcelona (Spain) Publicación	<1 %
38	Comité Editorial Revista Hechos Microbiológicos. "Memorias: XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología - ALAM 2014 4 Congreso Colombiano de Microbiología - 4 CCM 2014 Clínica -	<1 %

Bioanálisis - Industrial - Ambiental*, Hechos
Microbiológicos, 2015

Publicación

-
- 39 Ru -Salazar R, JS Muruaga-Martínez, MLP
Vargas-Vázquez, G Alejandro-Iturbide et al.
"SCAR molecular markers to identify disease
resistance sources in ayocote beans
(Phaseolus coccineus)*, Phytom, 2016
Publicación <1%
-
- 40 digibug.ugr.es <1%
Fuente de Internet
-
- 41 ECOLOGIA Y TECNOLOGIA AMBIENTAL S.A.C.
"MEIA para la Implementación del Proyecto
Implementar Línea de Cal, Mejoras
Ambientales e Integración de Instrumentos
Ambientales en la Planta Condorcocha-
IGA0006877", R.D. N° 081-2018-
PRODUCE/DVMYPE-1/DIGGAM, 2020
Publicación <1%
-
- 42 Submitted to Universidad Nacional de
Tumbes <1%
Trabajo del estudiante
-
- 43 ambiental.unam.mx <1%
Fuente de Internet
-
- 44 rinacional.tecnm.mx <1%
Fuente de Internet
-
- 45 Submitted to Institución Universitaria Digital
de Antioquia <1%
Trabajo del estudiante
-
- 46 Submitted to Universidad del Sinú <1%
Trabajo del estudiante
-
- 47 cicy.repositorioinstitucional.mx <1%
Fuente de Internet
-
- 48 repositorio.unap.edu.pe <1%
Fuente de Internet

< 1 %

49 repositorio.uaaan.mx
Fuente de Internet

< 1 %

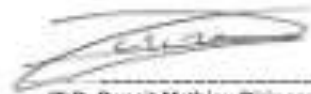
Excluir citas

Resumido

Excluir coincidencias: < 15 words

Excluir bibliografía

Activo



Ph.D. Benoit Mahieu Diringer
Asesor de investigación
Código ORCID 0000-0001-6129-1751

Índice General

	Página
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
CAPÍTULO I.....	19
INTRODUCCIÓN.....	19
CAPÍTULO II	22
REVISIÓN DE LITERATURA	22
2.1. Bases teóricas.....	22
2.1.1. Suelos cacaoteros contaminados con cadmio.....	22
2.1.1.1. Theobroma cacao.....	22
2.1.1.2. Cadmio (Cd ²⁺).....	22
2.1.1.3. Disponibilidad del cadmio en cultivos de cacao.....	22
2.1.2. Biorremediación de suelos contaminados con cadmio	24
2.1.2.1. Mecanismos de resistencia a cadmio	24
2.1.2.2. Bioacumulación.....	24
2.1.2.3. Detoxificación.....	25
2.1.2.4. Operon cad	25
2.1.2.5. Sistema de eflujo de cadmio (CzcCBA).....	26
2.1.2.6. Proteínas ATPasa de tipo P.....	26
2.1.3 Herramientas moleculares	27
2.1.3.1. Metagenómica	27
2.1.3.2. Genómica.....	27
2.1.3.3. Proteómica	27
2.2. Antecedentes	28
2.2.1. Investigaciones a nivel mundial	28
2.3. Definición de términos básicos	30
2.3.1. Contaminación de suelos.....	30
2.3.2. Bacterias biorremediadoras.....	30
CAPÍTULO III.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Área de muestreo.....	31
3.2. Toma de muestra	31
3.3. Procesamiento de las muestras.	32
3.3.1. Análisis de las comunidades bacterianas mediante metagenómica dirigida	32
3.3.2. Aislamiento de bacterias resistentes a cadmio.....	32
3.3.4. Identificación molecular de bacterias resistentes a cadmio	33
3.3.4.1. Extracción de ADN bacteriano	33
3.3.4.2. PCR dirigida al gen 16S	34

