

Universidad de Los Andes  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis  
Escuela de Bioanálisis  
Departamento de Análisis y Control  
Sección de Biotecnología del Instituto de Investigación

**Aislamiento y Caracterización de  
Microorganismos Resistentes a Metales  
Pesados.**

**Autor:** Escobar N., Iraima A.

**Tutor:** Dr. Gerardo Medina

**Cotutor:** Prof. Cristina Grassi

Mérida, Noviembre 2014

## INDICE

Índice	i
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	v
Agradecimientos	vi
Resumen	1
Suelo	3
Fertilidad del suelo	7
Microbiología del suelo	8
Microorganismos	9
Bacterias	10
Hongos	11
Algas	12
Protozoos	12
Metales Pesados	14
Dinámica de los metales pesados en el suelo	15
Origen de la contaminación por metales pesados	16
Agroquímicos	17
Pesticidas	18
Bioacumulación y Biomagnificación de los metales pesados	21
Impacto de los metales pesados en las comunidades microbianas	22
Contaminación	23
Biorremediación	26
Hipótesis	29
Objetivo general	29
Objetivos Específicos	29
Antecedentes	30
Materiales y Métodos	31

Población y Muestra	32
Microorganismos	32
Compuestos Químicos	32
Medios de cultivo	32
Caracterización de muestras de suelo	32
Determinación de la temperatura del suelo	33
Determinación del Ph	33
Evaluación de la población bacteriana	33
Aislamiento bacteriano	33
Aislados en estudio	34
Examen Macroscópico	35
Examen Microscópico	35
Evaluación de Resistencia a metales pesados	35
Resultados y Discusiones	36
Zonas de Recolección	37
Conclusiones	60
Referencias	62
Anexos	67

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA N°1:</b> Clasificación de los microorganismos según sus fuentes de energía y carbono	9
<b>TABLA N°2:</b> Clasificación de los plaguicidas en diversas familias de acuerdo a su estructura química, que incluyen desde los compuestos órgano clorados, y órgano fosforados hasta compuestos inorgánicos.	19
<b>TABLA N° 3:</b> Clasificación de los principales plaguicidas de acuerdo al blanco de acción.	20
<b>TABLA N° 4:</b> Por su vida media los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes y no persistentes.	21
<b>TABLA N° 5:</b> Composición química del medio mínimo con extracto de levadura.	34
<b>TABLA N° 6:</b> Concentraciones ensayadas de las sales de los metales pesados	35
<b>TABLA N° 7:</b> Lugares y características de las zonas de recolección de las muestras	37
<b>TABLA N° 8:</b> Crecimiento de los clones bacterianos a las 24 horas.	38
<b>TABLA N° 9:</b> Cantidad de clones bacterianos en las seis condiciones de siembra a las 24 horas.	38
<b>TABLA N° 10:</b> Cantidad de clones bacterianos en las seis condiciones de siembra a las 48 horas.	39
<b>TABLA N° 11:</b> Posiciones asignadas a los clones provenientes de ATS de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en ATS.	40
<b>TABLA N° 12:</b> Posiciones asignadas a los clones provenientes de ATS 100µg/mL Hg de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en ATS 100µg/mL Hg.	40
<b>TABLA N° 13:</b> Posiciones asignadas a los clones provenientes de ATS 100µg/mL Cu de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en ATS 100µg/mL Cu	40
<b>TABLA N° 14:</b> Posiciones asignadas a los clones provenientes de MME de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en MME	41
<b>TABLA N° 15:</b> Posiciones asignadas a los clones provenientes de MME 100µg/mL Hg de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en MME 100µg/mL Hg	42
<b>TABLA N° 16:</b> Posiciones asignadas a los clones provenientes de ATS 100µg/mL Cu de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en ATS 100µg/mL Cu	42
<b>TABLA N° 17:</b> Crecimiento y estabilización de los clones bacterianos en el primer repique en un periodo de 24 horas.	43

<b>TABLA N° 18:</b> Crecimiento y estabilización de los clones bacterianos en el segundo repique en un periodo de 24 horas.	45
<b>TABLA N° 19:</b> Crecimiento y estabilización de los clones bacterianos en el tercer repique en un periodo de 24 horas.	46
<b>TABLA N° 20:</b> Crecimiento y estabilización de los clones bacterianos en el cuarto repique en un periodo de 24 horas.	47
<b>TABLA N° 21:</b> evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de 400 µg/ml	49
<b>TABLA N° 22:</b> Evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de 1000 µg/ml	50
<b>TABLA N° 23:</b> evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de ATS 2000 µg/ml.	52
<b>TABLA N° 24:</b> Evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de ATS 3000 µg/ml	53
<b>TABLA N° 25:</b> Evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de ATS 1000 µg/ml Pb	55
<b>TABLA N° 26:</b> Procedencia de los clones conservados y máxima concentración de metales a los que fueron sometidos.	57
<b>TABLA N° 27:</b> Características macroscópicas y microscópicas.	59

## INDICE DE FIGURAS

**FIGURA N°1:** Contaminación local y difusa del suelo, AEMA(2002)

24

bdigital.ula.ve

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen por guiarme y cuidarme durante el transitar de mi carrera, por ser siempre mi luz y guía ayudándome a tomar siempre las mejores decisiones.

A mis padres por ser mi pilar fundamental, sin ellos este sueño de ser Bioanálista y muchos otros no serian posible; gracias por ser mis amigos y por cada sacrificio que realizaron para que yo pudiese llegar a ser una profesional.

A mi hermano por ser mi amigo incondicional y por estar apoyándome en cada meta nueva que me propongo.

A la ilustre Universidad de los Andes por ser mi alma mater y brindarme los conocimientos necesarios para mi vida profesional.

Al personal del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis U.L.A. por permitirme desarrollar en sus instalaciones este trabajo y brindarme los recursos necesarios para llevarlo a cabo.

A mi tutor Dr. Gerardo Medina principalmente por su mano amiga, por ser un guía ejemplar en la formación profesional y personal; por transmitirme sus conocimientos y el gran interés en que me nutriese al máximo de su experiencia y conocimientos.

A mi Co-Tutor Prof. Cristina Grassi por ser mi guía al final de esta etapa, gracias mil gracias por su esfuerzo y esas horas extra de trabajo en las que pude nutrirme de sus maravillosos conocimientos.

Al Prof. Efren Andrades y Manuel Jimenez, gracias por ser esa guía complementaria en la realización de la parte experimental de este trabajo.

## RESUMEN

El suelo, el agua superficial y el agua subterránea pueden ser contaminados con compuestos peligrosos como consecuencia de actividades naturales (la erosión y filtraciones salinas) y de actividades humanas (industria, agricultura, tratamiento de aguas residuales, construcciones y la minería). Es por ello que nos propusimos aislar y caracterizar cepas bacterianas de suelos de la rivera del Rio Albarregas, Mérida; Venezuela y evaluar el nivel de resistencia frente a metales pesados. Se encontró:

- En las cinco zonas seleccionadas para muestreo hay microorganismos con resistencia a los metales Hg, Cu y Pb.
- Los microorganismos que se obtuvieron con resistencia a Hg provienen de la parte sur seleccionada mientras que los que se obtuvieron con resistencia a Cu provienen de la parte norte. Como éste no es un estudio estadístico, este resultado puede estar influenciado por los métodos utilizados. sin embargo, esto tiende a indicar que la presencia de cobre puede ser de origen natural y la presencia de Hg puede ser de origen urbano o antropogénico. esto estaría de acuerdo con el contenido de Cu del suelo de esta zona.
- El medio rico sin metal puede ser utilizado para la cuantificación de microorganismos. si se toma el crecimiento a 24horas, hay un porcentaje muy alto de microorganismos resistentes al hg, pudiendo llegar a representar alrededor del 20% del total.
- Se cumplió el objetivo de poner en evidencia que la presencia de metales puede estar generando una presión selectiva.
- Todos los microorganismos seleccionados por su resistencia a Hg o Cu, resistieron la presencia de Pb hasta 6000ug/ml. adicionalmente se encontraron otras resistencias cruzadas entre Hg y Cu.
- En nuestro caso solamente microorganismos seleccionados por su resistencia al Hg mostraron resistencia a todos los otros metales en todas las concentraciones ensayadas.

- Los microorganismos seleccionados por sus resistencias a metales, tienden a ser cocos Gram positivos.
- Mérida puede representar una fuente de contaminación aguas abajo por su estructura geográfica y la presencia de los ríos que la atraviesan.
- Concluimos que las actividades antropogénicas como las que se enumeran a continuación, pueden estar contribuyendo con la contaminación del ambiente con metales: uso de pinturas, tintes, impresiones, textiles, cosméticos, empaques, materiales de construcción, juguetes, vehículos y sus partes, línea blanca, marrón, pilas, baterías, partes electrónicas, bombillos, etc.

bdigital.ula.ve

## INTRODUCCION

### Suelo

Mazparrote (1998) define el suelo como la capa más superficial de la corteza terrestre, constituido por un sistema complejo de partículas minerales, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. El suelo constituye el sustrato de muchísimos organismos vegetales y animales. El suelo está constituido por una fracción inorgánica o mineral, una fracción orgánica viviente, una fracción orgánica degradada, por agua y aire.

El suelo es la parte más externa de la corteza terrestre, resultante de la meteorización de las rocas subyacentes y con unas características claramente diferenciadas de las mismas. Podemos considerar el suelo como un sistema de Interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. El tipo y composición de la materia mineral viene dado por las características de las rocas del subsuelo, así como de los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación. La porción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación, retención de agua, etc. (Nogales, 2005)

La fracción inorgánica o mineral comprende las partículas minerales que provienen de la degradación o descomposición de las rocas. Esto se debe, a la acción de varios factores. Los elementos químicos más importantes para el desarrollo de las plantas son: carbono, fosforo, calcio, nitrógeno, azufre, potasio, magnesio, hidrogeno, oxigeno, boro, sodio, cobre, silicio, zinc. Algunos de estos elementos son ampliamente utilizados por las plantas; por lo tanto su presencia en el suelo es indispensable para el desarrollo de ellas. Otros de los elementos son requeridos por las plantas en pequeñas cantidades como el cloro, silicio, manganeso, entre otros.

Así mismo el suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). También encontramos virus y bacteriófagos. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas y también contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa antes mencionadas. (Nogales 2005).

La fracción orgánica viviente constituida por todos aquellos organismos vivos que sean visibles microscópicamente o de tamaños pequeños visibles a simple vista como son las bacterias los hongos, los protozoarios, insectos, anélidos y nematelmintos. Las bacterias y los hongos tienen una acción desintegradora de la materia orgánica y contribuyen a la formación del humus. En esta fracción también cabe destacar los grupos animales; como por ejemplo la lombriz de tierra, que proporciona al suelo oxigenación. La fracción orgánica degradada proveniente de animales y vegetales ya muertos y está constituida por residuos orgánicos en vías de descomposición como hojas, flores, ramas, frutos y las excreciones y cadáveres de los animales (Mazparrote, 1998).

La materia orgánica procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo y su composición y cantidad es variable, principalmente en función del tipo de cubierta vegetal. La porosidad (cantidad y tamaño de los poros) depende de la textura, determinada por la cantidad de arena, limo y arcilla, la estructura y el contenido en materia orgánica. Todos estos factores determinan a su vez el movimiento y capacidad de retención de agua del suelo y la composición gaseosa de su atmósfera. De forma característica la atmósfera del suelo se encuentra enriquecida en dióxido de carbono y empobrecida en oxígeno, como resultado de la respiración aeróbica de raíces de plantas, animales y microorganismos. Sin embargo, cuando se producen condiciones de anaerobiosis

(por acumulación de agua en los poros del suelo) aparecen en la atmósfera del suelo otros gases como óxido nitroso, nitrógeno gaseoso y metano, resultantes de actividad respiratoria anaeróbica bacteriana. (Nogales 2005).

Del mismo modo la función de los microorganismos en el suelo, especialmente la de algunos grupos definidos, puede ser manipulada para permitir que determinadas actividades microbianas, bioquímicas y enzimáticas se expresen de forma eficaz, de allí que pueden jugar un papel preponderante como indicadores de calidad y salud de los suelos (Acuña y col. 2004).

El agua es un compuesto indispensable en los suelos para facilitar la germinación de las semillas para disolver las sales minerales, ya que solo disueltas estas sales pueden ser aprovechadas por las plantas (Mazparrote, 1998).

El aire se encuentra en las partículas del suelo y contiene gases como nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono, y otros, necesarios para las plantas y los animales que viven en el suelo, que utilizan el oxígeno para la respiración (Mazparrote, 1998).

Mazparrote (2001) clasifica el suelo según su origen o según la composición que estos puedan tener:

Según origen su pueden ser:

- Residuales: se forman en el mismo punto a partir de las rocas presentes desintegradas por los agentes físicos, químicos y biológicos.
- Sedimentarios: cuando se forman por efecto de la acumulación de partículas y restos provenientes de otros lugares y que han sido arrastrados por el agua o el viento.

