UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES MICROBIOLOGÍCAS
"DRA. CELINA ARAUJO DE PÉREZ"

BUSQUEDA DE MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS EN SUELOS SOMETIDOS A EXPLOTACIONES MINERAS EN EL MUNICIPIO RIVAS DÁVILA DEL ESTADO MÉRIDA

www.bdigital.ula.ve

Autores:
Heydi Camacho
Nallivy Carrero
Tutor Académico:
MSc. José Manuel Jiménez

Mérida, junio de 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES MICROBIOLOGÍCAS
"DRA. CELINA ARAUJO DE PÉREZ"

BUSQUEDA DE MICROORGANISMOS EXTREMOFILOS EN SUELOS SOMETIDOS A EXPLOTACIONES MINERAS EN EL MUNICIPIO RIVAS DÁVILA DEL ESTADO MÉRIDA

www.bdigital.ula.ve

Autores:
Heydi Camacho
Nallivy Carrero
Tutor Académico:
MSc. José Manuel Jiménez

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIENTO

Agradecemos de todo corazón, a nuestro Señor Dios; seguidamente a nuestros padres, familiares, amigos y facilitadores. Un agradecimiento especial a nuestro Tutor, Prof. José Jiménez, gracias por la dedicación y el esfuerzo; sus sugerencias y observaciones; gracias a ellas, hoy presentamos este trabajo fruto de mucho sacrificio y amor.

Gracias enormes: Heydi y Nallivy

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo especialmente a Dios, por darnos el ser y la sabiduría para llevarlo a cabo; a nuestros padres, quienes supieron guiarnos hacia el alcance de metas; a nuestros profesores, familiares y amigos, por su apoyo y constantes palabras de aliento.

Heydi y Nallivy

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pp
VEREDICTO…….	iii
AGRADECIMIENTO……	iv
DEDICATORIA…….	v
ÍNDICE DE CONTENIDO……	vi
ÍNDICE DE FIGURAS……..	ix
ÍNDICE DE TABLAS……	x
RESUMEN…….	xi
INTRODUCCIÓN…….	1
CAPÍTULO I	
EL PROBLEMA	
Planteamiento del Problema……..	3
Justificación e Importancia de la Investigación…….	5
Objetivos de la Investigación	
Objetivo General……	6
Objetivos Específicos…….	6
Alcance y Limitaciones de la Investigación……..	7
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	
Trabajos Previos…….	9
Antecedentes Históricos…….	14
Bases Teóricas	
Generalidades del suelo……	16
Clasificación de la biodiversidad del suelo por su tamaño……..	17
Microorganismos……...	18
Bacterias……	18

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hongos……. 21
Aspectos estructurales de los hongos…….. 22
Características macroscópicas de hongosfilamentosos y……*levaduriformes* 23
Características microscópicas de hongosfilamentosos y……. *levaduriformes* 26
Tinciones básicas en el laboratorio de microbiología……. 28
Ambientes Extremos……. 29
Microorganismos en Ambientes Extremos……. 30
Clasificación de los organismos extremófilos 31
Microorganismos Metalófilos……. 35
Metales Pesados……. 37
Formas de Retención y Disponibilidad de Metales Pesados……. 38
Fuentes de Contaminación por Metales Pesados…….. 39
Mecanismos bioquímicos desarrollados por los microorganismos para el tratamiento de metales pesados.. 40
Unión a metales, bioacumulación y biosorción……. 41
Transformación de la valencia del metal…….. 41
Mecanismo de precipitación química extracelular…… 42
Resistencia bacteriana a metales pesados……. 43
Mecanismos de acción de los hongos…… 45
Metales Pesados de Interés…… 46
Cobre……. 46
Zinc…… 46
Definición Operacional de Términos…… 48
Operacionalización de las Variables…….. 50
Hipótesis Alternativa…….. 52
Hipótesis……. 50

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO III
MARCO METODOLÓGICO
Tipo de Investigación…….. 53
Diseño de la Investigación…….. 53
Población y Muestra……... 54
Unidad de Investigación……. 54
Selección del Tamaño de la Muestra……. 54
Sistema de Variables…….. 55
Variable Independiente…….. 56
Variable Dependiente……. 56
Variable Interviniente……. 56
Procedimiento de la Investigación……. 57
Diseño de Análisis…….. 63
CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIONES…….. 64
CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES…… 74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…….. 77
ANEXOS

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micro-escala del hábitat microbiano del suelo…….. 17

Figura 2. Árbol evolutivo de microorganismos (bacteria, arquea y eucaria). 18

Figura 3. Diferencias entre Gram positiva y Gram negativa……. 19

Figura 4. Diferencia entre hongos y bacterias…… 24

Figura 5. Características macroscópicas de levaduras…… 25

Figura 6. Características microscópicas de las levaduras…… 27

Figura 7. Diferentes condiciones ambientales extremas y grupos de organismos adaptados a ellas (extremófilos). 31

Figura 8. Presencia y disposición de microorganismos en suelos con alto contenido de metales. 36

www.bdigital.ula.ve

Figura 9. Proceso del desarrollo experimental de la investigación……... 57

Figura 10. Mapa del municipio Rivas Dávila del Estado Mérida, Venezuela. 58

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos microorganismos implicados en la biorremediación de metales pesados 12
Tabla 2.Diferencia entre hongos y bacterias……... 23
Tabla 3. Niveles Base Típicos de Metales en Suelos…….. 38
Tabla 4. Operacionalización de las Variables…….. 51
Tabla 5. Muestras recolectadas…… 55
Tabla 6. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo 64
Tabla 7.Crecimiento de las cepas a las 24, 48, 72 y 96 horas según el suplemento con las sales de metales 66
Tabla 8. Cantidad de UFC a las 72 y 96 horas de siembra……... 67
Tabla 9.Selección y aislamiento de las colonias crecidas a 96 horas según sus características macroscópicas 68
Tabla 10. Crecimiento y estabilización de las colonias seleccionadas……. 68
Tabla 11.Evaluación de resistencia de las colonias aisladas a metales pesados 69
Tabla 12. Características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas con resistencia a metales pesados 71
Tabla 13. Identificación de los microorganismos aislados y máxima concentración de metal a los que mostraron resistencia 72

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES MICROBIOLOGÍCAS
"DRA. CELINA ARAUJO DE PÉREZ"

BUSQUEDA DE MICROORGANISMOS EXTREMOFILOS EN SUELOS SOMETIDOS A EXPLOTACIONES MINERAS EN EL MUNICIPIO RIVAS DÁVILA DEL ESTADO MÉRIDA

Autores:
Heydi Camacho
Nallivy Carrero
Tutor Académico:
MSc. José Manuel Jiménez

RESUMEN

El principal interés por los suelos del municipio Rivas Dávila del estado Mérida, es debido a sus depósitos de mineral fosfato con altas concentraciones de metales pesados. Identificar las características de microorganismos, extremófilos sometidos a la influencia de altas concentraciones de Cu y Zn en esta zona es de gran importancia para grandes proyectos de biorremediación. Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue describir las características morfológicas de los microorganismos extremófilos con resistencia a metales pesados en suelos sometidos a explotaciones mineras en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida.Los resultados obtenidos arrojan que existen microorganismos extremofílosmesófilos, resistentes a altas concentraciones de Cu y Zn con respecto a la concentración tópica normal del suelo. Los microorganismos aislados de estos suelos son pertenecientes al reino Fungí, no se aislaron bacterias con resistencia mayores o iguales a 3 mg/mL tanto en Cu como en Zn. Los microorganismos aislados fueron *Fusarium sp, Penicilliumsp, Hormodendrumsp* y *Scytalidiumsp.*

Palabras Clave: Resistencia, Metales pesados, extremofilo, microorganismos, mesófilo, biorremediación.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INTRODUCCIÓN

La biomasa microbiana en el planeta conforma el 60 % de la biomasa total y constituye una reserva genética dinámica que no ha podido ser caracterizada en su totalidad, debido a la dificultad de su cultivo en el laboratorio. La mayor parte de la vida microbiana que se conoce vive en el subsuelo marino y terrestre; estos hábitats son un campo lleno de posibilidades para el descubrimiento de formas microbianas de vida aún desconocidas (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

El descubrimiento de los microorganismos extremófilos, capaces de vivir bajo condiciones extremas de temperatura, pH, presión, salinidad, radiación y sus combinaciones, ha proporcionado herramientas invaluables para su aplicación en una amplia gama de procesos biotecnológicos, permitiendo el manejo racional de los recursos naturales (Oliart, Manresa y Sánchez,2016).

Es importante saber que el deterioro de los recursos naturales es considerado como contaminación, además de la incorporación al medio de sustancias toxicas o que no pertenezcan a él, provocando daño y por ende un desequilibrio irreversible o no en el ecosistema. La contaminación con metales pesados puede llevar a una reducción parcial, así como total en la población de la masa microbiana, o bien provocar disminución efectiva en poblaciones de microorganismos del suelo (Escobar, 2014).

www.bdigital.ula.ve

El principal interés por los suelos del municipio Rivas Dávila del estado Mérida es precisamente sus depósitos de mineral fosfato con altas concentraciones de metales pesados (Morales, 2006). Por lo tanto, identificar las características morfológicas de microorganismos, sometidos a la influencia de materiales pesados en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida es de gran interés tanto regional como nacional.

Por consiguiente, se planteó la presente investigación, la cual está estructurada en cinco (5) capítulos, de acuerdo a como se describe a continuación: Capítulo I: hace referencia a la contextualización del problema, sus objetivos y justificación. Capítulo II: comprende lo relacionado al marco referencial, antecedentes, bases teóricas,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

sistemas de hipótesis y de variables. Capítulo III: contiene la modalidad y tipo de Investigación, procedimientos, población y muestra, técnicas e instrumentos de recolección de datos y de análisis. Capítulo IV: se describen los resultados obtenidos en la investigación y su correspondiente discusión. El Capítulo V: lo compone las conclusiones y recomendaciones. Finalmente se concluye el presente trabajo con la lista bibliohemerográfica y los anexos recopilados durante la investigación.

El objetivo de la presente investigación fue confirmar la presencia de microorganismos extremófilos en suelos sometidos a explotaciones mineras en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

El Municipio Rivas Dávila, cuenta con una superficie de 18.200 hectáreas de relieve irregular, de las cuales aproximadamente 6.950 ha., se ubican a lo largo de los conos de deyección, abanicos aluviales y pequeñas terrazas presentes en el municipio, con altas potencialidades para el desarrollo agropecuario, debido a que sus suelos son el producto de depósitos aluviales y de flujos de detritos, de variadas texturas, desde franco arenosas hasta franco arcillosas (Mora, 2004).

Un aspecto relevante es la presencia en el sector Las Tapias de importantes yacimientos mineros con concentraciones significativas de cobre, plomo y zinc (Contreras, Paolino y Rivas, 2004). Las reservas probadas se estiman en 2,6 a 3,5 millones de toneladas métricas, con porcentajes de concentración que indican posibilidades ciertas de explotación. El yacimiento mineral recibe el nombre de Lima Nº 2 constituido por dos vetas mineralizadas y formadas por relleno hidrotermal de temperatura media a alta en plano de fallas tectónicas, constituido por sulfuros metálicos entremezclados con blenda, pirrotita, pirita, galena argentífera en compañía de cuarzo y filitas cloríticas localizados en las Tapias. Las aguas termales se encuentran a 6 Km de Bailadores aproximadamente, en la aldea Las Tapias, sector Virgen del Duri por el ramal que conduce a las minas (Morales, 2006). Estas aguas tienen aspecto cristalino, olor sulfuroso, 134 ºC, con contenido de cloros y sulfatos.