3.3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	34
3.3.4.4. Secuenciación y análisis bioinformático	35
3.3.5. Detección de genes en bacterias resistentes a cadmio	35
3.3.6. Identificación de proteínas involucradas en la resistencia a cadmio	36
3.3.6.1. Extracción de proteínas.....	36
3.3.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y digestión de proteínas	37
3.3.6.3. Análisis espectrométrico de las proteínas recuperadas.....	37
3.3.6.4. Análisis de datos obtenidos del espectrómetro MALDI-TOF/TOF.	37
CAPÍTULO IV	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.2. Caracterización de las comunidades microbianas por metagenómica dirigida al gen 16S ARNr.....	39
4.1.1. Análisis de diversidad alfa de muestras de suelo.....	40
4.1.2. Análisis de diversidad beta en muestras de suelo	43
4.1.2.1 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA).....	43
4.1.3 Composición de la microbiota a nivel de filos y géneros.....	44
4.1.4 Microbiota núcleo.....	47
4.2. Aislamiento de cepas resistentes a cadmio.....	48
4.3. Caracterización molecular genómica	50
4.3.1. Detección de los genes de resistencia <i>CadA1</i> , <i>CadA2</i> y <i>CopA</i> en las cepas aisladas.....	50
4.3.2 Identidad taxonómica de las cepas aisladas mediante el secuenciamiento del gen 16S ARNr	52
4.4. Caracterización molecular de proteínas mediante MALDI TOF/TOF	53
4.4.1 Detección de las proteínas involucradas en la resistencia a cadmio.....	53
CAPÍTULO V.....	58
CONCLUSIONES.....	58
CAPÍTULO VI.....	59
RECOMENDACIONES.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	60
ANEXOS.....	67

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Geolocalización de los puntos de muestreo.	31
Tabla 2. Secuencias de iniciadores, dirigidos a los genes codificantes para la región del operón Cad.	35
Tabla 3. Programa de PCR para la amplificación de genes del sistema del operón Cad.	36
Tabla 1. Parámetros físicos-químicos y contenido de cadmio en las muestras de suelo de los cultivos de cacao en Amazonas.	38
Tabla 5. Datos de la calidad de secuencias obtenidas por NGS ilumina.	39
Tabla 6. Aislamiento de cepas bacterianas resistentes a distintas concentraciones de CdCl ₂	48
Tabla 7. Identificación de las cepas bacterianas aisladas seleccionadas	51
Tabla 8. Secuencias de las proteínas del sistema de resistencia a cadmio en cepas seleccionadas.	543

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Ciclo del cadmio en el subsuelo de cacao. Procesos de biomineralización y biometeorización desempeñado por bacterias resistentes a cadmio (Bravo et al., 2018).....	23
Figura 2. Representación esquemática de la transposición de Cd en una célula (A) mecanismo de transpote de Zn^{2+} basado en estudios realizados en <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> . (B) Transposición de Mn^{2+} en bacterias Gram negativa. (C) Transportador de Fe^{2+} por vía sideróforo en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Palmer y Skaar, 2016).	24
Figura 3. Representación esquemática de la regulación transcripcional en el operon Cad (Kumari et al., 2021).....	26
Figura 4. Curvas de acumulación de ASVs discriminadas por profundidad.	41
Figura 5. Índices de diversidad alfa. A) Shannon – B) Pielou	42
Figura 6. Diversidad beta de las poblaciones bacterianas mediante análisis de coordenadas principales (PCoA)	43
Figura 7. Abundancia relativa de los filos identificados en muestras de suelo de tres parcelas de cultivo de cacao.	44
Figura 8. Abundancia relativa de los géneros identificados en muestras de suelo de tres parcelas de cultivo de cacao.....	46
Figura 9. Diagrama de Venn representando la microbiota nucleo entre las diferentes muestras de suelos cacaoteros.....	48
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de la PCR dirigida al gen CopA. CEXT: control de extraccion; CPCR: Control de PRC; CPST: Control positivo.....	50
Figura 11. Electroforesis en gel SDS-PAGE del perfil proteómico de las cepas seleccionadas cultivadas en presencia de cadmio. AS1A1 <i>K. aerogenes</i> , AS1A13 <i>P. aeruginosa</i> , AS2C12 <i>S. marcescens</i> , AS2B16 <i>S. nematodiphila</i> , AS3C24 <i>K. aerogenes</i> y M Marcador de Peso molecular en KDa.	54