Según su composición pueden ser:

- Suelos arenosos: son aquellos cuyo contenido de arena oscila entre un 60 a 85%. Suelos muy permeables y de color gris. Se pueden cultivar en ellos zanahorias, papa, caraotas, y otros vegetales que requieran suelos sueltos.
- Suelos arcillosos: contienen hasta un 65% de arcilla, suelos muy pesados y compactos, poco permeables y por lo tanto poco permeables para la agricultura. Son de color rojizo y en ellos se puede cultivar arroz y lechuga, si se cuenta con agua abundante.
- Suelos magros o limosos: contienen una mezcla muy equilibrada de arena, limo y arcilla, y por lo tanto son muy aptos para la agricultura.
- Suelos humíferos: contienen gran cantidad de humus aproximadamente un 65%, por lo tanto son de color negruzco y debido a su alto contenido de materia orgánica, son suelos muy ricos y aptos para casi todo tipo de cultivo agrícola.
- Suelos calcáreos: contienen gran cantidad de sales calcáreas que le aportan una coloración blanquecina en ellos prosperan ciertos cultivos como el maíz, la cebada, etc. Necesitan de abono y abundante riego.

Por otra parte Mazparrote (2001) destaca que los suelos óptimos para la agricultura en general son aquellos que presentan una combinación proporcional los tipos de suelo mencionados anteriormente. La proporción ideal sería la siguiente: 10% de caliza (suelos calcáreos); 50% de arcilla (suelos arcillosos) y 15% de humus. Este tipo de suelo recibe el nombre de suelo franco, ya que resulta ideal para la agricultura por las siguientes razones. La cal neutraliza la acidez; la arcilla retiene el agua y el humus proporciona los compuestos nitrogenados y otros de los compuestos orgánicos requeridos por las plantas.

## Fertilidad del suelo

La fertilidad de un suelo se define como su capacidad para proporcionar a las plantas un medio físico, que permita su establecimiento y desarrollo y suministre en cantidad y forma adecuada, los nutrientes que necesitan para satisfacer sus necesidades durante toda su existencia. En cuanto a la fertilidad quizás los componentes biológicos sean los últimos que se han tomado en cuenta en investigación y producción de cultivos, además hoy se acepta que la actividad de los microorganismos no solo es un factor clave en la fertilidad del suelo, sino que también lo es en la estabilidad y funcionamiento de ecosistemas naturales como los agroecosistemas (Acuña y cols. 2004)

Los desbalances nutricionales en los suelos llevan a la degradación de la fertilidad nativa del suelo, ejemplificada en las marcadas disminuciones de materia orgánica y las caídas en la productividad de los cultivos (García, 2002)

Para la conservación de la fertilidad lo único necesario es incorporarle la materia prima necesaria para que se produzca el fenómeno de humificación debido a la intervención de la microflora del mismo. La microflora celulolítica se encarga de iniciar el ataque de este material mediante la descomposición de la celulosa y de esta manera comienza la formación del nuevo "humus" que permitirá la fertilidad del suelo.

## **Microbiología del suelo**

El componente microbiano del suelo es importante para salud de los ecosistemas. Los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales inciden sobre este componente afectando tanto su biodiversidad como la densidad de las poblaciones microbianas implicadas. (Olalde y Aguilera, 1998).

Los microorganismos son los seres más numerosos que existen, son organismos que han colonizado exitosamente cada nicho ecológico posible. El suelo contiene una alta población de microorganismos, los cuales desempeñan actividades de gran importancia en la fertilidad del mismo, ya que intervienen en los ciclos bioquímicos, mineralizando la materia orgánica y convirtiéndola en nutrientes asimilables por las plantas, de esta manera pueden transformar compuestos de importancia geológica (carbón, petróleo, azufre) y ambiental (pesticidas). Se han definido algunas de las actividades en las que participan los microorganismos del suelo tales como: fijación de nitrógeno, degradación de celulosa, incorporación de fósforo a la planta e integración con los otros microorganismos. (Olalde y Aguilera, 1998).

Las bacterias generalmente dominan a los hongos, algas y actinomicetos, en cuanto a sus funciones e importancia en el suelo. Existen procesos en los cuales las bacterias son los únicos microorganismos que participan, un ejemplo de ello es la oxidación de nitrógeno y azufre orgánico y la fijación de nitrógeno en plantas. (Olalde y Aguilera, 1998).

## **Microorganismos**

Los microorganismos importantes en el tratamiento biológico son:

-Procariotas: bacterias

-Eucariotas: hongos, protozoos, rotíferos y algas.

**Tabla N°1.** Clasificación de los microorganismos según sus fuentes de energía y carbono

CLASIFICACION	FUENTE DE ENERGIA	FUENTE DE CARBONO
<b>AUTOTROFOS</b>		
<b>Fotoautotrofos</b>	Luz	Anhídrido Carbónico
<b>Quimioautotrofos</b>	Reacción de oxidación - reducción inorgánica	Anhídrido Carbónico
<b>HETEROTROFOS</b>		
<b>Quimioheterotrófos</b>	Reacción de oxidación- reducción orgánica	Carbono Orgánico
<b>Fotoheterotrófos</b>	Luz	Carbono Orgánico

Fuente: Técnicas y tratamientos de contaminación (2003)

Cuando aplicamos el término de microorganismos al referirnos a células de vida libre, estamos incluyendo a todos los procariotas y a los eucariotas unicelulares: protozoos, algas y hongos. Los microorganismos están presentes en los medios naturales y son responsables de la mayor parte de los ciclos de compuestos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo. Todos estos microorganismos juegan un papel muy importante en los procesos de

biorremediación. Analizaremos cada uno de estos grupos destacando las características que los identifica (Técnicas y tratamientos de contaminación, 2003):

- **Bacterias**

Las bacterias son el grupo de organismos más abundantes en el suelo, miles de especies han sido identificadas y probablemente habrá otras miles sin identificar. Debido a su diversidad, las bacterias se encuentran en comunidades heterogéneas, algunas son degradadores primarios, esto es, inician la degradación de los compuestos orgánicos en los suelos, y otras especies crecen en los compuestos resultantes de una primera degradación parcial. Estructuralmente, las bacterias se caracterizan por tener una capa exterior poco organizada compuesta principalmente por polisacáridos (capa mucilaginosa), una pared celular rígida, una membrana celular que encapsula el citoplasma, y la región nuclear. Su tamaño, forma, capacidad de movimiento y características metabólicas, determinan su clasificación. En el suelo los géneros más comunes son: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Flavobacterium*. (López, 2005)

Los actinomicetos son un grupo intermedio entre las bacterias procariotas más primitivas y los hongos eucariotas. Aunque taxonómicamente estos organismos son clasificados como bacterias, los actinomicetos son similares a los hongos, producen filamentos muy ramificados llamados «hifas», que se desarrollan dentro del micelio. Los actinomicetos son muy abundantes en los suelos, toleran un intervalo amplio de pH y temperatura, y son capaces de crecer en condiciones muy limitadas de nutrientes y agua. Su presencia favorece la degradación de fenoles, compuestos aromáticos, aromáticos clorados y lignocelulosas. En el suelo los géneros más frecuentes son: *Streptomyces* y *Nocardia*. (Técnicas y tratamientos de contaminación, 2003)

- **Hongos**

Los hongos son organismos heterótrofos eucariotas, no tienen movimiento y emplean la materia orgánica como fuente de carbono y energía, pueden presentarse en forma unicelular, aunque generalmente tienen forma filamentosa. Estos filamentos miceliares o hifas están aislados o agrupados en verdaderos cordones (rizomorfos) que van de un sustrato nutritivo a otro. Los contaminantes inorgánicos, caso de existir, son incorporados dentro del tejido celular en cantidades estequiométricas, parecido a como se realiza en el crecimiento de bacterias. (López, 2005)

Mohos, levaduras y setas son los hongos más abundantes en el suelo, aunque están en menor número que las bacterias. Tienen un crecimiento más lento, y un proceso metabólico menos diverso. Por el contrario, los hongos son activos a pH más ácidos que las bacterias, muchas especies crecen a pH menor de 5, y son más sensibles a la variación del contenido en humedad. La variedad de especies encontradas en los suelos es muy grande. Encontramos desde las formas más primitivas, *Myxomicetes*, hongos con aparato vegetativo sin forma propia, a los *Ascomycetes*, hongos que tienen el micelio compartido, o los *Basidiomycetes* con micelio tabicado y reproducción sexual. Un hongo que tiene un considerable potencial en el tratamiento de compuestos orgánicos peligrosos es *Phanerochaete chrysosporium*, hongo de la podredumbre blanca. Este organismo produce una enzima extracelular, peroxidasa, que altera la lignina en presencia de peróxido. Se ha encontrado que degrada una gran variedad de compuestos altamente clorados y recalcitrantes, incluyendo dioxinas. El uso de este hongo está limitado a suelos con carencia de nitrógeno, ya que este elemento en exceso impide la formación de peroxidasa, (López, 2005)

- **Algas**

Las algas, igual que los hongos, son inmóviles, protistas, con pared celular, algunas son unicelulares y otras son filamentosas o coloniales, tienen estructura similar a plantas con crecimiento multicelular pero no tienen diferenciación real entre las células. La mayoría de ellas son acuáticas, aunque hay géneros que crecen en el suelo. El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y/o aniones bicarbonatados (HCO<sub>3</sub>) sirven como fuente de carbono para el crecimiento, por lo que la energía proviene de la adsorción de la luz por pigmentos fotosintéticos, dando como producto el oxígeno. Su importancia en los suelos es mal conocida, salvo en medios extremos: helados o tórridos, donde pueden ser abundantes. En estas situaciones forman a modo de costras que impiden los procesos de erosión y evaporación. Las algas no son importantes en el campo de la biorrecuperación, sólo en algunos casos han sido empleadas en la recuperación de sistemas acuáticos, fundamentalmente en la eliminación de nutrientes para impedir procesos de eutrofización. Las diatomeas (algas del grupo de los Cromófitos) intervienen en los procesos de inmovilización de la sílice. (Técnicas y tratamientos de contaminación, 2003)

#### - **Protozoos**

Los protozoos son protistas que carecen de pared celular, pueden ser móviles o no, se alimentan por predación de bacterias, u otros organismos como levaduras, hongos, e incluso de otros protozoos. Requieren agua para realizar las actividades metabólicas y hay un gran número de especies que se encuentran formando parte de muchos sistemas biológicos. Su carácter depredador se ha puesto de manifiesto en estudios de laboratorio, donde se ha podido comprobar que un solo protozoo consume en algunas ocasiones entre varios cientos y varios cientos de miles de células bacterianas por hora, este número depende del tipo de protozoo y del tipo de bacteria. En los suelos los protozoos se localizan en la solución del suelo unidos a partículas en suspensión, o en la fase sólida, unidos a los agregados, y juegan un importante papel en el control de la masa microbiana.

En estudios realizados en campo se ha comprobado que la cantidad de bacterias consumidas es más baja que en las condiciones de laboratorio, debido probablemente a que las bacterias tienden a colonizar, en forma de agregado, los poros y grietas de pequeño tamaño, lo que impide el paso de los protozoos. Esta ingestión que los protozoos hacen de las bacterias ayuda a controlar el crecimiento bacteriano, ocasionando distintos efectos en los suelos. Cuando el crecimiento de bacterias es excesivo y puede impedir el desarrollo de las plantas, o causar obstrucciones del medio poroso, con la consiguiente disminución de la conductividad hidráulica, el efecto es positivo, pues al disminuir la masa bacteriana ayuda a paliar estos hechos. Por el contrario, cuando como consecuencia de la predación de bacterias se reduce drásticamente el número de especies, los protozoos pueden ser responsables de una alteración del equilibrio entre los diferentes géneros que constituyen la biomasa de los ecosistemas. En general, los protozoos no son buenos biorremediadores de contaminantes, en ocasiones se emplean por su capacidad de ingerir compuestos orgánicos adsorbidos a células bacterianas, o atrapados dentro de secreciones extracelulares alrededor de las células. Generalmente, la cantidad de contaminantes eliminados por protozoos es prácticamente despreciable si lo comparamos con las cantidades eliminadas por hongos o bacterias. (López, 2005)

Para terminar con este apartado es importante decir que los microorganismos empleados en los tratamientos biológicos suelen pertenecer a distintas especies. La asociación implica una interacción positiva, donde el grupo se beneficie de las acciones individuales. Se ha visto que especies aisladas a partir de cultivos puros, a las cuales se les proporciona el compuesto a estudiar, para que les sirva como fuente de carbono, son incapaces de mineralizarlo. Cuando este mismo ensayo se ha realizado utilizando una asociación de especies se ha realizado con mayor eficacia la degradación. (Técnicas y tratamientos de contaminación, 2003)

## **Metales pesados**

El suelo, el agua superficial y el agua subterránea pueden ser contaminados con compuestos peligrosos como consecuencia de actividades naturales (la erosión y filtraciones salinas) y de actividades humanas (industria, agricultura, tratamiento de aguas residuales, construcciones y la minería). Dentro de los compuestos peligrosos que son considerados como contaminantes de naturaleza inorgánica se tiene a los metales pesados, nitratos, fosfatos y ácidos. (Labra, Guerrero., Rodríguez, Montes, Pérez, y Rodríguez, 2012).