Es evidente que la minería, a pesar de brindar muchos beneficios económicos, es una de las principales industrias contaminantes. El drenaje ácido de minas es agua con pH menor a 5 proveniente de los residuos de las minas (Tábora, 2017). En minas cerradas y abandonadas, el nivel freático puede incrementar y causar una descarga de agua contaminada con ácidos y metales pesados (Johnson y Thornton, 1987).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Sin embargo, el papel ecológico de los microorganismos es enorme, muchos procesos ambientales que soportan la vida en la tierra están mediados por ellos. Un ejemplo de esto es su participación en los ciclos biogeoquímicos de los elementos, entre ellos los metales (Bautista, 2008). Debido a sus capacidades, el hombre los ha usado en varios procesos industriales aplicados a un gran número de productos (detergentes, explotación de petróleo, enzimas, medicamentos, etc.) y en la extracción de metales valiosos de minas (biolixiviación). Así mismo, han sido ampliamente utilizados para remediar eventos de contaminación (biorremediación); los microorganismos pueden ser usados para reducir o eliminar el riesgo para el medio ambiente a través de la acumulación, degradación o transformación de productos químicos tóxicos y de otros desechos peligrosos (Maier, 2006).

El descubrimiento de microorganismos que habitan en ambientes con temperaturas extremas, pH extremos, altas presiones barométricas y alta salinidad, ha despertado el interés de su estudio desde el punto de vista biotecnológico debido a las características de estos microorganismos ya que sus biomoléculas son necesariamente resistentes a las condiciones agresivas de su entorno, lo que desemboca en intensos trabajos para intentar comprender los mecanismos íntimos de resistencia, pero también para estudiarlos en la perspectiva del desarrollo de aplicaciones industriales entre las que la PCR (Polymerase Chain Reaction) constituye el más destacado ejemplo (Ramírez, Serrano y Sandoval, 2006).

www.bdigital.ula.ve

La investigación científica acerca de la microbiota presente en ambientes extremos quizás no ha tenido la difusión necesaria en Venezuela, a pesar de la gran diversidad geológica y ecológica que presenta, sin embargo en años recientes, el aislamiento e identificación de microorganismos extremófilos han sido estudiados con la finalidad de conocer sus características por la gran relevancia científica debido a las múltiples aplicaciones biotecnológicas de los metabolitos y enzimas extracelulares (Escobar, 2014).

El municipio Rivas Dávila del estado Mérida, es una zona agrícola donde se utilizan grandes cantidades de fertilizantes y fungicidas para el control de plagas, lo

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

que ha ocasionado cambios en los suelos dentro de los cuales se destacan cambio de pH, salinidad entre otros, además las altas concentraciones de metales pesados presentes en los depósitos de mineral de sus formaciones geológicas, hizo de este municipio un lugar de interés relevante para la búsqueda y estudio de microorganismos metalófilos.

Por lo tanto, una vez planteada la situación actual del problema de investigación, se pudo formular la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la relación que existe entre los microorganismos extremófilos y los suelos sometidos a explotaciones mineras en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida?

Justificación e Importancia de la Investigación

La biodiversidad en nuestro país es muy amplia debido principalmente a la variación del clima y la diversidad de regiones que tiene. Sin embargo, la investigación en el área es escasa. En el ámbito microbiológico se han registrado estudios en suelos, en su mayoría evaluando la fijación biológica de nitrógeno, también en aguas, pero más enfocado a aguas residuales, potables y control de calidad, aun así, la información obtenida es pobre por lo que se requiere mayor profundidad en el campo investigativo (Contreras, 2015; Escobar, 2014 y Contreras y cols., 2004).

www.bdigital.ula.ve

Aislar e identificar microorganismos extremófilos, es un trabajo pionero que contribuirá en el conocimiento de lamicrobiota presente en suelos con explotaciones mineras y agropecuarias en el país y permitirá identificar aislados con gran potencial biotecnológico, ya que no sólo producen compuestos de gran interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial (Escobar, 2014).

Desde el punto de vista tecnológico, el estudio de los extremófilos ha despertado el interés de varias industrias, debido a sus enzimas, catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas de la célula, como en el caso de las arqueas

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

extremófilas que les permiten colonizar los ambientes más inhóspitos. Las enzimas habituales tienen ciertas limitaciones, sin embargo, las extremo enzimas, empiezan a operar justo en el punto donde las habituales dejan de funcionar (Castillo, 2005).

Los productos de estos microorganismos contribuyen en varios procesos industriales que requieren el uso de aceleradores químicos, tal es el caso de las enzimas que participan en la producción de edulcorantes, papel, síntesis de detergentes, elaboración de alimentos como pan y vino, tratamiento de residuos, extracción de petróleo, obtención de biochips para la identificación de personas y el diagnóstico de enfermedades, así como la biorremediación de los ambientes, aguas y suelos contaminados por metales pesados(Guerrero, Egea y Martínez, 2013).

Por consiguiente, se justificó la búsqueda de microorganismos extremófilos en suelos que han sido sometidos a explotaciones mineras en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida, para conocer sus características y tener un registro de las propiedades fisiológicas de estos microorganismos presentes en la zona de estudio y que se asienten las bases teóricas para futuras investigaciones.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la presencia de microorganismos extremófilos en suelos sometidos a explotaciones mineras en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida.

Objetivos Específicos

- Determinar los parámetros fisicoquímicos del suelo como Ph y temperatura.
- Inocular medios de cultivos sólidos con extractos de las muestras recolectadas de los suelos.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- Obtener colonias puras de los microorganismos presentes en las muestras de suelo.
- Determinar la concentración máxima de cobre y zinc en la que los microorganismos aislados pueden crecer.
- Describir las características macroscópicas como tamaño, forma, color, aspecto, pigmentación y consistencia de las colonias de los diferentes microorganismos crecidos en los cultivos.
- Describir las características microscópicas como tamaño, forma, disposición, tinción, estadio, de los microorganismos aislados en medios de cultivos suplementados con Cu y Zn.
- Identificar de los microorganismos aislados en las muestras de suelo.

Alcance y Limitaciones de la Investigación

www.bdigital.ula.ve

Alcance de la investigación

Aislar e identificar microorganismos en suelos sometidos a la presencia de metales pesados, es un trabajo que contribuye en el conocimiento, definición de características morfológicas y propiedades de crecimiento, de microorganismos en la zona de municipio Rivas Dávila del estado Mérida. Este estudio aporta la base para futuras investigaciones en el país, contribuyendo a localizar posibles poblaciones microbianas productoras de compuestos de gran interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, siendo estas de gran interés biotecnológico para la industria en general.

Limitaciones de la investigación

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se presentaron limitaciones relacionadas con los aspectos teóricos, técnicos y recursos económicos. La principal

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

limitación de la investigación fue la restricción para evaluar la población microbiana del suelo en estudio. Además, las fallas en cuanto a la disponibilidad de los servicios de agua, luz y gas que afectaron la realización del desarrollo del trabajo de grado II. Asimismo, la intermitencia de las comunicaciones de telefonía e internet que dificultó la revisión bibliográfica y correcciones del manuscrito por parte de los evaluadores.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Pérez (2019), realizó estudios sobre los hongos extremófilos con potencialidades para el tratamiento y valorización de biosólidos municipales, con el objetivo de evaluar el potencial de los hongos filamentosos. En esta investigación se caracterizaron las actividades enzimáticas aril alcohol oxidasa, amilasa, celulasa, esterasa, lacasa, lignina peroxidasa, lipasas, manganeso peroxidasa, peroxidasas totales y xilanasa durante el tratamiento de biosólidos municipales con las cepas *Aspergillus sydowiilike* H1 y *Aspergillus destruens*EXF-1041. Se evaluó la remoción de fenoles, metales pesados y compuestos farmacéuticos de los mejores tratamientos seleccionados a partir del análisis estadístico realizado. Las pruebas toxicológicas post-tratamiento se realizaron mediante pruebas de germinación de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*). Ambas cepas demostraron ser eficaces en la remoción de fenoles, metales pesados y compuestos farmacéuticos. También fueron capaces de expresar enzimas extracelulares (aril alcohol oxidasa, amilasa, celulasa, esterasa, lacasa, lignina peroxidasa, lipasas, manganeso peroxidasa, peroxidasas totales y xilanasa) durante el tratamiento de biosólidos municipales en procesos fermentativos sólidos y líquidos. En este estudio, se desarrolló una estrategia de reducción de costos, que se refirió a la capacidad presentada por las cepas de estudio para producir cócteles enzimáticos utilizando biosólidos municipales como sustrato, lo que redujo considerablemente el costo de producción de enzimas.

Tabora (2017), estudió el efecto del cobre y zinc en la comunidad microbiana del río Arkansas, Leadville, Colorado, Estados Unidos. Con el fin de determinar el efecto de estos metales en el número de bacterias provenientes de este río, en la cual se crearon perfiles de resistencia bacteriana hacia el cobre, zinc y a ambos metales.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Adicionalmente, se realizó un análisis de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) para identificar bacterias encontradas en las muestras e identificar genes de resistencia hacia el cobre y zinc. Según los resultados obtenido por los Tabora, estos metales pesados tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias.

Específicamente, el cobre con una concentración de 50 mg/L fue el metal con mayor toxicidad y efecto inhibitorio en el número de bacterias del río Arkansas en comparación con el zinc. La inhibición fue aún mayor en los medios con presencia de ambos metales, cobre y zinc a 50 mg/L. El investigador pudo identificar que los géneros *Sphingobacterium* y *Luteibacter* presentan una resistencia al cobre a 50 mg/L. Al agregar zinc a 50 mg/L solamente *Sphingobacterium* continúa con crecimiento normal. Con respecto a los genes de resistencia determinados con análisis de PCR, el género de las *Sphingomonas* muestra una banda del gen resistente a zinc, en cambio *Sphingobacterium* y *Luteibacter* no presentaron ninguna banda en ninguno de los cebadores para los metales evaluados en este estudio.

www.bdigital.ula.ve

Arias (2016), realizó un trabajo titulado Aislamiento e Identificación de Bacterias Termófilas de la Fuente Geotermal Papallacta, en Ecuador, esta investigación fue de campo con el objetivo de identificar bacterias mediante técnicas microbiológicas y moleculares en la fuente geotermal Papallacta localizada en la provincia de Napo en Ecuador. Se tomaron muestras de agua y sedimento en la fuente así como datos de pH y temperatura. Las muestras fueron procesadas, inoculadas y purificadas en medios semi específicos.

Para su identificación se extrajo ADN, se realizó una amplificación del gen 16S rRNA, posteriormente se realizó la técnica de Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), y se realizó la secuenciación. El promedio de la temperatura del agua termal fue 54 °C y del pH fue 8,2. Se obtuvieron un total de cuarenta cepas bacterianas, de los cuales nueve son especies diferentes. Predominan *Anoxybacillusamylolyticus*, *Aeribacilluspallidus*y *Anoxybacillusgonensis*. También se encontró *Bacilluslicheniformis*, *Geobacillusstearo thermophilus*, *Thermoactinomycesintermedius*, *Tepidimonastaiwanensis*, *Bacillussubtilis* y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Anoxybacillusflavithermus. Los microorganismos identificados están relacionados con la biodiversidad de fuentes geotermales de otras partes de mundo.