Índice de Anexos

	Página
Anexo 1. Toma de muestra en cultivos de cacao en Amazonas.....	676
Anexo 2. Parámetros físicos-químicos y contenido de cadmio en las muestras de suelo de los cultivos de cacao en Amazonas	66
Anexo 3. Proceso de aislamiento y obtención de bacterias resistentes a cadmio.....	687
Anexo 4. Proceso de extracción de ADN metagenómico en suelo	688
Anexo 5. Proceso de la PCR para la identificación de las cepas bacterias.....	688
Anexo 6. Proceso de extracción, lavado, tinción y espoteo en la placa Opti-Tof	69
Anexo 7. Análisis de los datos sobre proteínas en la Herramienta MALDI TOF-TOF	69

RESUMEN

El cadmio es un metal tóxico presente en el medio ambiente, principalmente debido a actividades industriales y agrícolas. En el cacao, este metal puede acumularse en los granos y exceder los límites permitidos establecidos por los mercados internacionales, lo que representa un desafío para el Perú, ya que se limita la exportación hacia países de la Unión Europea. Una de las estrategias más prometedoras para abordar esta problemática es el uso de microorganismos capaces de resistir al cadmio. El objetivo de esta investigación fue analizar la comunidad bacteriana, aislar y caracterizar molecularmente bacterias presentes en suelos de cultivos de cacao contaminados con cadmio en la región Amazonas. La metodología consistió en recolectar tres muestras de suelo de diferentes parcelas de cacao para extraer ADN total, amplificando y secuenciando la región V4 del gen 16S rRNA. Para aislar bacterias resistentes al cadmio, se suplementaron medios con CdCl_2 a concentraciones de 1,5 ppm, 350 ppm y 500 ppm y mediante PCR se verificó la presencia de genes asociados a la resistencia de cadmio. Los resultados revelaron una comunidad microbiana con los filos más dominantes como *Proteobacteria* (36.5%), *Acidobacteriota* (32.72%), *Methylomirabilota* (12.04%), *Verrucomicrobiota* (14.18%) y *Firmicutes* (7.64%) en las tres muestras de suelo, además 76 géneros comunes entre las tres muestras de suelo mencionando a *Pseudomonas*, *Rokubacterales* y *Nitrospira*. Se aislaron 26 bacterias expuestas a concentraciones de cadmio, de las cuales 12 fueron identificadas como los géneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Bacterium* y *Bacillus*, detectando la presencia del gen *copA* en *Bacillus*. El análisis de péptidos reveló 9 bacterias con proteínas involucradas en el operón *cadA* (sistema clave para la tolerancia a cadmio de las bacterias), además las ATPasas de tipo P que transloca cadmio y proteínas ligadas a otros metales. Estos resultados revelan géneros bacterianos con potencial de biorremediación de suelos cacaoteros.

Palabras clave: Cadmio, caracterización molecular, cacao, aislamiento bacteriano, proteómica, Amazonas

ABSTRACT

Cadmium is a toxic metal present in the environment, mainly due to industrial and agricultural activities. In cocoa, this metal can accumulate in the beans and exceed the permitted limits established by international markets, which represents a challenge for Peru, since exports to countries in the European Union are limited. One of the most promising strategies to address this problem is the use of microorganisms capable of resisting cadmium. The objective of this research was to analyze the bacterial community, isolate and molecularly characterize bacteria present in soils of cocoa crops contaminated with cadmium in the Amazon region. The methodology consisted of collecting three soil samples from different cocoa plots to extract total DNA, amplifying and sequencing the V4 region of the 16S rRNA gene. To isolate cadmium-resistant bacteria, media were supplemented with CdCl_2 at concentrations of 1.5 ppm, 350 ppm and 500 ppm and the presence of genes associated with cadmium resistance was verified by PCR. The results revealed a microbial community with the most dominant phyla as Proteobacteria (36.5%), Acidobacteriota (32.72%), Methylophilota (12.04%), Verrucomicrobiota (14.18%) and Firmicutes (7.64%) in the three soil samples, in addition to 76 common genera among the three soil samples mentioning *Pseudomonas*, *Rokubacteriales* and *Nitrospira*. 26 bacteria exposed to cadmium concentrations were isolated, of which 12 were identified as the genera *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Bacterium* and *Bacillus*, detecting the presence of the *copA* gene in *Bacillus*. Peptide analysis revealed 9 bacteria with proteins involved in the *cadA* operon (key system for cadmium tolerance in bacteria), in addition to P-type ATPases that translocate cadmium and proteins bound to other metals. These results reveal bacterial genera with bioremediation potential in cocoa soils.

Keywords: Cadmium, molecular characterization, cocoa, bacterial isolation, proteomics, Amazon.