El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones bajas (Ariza y Pulido, 2008). Corresponden a un grupo de elementos con características químicas semejantes: a un mismo estado de oxidación, igual distribución electrónica de las capas externas (metales de transición) y pesos atómicos comprendidos entre 63,55 a 200,59 g mol<sup>-1</sup>. Estos elementos son constituyentes naturales del agua de mar y se encuentran en bajas concentraciones por lo que son conocidos como oligoelementos o elementos traza, algunos de estos metales son considerados esenciales para la vida, tienen como función catalizar reacciones a nivel bioquímico (Ahumada, 1994)

La presencia de los metales pesados en la corteza terrestre es inferior al 0.1%, conviene clarificar que el termino metales pesados es impreciso ya que con este termino lo que en realidad se pretende indicar es que aquellos metales que, siendo elementos pesados, son toxicos para la celula. Sin embargo en realidad cualquier elemento que en algún momento es beneficioso para la celula, en concentraciones excesivas puede llegar a ser toxico. Los metales pesados se clasificaran en dos grupos (Navarro y cols 2007)

- Oligoelementos o micronutrientes: necesarios en pequeñas cantidades para el organismo, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen

Arsénico (As), Boro (B), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Manganeseo (Mn), Níquel (Ni), Selenio (Se) y Zinc (Zn)

- Sin función biológica conocida: son altamente tóxicos, e incluyen Bario (Ba), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Antimonio (Sb), Bismuto (Bi).

Los metales pesados como plomo (Pb), arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni) y mercurio (Hg), se adicionan en forma continua a los suelos a través de actividades agrícolas, actividades industriales, incineración y emisiones de los vehículos. Tanto el Cd como el Zn son elementos que poseen propiedades ambientales y químicas similares; el Cd es considerado un metal pesado que se libera al ambiente como resultado de una gran variedad de actividades antrópicas. No obstante que no es un elemento esencial para las plantas, este metal se absorbe por las raíces y se transporta hacia las hojas en muchas especies. Por lo que altas concentraciones de éste ocasionan toxicidad en las plantas por su alta movilidad generalmente, causa daños en las hojas produciendo clorosis y enrollamiento de las mismas; así como también la disminución del crecimiento de las raíces y el brote (Labra y cols, 2012).

### **Dinámica de los metales pesados en el suelo**

Los metales pesados presentes en los suelos no se comportan como elementos estáticamente inalterables, sino que siguen unas pautas de movilidad generales. La dinámica de los metales pesados en el suelo puede clasificarse resumidamente en cuatro vías (Navarro y cols, 2007):

- Movilización a las aguas superficiales o subterráneas.
- Transferencia a la atmosfera por volatilización.
- Absorción por las plantas e incorporación a las cadenas tróficas.
- Retención de metales pesados en el suelo de distintas maneras: disueltos o fijados, retenidos por adsorción y precipitación.

## Origen de la contaminación por metales pesados

- **Origen natural:** los metales pesados han existido desde siempre en la corteza terrestre, estos metales al exteriorizarse se concentran en los suelos. Las concentraciones naturales de los metales pesados en algún momento pueden llegar a ser tóxicas, ya que estos tienen la capacidad de acumularse principalmente en plantas y producir efectos tóxicos para todos aquellos organismos que las consumen.

Las rocas ígneas ultrabásicas (peridotitas y serpentinas) revelan los más altos contenidos en metales pesados, seguidas de las rocas ígneas básicas (gabros y basaltos). Las menores concentraciones se encuentran en las rocas ígneas ácidas (granito) y en las sedimentarias como la areniscas y calizas. Los porcentajes más altos se dan para el Cr, Mn, y Ni, mientras que el Co, Cu, Zn, y Pb se presentan en menores cantidades, siendo mínimos los contenidos para el As, Cd, y Hg (Sánchez, 2003)

El proceso natural de transformación de las rocas para originar los suelos produce una gran parte de los metales pesados, aunque estos metales originados de forma natural se encuentran a elevadas concentraciones, por lo regular no suelen rebasar los umbrales de toxicidad y además se encuentran bajo formas muy poco asimilables para los organismos.

- **Origen antropogénico:** la concentración de metales pesados y su movilidad en suelos ha aumentado por causas no naturales, siendo la actividad humana la fuente principal de este incremento de contaminación por metales pesados.

Las actividades humanas que provocan una modificación de contenido natural de los metales pesados son muy variadas: vertido industriales, vertidos

procedentes de actividades mineras, aplicación de productos químicos agrícolas, lodos residuales, gases de combustión, emisión de partículas por automóviles y por último aunque no menos importante, los residuos sólidos de origen doméstico (Sánchez,2003)

### **Agroquímicos.**

Los productos químicos agrícolas son compuestos utilizados en la agricultura para el control de plagas, la utilización de productos químicos como los pesticidas en altas concentraciones ha ocasionado una amplia dispersión de ellos en el medio ambiente, con consecuencias graves en todos los hábitats obteniendo un resultado altamente tóxico, tanto para los organismos superiores como para los microorganismos del suelo, los cuales intervienen en los ciclos biológicos y químicos así como en la degradación de sustancias contaminantes del suelo. El uso indiscriminado de estos productos químicos se ha convertido en un problema de contaminación ambiental afectando a todos los seres vivos, ya que diferentes estudios han demostrado que el 99% de los pesticidas empleados para combatir las plagas en las cosechas es depositado en el suelo y solo el 1% llega a cumplir el verdadero objetivo. (Rodríguez, 2011)

Según la definición adoptada por Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) se entiende por agroquímicos, los compuestos químicos generalmente sintéticos, producidos de un modo comercial utilizados en la agricultura, tales como pesticidas, fertilizantes y acondicionadores del suelo. Sin embargo, frecuentemente se identifica el término agroquímico únicamente con su acepción de pesticida (o su sinónimo plaguicida). (Fedit, 2008).

La degradación o destrucción de los recursos naturales se ha convertido en uno de los fenómenos de nuestra civilización. Es necesario un gran esfuerzo, para medir la gravedad de la contaminación, ver las consecuencias y provocar el cambio necesario para no seguir alterando nuestra esfera de vida. (Polanco,

2008). La contaminación es un proceso de cambio indeseable que puede producirse tanto en el aire, el suelo como el agua. Afecta la vida del hombre y del resto de los seres vivos, poniendo en peligro el equilibrio biológico.

Se llama pesticida o plaguicida al amplio conjunto de sustancias químicas, orgánicas o inorgánicas, o sustancias naturales que se utilizan para combatir plagas en los vegetales. Se emplean para eliminar insectos, ácaros, hongos, roedores, caracoles, gusanos, etc. También sirven como defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad, evitar la caída y/o deterioro de la fruta, entre otros. (Polanco, 2008)

El uso excesivo de plaguicidas ocasiona efectos dañinos a la producción agrícola, e impactos ambientales, que acarrearán graves consecuencias en la contaminación del agua y del suelo. Las actividades industriales y agroindustriales normalmente están ubicadas en áreas de influencia urbana municipal, vierten sus aguas residuales sin tratamiento alguno. Se desconoce la real magnitud de la contaminación atmosférica, los pocos estudios que se han realizado indican que el problema puede tener serias consecuencias a la salud, al medio ambiente y a la economía. (Polanco, 2008)

### **Pesticidas**

Los pesticidas según la organización para la agricultura y la alimentación (FAO), son sustancias o mezclas de sustancias destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o animales, especies indeseables de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercadeo de los alimentos y otros productos agrícolas. (Ferrer, 2003).

Los pesticidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso. En 1978, la organización mundial de la salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida esta capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un periodo de tiempo relativamente corto. (Ramírez y Lacasaña, 2001)

La toxicidad se mide a través de la dosis letal media o de la concentración letal media. Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, líquido, gel, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc., (Ramírez y Lacasaña, 2001)

**TABLA N°2:** Clasificación de los plaguicidas en diversas familias de acuerdo a su estructura química, que incluyen desde los compuestos órgano clorados, y órgano fosforados hasta compuestos inorgánicos.

Familia química	Ejemplo
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín.
Organofosforados	Bromofos, diclorvos, malatión.
Carbamatos	Cabaryl, methomyl, propoxur.
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb.
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permethrin.
Derivados bipyridilos	Clomequat, diquat, paraquat.
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex.
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap.
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine.

Compuestos orgánicos del estaño	Cyhecatin, dowco, plictrán.
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fosforo blanco.
Compuestos de origen botánico	Retenona, nicotina, aceite de canola.

Fuente: Ramírez y Lacasaña, (2001)

**TABLA N° 3:** Clasificación de los principales plaguicidas de acuerdo al blanco de acción.

<b>INSECTICIDAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organoclorados.</li> <li>• Organofosforados.</li> <li>• Carbamatos.</li> <li>• Piretroides.</li> </ul>
<b>FUNGUICIDAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Órganoclorados.</li> <li>• Órgano mercuriales.</li> </ul>
<b>HERBICIDAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bipiridílicos.</li> <li>• Organoclorados.</li> <li>• Otros.</li> </ul>
<b>RATICIDAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dicumarínicos.</li> </ul>

Fuente: intoxicación por plaguicidas (Ferrer, 2003)

**TABLA N° 4:** Por su vida media los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes y no persistentes.

Persistencia	Vida media	Ejemplo
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrin,
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

Fuente: Ramírez y Lacasaña, (2001)

### **Bioacumulación y biomagnificación de los metales pesados**

La característica que hace que los metales pesados sean tan peligrosos es su tendencia a acumularse en los organismos. Por esta causa, cantidades reducidas y en apariencia inofensivas absorbidas durante un largo periodo, llegan a alcanzar niveles tóxicos. Este fenómeno es conocido como bioacumulación.

La bioacumulación que ocurre en los organismos, se agrava conforme avanzan los niveles en la cadena alimenticia. Cada organismo acumula la contaminación de sus alimentos, de modo que la concentración en su cuerpo es muchas veces mayor que en estos. El siguiente organismo de cadena tiene ahora un alimento más contaminado y acumula el agente a un grado mayor. Todo el

contaminante acumulado en la gran biomasa de la base de la pirámide alimentaria se concentra, al avanzar por las cadenas. Este efecto multiplicador de la bioacumulación a lo largo de las cadenas alimentarias se llama biomagnificación.

Uno de los aspectos más desoladores de la bioacumulación y la biomagnificación es que no hay síntomas de advertencia hasta que las concentraciones del contaminante en el organismo son lo bastante elevadas como para dar problemas, y entonces suele ser demasiado tarde para hacer algo (Nebel y Wright, 1999)

### **Impacto de los metales pesados en las comunidades microbianas.**

Los metales pesados provocan grandes efectos en procesos importantes de fertilización de suelo pues afectan la estructura y la función de las comunidades microbianas (González, 2000). Funciones claves en estos procesos la mineralización de la materia orgánica y la fijación biológica del nitrógeno pueden ser inhibidos por concentraciones mínimas por debajo del límite permisible (Madigan *et al.*, 1998).

La contaminación con metales pesados puede llevar a una reducción parcial así como total en la población de la masa microbiana, o bien provocar disminuciones efectivas en poblaciones de microorganismos como *Rhizobium* (Chaudriet *et al.*, 1999) o micorrizas, así como alterar la composición en la estructura microbiana de los suelos. Estudios sobre el dominio *Archea*, realizados en suelos contaminados con metales pesados demuestran una reducción en el porcentaje de especies comparadas con un suelo no contaminado, demostrándose además diferencias cualitativas en la estructura de esas (Enger y Torsvik, 1999; Castrillo, 2004).

Varios estudios han concluido que los metales influyen sobre los microorganismos afectando su crecimiento, morfología y actividades bioquímicas (Reber, 1992). A pesar de estos efectos tóxicos de los metales pesados, los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia que permiten su supervivencia: entre los que se encuentran la volatilización, precipitación extracelular y exclusión, ligazón en la superficie celular y secuestro intracelular (Shuttleworth y Unz, 1993).