Este estudio estuvo altamente relacionado con la presente investigación que buscó identificar microorganismos extremófilos, en este caso termófilos. Cuya relación con la presente investigación se fundamenta en la presencia de nacientes hidrotermales muy adyacentes al área de estudio y que es de gran influencia en la composición microbiana de los suelos sometidos a explotaciones mineras en el estado Mérida.

Beltrán y Gómez (2016), publicaron una revisión acerca de la Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética. En la cual se abordan diferentes mecanismos bioquímicos para contrarrestar la toxicidad de los metales pesados. Algunos de estos comprenden mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para remover metales, entre los cuales destacan: Unión a metales, bioacumulación y biosorción, transformación de la valencia del metal, biometilación y volatilización, precipitación química extracelular y mecanismo simbiótico. Entre las transformaciones enzimáticas de los metales realizadas por microorganismos se incluyen la oxidación, la reducción, la metilación, la demetilación, entre otras.

www.bdigital.ula.ve

En la revisión se nombran algunas especies de organismos destacadas (Tabla 1) y se hace un esbozo acerca de algunas aproximaciones de ingeniería genética con el objetivo de mejorar las capacidades biorremediadoras de estas especies. Esta síntesis ayudara a comprender los mecanismos de funcionamiento de sus biomoléculas específicamente la resistencia desarrollada por los microorganismos presentes en condiciones extremófilas en altas concentraciones de metales pesados en el suelo. Además de orientar sobre la utilidad de la búsqueda de dichos organismos para futuros proyectos de biotecnología para la biorremediación de suelos que presenten las mismas características u obtener información sobre otras aplicaciones de dichos microorganismos.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 1.

Algunos microorganismos implicados en la biorremediación de metales pesados.

MICROORGANISMO	METAL
Cunninghamellaechinulata, Fusarium oxysporum, Rhizopusstolonifer, Thrichodermaviride Staphylococcusxylosus, Staphylococcus carnosus, Trichodermareesei Pseudomonasaeruginosa Deinococcusradiodurans, Thermusthermophilus, Acidiphliumangustum, Flavobacteriumaquatile y Flavobacteriumhibernum Fusarium oxysporum Vibrio harveyi, Enterobactercloacae, Rhodobiummarinum, Rhodobactersphaeroides Glomussp, Gigasporasp, Acaulosporasp.	Cadmio
Pseudochrobactrumsaccharolyticum, Enterobactercloacae, Pseudomonassp, Micrococcussp, Bacillussp, Achromobactersp, Microbacteriumsp, Arthrobactersp, y Corynebacterium	Cromo (VI)
Pseudomonasambígua, Escherichiacoli, Cupriavidus metallidurans	Cromo (Cr)
Bacillussp.	Cromo, Cadmio y Mercurio
Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Listeria sp,Alcaligenes eutrophus, Pseudomonas putida. Aeromonassp, Staphylococcus aureus, Lactobacillus sp, Micrococcus sp, Bacillus sp, Bacillus megaterium, Acinetobactersp, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli	Cromo y Cadmio
Geobacillusthermodenitrificans	Cromo (III), Cadmio (II)
Shewanellaoneidensis, Chlamydomonasreinhardtii, Trichodermaharzianum, Enterobactersp., Bacilluscereus	Mercurio (II)
Pseudomonassp., Psychrobactersp.	Hg orgánico e inorgánico
Pseudomonas baleárica, Pseudomonasputida V1, Pseudomonasfluorescens, Enterobactercloacae, Citrobacterbraakii, Alcaligenesfaecalis	Me Hg (metil mercurio)

Fuente: Tomada y modificada de Beltrán y Gómez (2016).

www.bdigital.ula.ve

Avellaneda (2015), en su Tesis Doctoral trabajo en la Caracterización de comunidades microbianas asociadas a prácticas agrícolas y usos del suelo de la vereda El Bosque - Parque Nacional Natural de los Nevados, en la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias. Bogotá, Colombia. El investigador evaluó los cambios de las comunidades microbianas asociados al cultivo

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de papa y la ganadería en suelos de páramo de la vereda El Bosque del Parque Nacional Natural de Los Nevados (PNN Los Nevados).

La evaluación se realizó bajo un enfoque agroecológico en donde no solo se realizó la caracterización de los microorganismos del suelo, se evaluaron los parámetros físico-químicos y las actividades enzimáticas de diferentes ciclos biogeoquímicos en los suelos bajo cultivo de papa, ganadería y páramo en conservación. Posteriormente, y como parte de la caracterización a nivel de diversidad funcional de la comunidad microbiana mediante métodos cultivo dependientes; también se reportaron los registros biológicos de los microorganismos aislados e identificados con base en la determinación de grupos funcionales (Avellaneda, 2015).

Las bacterias identificadas pertenecen a los géneros *Acinetobacter, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacillus, Burkholderia, Chitinophaga, Comamonas, Enterobacter, Escherichia, Kaistia, Leucobacter, Microbacterium, Micromonospora, Oerskovia, Paenibacillus, Pantoea, Pedobacter, Pseudomonas, Rahnella, Rhodococcus, Roseomonas, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Streptomyces*. Por su parte, los hongos identificados pertenecen a los géneros *Aspergillus, Aureobasidium, Beauveria, Bionectria, Coniothyrium, Diplogelasinospora, Drechslera, Fusarium, Geomyces, Hypocrea, Leptosphaeria, Mortierella, Mucor, Neonectria, Paecilomyces, Penicillium, Preussia, Torula, Trichoderma, Trichosporon, Truncatella, Umbelopsis* (Avellaneda, 2015)

www.bdigital.ula.ve

Existe una correlación entre esta investigación y la presente, ya que pretende identificar microorganismos extremófilos en la zona del municipio Rivas Dávila dedicado a explotaciones agropecuarias y mineras del estado Mérida, debido a los ecosistemas de alta montaña, exclusivos de la cordillera central de los Andes presente en Colombia, Venezuela, Ecuador y norte de Perú, donde subjetivamente podría presentar una correlación del habitad microbiana del suelo por pertenecer al mismo conjunto geológico.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Antecedentes Históricos

El término extremófilo fue usado por vez primera por MacElroy en 1974. El descubrimiento de microorganismos que habitan en ambientes con temperaturas extremas, pH extremos, altas presiones barométricas y alta salinidad, despertó el interés de su estudio desde el punto de vista biotecnológico debido a las características de estos microorganismos ya que sus biomoléculas son necesariamente resistentes a las condiciones agresivas de su entorno, lo que desembocó en intensos trabajos para intentar comprender los mecanismos íntimos de resistencia, pero también para estudiarlos en la perspectiva del desarrollo de aplicaciones industriales entre las que la PCR constituye el más destacado ejemplo (Ramírez, Serrano y Sandoval, 2006).

El hallazgo de los extremófilos ha abierto una nueva panorámica en las ciencias naturales al extenderse los límites en los que es posible la vida. Se ha favorecido el surgimiento de nuevas hipótesis sobre el origen de la vida, dado que las condiciones en las que habitan los extremófilos semejan a las que debieron existir cuando surgieron las primeras células (Oliart, Manresa y Sánchez, 2016). Asimismo, ha estimulado la búsqueda de las condiciones más extremas que pueden llegar a ser compatibles con alguna forma de vida, haciendo más plausible su búsqueda fuera del planeta Tierra (Rothschild y Mancinnelli, 2001).Además,la presencia de microorganismos en ambientes extremos hace especular que la vida podría existir en algunos de los ambientes extremos encontrados en el espacio extraterrestre (Rossi, Ciaramella, Cannio, Pisanni, Moracci y Bartolucci, 2003).

Hace algunos años atrás no se podía conocer con certeza la diversidad microbiana debido a la falta de medios, no se tenían las condiciones adecuadas para el cultivo, por el desconocimiento de los factores de crecimiento, porque se encontraban en estado fisiológico no cultivable, entre otros. Al no ser cultivables aproximadamente el 99% de los microorganismos presentes en ambientes naturales, se desarrollaron

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

técnicas independientes de cultivo que son eficaces para su identificación (Asociación Vida Sana, 2005).

Por otra parte, los extremófilos son una fuente potente de enzimas, que demuestran alta estabilidad bajo condiciones extremas. La mayoría de las enzimas usadas hasta la fecha se originan de organismos mesófilos y a pesar de sus muchas ventajas, el uso de estas enzimas está restringido debido a su estabilidad limitada en los extremos de la temperatura, del pH y de la fuerza iónica (Ramírez, Serrano,y Sandoval, 2006).

No obstante, se han podido obtener y caracterizar extremoenzimas provenientes de diferentes grupos de microorganismos extremófilos, muchas de ellas se aplican actualmente en procesos industriales sustentables, como la síntesis enantioselectiva de fármacos (Oliart y cols., 2016). Un ejemplo lo constituye la ADN polimerasa (ADN pol), que fue obtenida de la bacteria *Thermusaquaticus* aislada desde los géiseres del Parque Nacional Yellowstone (PNY) en los Estados Unidos. Después de ese hallazgo, se han descrito más enzimas que realizan su función a más de 100 ºC (amilasas, galactosidasas, ADN polimerasa y pululanasas) (Zavala, 2005).

www.bdigital.ula.ve

En las últimas décadas, los estudios basados en los microorganismos extremófilos ponen de manifiesto que la diversidad taxonómica presente en los ambientes extremos no es tan reducida como se pensó en un principio (Benlloch, López y Rodríguez, 2002).

Se ha estimado que menos del 1 % de los microorganismos que habitan el planeta han sido cultivados y estudiados en el laboratorio. En general, las condiciones de los medios de cultivo imponen presiones de selección sobre los microorganismos, impidiendo el crecimiento de una gran cantidad de ellos, por lo que pudiera haber alrededor de 50 millones de especies por descubrir (Singh, 2010).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Bases Teóricas

Generalidades del suelo

El suelo es la capa superficial de la corteza terrestre en la que viven numerosos organismos y crece la vegetación. Es una estructura de vital importancia para el desarrollo de la vida. El suelo sirve de soporte a las plantas y le proporciona los elementos nutritivos necesarios para subdesarrollo. Suele ser un material suelto y poroso compuesto por partículas de origen mineral, materia orgánica, agua y gases que ocupan los espacios libres, que permite el sostenimiento de una presencia vegetal y animal (García, 2006).