## **Contaminación**

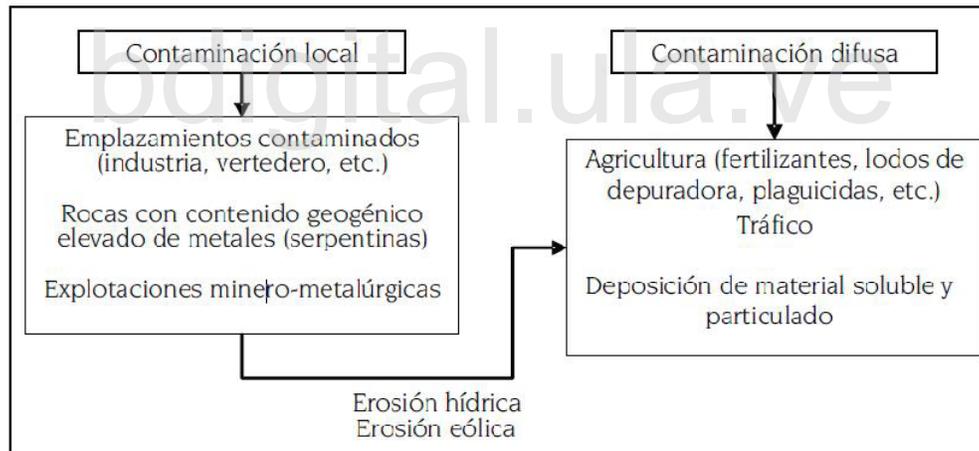
Según la unión europea es la introducción directa o indirecta como consecuencia de la actividad humana de sustancias, vibraciones, calor o ruido en el aire, el agua o el suelo que pueden ser nocivos para la salud humana o la calidad del medio ambiente, causar daños a la propiedad material o perjudicar o entorpecer las actividades recreativas y otros usos legítimos del medio ambiente. (Navarro y cols, 2007).

Existen diferentes tipos de contaminación, y es necesario resaltar en este caso la contaminación del suelo; donde el aumento continuo de la población, su concentración progresiva en grandes centros urbanos, el desarrollo industrial y agrícola ocasionan, día a día, la contaminación de los suelos, que radica en la presencia de sustancias (basura, fertilizantes, hidrocarburos, pesticidas...) extrañas de origen humano en él. (CICEANA)

El suelo es un medio receptivo por excelencia, puesto que interacciona con la litosfera, la hidrosfera y la atmósfera y recibe el impacto de los seres vivos que, de manera directa o indirecta, pueden romper el equilibrio químico establecido en su seno. Es importante notar que el suelo posee una capacidad de auto-depuración, en sus horizontes más contaminados, que le permite asimilar una cierta cantidad de contaminantes. Los contaminantes edáficos o del suelo pueden clasificarse en endógenos y exógenos. Los endógenos son aquellos que

proviene del mismo suelo, mientras que los exógenos son aquellos que provienen del exterior. La presencia de un contaminante endógeno se genera cuando se produce un desequilibrio natural que conduce a la proliferación de un componente a niveles nocivos para las especies vivas. (CICEANA)

De esta manera, se puede decir que un suelo está contaminado, cuando las características físicas, químicas o biológicas originales han sido alteradas de manera negativa, debido a la presencia de componentes de carácter peligroso para el ecosistema; en este caso, la productividad que el suelo tenía, se pierde total o parcialmente (Cepeda, 2003). Por consiguiente, la contaminación del suelo generada por actividades económicas puede presentarse de dos formas: degradación edáfica, proveniente de fuentes claramente delimitadas (contaminación local o puntual) y la causada por fuentes difusas.



**FIGURA N° 1:** contaminación local y difusa del suelo. AEMA (2002)

Martínez y otros (2005) plantean que la contaminación local (o puntual) va unida generalmente a actividades económicas como la minería, las instalaciones industriales y los vertederos. En la minería los principales riesgos están relacionados con el almacenamiento de lodos, la generación de aguas ácidas de mina y el uso de ciertos reactivos químicos. Así mismo, el vertido de residuos constituye otra actividad potencialmente contaminante.

Ahora bien, la contaminación difusa es causada generalmente por el transporte de sustancias contaminantes, tanto solubles como particuladas, a lo largo de amplias zonas con frecuencia alejadas de la fuente de origen. Este tipo de contaminación está más relacionado con la deposición atmosférica, determinadas prácticas agrícolas por el uso de pesticidas y el tratamiento y reciclaje inadecuado de los lodos de depuración y aguas residuales (Martínez y otros, 2005).

Puede decirse, entonces, que los principales efectos desfavorables de los contaminantes en el suelo como sistema son la afectación de su ciclo biogeoquímico y su función de biofiltro; la disminución cualitativa y cuantitativa del crecimiento de microorganismos; la disminución del rendimiento de los cultivos y la contaminación de las aguas superficiales. (Porta, Lopez y Roquero 1994)

Un suelo contaminado es aquel donde se encuentran presentes uno o más materiales peligrosos y/o residuos de índole tal que pueden construir un riesgo para el ambiente y la salud (Medina *et al.*, 2001).

La contaminación antrópica del suelo aparece cuando una sustancia está presente a concentración superior a sus niveles naturales, y tiene un impacto negativo en alguno o todos los constituyentes del mismo. (Ortega y cols)

Por otra parte el suelo puede su valor para la producción de alimentos o diferentes productos o servicios a causa de la acumulación de materiales peligrosos que pueden constituir un riesgo para el ambiente y la salud, a niveles tales que repercuten negativamente en su comportamiento. Los elementos que se consideran causantes de contaminación son: Pb, Cr, Cd, Co, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Sn, Ba, Hg. Los metales no se degradan, así que pueden acumularse provocando efectos adversos en la mayoría de los organismos (Ortega y cols)

Las tecnologías tradicionales de remediación requieren remover físicamente el suelo contaminado, debido a esto surge la necesidad de utilizar técnicas alternas, como la biorremediación, la cual promueve los procesos naturales para acelerar la recuperación de suelos, como lo es la fitoremediación que se basa en el uso de una especie de plantas llamadas Metalofitas que han desarrollado mecanismos fisiológicos para resistir, tolerar y sobrevivir en suelos con altos niveles de metales. (Ortega y cols)

### **Biorremediación**

La biorremediación un proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para transformar contaminantes en productos inocuos, o en su defecto, menos tóxicos, que pueden entonces integrarse a los sitios bioquímicos naturales, tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, presentando un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental (Garbisuet *al.*, 2002b).

Es una tecnología que tiene como objetivo acelerar la biodegradación natural de los compuestos orgánicos mediante la optimización de las condiciones limitantes del proceso. En este proceso influye la composición, concentración y disponibilidad de los contaminantes, o las características físicas y químicas del lugar contaminado. En muchos casos, una o varias de estas condiciones no se encuentran presentes, de forma que la biodegradación se produce a velocidades tan bajas que impiden conseguir rendimientos de depuración satisfactorios (Montrás y Vincent, 2002).

Lo que hace sobresaliente a esta técnica frente a los métodos convencionales de "limpieza" ambiental, es que se basa en medidas y aplicaciones que permiten potenciar la actividad metabólica de ciertos microorganismos nativos capaces de transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos, que la naturaleza puede aprovechar (Vásquez, 2002).

Constituye una técnica muy segura, ya que depende de microbios que existen normalmente en los suelos. Esos microbios son útiles y no representan un peligro para los seres humanos en el sitio o la comunidad. Además, no se emplean sustancias químicas peligrosas. Los nutrientes que se añaden para que las bacterias crezcan son fertilizantes de uso corriente en el césped o el jardín (ITGE, 1995)

La recuperación de suelos contaminados es uno de los aspectos de la rehabilitación ambiental que menos interés ha tenido en el pasado. La abundancia de tierras permitía el abandono de zonas con riesgo de contaminación o su reutilización para usos alternativos. En los últimos años la cantidad de suelos contaminados ha ido creciendo de forma alarmante, los estados comienzan a preocuparse y la Comunidad Europea en el año (1986), publica la directiva relativa a la protección del medio, e incluye de forma específica el suelo. (López, 2005)

Hoy día el tratamiento de suelos contaminados es una realidad, las técnicas a emplear son cada vez más estudiadas, soluciones como el traslado del suelo a vertederos, o el encapsulado (construcción de barreras para impedir su extensión), están muy cuestionadas. Otras técnicas, como la solidificación (empleando cemento, cal, resinas termoplásticas), o la vitrificación (sometimiento a altas temperaturas para convertir los contaminantes en vidrios), se utilizan en mayor grado, aunque no están exentas de inconvenientes. Actualmente, los métodos que se están probando con más éxito son los que dejan al suelo con propiedades semejantes a las que tenía antes de la contaminación. Para ello es necesario conocer bien las características del suelo y el tipo de tóxico que lo contamina. Básicamente, se distinguen cuatro tipos de metodologías: extracción con un fluido, ya sea líquido, vapor o gas; tratamiento químico; tratamiento térmico y tratamiento biológico. En general, las técnicas se pueden hacer in situ, es decir, en el mismo lugar donde se produce la contaminación, o ex situ, en un lugar distinto, lo que requiere el transporte y la modificación de las condiciones naturales. (López, 2005)

De todas las posibles técnicas, nos centraremos en los tratamientos biológicos o tratamientos por biorremediación. Esta técnica se basa en favorecer los procesos microbiológicos que de una forma natural se producen en el suelo y que conllevan la degradación de los contaminantes. El objetivo final es conseguir la mineralización de los contaminantes, esto es, transformar los compuestos químicos nocivos en compuestos inocuos, tales como dióxido de carbono, agua, o materia celular. Son muchas las dificultades a superar para que la biorremediación tenga el éxito esperado. Una de ellas es el tiempo que se utiliza para la transformación, la vida media (tiempo que tarda en transformarse el 50% de un contaminante) de un hidrocarburo varía entre 6 y 230 días. En general, se puede decir que, cuanto más pequeña sea la molécula, más soluble y de composición más simple, más rápidamente se biodegrada, y que, en compuestos con moléculas de mayor peso molecular, menor solubilidad y mayor fuerza de adsorción, la biorremediación, o bien no es posible, o bien es muy lenta. Adecuar las condiciones físico-químicas del suelo para favorecer el crecimiento de los microorganismos es otro factor básico. Hemos de tener en cuenta que un horizonte A con proporciones equilibradas de carbono, oxígeno y nutrientes, puede contener entre 107 y 109 microorganismos por gramo de suelo. Esto hace que antes de empezar la biorremediación sea necesario tratar el suelo.

## **HIPOTESIS**

Si la presencia de metales pesados en suelos ejerce una presión selectiva en las comunidades microbianas, entonces bacterias nativas aisladas de estos suelos deberían poseer la capacidad de tolerar estos compuestos.

### **OBJETIVO GENERAL**

- Aislar y caracterizar cepas bacterianas aisladas de suelos de la rívera del Río Albarregas, Mérida; Venezuela y evaluar el nivel de resistencia frente a metales pesados.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Aislar bacterias obtenidas de suelos de la rívera del Río Albarregas.
- Caracterizar macroscópica y microscópicamente los aislados.
- Evaluar la resistencia de los clones en medios suplementados con mercurio, cobre y plomo.

### **ANTECEDENTES DE INVESTIGACIONES PREVIAS**

En el año 2005 la licenciada Luisa Raquel molina y el Profesor Gerardo Medina, realizaron una investigación que llevo por nombre “Aislamiento de bacterias a partir de los suelos tratados con pesticidas, potencialmente utilizables en biorremediación” en la que utilizaron medios de cultivos que fueron factibles para el crecimiento de las bacterias así como también la suplementar estos medios con pesticidas, observándose de igual manera el crecimiento de clones bacterianos, seleccionaron 11 clones que plantearon como utilizables para hacer biorremediación. Estos clones seleccionados lograron disminuir la toxicidad de los medios de cultivo suplementados con pesticidas. De los 11 clones seleccionados 5 mostraron baja toxicidad al mismo tiempo que los valores de absorbancia con respecto al control, en los medios de cultivo suplementados con los pesticida Paration y DDT, los cuales pueden proponerse como microorganismos potencialmente utilizables para biorremediación.

Otro estudio similar, fue realizado por el Br. David Jonathan castro y el Profesor Gerardo Medina, llamado “Caracterización de cepas bacterianas resistentes al Dicloro Difenil Tricloroetano y Paration, aisladas de suelos sometidos a manejo agrícola intensivo de diferentes localidades del estado Mérida” en el presentaron la caracterización macroscópica de las bacterias obtenidas, obtuvieron el crecimiento de dos fenotipos bacterianos. En el examen microscópico visualizaron bacilos Gram negativos en un 95% y el 5% restante fueron cocos Gram positivos con disposición individual. Estudiaron la viabilidad en medio salino solido con glicerol suplementado con Acarin. También evaluaron otros parámetros, uno de ellos el Acarin como única fuente de carbono, la resistencia a metales pesados, la presencia de plásmidos, entre otros. La identificación por pruebas bioquímicas mostro que los aislados estudiados corresponden a los generos *Serratia* y *Citrobacter*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos propuestos, esta investigación se apoyó a lo largo de su desarrollo lógico en una serie de pasos, que permitió el correcto desarrollo y logro de los objetivos propuestos, estas se presentan a continuación:



## Población y Muestra

Para la realización del presente estudio se recolectaron muestras, extraídas de diferentes lugares del Río Albarregas, de las cuales se tomaron al azar, para evitar la contaminación con materiales de la superficie del suelo (plantas, restos vegetales, rocas, desechos, entre otros), se utilizó como profundidad una medida entre 0 y 10 cm., luego se almacenó en recipientes estériles, y se transportó al laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA.

#### **Microorganismos.**

- Bacterias aisladas de las muestras de suelos.

#### **Compuestos químicos.**

Metales pesados: mercurio, cobre y plomo. Bajo la forma de:

- Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$ ).
- Cloruro de plomo ( $\text{PbCl}_2$ ).
- Cloruro de mercurio ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ).

#### **Medios de cultivo sólidos**

- Medio mínimo con extracto de levadura.
- Agar tripticasa de soya.
- Agar BHI.

#### **Caracterización de las muestras de suelo.**

Para el momento de la recolección de las muestras de suelo se tomó en cuenta el pH, la temperatura y la conductividad de cada lugar.

#### **Determinación de la Temperatura del Suelo.**

En el momento de la recolección de las muestras, se introdujo un termómetro en el suelo a una profundidad aproximada de 0-10 cm. luego de 5 minutos se realizó la lectura de la temperatura en cada sitio de recolección.

### **Determinación del pH.**

Se procedió a medir el pH en cada una de las zonas de recolección introduciendo un pHmetro dejándolo aproximadamente 5 minutos y se obtuvo el pH del área.

### **Evaluación de la Población Bacteriana del suelo.**

Las muestras del suelo se procesaron inmediatamente después de su recolección. Se realizó el primer aislamiento bacteriano según el siguiente protocolo:

Obtención del Inoculo (extracto de suelo)

- Se pesó 10g de muestra de suelo.
- Se agregó 20ml., de agua destilada estéril.
- Se mezcló y dejó en reposo por 2 horas.
- Se decantó el sobrenadante y se recolectó, para su posterior utilización como Inoculo.

### **Aislamiento Bacteriano.**

- **Selección y aislamiento** de clones sobre medios de cultivo suplementados con cobre, mercurio y plomo.
- **Evaluación del crecimiento Bacteriano** sobre Medio mínimo de Cultivo con extracto de levadura suplementado con cobre, mercurio y plomo.
- **Evaluación de crecimiento Bacteriano** en Medio rico de cultivo como es el Agar tripticasa de soya suplementado con cobre, mercurio y plomo.

- Se sembraron 25 ul por cada placa utilizando para la siembra la técnica de rastrillo.

### Aislados en estudio

Se trabajó con 147 aislados bacterianos obtenidos de suelos de la rivera del Rio Albarregas. Cada uno de ellos fue sembrado en placas de medio mínimo con extracto de levadura, agar tripticasa de soya; a temperatura ambiente por 24 horas. Se evaluó el crecimiento bacteriano luego de 24 horas de la siembra y se procedió a seleccionar los clones más representativos de cada lugar de muestreo. Las colonias seleccionadas se purificaron y fueron conservadas para su posterior estudio.

**TABLA N° 5:** Composición química del medio mínimo con extracto de levadura.

Compuesto químico	Cantidad en gramos
H <sub>2</sub> O C.S.P.	250 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,64 g
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,05 g
CaCl <sub>2</sub>	1,87x10 <sup>-4</sup> g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,5X10 <sup>-4</sup> g
GLICEROL	0,5 g
Extracto de Levadura	0.5 g
Agar-Agar	5 g

### Examen macroscópico

Se realizó una valoración por inspección visual de las características morfológicas de 14 colonias obtenidas en el último periodo de la investigación sobre la superficie de las placas de medio mínimo con extracto de levadura y agar tripticasa de soya, siendo las estos 14 los clones que lograron crecer en las mayores concentraciones de metales pesados. Las colonias fueron descritas de acuerdo a los criterios: tamaño, forma, elevación, margen, color, superficie y consistencia (Koneman, 1999).

### **Examen microscópico**

Se realizaron 14 coloraciones de Gram de las colonias obtenidas en el último periodo de la investigación y fueron observadas al microscopio con objetivo de 100x, para así describir las formas celulares y disposición espacial de los microorganismos.

### **Evaluación de resistencia a metales pesados**

Se evaluó el crecimiento de los aislados bacterianos frente a las siguiente sales de metales pesados: Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$ ), Cloruro de plomo ( $\text{PbCl}_2$ ) y cloruro de mercurio ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ). Para este fin, se emplearon placas con medio mínimo mas extracto de levadura sin suplementar y suplementado con cada uno de los metales pesados y placas de agar tripticasa de soya sin suplementar y suplementado con cada uno de los metales pesados a fin de conocer la máxima tolerancia para estas sales. Se emplearon las concentraciones descritas en la tabla N° 5. Como control de ensayo se realizaron las placas sin suplementar con sales de metales pesados.

**TABLA N° 6:** Concentraciones ensayadas de las sales de los metales pesados

Sal del metal pesados	Concentraciones usadas en $\mu\text{g/mL}$
-----------------------	--

<b>Sulfato de cobre</b>	100, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000
<b>Cloruro de plomo</b>	1000,2500,4000,6000
<b>Cloruro de mercurio</b>	100, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000

Las placas fueron sembradas por repique con palillos estériles, se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas y se realizaron observaciones periódicamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Zonas de recolección

Las muestras tomadas tenían un peso aproximado de 300 gramos, siendo recolectadas en envases de vidrio esterilizados, luego de la recolección se trasladaron al laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA, en un periodo no mayor a dos horas, manteniendo en su transporte una temperatura aproximada de 25 °C; luego se procedió a realizar el inculo donde se tomó 10 gramos de la muestra y 20 mililitros de agua destilada estéril, se mezcló y se dejó en reposo por un periodo de dos horas, se tomó 25 microlitros de cada muestras sembrado cada una en 6 placas diferentes; las cuales tenían las siguientes características:

- Placa N°1: Medio mínimo con extracto de levadura sin suplementar.
- Placa N°2: Medio mínimo con extracto de levadura suplementado con 100µl de mercurio.
- Placa N°3: Medio mínimo con extracto de levadura suplementado con 100µl de cobre.
- Placa N°4: Agar tripticasa de soya sin suplementar.
- Placa N°5: Agar tripticasa de soya suplementado con 100µl de mercurio.
- Placa N°6: Agar tripticasa de soya suplementado con 100µl de cobre.

Las zonas de la rivera del Rio Albarregas donde se recolectaron las muestras de suelo partieron desde la naciente de dicho rio hasta la unión del mismo con el Rio Chama, estos suelos presentaron pH con tendencias alcalinas que oscilaban entre 7,38 – 8,00, las temperaturas a lo largo de la rivera fueron variadas encontrando temperaturas entre 12,1 – 21,4 °C, de igual manera se evidenció que a lo largo del cauce del rio la conductividad fue aumentado hasta la última muestras obtenida.

**TABLA N° 7:** Lugares y características de las zonas de recolección de las muestras

Lugar	Muestra	pH	Temperatura °C	Conductividad
<b>Santa Rosa</b>	1	7.90	12.1	71.1
<b>Albarregas</b>	2	7.38	15.4	116.0
<b>Viaducto Miranda</b>	3	7.72	18.2	292.0
<b>La Mata</b>	4	7.80	19.5	255.0
<b>Planta eléctrica ejido</b>	5	8.00	21.4	212.0

En las primeras 24 horas de crecimiento en M1 y M5 hubo un crecimiento bacteriano lento, pudiéndose observar desarrollo bacteriano solo en agar tripticasa de soya sin suplemento y suplementado 100µg/ml de cobre, en M2 el crecimiento fue más acelerado y se evidenció desarrollo de colonias en las seis condiciones de sembrado, mientras que en M3 a pesar de que hubo un crecimiento rápido no se logró ver desarrollo de clones en medio mínimo suplementado con 100µg/ml de mercurio. Por otro lado en M4 hubo un crecimiento rápido pero en las condiciones donde los medios estaban suplementados con mercurio el crecimiento fue nulo en las primeras 24 horas.

**TABLA N° 8:** Crecimiento de los clones bacterianos a las 24 horas.

Muestra	MME	MME Hg 100ug/ml	MME Cu 100ug/ml	ATS	ATS Hg 100ug/ml	ATS Cu 100ug/ml
<b>M1</b>	NC	NC	NC	C	NC	C
<b>M2</b>	C	C	C	C	C	C
<b>M3</b>	C	NC	C	C	C	C
<b>M4</b>	C	NC	C	C	NC	C
<b>M5</b>	NC	NC	NC	C	NC	C

**Nota:** Medio mínimo con extracto de levadura (MME), agar tripticasa de soya (ATS). M1 (Santa Rosa), M2 (Albarregas), M3 (Viaducto Miranda), M4 (La Mata), M5 (Planta Eléctrica Ejido). NC (No hubo crecimiento), C (Hubo crecimiento).

En cuanto a la cuantificación de las colonias podemos notar que el ATS le proporcionó a las UFC condiciones ideales para su desarrollo desde M1 hasta M5, de igual manera los clones en las placas de ATS que fueron suplementadas con 100µg/ml Cu a pesar de tener un agente selectivo, sí mostraron crecimiento.

bdigital.ula.ve

**TABLA N° 9:** Cantidad de UFC en las seis condiciones de siembra a las 24 horas.

Muestra	MME	MME Hg 100ug/ml	MME Cu 100ug/ml	ATS	ATS Hg 100ug/ml	ATS Cu 100ug/ml
<b>M1</b>	NC	NC	NC	125	NC	134
<b>M2</b>	2777	767	1748	2802	555	2673
<b>M3</b>	1820	NC	837	1868	47	2797
<b>M4</b>	416	NC	64	518	NC	840
<b>M5</b>	NC	NC	NC	82	NC	54

Cuarenta y ocho horas luego de ser sembradas las muestras se pudo observar crecimiento bacteriano de escaso a abundante (según sea el caso) en las 5 zonas de muestras encontrándose ausencia de crecimiento solo en la placa

de medio mínimo suplementado con 100µl/mL Hg de M1. En algunos casos el tiempo ayudó a que algunas de las placas tuviesen un número incontable de UFC.

**TABLA N° 10:** Cantidad de UFC en las seis condiciones de siembra a las 48 horas.

Muestra	MME	MME Hg 100ug/ml	MME Cu 100ug/ml	ATS	ATS Hg 100ug/ml	ATS Cu 100ug/ml
1	65	NC	37	209	10	200
2	Incontable	775	Incontable	Incontable	1169	Incontable
3	Incontable	47	1739	Incontable	461	Incontable
4	476	19	184	602	98	1129
5	14	6	25	141	7	115

Luego de las 48 horas de crecimiento se seleccionaron aproximadamente cinco clones de cada una de las placas con condiciones iguales. A cada uno de estos clones se les asignó posiciones que se mantuvieron durante una serie de repiques que se realizaron para estabilizar y purificar cada uno de los clones bacterianos. Las nuevas placas tenían alrededor de veinte a veinticinco clones según las condiciones de ensayo.

**TABLA N° 11:** Posiciones asignadas a los clones provenientes de ATS de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en ATS.

Muestra	Posición
---------	----------

<b>M1</b>	1, 2, 3, 4.
<b>M2</b>	5, 6, 7, 8, 9.
<b>M3</b>	10, 11, 12, 13, 14.
<b>M4</b>	15, 16, 17, 18, 19.
<b>M5</b>	20, 21, 22, 23, 24.

**TABLA N° 12:** Posiciones asignadas a los clones provenientes de ATS 100µg/mL Hg de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en ATS 100µg/mL Hg.

<b>Muestra</b>	<b>Posición</b>
<b>1</b>	1, 2, 3, 4.
<b>2</b>	5, 6, 7, 8, 9.
<b>3</b>	10, 11, 12, 13, 14.
<b>4</b>	15, 16, 17, 18, 19.
<b>5</b>	20, 21, 22, 23, 24.

**TABLA N° 13:** Posiciones asignadas a los clones provenientes de ATS 100µg/mL Cu de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en ATS 100µg/mL Cu

<b>Muestra</b>	<b>Posición (Placa A)</b>
<b>1</b>	2, 3, 4, 5, 6.
<b>2</b>	7, 8, 9, 10, 11.
<b>3</b>	12, 13, 14, 15, 16.
<b>4</b>	17, 18, 19, 20, 21.
<b>5</b>	22, 23, 24, 25, 1.
<b>Muestra</b>	<b>Posición (Placa B)</b>
<b>1</b>	1, 2, 3, 4, 5.
<b>2</b>	6, 7, 8, 9, 10.

<b>3</b>	11, 12, 13, 14, 15.
<b>4</b>	16, 17, 18, 19, 20.
<b>5</b>	21, 22, 23, 24.

**NOTA:** Debido al gran número de clones que su crecimiento se vio favorecido por esta condición de ensayo se decidió ampliar el número de clones seleccionados en cada una de las muestras.

**TABLA N° 14:** Posiciones asignadas a los clones provenientes de MME de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en MME

<b>Muestra</b>	<b>Posición</b>
<b>1</b>	1, 2, 3, 4, 5.
<b>2</b>	6, 7, 8, 9, 10.
<b>3</b>	11, 12, 13, 14, 15.
<b>4</b>	16, 17, 18, 19, 20.
<b>5</b>	21, 22, 23, 24, 25.