El suelo es considerado un espacio heterogéneo definido por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que bajo condiciones naturales tiende a desarrollar un equilibrio dinámico entre sus diferentes atributos, lo que genera las condiciones adecuadas para una diversidad de organismos transformadores y descomponedores de sustratos (Reyes y Valery, 2007).

www.bdigital.ula.ve

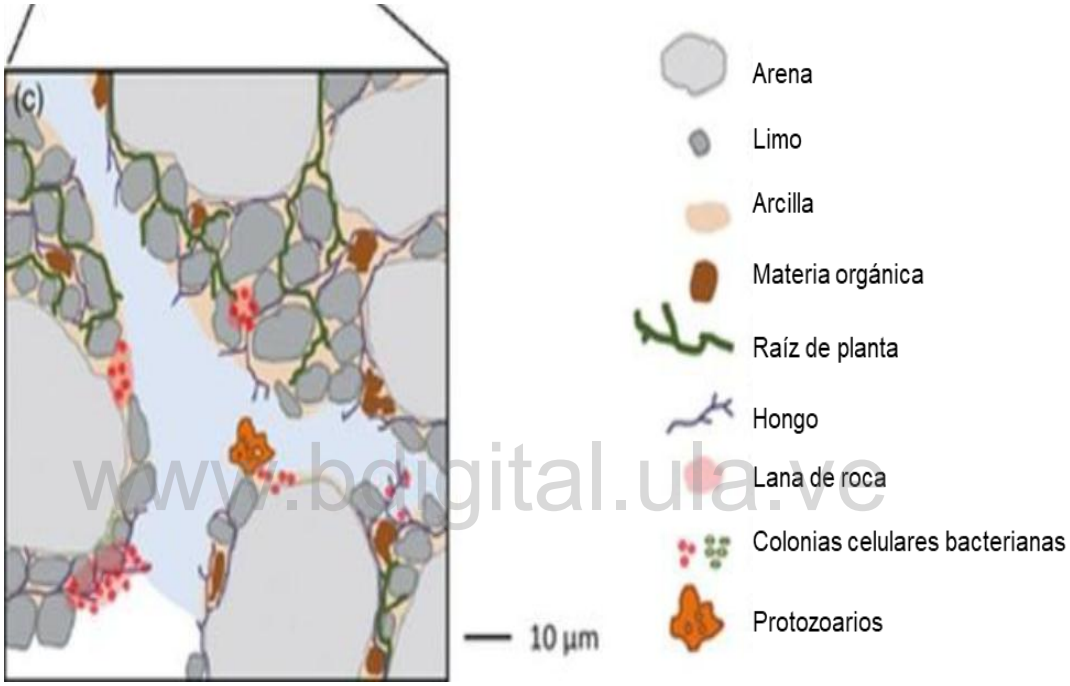
El suelo es un hábitat que alberga, durante toda o parte de su vida, una gran gama de organismos dentro de los tres Dominios Taxonómicos (Núñez, 2015). En general, se considera que la microbiota del suelo, conformada principalmente por bacterias y hongos, juega un papel importante en la fertilidad, reciclaje de nutrientes, evolución, estructura y conservación del mismo (Singh, 2010).

Para entender qué fuerzas son responsables de conducir la diversidad microbiana, es vital ver el hábitat del suelo desde el punto de vista del lugar que ocupan los microorganismos individualmente. El suelo es un entorno altamente complejo de partículas agregadas que crean una red tridimensional intrincada de poros, con agua y aire. La formación de agregados es un elemento clave de la estructura del suelo, donde las partículas de arcilla y humus forman microagregados cuando su carga negativa es absorbida por cationes, pero los agregados más grandes se forman más

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

por acción de polímeros orgánicos con capacidad adherente generados por hifas, raíces, mucopolisacáridos y lipopolisacáridos de origen varios (intestinos animales, glándulas salivares, secreciones fúngicas (Figura 1) (Núñez; 2015).

Figura 1. Micro-escala del hábitat microbiano del suelo



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Tomada y modificada de Núñez (2015)

Clasificación de la biodiversidad del suelo por su tamaño

- Macroorganismos (> 2 mm de ancho).
- Mesoorganismos (0,2 a 2 mm de ancho).
- Microorganismos (< 0,2 mm de ancho) (Núñez, 2015).

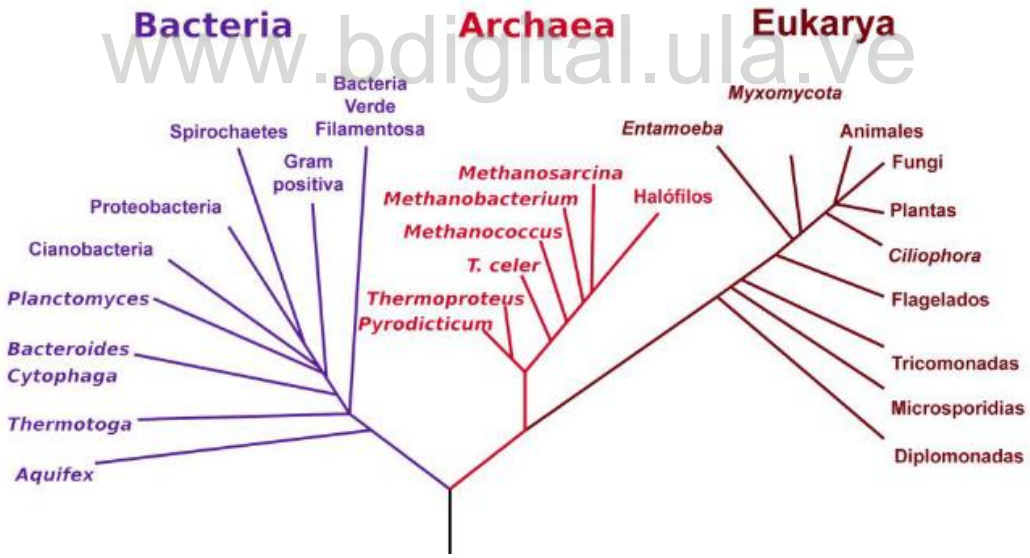
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Microorganismos

Son considerados como células de vida libre incluyendo a procariotas y eucariotas unicelulares, abarcando al conjunto de arqueas, bacterias y hongos (Figura 2). Los cuales presentan un tamaño o diámetro < de 10 µm (Núñez, 2015). 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 fosforo. Todos estos microorganismos juegan un papel muy importante en los procesos de biorremediación (Escobar, 2014).

Figura 2. Árbol evolutivo de microorganismos (bacteria, arquea y eucaria)

www.bdigital.ula.ve



Fuente: Tomada y modificada de Núñez (2015)

Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares. Son ubicuas, en todos los ámbitos terrestres. En el suelo, su menor tamaño se compensa con su número, pero no con su

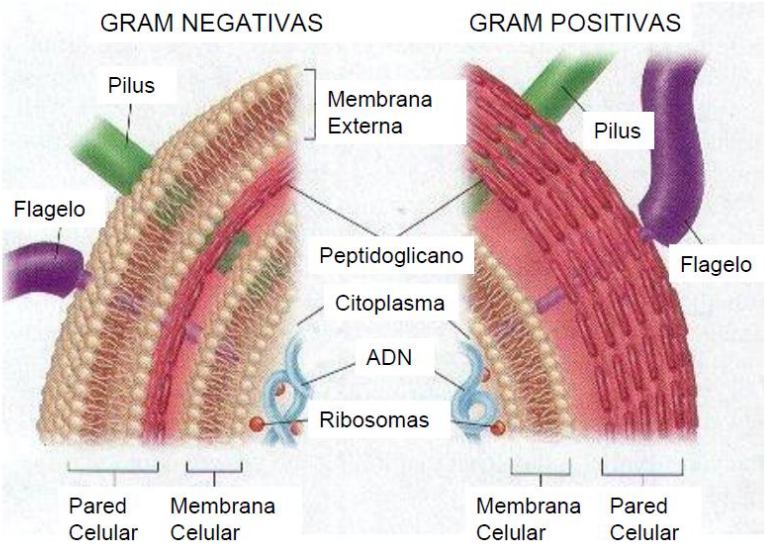
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

biomasa. Su número, concentrado en los primeros cm del suelo, alcanza el mayor de todos los componentes vivos y junto con los hongos constituyen una biomasa muy importante. Pueden ser autótrofas o heterótrofas y aeróbicas o anaeróbicas. Son únicamente unicelulares y procariotas (sin núcleo). Poseen una pared celular, membrana plasmática que contiene mesosomas y un citoplasma donde están los ribosomas y una estructura que contiene una gran molécula circular de DNA. Solo tienen un cromosoma. Muchas bacterias disponen de flagelos u otros sistemas de desplazamiento para poder moverse. La clasificación se basa generalmente en caracteres fenotípicos como la morfología celular (bastones, bacilos, cocos) la presencia de endosporas, la movilidad de la célula, la estructura de la pared celular (Gram positivas; Gram negativas) y el metabolismo (bacterias autótrofas y heterótrofas) (Núñez, 2015).

En el reino eubacteria se distinguen dos tipos de pared celular, con los que permite dividir a los organismos en Bacterias Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo a la tinción Gram (Figura 3) (Bautista, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Figura 3. Diferencias entre Gram positiva y Gram negativa



Fuente: Tomada y modificada de Bautista, (2008).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

En bacterias Gram-positivas, la pared está compuesta por una estructura de peptidoglicanos, haciendo un material rígido, poroso y amorfo, hecho de cadenas lineales del disacárido N-acetilglucosamina-b-1,4-N- ácido acetilmurámico. Este peptidoglicano está unido covalentemente a ácidos teicoicos y teicurónicos, estos ácidos contribuyen a la propiedad aniónica de la pared. La proporción de éstos dos depende de las condiciones de cultivo, especialmente sobre la fuente de fosfatos, se ha probado la capacidad de atrapar metales de estos ácidos, pero su función fisiológica es el suministro de magnesio a la membrana plasmática. La pared celular de las bacterias Gram-positivas es de 50 a 150 nm de ancho y principalmente consiste de 40 a 90% de peptidoglicano (Bautista, 2008).

La pared celular de las bacterias Gram negativas parecen ser algo más delgadas, usualmente de 30 a 80 nm de espesor, y solamente 10% de material es hecho de peptidoglicano. La membrana más exterior se compone de una capa externa de lipopolisacáridos (LPS), fosfolípidos y proteínas. La superficie altamente negativa de las bacterias Gram-negativas resulta principalmente de la carga negativa neta de LPS (Volesky, 1999).

www.bdigital.ula.ve

Las bacterias heterótrofas, también llamadas organotrofas, son microorganismos que sintetizan sus propias biomoléculas a partir de compuestos orgánicos carbonados complejos, aunque pueden captar elementos inorgánicos diferentes al carbono. Algunas necesitan parasitar a organismos superiores para poder sobrevivir. Éstas se clasifican en fotoheterótrofas y quimioheterótrofas. Ambas utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono, pero se diferencian en que las primeras utilizan la luz como fuente de energía y las segundas utilizan energía química (González y González, 2011).

Las bacterias presentes en el suelo, necesitan nutrientes para producir la energía y la multiplicación celular. Responden a la demanda de un ambiente físico y químico conveniente para vivir. Temperatura, pH, presión parcial de O_2 y presión osmótica son esenciales para la supervivencia de las bacterias. Son generalmente saprofitas, anaerobias o facultativas. Para responder a sus necesidades energéticas y de C la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

mayor parte utilizan sustancias orgánicas fácilmente degradables (azúcares, almidón pectina o celulosa). Como consecuencia son heterótrofas y quimio-organotrofas. Otras son autótrofas, pues utilizan como recurso de C al bicarbonato y al CO_2. Algunas son quimiolitotrofas, obtienen la energía de la oxidación de compuestos minerales como el NH_4, Los nitritos, el Fe o sus sales (Henao, Comba, Alvarado y Santamaría, 2015).