**TABLA N° 15:** Posiciones asignadas a los clones provenientes de MME 100µg/mL Hg de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en MME 100µg/mL Hg

<b>Muestra</b>	<b>Posición</b>
<b>1</b>	NC
<b>2</b>	1, 2, 3.

<b>3</b>	4, 5, 6, 7, 8.
<b>4</b>	9, 10, 11, 12, 13.
<b>5</b>	16, 17, 18, 19, 20.

**TABLA N° 16:** Posiciones asignadas a los clones provenientes de ATS 100µg/mL Cu de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, repicadas en ATS 100µg/mL Cu

Muestra	Posición
<b>1</b>	1, 2, 3, 4, 5.
<b>2</b>	6, 7, 8, 9, 10.
<b>3</b>	11, 12, 13, 14, 15.
<b>4</b>	16, 17, 18, 19, 20.
<b>5</b>	21, 22, 23, 24, 25.

Veinticuatro horas luego de la selección y siembra de los clones, se obtuvo un crecimiento total de los clones seleccionados teniendo ciento cuarenta y siete (147), estos clones provenían de las mismas condiciones en las que se repicaron los mismos fueron repicados por segunda vez con palillos estériles para continuar con el proceso de estabilización y purificación. En las Tablas 16-19 se muestra el resumen del crecimiento de estos 147 clones en cuatro repiques sucesivos, cada uno en su respectivo medio. Es de hacer notar que el número de posición corresponde a 7 clones diferentes pero que en general, provienen del mismo sitio de recolección.

**TABLA N° 17:** Crecimiento y estabilización de los clones bacterianos en el primer repique en un periodo de 24 horas.

N°	ATS	ATS Hg 100ug/ml	ATS Cu 100ug/ml (A)	ATS Cu 100ug/ml (B)	MME	MME Hg 100ug/ml	MME Cu 100ug/ml
<b>1</b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>2</b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21	✓	✓	✓	✓	✓	SU	✓
22	✓	✓	✓	✓	✓	SU	✓
23	✓	✓	✓	✓	✓	SU	✓
24	✓	✓	✓	✓	✓	SU	✓
25	SU	SU	✓	SU	✓	SU	✓

NOTA: SU (espacio sin utilizar para la siembra de clones)

Durante el segundo repique en la placa de ATS sin suplemento se vio el crecimiento de una colonia que abarcaba en un gran porcentaje el total de la placa por lo que se decidió volver a seleccionar los clones desde las primeras placas en las que se sembró directamente el inóculo del suelo. Sin embargo, la placa se volvió a perder debido a una colonia que contaminaba a las otras, por lo que se

eliminó esta condición de ATS y se siguió con cinco condiciones y un total de 123 clones.

bdigital.ula.ve

**TABLA N° 18:** Crecimiento y estabilización de los clones bacterianos en el segundo repique en un periodo de 24 horas.

Posición	ATS Hg 100ug/ml	ATS Cu 100ug/ml (A)	ATS Cu 100ug/ml (B)	MME	MME Hg 100ug/ml	MME Cu 100ug/ml
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓

3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17	✓	✓	✓	✓	✓	✓
18	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21	✓	✓	✓	✓	SU	✓
22	✓	✓	✓	✓	SU	✓
23	✓	✓	✓	✓	SU	✓
24	✓	✓	✓	✓	SU	✓
25	SU	✓	SU	✓	SU	✓

**TABLA N° 19:** Crecimiento y estabilización de los clones bacterianos en el tercer repique en un periodo de 24 horas.

Posición	ATS Hg	ATS Cu	ATS Cu	MME	MME Hg	MME Cu
	100ug/ml	100ug/ml	100ug/ml		100ug/ml	100ug/ml
	(A)		(B)			
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓

3	✓	✓	✓	✓	✓	x
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓	x
14	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17	✓	✓	✓	✓	x	✓
18	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21	✓	✓	✓	✓	SU	✓
22	✓	✓	✓	✓	SU	✓
23	✓	✓	✓	✓	SU	✓
24	✓	✓	✓	✓	SU	✓
25	SU	✓	SU	✓	SU	✓

**TABLA N° 20:** Crecimiento y estabilización de los clones bacterianos en el cuarto repique en un periodo de 24 horas.

Posición	ATS Hg 100ug/ml	ATS Cu 100ug/ml (A)	ATS Cu 100ug/ml (B)	MME	MME Hg 100ug/ml	MME Cu 100ug/ml
1	x	x	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓

3	x	✓	✓	✓	✓	x
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓	x
14	✓	✓	✓	✓	x	✓
15	✓	✓	✓	✓	x	✓
16	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17	✓	✓	✓	✓	✓	✓
18	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21	✓	✓	✓	✓	SU	✓
22	✓	✓	✓	✓	SU	✓
23	x	✓	✓	✓	SU	✓
24	✓	✓	✓	✓	SU	✓
25	SU	✓	SU	✓	SU	✓

A los clones bacterianos se les realizó solamente cuatro repiques para estabilizarlos en cada una de las condiciones de ensayo. Luego en esta etapa algunos clones no pudieron crecer más y se obtuvo un total de 115 clones bacterianos con los que se procedió a realizar los ensayos de resistencia. Para realizar estos ensayos, los clones se pasaron a placas que contenían 400ug/ml del metal a evaluar. Sin embargo, aquellos que venían de MME sin suplementar no

crecieron en MME 400 µg/mL Hg y MME 400 µg/mL Cu, por lo que no se le hizo más seguimiento a los clones provenientes de MME sin suplementar.

Adicionalmente, algunos clones de las otras condiciones también se vieron afectados por la concentración del metal y no pudieron seguir creciendo, solo setenta y nueve clones tuvieron la capacidad de seguir creciendo en estas nuevas concentraciones de metales pesados, como se muestra en la Tabla 21.

bdigital.ula.ve

**TABLA N° 21:** evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de 400 µg/ml

Posición	ATS Hg 400ug/ml	ATS Cu 400ug/ml (A)	ATS Cu 400ug/ml (B)	MME Hg 400ug/ml	MME Cu 400ug/ml
1	x	x	x	✓	✓
2	x	✓	✓	✓	✓

3	x	x	x	✓	x
4	x	✓	x	x	✓
5	x	✓	✓	x	✓
6	✓	✓	✓	x	✓
7	✓	✓	✓	x	x
8	✓	x	x	x	x
9	✓	✓	x	✓	✓
10	✓	x	x	✓	✓
11	✓	✓	x	✓	✓
12	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	x	x	✓	x
14	✓	✓	x	✓	✓
15	✓	x	✓	✓	✓
16	✓	x	x	✓	✓
17	✓	✓	x	x	✓
18	✓	x	x	✓	x
19	✓	x	x	✓	x
20	✓	x	x	✓	x
21	✓	✓	✓	SU	x
22	✓	x	✓	SU	✓
23	✓	x	x	SU	✓
24	✓	✓	x	SU	✓
25	SU	✓	SU	SU	✓

Los clones que toleraron una concentración de 400 µg/ml de los metales pesados fueron sometidos a un aumento de concentración de los metales llevándolos a 1000 µg/ml de cada metal del interés. Como se puede observar en la Tabla 22, al aumentar las concentraciones, algunos clones no tuvieron la capacidad de crecer aunque un buen número soportó esta concentración obteniendo 67 clones resistentes a 1000µg/mL.

**TABLA N° 22:** Evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de 1000 µg/ml

Posición	ATS Hg		ATS Cu		MME Hg		MME Cu	
	1000ug/ml		1000ug/ml (A)		1000ug/ml		1000ug/ml	
1	x		x		x		✓	✓
2	x		✓		✓		✓	✓
3	x		x		x		✓	x
4	x		✓		x		x	✓
5	x		✓		✓		x	✓
6	✓		✓		✓		x	✓
7	✓		✓		✓		x	x
8	✓		x		x		x	x
9	✓		✓		x		✓	✓
10	✓		x		x		✓	✓
11	✓		✓		x		✓	✓
12	✓		✓		✓		✓	✓
13	✓		x		x		✓	x
14	✓		✓		x		✓	✓
15	✓		x		✓		✓	✓
16	✓		x		x		✓	✓
17	✓		✓		x		x	✓
18	✓		x		x		✓	x
19	✓		x		x		✓	x
20	✓		x		x		✓	x
21	✓		✓		✓		SU	x
22	✓		x		✓		SU	✓
23	✓		x		x		SU	✓
24	✓		✓		x		SU	✓
25	SU		✓		SU		SU	✓

A partir de este punto y debido a que el medio mínimo presentó una falla en la solidificación del agar durante varias preparaciones, se trabajó con los clones de las placas de ATS en diferentes condiciones, aumentando la concentración del metal a 2000ug/ml. Es decir que a partir de este punto se siguió trabajando con dos condiciones, ATS Hg y ATS Cu, además de los clones que se probaron sobre ATS Pb que aunque provienen de las mismas fuentes, no tienen el mismo orden que los anteriores.

Como se puede observar en la Tabla 23, treinta y cuatro clones resistieron una concentración de 2000µg/mL de los cuales 16 crecieron en placas de ATS suplementadas con 2000µg/mL de Hg y 18 en placas de ATS suplementadas con 2000µg/mL de Cu.

bdigital.ula.ve

**TABLA N° 23:** evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de ATS 2000 µg/ml.

Posición	ATS Hg 2000ug/ml	ATS Cu 2000ug/ml (A)	ATS Cu 2000ug/ml (B)
1	x	x	x
2	x	✓	✓

3	x	x	x
4	x	✓	x
5	x	✓	✓
6	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓
8	✓	x	x
9	✓	✓	x
10	✓	x	x
11	✓	✓	x
12	✓	✓	✓
13	✓	x	x
14	✓	✓	x
15	✓	x	✓
16	✓	x	x
17	✓	✓	x
18	✓	x	x
19	x	x	x
20	✓	x	x
21	✓	✓	x
22	✓	x	x
23	✓	x	x
24	x	✓	x

Los clones que crecieron con 2000 ug/ml del metal correspondiente, se evaluaron a 3000 ug/ml. De la placa de ATS 3000 µg/ml Hg crecieron siete clones bacterianos y de las placas de ATS 3000 µg/ml Cu, crecieron catorce clones, como se puede observar en la Tabla 24.

**TABLA N° 24:** Evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de ATS 3000 µg/ml

Posición	ATS	Hg	ATS	Cu	ATS	Cu	Zona de recolección
	3000ug/ml		3000ug/ml (A)		3000ug/ml (B)		
1	x		x		x		Sta. Rosa
2	x		✓		✓		Sta. Rosa
3	x		x		x		Sta. Rosa
4	x		✓		x		Sta. Rosa
5	x		x		✓		Sta. Rosa
6	x		x		x		Albarregas
7	x		✓		✓		Albarregas
8	x		x		x		Albarregas
9	✓		✓		x		Albarregas
10	✓		x		x		Albarregas
11	x		✓		x		Vto. Miranda
12	✓		✓		✓		Vto. Miranda
13	x		x		x		Vto. Miranda
14	x		✓		x		Vto. Miranda
15	✓		x		✓		Vto. Miranda
16	x		x		x		La Mata
17	x		✓		x		La Mata
18	✓		x		x		La Mata
19	x		x		x		La Mata
20	✓		x		x		La Mata
21	x		✓		x		Ejido
22	✓		x		x		Ejido
23	x		x		x		Ejido
24	x		x		x		Ejido
25	SU		x		SU		Ejido

La Tabla 24 resume los resultados de la primera parte de este trabajo. En ella se puede observar que logramos obtener clones bacterianos que resisten hasta 3000ug/ml de Hg, hacia las partes bajas ensayadas, es decir que estos clones provienen en su mayoría, del Viaducto Miranda hasta Ejido. Por otra parte, los clones con características de resistencia a 3000ug/ml de Cu los obtuvimos en la parte alta del recorrido, es decir mayoritariamente desde Santa Rosa hasta el Viaducto Miranda.

En este punto, se decidió probar la resistencia al plomo. Para ello se ensayó la placa ATS 1000 µg/ml Pb como nueva condición de ensayo; a la que se sometieron setenta clones que provenían de diferentes condiciones con cobre y mercurio. Éstos al ser sembrados en las placas de ATS 1000 µg/ml Pb mostraron que la mayoría soportaron la nueva condición de ensayo, ya que crecieron 63 clones en esta condición, ver Tabla 25. Es decir que los clones que venían creciendo en cobre y mercurio además de resistir a uno de estos metales, pudieron resistir muy bien un metal diferente.

**TABLA N° 25:** Evaluación de resistencia de los clones bacterianos a metales pesados en concentraciones de ATS 1000 µg/ml Pb

N°	Proviene ATS µg/mL	Zona de muestreo	ATS Pb 1000 µg/mL	N°	Proviene ATS µg/mL	Zona de muestreo	ATS Pb 1000 µg/mL
1	400 de Hg	Sta. Rosa	✓	36	400 de Cu (A)	Albarregas	✓
2	400 de Hg	Sta. Rosa	✓	37	400 de Cu (A)	Albarregas	✓

3	400 de Hg	Albarregas	✓	38	400 de Cu (A)	Sta. Rosa	✓
4	400 de Hg	Albarregas	✓	39	400 de Cu (A)	Albarregas	✓
5	400 de Hg	Albarregas	✓	40	400 de Cu (A)	Sta. Rosa	✓
6	400 de Hg	Vto. Miranda	✓	41	400 de Cu (A)	Sta. Rosa	✓
7	400 de Hg	Vto. Miranda	✓	42	400 de Cu (A)	Vto. Miranda	✓
8	400 de Hg	La Mata	✓	43	400 de Cu (A)	Vto. Miranda	✓
9	400 de Hg	La Mata	✓	44	400 de Hg	La Mata	✓
10	400 de Cu (A)	Albarregas	✓	45	400 de Hg	Ejido	✗
11	400 de Cu (A)	Albarregas	✗	46	400 de Hg	Ejido	✓
12	400 de Cu (A)	Sta. Rosa	✓	47	400 de Hg	Vto. Miranda	✓
13	400 de Cu (A)	Sta. Rosa	✗	48	400 de Hg	La Mata	✓
14	400 de Cu (A)	Sta. Rosa	✓	49	400 de Hg	La Mata	✓
15	400 de Cu (A)	La Mata	✓	50	400 de Hg	Ejido	✓
16	400 de Cu (A)	La Mata	✓	51	400 de Hg	Ejido	✓
17	400 de Cu (A)	Ejido	✓	52	400 de Hg	Vto. Miranda	✓
18	400 de Cu (A)	Ejido	✓	53	400 de Hg	Vto. Miranda	✓
19	400 de Cu (A)	Ejido	✓	54	400 de Cu (B)	La Mata	✓
20	400 de Cu (B)	La Mata	✓	55	400 de Cu (B)	Vto. Miranda	✓
21	400 de Cu (B)	Albarregas	✓	56	400 de Cu (B)	Sta. Rosa	✓
22	400 de Cu (B)	Albarregas	✓	57	400 de Cu (B)	Sta. Rosa	✓
23	400 de Cu (B)	Albarregas	✓	58	400 de Cu (B)	Sta. Rosa	✓
24	400 de Cu (B)	Sta. Rosa	✓	59	400 de Cu (B)	Sta. Rosa	✓
25	400 de Cu (B)	Sta. Rosa	✓	60	400 de Cu (B)	Albarregas	✓
26	400 de Cu (B)	Sta. Rosa	✓	61	400 de Cu (B)	Vto. Miranda	✓
27	400 de Cu (B)	Ejido	✓	62	400 de Cu (B)	Ejido	✓
28	400 de Cu (B)	Ejido	✓	63	400 de Cu (B)	Ejido	✓
29	400 de Cu (B)	Ejido	✓	64	400 de Cu (B)	Ejido	✗
30	400 de Cu (B)	Sta. Rosa	✓	65	400 de Cu (B)	Ejido	✓
31	400 de Cu (B)	Albarregas	✓	66	400 de Hg	Sta. Rosa	✗
32	400 de Cu (A)	Albarregas	✓	67	400 de Hg	Sta. Rosa	✗
33	400 de Cu (A)	Vto. Miranda	✓	68	400 de Hg	Albarregas	✗
34	400 de Cu (A)	Ejido	✓	69	400 de Hg	Ejido	✓

35	400 de Cu (A)	Albarregas	✓	70	400 de Hg	Ejido	✓
----	---------------	------------	---	----	-----------	-------	---

En vista de que los clones que habían sido seleccionados por su resistencia a Hg y Cu y presentaban resistencia al Pb, se decidió hacer una evaluación cruzada de resistencia. Para ello se partió de los clones guardados en ATS con Hg, Cu o Pb y se les evaluó la resistencia a altas concentraciones de los metales en medio BHI.

Se sembraron seis placas con 4000 y 6000 µl de Cu, Hg y Pb respectivamente. Como se muestra en la Tabla 26, algunos clones mostraron resistencia a la máxima concentración a la que fueron sometidos. De estos 26 clones, los catorce que mejor crecimiento tuvieron en cuanto a tiempo de crecimiento, características de resistencia, y características macroscópicas fueron los que se evaluaron microscópicamente con la tinción de Gram.

bdigital.ula.ve

**TABLA N° 26:** Procedencia de los clones conservados y máxima concentración de metales a los que fueron sometidos.

N°	Zona de recolección	Proviene µg/ml	Agar	Agar	Agar	Agar	Agar	Agar
			BHI 4000 µl Hg	BHI 6000 µl Hg	BHI 4000 µl Cu	BHI 6000 µl Cu	BHI 4000 µl Pb	BHI 6000 µl Pb
1	Sta. Rosa	ATS 400 Hg	x	x	✓	✓	✓	✓

2	Albarregas	ATS 400 Hg	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	La Mata	ATS 400 Hg	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	Ejido	ATS 400 Hg	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	La Mata	ATS 400 Cu (A)	✓	✓	x	x	✓	✓
6	Sta. Rosa	ATS 400 Cu (A)	✓	x	✓	x	✓	✓
7	Albarregas	ATS 400 Cu (A)	x	x	✓	✓	✓	✓
8	Albarregas	ATS 400 Cu (A)	✓	✓	✓	✓	x	x
9	Ejido	ATS 400 Cu (A)	x	x	✓	✓	✓	✓
10	Albarregas	ATS 400 Cu (B)	x	x	✓	x	✓	✓
11	Sta. Rosa	ATS 400 Cu (B)	✓	✓	✓	x	✓	✓
12	La Mata	ATS 400 Cu (B)	✓	✓	✓	x	✓	✓
13	Vto.Miranda	ATS 400 Cu (B)	✓	✓	x	x	✓	✓
14	Vto.Miranda	ATS 400 Cu (B)	✓	✓	x	x	✓	✓
15	Albarregas	ATS 1000 Pb (ATS 400 Cu (A))	✓	✓	x	x	✓	✓
16	Sta. Rosa	ATS 1000 Pb (ATS 400 Cu (A))	✓	✓	x	x	✓	✓
17	Vto.Miranda	ATS 1000 Pb (ATS 400 Hg)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
18	La Mata	ATS 1000 Pb (ATS 400 Cu (B))	✓	✓	x	x	✓	✓
19	Ejido	ATS 1000 Pb (ATS 400 Hg)	✓	✓	✓	x	✓	✓
20	Albarregas	ATS 400 Hg	✓	✓	x	x	✓	✓
21	Sta. Rosa	MME 400 Hg	✓	x	x	x	x	x
22	Sta. Rosa	MME 400 Hg	✓	✓	x	x	✓	✓
23	Vto.Miranda	MME 400 Hg	x	x	✓	x	x	x
24	Ejido	MME 400 Cu	✓	✓	x	x	✓	✓
25	Ejido	MME 400 Cu	✓	✓	x	x	✓	✓

26	La Mata	MME 400 Cu	✓	✓	x	x	✓	✓
----	---------	------------	---	---	---	---	---	---

A partir de este ensayo se puede observar que la mayoría de los clones aislados por un criterio de resistencia a un metal, resultaron resistentes a los otros metales. También observamos que los clones que mostraron la mayor cantidad de resistencias y toleraron las concentraciones más altas ensayadas, provienen de una selección original en ATS con Hg. En general se observó que aquellos clones seleccionados por Hg, tienden a resistir las concentraciones más altas ensayadas, mientras que esto no se cumple igual para los seleccionados por Cu.

Las colonias fueron descritas de acuerdo a los criterios sugeridos por Koneman, 1999 y los resultados se muestran en la Tabla 27, siguiendo el mismo sistema organizativo por números de la Tabla 26. El 100% de los aislados mostró forma circular, elevación convexa, margen entero, superficie brillante; en relación al tamaño de las colonias en 35,7% mostró tamaño grande, 35,7% mediano y el 28,6% pequeño.

El 57,2% mostró morfología de cocos Gram positivo, 21,5% cocobacilos Gram positivo, 7,1 % cocobacilos Gram negativo, 7,1 % diplococos Gram positivo, 7,1 % diplococos Gram negativo; la homogeneidad en los resultados obtenidos de la tinción de Gram puede deberse al criterio de selección utilizado para el aislamiento de los microorganismos.

**TABLA N° 27:** Características macroscópicas y microscópicas.

N° de clon	Tamaño	Forma	Elevación	Margen	Color	Superficie	Gram
1	Mediano	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante	Cocos Gram positivos
2	Pequeño	Circular	Convexa	Entero	Gris	Brillante	Diplococos Gram positivos
3	Grande	Circular	Convexa	Entero	Gris	Brillante	Cocobacilos Gram

							positivos	
4	Grande	Circular	Convexa	Entero	Gris	Brillante	Cocos Gram positivos	
5	Pequeño	Circular	Convexa	Entero	Beige	Brillante	Cocobacilos Gram positivos	
6	Pequeño	Circular	Convexa	Entero	Beige	Brillante	Cocos Gram positivos	
7	Grande	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Brillante	Cocobacilos Gram negativos	
8	Mediano	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Brillante	Cocos Gram positivos	
9	Pequeño	Circular	Convexa	Entero	Beige	Brillante	Cocos Gram positivos	
10	Mediano	Circular	Convexa	Entero	Marrón	Brillante	Diplococos Gram negativos	
11	Mediano	Circular	Convexa	Entero	Marrón	Brillante	Cocos Gram positivos	
12	Mediano	Circular	Convexa	Entero	Salmon	Brillante	Cocobacilos Gram positivos	
17	Grande	Circular	Convexa	Entero	Marrón	Brillante	Cocos Gram positivos	
20	Grande	Circular	Convexa	Entero	Blanca	Brillante	Cocos Gram positivos	

bdigital.ula.ve

## CONCLUSIONES

- En las cinco zonas seleccionadas para muestreo hay microorganismos con resistencia a los metales Hg, Cu y Pb.
- Los microorganismos que se obtuvieron con resistencia a Hg provienen de la parte sur seleccionada mientras que los que se obtuvieron con

resistencia a Cu provienen de la parte norte. Como éste no es un estudio estadístico, este resultado puede estar influenciado por los métodos utilizados. sin embargo, esto tiende a indicar que la presencia de cobre puede ser de origen natural y la presencia de hg puede ser de origen urbano o antropogénico. esto estaría de acuerdo con el contenido de Cu del suelo de esta zona.

- El medio rico sin metal puede ser utilizado para la cuantificación de microorganismos. si se toma el crecimiento a 24 horas, hay un porcentaje muy alto de microorganismos resistentes al hg, pudiendo llegar a representar alrededor del 20% del total.
- Se cumplió el objetivo de poner en evidencia que la presencia de metales puede estar generando una presión selectiva.
- Todos los microorganismos seleccionados por su resistencia a Hg o Cu, resistieron la presencia de Pb hasta 6000ug/ml. adicionalmente se encontraron otras resistencias cruzadas entre Hg y Cu.
- En nuestro caso solamente microorganismos seleccionados por su resistencia al Hg mostraron resistencia a todos los otros metales en todas las concentraciones ensayadas.
- Los microorganismos seleccionados por sus resistencias a metales, tienden a ser cocos Gram positivos.
- Mérida puede representar una fuente de contaminación aguas abajo por su estructura geográfica y la presencia de los ríos que la atraviesan.
  
- Concluimos que las actividades antropogénicas como las que se enumeran a continuación, pueden estar contribuyendo con la contaminación del ambiente con metales: uso de pinturas, tintes, impresiones, textiles, cosméticos, empaques, materiales de construcción, juguetes, vehículos y sus partes, línea blanca, marrón, pilas, baterías, partes electrónicas, bombillos, etc.

bdigital.ula.ve

#### REFERENCIAS.

Acuña, O., Peña, W., Serrano, E., Pocasangre, L., Rosales, F., Delgado, E., Trejos, J., Segura, A. (2004). *La importancia de los microorganismos en la calidad de salud de los suelos*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la

página

Web:

<http://www.fontagro.org/sites/default/files/ListadoPublicaciones.pdf>

Castro, J. (2008). *Caracterización de cepas bacterianas resistentes al diclorodifeniltricloroetano (DDT) y paration, aisladas de suelos sometidos a manejo agrícola intensivo de diferentes localidades del estado Mérida.*

Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web:

[http://tesis.ula.ve/pregrado/tde\\_arquivos/1/TDE-2009-09-16T16:01:59Z-625/Publico/castrodavid.pdf](http://tesis.ula.ve/pregrado/tde_arquivos/1/TDE-2009-09-16T16:01:59Z-625/Publico/castrodavid.pdf)

Castrillo, G. (2004). A las plantas también les gusta el “Heavy metal”

Chaudri, A., McGrath, S., Sauerbeck, D. (1999). Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarumbiovarTrifolii* in soils previously treated with metal-contaminated sewage sludge.

Enger, O. y Torsvik, V. (1999). Abundance and Diversity of Archaea in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3293-3297.