Hongos

Eucariontes, aeróbicos y heterótrofos, los hongos, finalizan el proceso de degradación enzimática de las estructuras orgánicas. Para vivir se nutren captando moléculas simples de las que extraen su energía de enlace (mineralizándolas) para producir calor, ATP y quedando el resto de lo captado disponible para su metabolismo funcional y para el desarrollo de estructuras propias que sirven de alimento a los fungívoros y para el desarrollo de agregados en el suelo. Con células microscópicas que normalmente forman largas hebras, (hifas), los hongos crecen entre las partículas del suelo, raíces y rocas, empujándolas y ordenándolas espacialmente. Las hifas, con unas pocas micras de diámetro, alcanzan una longitud muy variada, desde unas pocas células a muchos metros. Algunos hongos, como las levaduras, son células individuales (Weber, 1982).

www.bdigital.ula.ve

Los hongos son los seres más resilientes en el ámbito de los eucariotas porque:

- Prosperan sobre una gran variedad de compuestos.
- Son capaces de ocupar hábitat, aparentemente inhóspitos, como el interior de los glaciares o las aguas ácidas.
- Algunos son extremófilos:
    1. Son poco sensibles a pH ácido, pero les afectan los territorios alcalinos de las bacterias.
    2. Resistentes a altas concentraciones osmóticas

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

3. Resistentes a umbrales térmicos fríos (inferiores a los de las bacterias) hay hongos típicos de los refrigeradores.

- Otros se asocian para sobrevivir generando los líquenes (con algas) para colonizar rocas y evitar la aglomeración de insectos, o a raíces (micorrizas). Lo que permite la expansión territorial del vegetal o evitando la acción tóxica de algún macronutriente (caso del aluminio) que supera el umbral de toxicidad debido a edafogénesis específicas (Núñez, 2015).

Aspectos estructurales de los hongos

- No todos los hongos son multicelulares, algunas levaduras son unicelulares. Los hongos multicelulares filamentosos se llamaban mohos.
- Las células fúngicas tienen pared celular como las vegetales, pero son heterótrofas como los animales. Las células de la mayoría de los hongos tienen paredes celulares flexibles de quitina, aunque la estructura de los hongos multicelulares, se mantuvo mucho más simple que la de las plantas superiores y animales.
- Los hongos no presentan tejidos u órganos verdaderos. Los organismos se conforman en filamentos llamados hifas (con excepción de las levaduras). La mayoría de las hifas están formados por cadenas de células individuales.
- La estructura filamentosa proporciona una específica y amplia superficie para la absorber nutrientes: las hifas forman una estera entrelazada = micelio de filamentos individuales (= hifas).
- El micelio representa el organismo individual.
- Los hongos son organismos sin forma clara: siempre creciente y cambiante.
- La parte vegetativa de la mayoría de los hongos es el micelio, que se encuentra oculta en el interior de soporte trófico al que están atacando y del que capta nutrientes con sus hifas (Weber, 1982).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Algunas diferencias entre los hongos y bacterias se resumen en la tabla 2 y se puede apreciar en la Figura 4.

Tabla 2.

Diferencia entre hongos y bacterias

Hongos	Bacterias
Eucariotas	Procariotas
Membrana nuclear	Sin membrana nuclear
Múltiples cromosomas	Un solo cromosoma
Mitocondria, organelas	Escasas estructuras internas
Pared de tipo polisacárido (celulosa y quitina)	Paredes de peptidoglicano
Dos tipos de ribosomas: 80S y 70S	Sólo ribosomas 70S
Multicelulares y diferenciados	Generalmente unicelulares
Reproducción sexual/asexual	Sólo reproducción asexual
Células con un diámetro superior a 5 mm	Células con un diámetro inferior a 5 mm
Diversidad estructural	Diversidad metabólica

www.bdigital.ula.ve

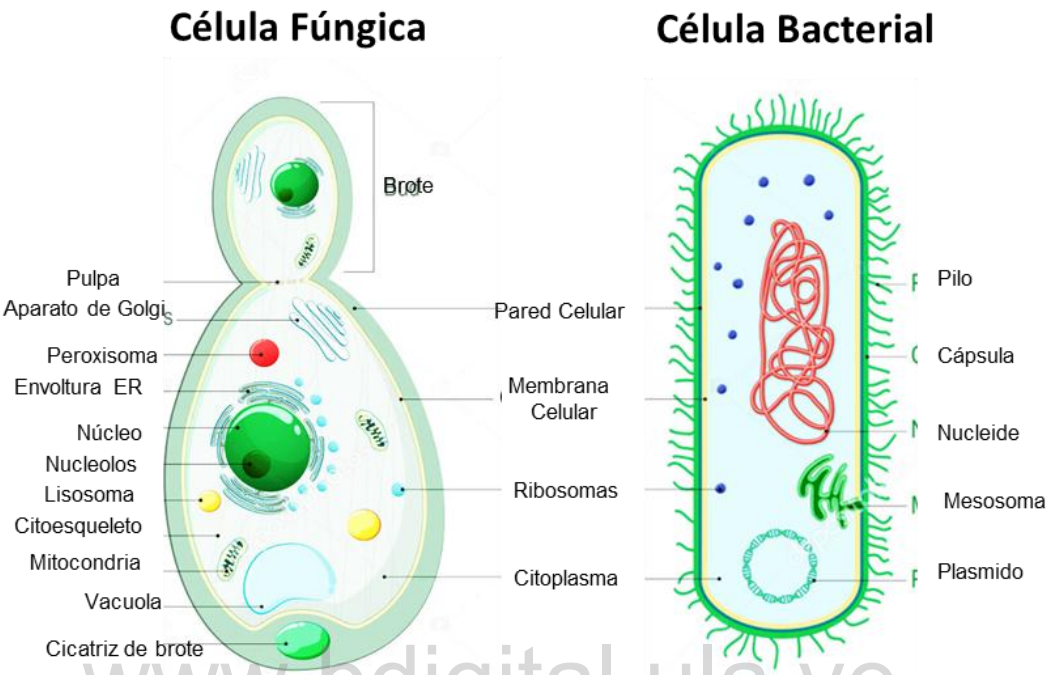
Fuente: Tomada y modificada de Coyne (2000).

Características macroscópicas de hongos filamentosos y levaduriformes

Las características macroscópicas de los hongos, corresponden a las descripciones de los aspectos fenotípicos de las colonias. Los hongos presentan una gran diversidad de colonias que van desde pequeñas producidas por levaduras, hasta grandes y algodonosas producidas por hongos filamentosos. Las características especialmente de hongos filamentosos pueden variar debido a la constitución nutritiva de los medios de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación (Arenas R.2014)

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 4.Diferencia entre hongos y bacterias



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Tomada y modificada de López, Marulanda y López (2013).

De acuerdo a (Arenas,R. 2014), en el análisis macroscópico de levaduras, se debe considerar:

- Color (frente y revés): blanca, rosada, gris, anaranjada, verde, rojiza, negra, etc.
- Textura: yesosa, terrosa, granulosa, vellosa, algodonosa, cérea, aunque predomina el aspecto cremoso y opaco.
- Superficie: elevada o plana, levantamiento central.
- Aspecto: plegado, radiado, cerebriforme, crateriforme.
- Consistencia: suave, firme, membranosa.
- Borde: regular e irregular.
- Pigmentación.
- Rapidez de crecimiento 24 – 72 horas: horas.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

En el análisis macroscópico de hongos filamentosos se debe considerar:

- Medio de cultivo
- Tamaño: 10 – 30 mm de diámetro.
- Coloración (frente y revés): blanca, rosada, gris, verde, café, rojiza, negra.
- Textura: algodonoso, velloso, aterciopelado, polvoso.
- Superficie: elevada con micelio aéreo, plana, levantamiento central.
- Borde: regular e irregular
- Rapidez de crecimiento: lento (15-30 días), moderado (7-10 días),rápido (6 días o menos) (Figura 5).

Figura 5. Características macroscópicas de levaduras

Fuente: Tomada y modificada de López, Marulanda y López (2013).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Características microscópicas de hongos filamentosos y levaduriformes

Las características microscópicas de los hongos hacen referencia a la determinación de las características relacionadas con el tipo y la forma de las células vistas al microscopio óptico. Según Arenas (2014), en el análisis microscópico de levaduras se debe considerar la presencia o ausencia de:

- Pseudohifa: conjunto de células levaduriformes que no se han separado después de la gemación.
- Blastosporas: espora formada por la gemación
- Clamidosporas: espora de pared gruesa que sobrevive en condiciones desfavorables.

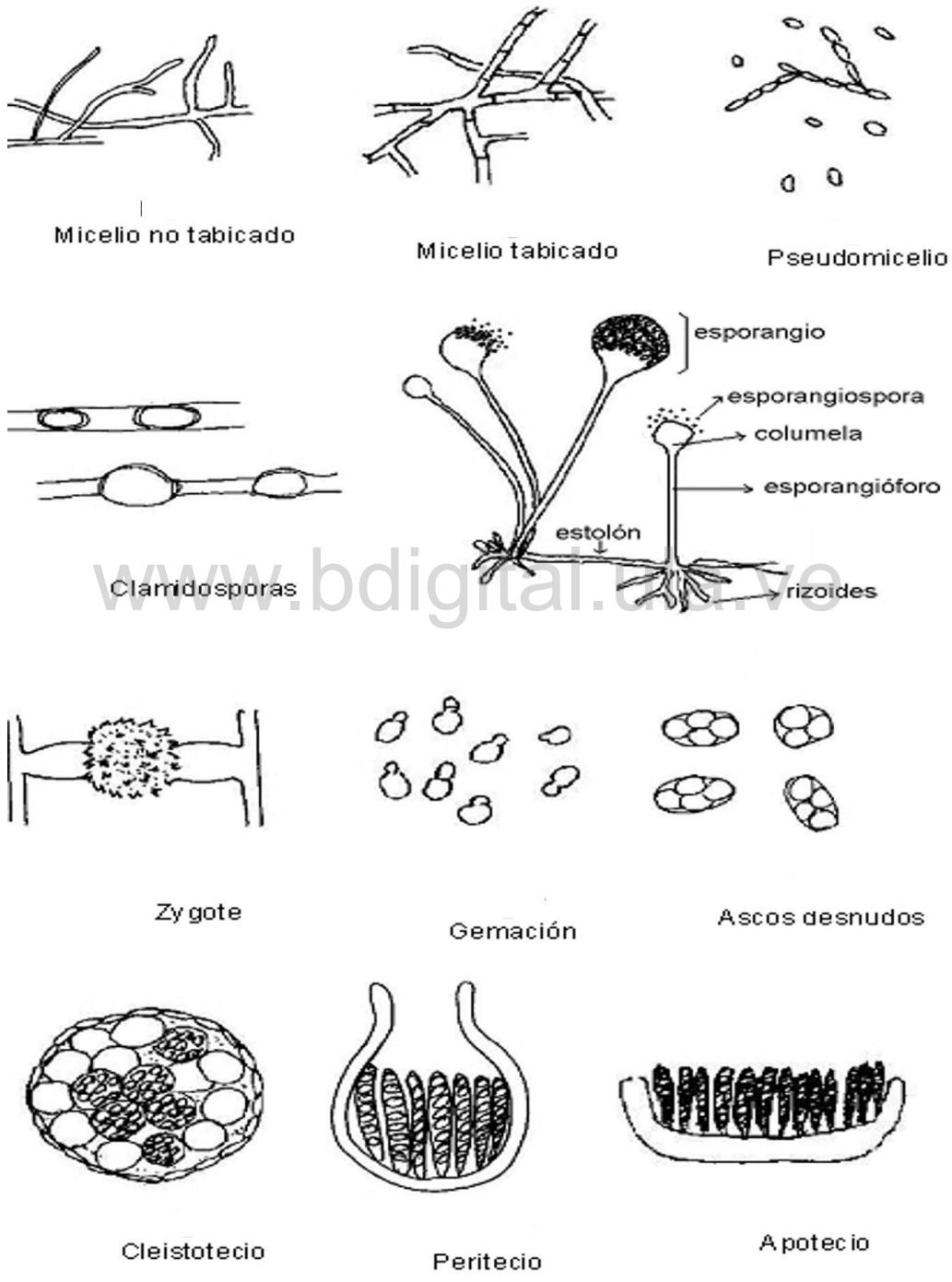
Según Arenas (2014), en el análisis microscópico de hongos filamentosos se debe considerar la presencia o ausencia de:

www.bdigital.ula.ve

- Micelio macrosifonado hialino y cenocítico: micelio con diámetro mayor a 1 µm, carecen de tabiques y pigmento.
- Micelio macrosifonado hialino y tabicado: micelio con diámetro mayor a 1 µm, carecen de pigmento y presenta tabiques.
- Micelio microsifonado: micelio con diámetro menor a 1 µm.
- Modalidad de las hifas: candelabro fávico, cuerpos nodulares, espirales, pectinadas, zarcillos, rizoides, estolón.
- Microconidios: células ovoides o globosas de tamaño pequeño.
- Macroconidios: células globosas, ovoides o en forma de hoja de gran tamaño.
- Clamidoconidios: células globosas u ovoides que se localizan a nivel terminal e intercalar. Producidas en condiciones adversas.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 6. Características microscópicas de las levaduras



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Tomada y modificada de López, Marulanda y López (2013).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tinciones básicas en el laboratorio de microbiología para determinar características microscópicas

Tinción de Gram

Esta tinción es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas. Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en1884. Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo (Araque y cols., 1999).

La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano dela pared bacteriana. En seguida, se coloca una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gramnegativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol y acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano (Araque y cols., 1999).

Por último, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contra tinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo. Las bacterias Gram positivas se observan de color azul obscuro a morado, mientras que las Gramnegativas se observan de color rosa a rojo (López, Hernández, Colin, Ortega, Ceron y Franco, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tinción de azul algodón de lactofenol

La tinción de azul algodón de lactofenol no es considerada una tinción diferencial, sin embargo, posee características tintoriales que permite observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación. El fenol inactiva las enzimas líticas dela célula e impide que ésta se rompa; de igual forma, destruye la flora acompañante e inactiva a la célula, quitándole el grado de patogenicidad; además, actúa como mordiente cuando se usa en combinación con colorantes. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación. Una vez preparado el colorante, se debe colocar la muestra microbiológica en un portaobjetos por medio de una impronta (proceso en elcual se coloca una impresión de la muestra sobre una estructura utilizando una cinta adhesiva transparente) (López y cols., 2014).

www.bdigital.ula.ve

Ambientes Extremos

Son aquellos que presentan valores extremos de determinados parámetros físico-químicos tales como temperatura, pH, presión hidrostática, potencial redox, actividad del agua, salinidad, irradiación solar, concentración de nutrientes o metales tóxicos, condiciones inusuales poco favorables o letales para la mayoría de organismos (Mata, 2006).

Para Rodríguez y Valera (2008), son ambientes en los que existe una escasa diversidad de especies y en los que están ausentes algunos grupos taxonómicos. Sin embargo, "ambiente extremo" es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la supervivencia de otro organismo (Rothschild y Mancinelli, 2001).Estos ambientes presentan,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

además de un alto contenido de iones (factor que le atribuye la característica de ser un ambiente inhóspito para la mayoría de los microorganismos) (Mata, 2006), características ambientales peculiares que incluyen aquellos con temperaturas muy elevadas (55-121°C) o bajas (-2-20°C), alta salinidad (NaCl 2-5M), alta presión barométrica y alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor de 4) (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Estos ambientes reconocidos como extremos se encuentran colonizados por una amplia diversidad de microorganismos como bacterias, cianobacterias, hongos, algas y levaduras que se han adaptado a las condiciones que son altamente predominantes en estos nichos ecológicos (Herbert, 1992).

Microorganismos en Ambientes Extremos

www.bdigital.ula.ve

Los microorganismos extremófilos tienen como hábitat natural ambientes que antiguamente se consideraban demasiado hostiles para permitir la supervivencia de organismos vivos (Arenas 2014). Actualmente, se definen diferentes grupos de organismos extremófilos de acuerdo con las condiciones ambientales en las que se desarrollan. La mayor parte de estos pertenecen a bajos niveles de organización, siendo la gran mayoría de estructura celular procarionte (Castillo, 2005). En la Figura 7, se indican algunas de las diferentes condiciones extremas ambientales y los organismos que viven en ellas.

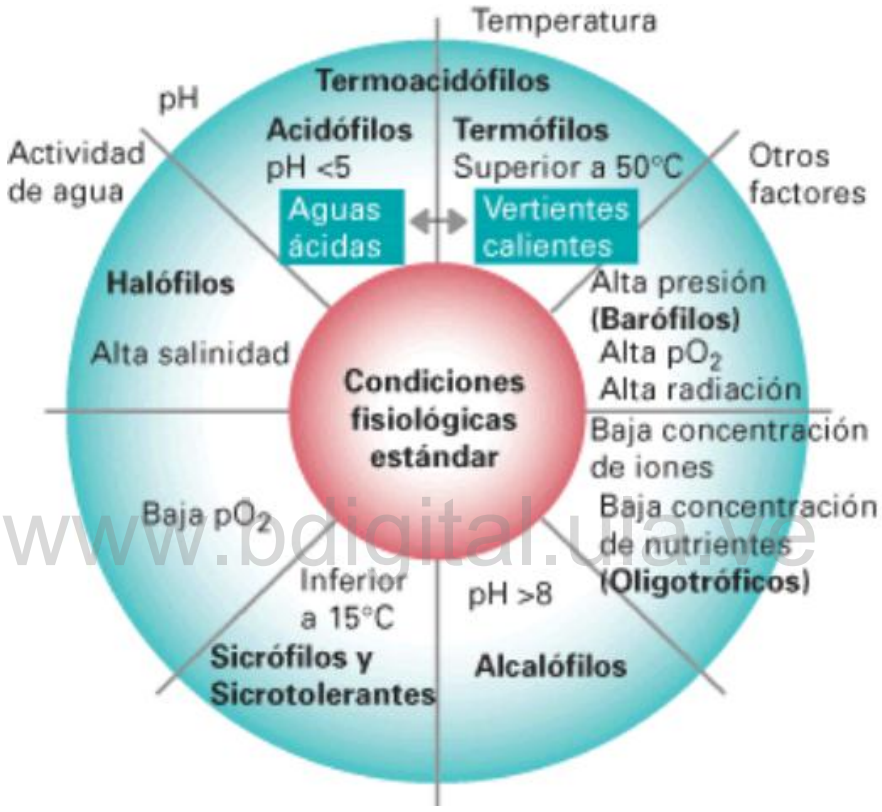
De acuerdo con Comerio y cols., (2007), los extremófilos principalmente pertenecen a las Eubacterias y Arqueobacterias, que son microorganismos unicelulares procariotas, afirmación que concuerda con lo expresado por el autor Urbietay col., (2015). Su hábitat en ambientes extremos se debe a varias características como por ejemplo (Comerio y cols.; Gómez y Steiner, 2004):

- Enzimas estables: conocidas como extroenzimas, las cuales no se desnaturalizan a altas temperaturas o condiciones de pH, su función principal es proteger el ADN.
- Monocapa lipídica que les permite mayor estabilidad.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- Enzimas específicas para metabolizar metales pesados.

Figura 7. Diferentes condiciones ambientales extremas y grupos de organismos adaptados a ellas (extremófilos).



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Tomada y modificada de Comerio y cols. (2007).

Clasificación de los organismos extremófilos

Según Oliart y cols. (2016), en una descripción sintetizada de estos organismos los clasifica en base a la condición física o química extrema del ambiente donde se desarrollan: termófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 45 °C); dentro de éstos se encuentran los hipertermófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 80 °C); psicrófilos (temperatura óptima de crecimiento por abajo de 10 ºC); acidófilos (pH óptimo de crecimiento por abajo de 5); alcalófilos (pH óptimo de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

crecimiento por arriba de 8); halófilos (habitan en medios hipersalinos, de 5 % a 30 % de sal); osmófilos (viven a altas presiones osmóticas); radiófilos (resisten altos niveles de radiación); Metalófilos (toleran altas concentraciones de metales pesados); piezófilos (antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm).

Termófilos

Se consideran termófilos aquellos microorganismos que crecen en temperaturas por encima de 65°C, la temperatura para un crecimiento óptimo se encuentra entre 70 – 80°C y la máxima entre 80 – 113°C. La mayoría de los microorganismos mesófilos crecen más rápidamente entre 25 y 40°C. No se han encontrado animales o plantas multicelulares que vivan por arriba de los 50°C (Madigan y cols., 2003).

El hábitat natural con temperaturas permanentemente altas (por encima de 45 – 50°C) está restringido a unas pocas zonas de la biosfera, normalmente relacionadas con fenómenos volcánicos: fuentes termales volcánicas terrestres, fuentes termales submarinas (fumarolas hidrotermales) asociadas a las grandes dorsales oceánicas y materiales en fermentación como acúmulos de abono (compostas) los cuales pueden alcanzar temperaturas de 65°C. Sus enzimas tienen alta estabilidad térmica debido principalmente a redes de interacciones iónicas y modificaciones de la membrana plasmática (Gómez y Steiner, 2004).Un ejemplo es *Thermusacuaticus*, crece a temperaturas mayores de 70°C y es ampliamente utilizada en la industria para la tecnología PCR (Rothschild y Mancinelli, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Psicrófilos

Según Ramírez y cols. (2006), típicamente los organismos psicrófilos pueden crecer en temperaturas por debajo de los 5°C, aunque su rango de temperaturas de crecimiento puede ir desde los 20°C hasta menos de 0°C. Los principales ambientes habitados por los psicrófilos incluyen regiones polares, montañas altas, glaciares, el fondo de los océanos, sistemas subterráneos bajos (cuevas), la atmósfera superior y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

las superficies de las plantas y de los animales que viven en los ambientes fríos, donde las temperaturas nunca exceden los 5 °C.