Fedit Centros Tecnológicos de España. (2008). *Tendencias en el uso de la Biotecnología en el sector químico.* Extraído el 10 de noviembre de 2011, de

la

página

Web:

<http://www.fedit.com/Spanish/DocumentosInformes/Portal/Publico/DocumentosEInformes/ObservatoriosIndustriales/Jornadas%20Difusi%C3%B3n%2009/OI-Qu%C3%ADmico.pdf>

Ferrer, A. (2003). *Intoxicación por plaguicidas.* Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v26s1/nueve.pdf>

Garbisu C, Hernandez-Allica J, Barrutia O, Alkorta I, Becerril JM (2002b).

Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. *Rev Environ Health*. 2002 Jul-Sep; 17(3):173-88.

González, A. (2000). Nivel de Contaminación en suelos por elementos traza. Impacto sobre las comunidades Microbianas. *Edafología*. Volumen 7-3. Septiembre. p 47-54.

ITGE (1995). Contaminación y depuración de suelos. Publicaciones del ITGE. 330p.

Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P. y Winn, W. (1999). *Diagnostico Microbiologico*. Texto y atlas color. Editorial panamericana, quinta edición.

Labra, D., Guerrero, L., Rodríguez, A., Montes, S., Pérez, S., y Rodríguez, A. (2012). *Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de cyperuselegans y echinochloapolystachya inoculados con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/article/view/29701>

López, A. (2005). *Biorremediación y fitorremediación en suelos contaminados*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/598/615>

Madigan M., Martinko J. y Parker J. (1998). *Biología de los microorganismos*". 8<sup>va</sup> edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A. Madrid.

Mazparrote, S.(2001). *Estudios de la naturaleza*. Editorial biosfera, Caracas-Venezuela. 57

Molina, J. (2005). *Aislamiento de bacterias a partir de los suelos tratados con pesticidas, potencialmente utilizables en biorremediación*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://www.conama9.org/conama9/download/files/CT%202010/41225.pdf>

Montras., A y Vincent, T. (2002). *Biodegradacion y Biorremediacion*. Ecotropia.

Navarro, J., Aguilar, I., Lopez, J., (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16 (2), 10-25.

Nebel, J. y Wright, T., (1999). *Ciencias ambientales: ecología y desarrollo sostenible*. Sexta edición. Editoril Prentice hall hispanoamericana, S. A. México. 720 Pág.

Olalde, V., y Aguilera, L., (1998). *Microorganismos y biodiversidad*. Editorial Terra: Universidad Autónoma de Chapingo

Olea, N., Fernández, M. (2001). *Plaguicidas persistentes. Congreso implementación del convenio de contaminantes orgánicos persistentes Madrid*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://www.istas.ccoo.es/descargas/cops10.pdf>

Pérez, A. (2009). *Guía Metodológica para anteproyectos de investigación*. Universidad Pedagógica Libertador.

Polanco, J. (2008). *Implicaciones Ambientales y Legales del Uso y Abuso de Agroquímicos en la Salud de los Habitantes del Departamento de Chimaltenango*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/04/04\\_7676.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/04/04_7676.pdf)

Ramírez, J., y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>

Rivera, D., Camelo, M., Estrada, G., Obando, M., Bonilla, R. (2010). *Efecto de los diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de Azotobacterchroococcum*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://www.google.co.ve/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.revistas.unal.edu.co%2Findex.php%2Fbiotecnologia%2Farticle%2Fdownload%2F15566%2F16322&ei=v4NeUMi1G6T00gGGnoHQDw&usq=AFQjCNHslontEAAaxXWPE1Kh7cZ5cZyhxg&sig2=3b46BnDSNdBbUiuzso4fYA>

Rivera, P. (s.f.). *Marco Teórico, Elemento Fundamental en el Proceso de Investigación Científica*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: [http://brayeban.aprenderapensar.net/files/2010/10/Marco\\_Terico\\_Referencia1.pdf](http://brayeban.aprenderapensar.net/files/2010/10/Marco_Terico_Referencia1.pdf)

Rodríguez, J. (2001). *La Química como armamento*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://www.ehu.es/zorrilla/juanma/ARMAS/Armamento.pdf>

Sánchez, I. (2003). Determinación de metales pesados en suelos de mediana del campo Valladolid. Tesis de doctorado. Universidad de Valladolid. España.

Shuttleworth, W. y Unz, F. (1993). Sorption of heavy metal to the Filamentous bacterium triothrix strain A1.

Técnicas y tratamientos de contaminación (2003). *Biorremediación*. Extraído el 10 de noviembre de 2011, de la página Web: <http://www.uhu.es/sevirtual/ocw/politecnico/tecnicas-tratamiento-contaminacion/material/003.pdf>

Vázquez, I.; Martín, J.A.; Moreno, A.M.; González, J. (2002). Calculation of reference values of trace elements in soils in the Community of Madrid (Spain).

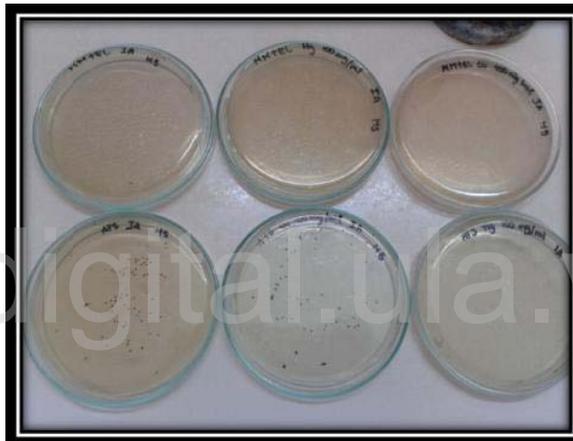
bdigital.ula.ve

# **Anexos**

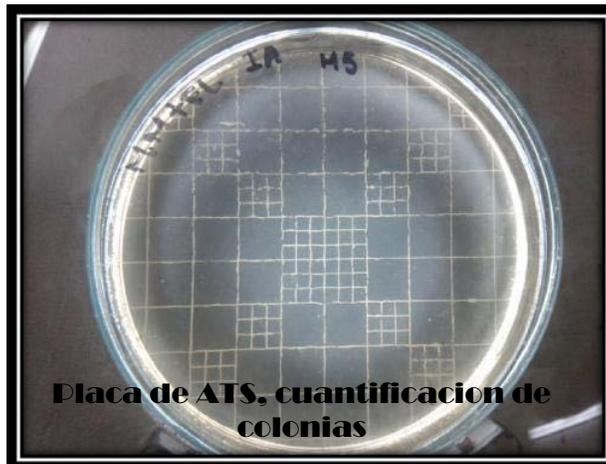
bdigital.ula.ve



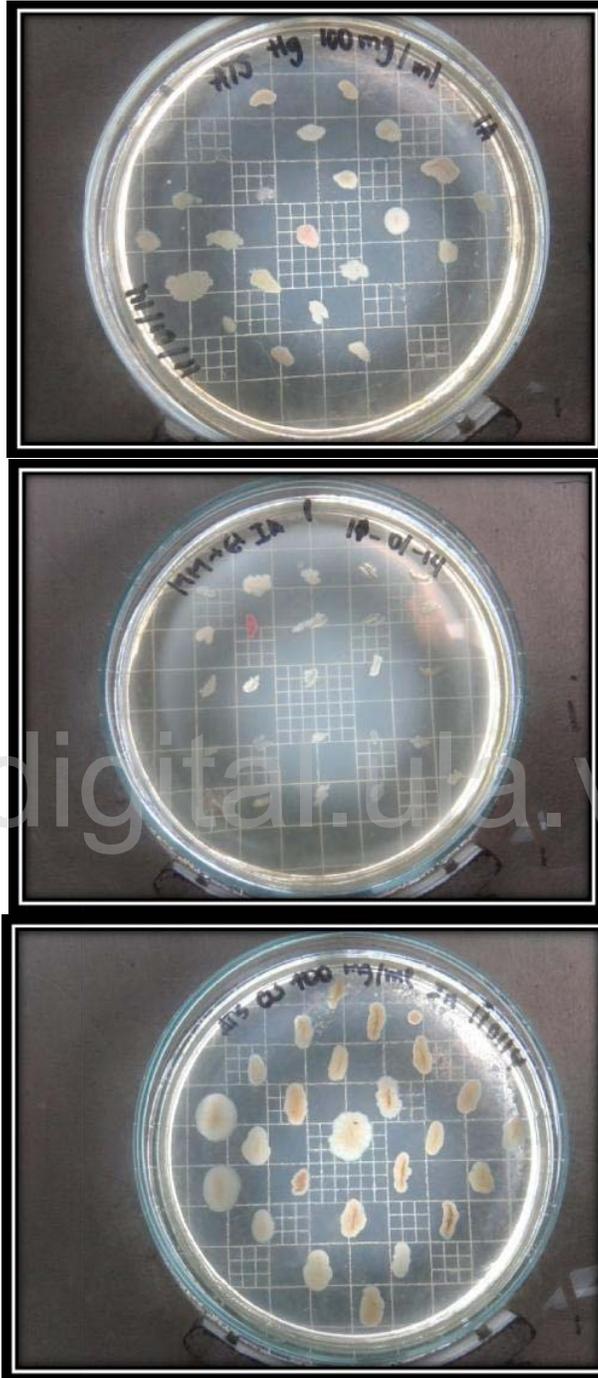
**Material de trabajo**



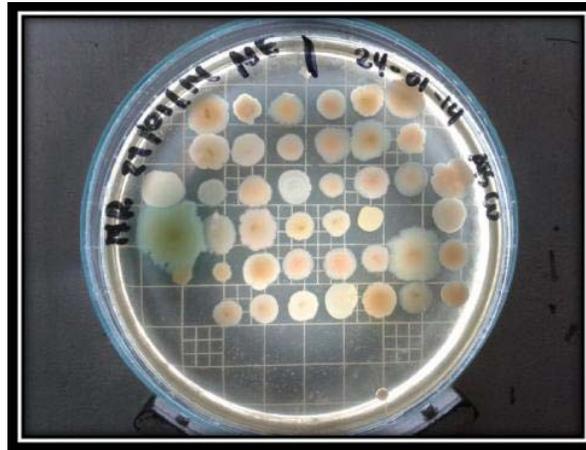
**Placas con las seis condiciones de siembra**



**Placa de ATS, cuantificación de colonias**



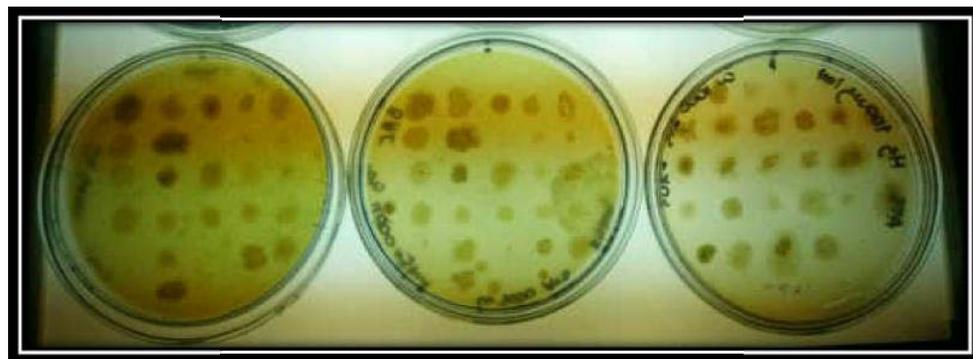
### Selección de clones



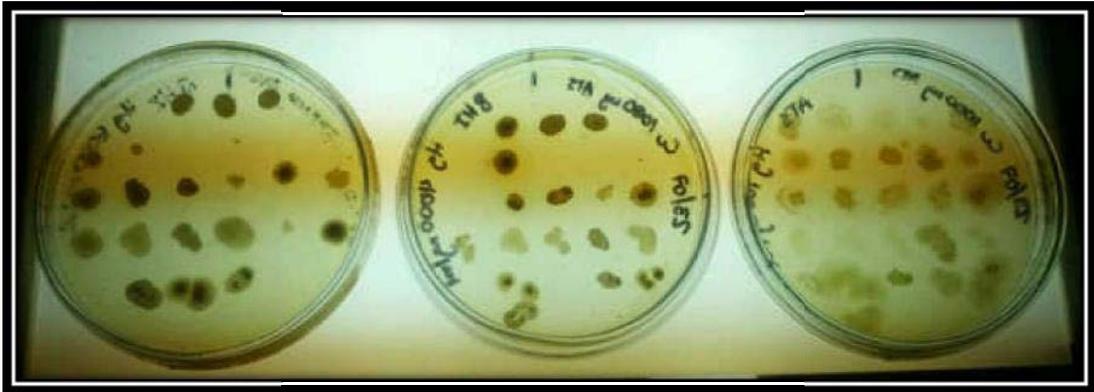
**Clones conservados**



**Evaluación de resistencia en medio BHI**



**Evaluación de resistencia en medio BHI**



**Evaluación de resistencia en medio BHI**



**Evaluación de resistencia en medio BHI**