Los psicrófilos son capaces de degradar sustancias poliméricas tales como: almidón, celulosa, xilano, pectina, quitina, proteínas y lípidos; produciendo enzimas como: amilasa, celulasa, xilanasa, pectinasa, quitinasa, proteasa y lipasa respectivamente (Rothschild y Mancinelli, 2001). Algunas bacterias aisladas de estos ambientes corresponden según Van Den Burg, (2003) a bacterias Gram-negativas: *Pseudoalteromonas, Moraxella, Psychrobacter,Polaromonas, Psychroflexus, Polaribacter, Moritella, Vibrio* y*Pseudomonas;* y bacterias Gram-positivas: *Arthrobacter, Bacillus*y *Micrococcus.*

Alcalófilos

Se llaman alcalófilos aquellos organismos que viven en ambientes con pH por encima de 9. Los microorganismos alcalófilos se encuentran por lo general en hábitats muy básicos como lagos sódicos y suelos muy carbonatados, como los que se encuentran en Egipto, el Rift Valley de África y oeste de los Estados Unidos, pertenecen al género *Bacillus* y son también halófilos (Gómez y Steiner, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Acidófilos

Se consideran acidófilos aquellos organismos que viven en medios con pH menor de 5.Los ambientes ácidos surgen naturalmente de actividades geoquímicas, como pueden ser la producción de gases sulfurosos de emanaciones volcánicas. Otro lugar donde es posible encontrar acidófiloses en las escorias de las minas, como por ejemplo en “The Iron Mountain Mine” en California del Norte donde crece la arquea *Ferroplasma acidarmanus* en soluciones con pH 0,5 a 1 (Wiegel y Keubrin, 2004).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Xerófilos

La pérdida de pequeñas fracciones de agua intracelular puede ser letal para muchas células, sin embargo, existen ciertos organismos que pueden sobrevivir a una extrema desecación incluso durante largos periodos de tiempo. Los microbios especializados que pertenecen a los hongos, líquenes y algas tienen la capacidad de crecer en tales condiciones extremadamente secas. Estos organismos especializados se llaman los xerófilos (Gómez y Steiner, 2004).

Los organismos capaces de sobrevivir en condiciones de extrema sequedad van desde colonias de bacterias hasta colonias simbióticas de algas con hongos (líquenes). Generalmente las colonias de bacterias sobreviven mejor en las rocas expuestas al sol, pero en el caso de que las rocas hayan sido colonizadas previamente por líquenes, las bacterias no pueden desarrollarse plenamente. Esto puede deberse a diferencias en la humedad o por ácidos orgánicos producidos por los líquenes. Se conocen varios tipos de bacterias xerófilas como *Metallogenium* y *Pedomicrobium*. Su tamaño varía desde 0,4 a 2 micrómetros de largo (Rothschild y Mancinelli, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Piezófilos o Barófilos

Los microorganismos que requieren condiciones de alta presión (superior a 1 atm) para su desarrollo y crecimiento se llaman los piezófilos (conocidos antes como barófilos). Los organismos aislados a profundidades de alrededor de 400 m y utilizados en estudios que relacionan el crecimiento o la actividad metabólica con la presión, demuestran que son barotolerantes, se han obtenido barófílos en profundidades mayores entre 5.000 y 6.000 m; mientras que a profundidades mayores de 10,000 m se han obtenido barófilos extremos (Rossy y cols., 2003).Los piezófilos se distribuyen entre los géneros *Shewanella, Colwellia, Moritella, Methanococcus, Pyrococcus* y *Thermus* (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Halófilos

Se llaman halófilos a aquellos organismos que requieren cierta concentración de NaCl para su desarrollo y crecimiento. Pueden ser clasificados en función de la cantidad de sal que requieren para sobrevivir y reproducirse. La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo (Ventosa y cols., 1998). La mayoría de las bacterias halófilas, Gram positivas y Gram negativas; aerobias o anaerobias facultativas son consideradas como miembros de los géneros: *Halomonas, Delega, Volcaniella, Flavobacterium, Paracoccus, Pseudomonas, Halovibrio* y *Chromobacterium* (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Microorganismos Metalófilos

www.bdigital.ula.ve

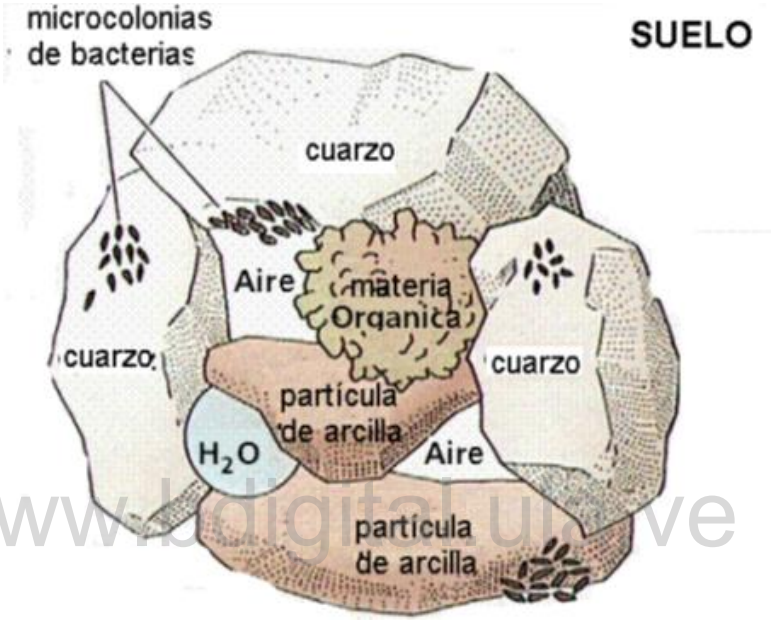
Para Madigan y Marrs (1997), son microorganismos que pueden crecer en la presencia de altas concentraciones de metales. Estos organismos colonizan los sedimentos, los suelos o las basuras industriales con alto contenido de metales pesados (Figura 8). Las bacterias metalófilas muestran un gran número de actividades enzimáticas que transforman ciertos metales por medio de reacciones como oxidación, reducción, metilación y alquilación. Las transformaciones enzimáticas que conducen a la precipitación y a la inmovilización del metal están siendo aplicadas a la biorremediación.

Una característica típica de *Ralstonia* (metal-resistente), es la presencia de grandes plásmidos que contienen genes para la múltiple resistencia a los metales pesados. Estos plásmidos confieren resistencia al Zn, Cd, Co, Pb, Cu, Ni y Cr, etc. La especie *Ralstonia metallidurans*es una bacteria Gram-negativa no esporulada, que se desarrolla en concentraciones milimolares de metales pesados tóxicos. Fue el primer aislado en 1976 del lodo de un tanque de decantación del cinc en Bélgica el cual

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

había sido contaminado con metales pesados en elevadas concentraciones (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt y Leys, 2003).

Figura 8: Presencia y disposición de microorganismos en suelos con alto contenido de metales



www.bdigital.ulpgc.es

Fuente: Tomada y modificada de Bautista (2008).

Muchos microorganismos, incluyendo *Ralstonia*, se podrían utilizar en la bioremediación de metales pesados. Estas bacterias también pueden ser utilizadas para inmovilizar ciertos metales pesados eficientemente. Esto sería posible debido a su capacidad para reducir dichos elementos a un estado redox más bajo, produciendo metales con baja bioactividad (Ramírez y cols., 2006).El aislamiento de bacterias extremófilas se realiza a partir de muestras de suelo y agua para su procesamiento e incubación en las condiciones ambientales adecuadas, sin embargo, hay que tomar en cuenta que no todos los microorganismos ambientales son cultivables (Contreras, 2015), se aproxima que del 0,001-0,1 por ciento de bacterias en el agua marina, 0,25 en agua fresca, 0,3 por ciento en el suelo y 0,25 por ciento en sedimentos lo son. Lo que se debe principalmente a que algunos microorganismos son parásitos de otros, al

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

desconocimiento de requerimientos nutritivos específicos, algunos casos de sintrofia, que es la dependencia de alimentación de dos especies, es decir, que mutuamente dos organismos se ayudan para metabolizar sustancias que de forma individual no podrían hacerlo por si solos (Madigan y cols., 2003).

Desde el punto de vista ambiental, los hongos extremófilos son importantes debido a su capacidad para producir diferentes extremoenzimas, caracterizadas por su termotolerancia, resistencia a cambios de pH, a altas concentraciones de sales y metales pesados, etc. Las propiedades anteriores los convierten en candidatos ideales para el procesamiento y la bioconversión de materias primas como las presentes en las industrias alimentarias, textiles y en procesos como la biorremediación. Diversas especies de hongos han sido caracterizadas como resistentes a ese tipo de condiciones extremas, entre las que se encuentran *Pestalotiopsispalmarum*, *Lecanicillium muscarium*, *Phanerocheatechrysosporium* y *Aspergillus niger*, capaces de producir extremoenzimas para descomponer hidrocarburos policíclicos aromáticos como sustratos, por lo que podrían ser utilizadas eficazmente como agentes biodegradativos (Pérez, 2019).

www.bdigital.ula.ve

Metales Pesados

Un metal pesado se define como un elemento que tiene propiedades metálicas como ductibilidad, conductividad, densidad, estabilidad como catión y especificidad a ligando (Garbisuyy Alkorta, 2003). Bajo la denominación de metales pesados se incluye a un conjunto de 65 elementos de la tabla periódica con un número atómico mayor a 20 y con una alta densidad relativa, mayor o igual a 5 g/cm^3 en su forma elemental. Estos presentan diferentes características fisicoquímicas y biológicas, se encuentran formando complejos como iones libres o participando en reacciones redox que resultan potencialmente tóxicas para los organismos (Beltrán y Gómez, 2016).

Dentro del grupo de los metales más tóxicos se encuentran el mercurio (Hg), cobalto (Co), cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), zinc (Zn), plomo (Pb) y níquel

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

(Ni) (Tabla 3) (Hassen, Saidi, Cherif y Boudabous, 1998).Los metales pesados son imprescindibles para el desarrollo de microorganismos, plantas y animales pues ejercen roles importantes en algunas reacciones bioquímicas y son esenciales para su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, cuando se presentan en altas concentraciones pueden formar compuestos inespecíficos creando efectos citotóxicos y letales (Nessner y Esposito, 2010).

Tabla 3.

Niveles Base Típicos de Metales en Suelos

Metal	µM
Oro (Au)	ND
Aluminio (Al)	$2{,}63x10^7$
Arsénico (As)	660
Bario (Ba)	31,623
Cadmio (Cd)	5,37
Cobalto (Co)	1,349
Cromo (Cr)	19,054
Cesio (Cs)	447
Cobre (Cu)	4.667
Mercurio (Hg)	1,48
Manganeso (Mn)	$1{,}10x10^5$
Níquel (Ni)	6.761
Plomo (Pb)	478
Estaño (Sn)	851
Zinc (Zn)	7.585

www.bdigital.ula.ve

Fuente: Tomada y modificada de Field, (2004)

Formas de Retención y Disponibilidad de los Metales en el Suelo

Los metales pesados pueden presentarse en el suelo bajo diferentes niveles (Tabla 3) y formas según Sánchez (2009) como:

1. Solubles en la solución del suelo.
2. Como iones intercambiables de los coloides que integran el complejo de cambio.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

3. Formando complejos con la materia orgánica.

4. Adsorbidos en los óxidos e hidróxidos de Fe, Mn y Al, sulfuros y fosfatos.

5. Como constituyentes de los minerales secundarios del suelo.

Los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías (Navarro, Aguilar y López, 2007):

1. Quedar retenidos en la solución del suelo o bien, fijados o disueltos por adsorción, complejación y/o precipitación.

2. Ser absorbidos por las plantas e incorporarse a las cadenas tróficas.

3. Pasar a la atmósfera por volatilización.

4. Movilizarse a las aguas superficiales o subterráneas.

Puesto que la contaminación por metales pesados plantea una amenaza a la salud pública, a la industria pesquera y a la fauna, existe un interés creciente en desarrollar sistemas que puedan remover o neutralizan los efectos tóxicos de metales pesados en suelos, sedimentos y aguas residuales (Rothschild y Mancinelli, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Fuentes de Contaminación por Metales Pesados

Se pueden distinguir diferentes fuentes de contaminación de los suelos por metales pesados dependiendo de su origen. En ocasiones, la propia naturaleza del material originario y su alteración son los responsables de la contaminación; en este caso, se denomina contaminación endógena. Otras veces los aportes contaminantes son externos, frecuentemente como resultado de actividades antropogénicas, denominándose contaminación exógena (Escobar, 2014)

La contaminación por metales pesados provenientes de drenaje de minas suele persistir y ser transferidos al ecosistema, incluso hasta 100 años después del cierre de la mina (Tabora, 2017).Por su lado, Johnson y Thornton (1987), en su estudio sobre los factores hidrológicos y químicos que controlan las concentraciones de metales pesados en un río contaminado por drenaje ácido de minas encontraron que las

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

concentraciones de Cu y Zn son directamente proporcionales al caudal (Johnson y Thornton, 1987).

La toxicidad de los metales concuerda con el estudio realizado por Cabrera, Pérez, Gómez, Abalos y Canteros (2006), en el cual se utilizó $CuSO_4$ y $ZnSO_4$ para determinar la toxicidad de metales pesados en dos diferentes bacterias (*Desulfovibriovulgaris* y *Desulfovibriosp*. Este estudio muestra una relación inversa entre la población de bacterias y el incremento de la concentración de metales. Por lo tanto, todos los metales pesados, en diferentes concentraciones, tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias (Hasseny cols., 1998).

La acción tóxica de los metales pesados sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos sulfhídrilos(-SH) y otros grupos funcionales de las proteínas y enzimas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos, desplazando otros iones metálicos o modificando la conformación activa de moléculas biológicas, como lo descubrieron Garbisu y Alkorta, (2003); Rajendran Muthukrishnan, y Gunasekaran,(2003). Una vez los metales son emitidos se absorben muy fácilmente a través de las membranas biológicas, por su elevada afinidad química a las proteínas aumentando su bioacumulación, dificultando su degradación y eliminación (Soto, Gutiérrez, Rey y González, 2010). Existen estrategias biológicas en donde microorganismos y plantas pueden inmovilizar o transformar el metal *in situ*, lo cual puede reducir su biodisponibilidad (Rajendran y cols., 2003).

www.bdigital.ula.ve

Mecanismos bioquímicos desarrollados por los microorganismos para el tratamiento de metales pesados

Los microorganismos juegan un rol vital y fundamental en la transformación de elementos traza incluidos los metales, ya que influencian su biodisponibilidad y remediación; ellos pueden alterar la toxicidad, solubilidad en agua y la movilidad del elemento (Bolan, Kunhikrishnan, Thangarajan y Kumpiene, 2014). Asimismo,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

modifican la concentración de metales pesados en el ambiente, pues estos cuentan con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para remover metales en solución (Beltrán y Gómez, 2016).Tomando los aportes de los citados autores, a continuación, se describen diferentes mecanismos bioquímicos desarrollados por los microorganismos para transformar o acumular diversos iones metálicos.

Unión a metales, bioacumulación y bioabsorción

Los metales se unen a la superficie celular a través de mecanismos que incluyen interacciones electrostáticas, fuerzas de Van de Waals, unión covalente, interacciones redox, precipitación extracelular o la combinación de esos procesos; los grupos cargados negativamente (carboxil, hidroxil y fosforil) de la pared celular bacteriana adsorben los iones metálicos y estos son retenidos. Cuando los metales se unen a la superficie celular pueden bioacumularse. La bioacumulación es un proceso celular que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza el metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía, este consumo energético se realiza a través de la H+-ATPasa; una vez incorporado el metal pesado al citoplasma este es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhídrilos llamadas metalotioneinas(MT), fitoquelatinas (FQ) y algunos nuevos péptidos de unión a metales, si se trata de hongos este es compartementalizado dentro de las vacuolas. Las MT son proteínas de bajo peso molecular (6-7 KDa) ricas en cisteína, que se dividen en tres clases de acuerdo al contenido de cisteína y a su estructura. Estas proteínas han sido aisladas de especies bacterianas tales como la *Escherichiacoli* y *Pseudomonasputida* y los géneros *Cyanobacterium sp y Syneococcussp.*(Beltrán y Gómez, 2016).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Transformación de la valencia del metal

Dependiendo del estado de oxidación del metal un microorganismo puede realizar dos posibles transformaciones, una corresponde a la movilización del metal, es decir la transformación del estado insoluble inicial que corresponde a una fase sólida a un estado soluble final que se presenta en fase acuosa, este proceso se conoce como lixiviación; la otra transformación es la inmovilización del metal que es un proceso en donde la fase soluble inicial en fase acuosa pasa a un estado insoluble final en fase sólida (Soto y col., 2010).

De manera tal, que la solubilidad y movilidad de los metales depende de su estado de oxidación y de su forma iónica (Beltrán y Gómez, 2016). A su vez, los metales de diferentes valencias varían en su toxicidad; cuando se excretan enzimas redox especiales, los microorganismos pueden transformar el metal a formas menos tóxicas. Las reacciones redox se agrupan en dos categorías, las asimilatorias y las desasimilatorias; en las reacciones asimilatorias el metal está involucrado en las reacciones metabólicas del organismo actuando como aceptor final de los electrones; mientras que en las reacciones desasimilatorias no se conoce el rol del metal en el metabolismo del organismo e indirectamente inicia las reacciones redox (Bolan y cols., 2014).

www.bdigital.ula.ve

Mecanismo de precipitación química extracelular

Los microorganismos secretan productos metabólicos de tipo inorgánico como iones sulfatos, carbonatos o fosfatos que pueden precipitar iones metálicos tóxicos como una forma de detoxificación no enzimática. En la naturaleza los microorganismos inmovilizan metales a través de la precipitación extracelular (Rajendran y cols., 2003). En ese orden de ideas, un buen número de sustancias ligadoras de metales son excretadas por los microorganismos, éstas varían desde ácidos orgánicos simples, alcoholes, grandes polisacáridos o ácidos húmicos y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

fúlvicos. Recientes estudios han encontrado que los grupos carboxil del peptidoglicano son el principal lugar de unión de cationes en la pared celular de bacterias Gram positivas, mientras que en bacterias gramnegativos es el grupo fosfato y en los hongos, sería la quitina, sin importar que la precipitación sea en la superficie externa de la pared celular o lejos de ella, siendo un mecanismo exitoso para mantener los iones tóxicos fuera del citoplasma (Wu, Kang, Zhang, Shao, Chu, y Chengjiang, 2010).

De igual forma, multiplicidad de microorganismos producen y excretan sideróforos que son moléculas acomplejantes de hierro, muchas de las cuales tienen alta afinidad por los metales pesados, en *Pseudomonasaeruginosa* y *Alcaligeneseutrophus*la síntesis de sideróforos está inducida por metales pesados en presencia de altas concentraciones de hierro (Beltrán y Gómez, 2016).

www.bdigital.ula.ve

Resistencia bacteriana a metales pesados

Los metales pesados pueden modificar la flora bacteriana de los suelos y alterar las funciones de algunos organismos vivos, incluso estos seres vivos pueden generar resistencia a los metales pesados e incrementar la bioacumulación de ellos (Moraga, Merino y Mondaca, 2003).

Existen dos causas de la resistencia de metales en bacterias, la primera es cuando las bacterias han sido expuestas a estos contaminantes por períodos prolongados de tiempo y generan un grado de tolerancia hacia ellos mediante una transformación fisiológica. La segunda es cuando las bacterias evolucionan genéticamente para obtener esta resistencia por selección natural de genes resistentes (Klerks y Weis, 1987).

En el trabajo realizado por Tábora (2017), donde estudió el efecto del cobre y zinc en la comunidad microbiana, identificó las siguientes bacterias resistentes a Cu y Zn:

- *Sphingomonas*, gramnegativa, estrictamente aerobia, monoflagelados con pigmentación amarilla, relacionada con plantas y no se ve afectada por $ZnCl_2$.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- *Luteibacter*, gramnegativa, aerobia, monoflagelado con pigmentación amarilla, pertenece a la familia *Xanthomondaceae*y está relacionada con suelo o rizósfera.
- *Sphingobacterium*, Gram negativa, aerobia, pigmentación amarilla, usualmente encontrada en suelo, agua estancada o vegetación.

Las *Sphingomonas,* son un género de bacterias Gram negativo que no se ven afectadas por algunas sales, entre ellas el $ZnCl_2$, debido a que presenta un gen de resistencia hacia el zinc. Los géneros *Sphingobacterium* y *Luteibacter* presentan una resistencia al cobre a 50 mg/L. Al agregar zinc a 50 mg/L solamente *Sphingobacterium* continúa con crecimiento normal (Tabora, 2017).

En ese mismo orden de ideas, un estudio sobre la resistencia a metales pesados en bacterias de la bahía de Iquique mostró 11 cepas con cierta resistencia hacia el cobre, mayormente *Pseudomon* (Moraga y cols., 2003). A su vez, numerosos estudios han examinado las interacciones de la pared celular Gram positiva con los iones metálicos (particularmente los del género *Bacillus*). Los sitios de suelos responsables para la unión de metales en estos organismos son probablemente los sitios carboxilos dentro del peptidoglicano, así como los grupos fosforilos de polímeros secundarios como los ácidos teicoicos y teicurónicos (Bautista, 2008).

www.bdigital.ula.ve

En las bacterias Gram-negativas la capa de lipopolisacáridos (LPS) puede estar implicada como la mayor fuente de unión a metales, los iones metálicos exógenos se unen primariamente a las cabezas de los grupos polares de fosfolípidos y LPS en la membrana externa, los grupos fosforilos parecen ser los sitios de unión más probables (Kotrba, Doleckova, De Lorenzo y Ruml, 1999).

En realidad las interacciones específicas serán diferentes de acuerdo al ión metálico en cuestión (Bautista, 2008) de acuerdo con ello, el citado autor sostiene que en la cadena de polisacáridos lateral que contiene Oxígeno en la captura de cuatro iones metálicos: Oro, Cobre, Hierro y Lantanio, existe una precipitación intracelular de oro el cual no parece ser un evento mediado por la superficie, en la captura de cobre al parecer sucede en los grupos fosforilos en la región A del lípido central del

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

LPS, mientras que en el caso del hierro y lantano hay una precipitación producto de una combinación de un efecto de los dos tipos de LPS producidos.

Muchos son los grupos funcionales con potencial de unión a metales. Muchos de ellos intercambian protones por cationes divalentes, es el caso de los grupos ácidos, en el caso de los grupos básicos no es necesario un intercambio de cationes, la unión es producto de la coordinación con los pares de electrones desapareados, dicho grupo funcional actúa como base de Lewis (Bautista, 2008). En atención a lo expuesto, se puede considerar la pared microbiana como un material aniónico inanimado. Por consiguiente y de acuerdo a las consideraciones del autor, la capacidad de captura metálica de la pared celular microbiana no está controlada solamente por el número, el tipo y el acceso a los grupos funcionales, sino también por el diámetro de la malla de la estructura de la pared celular y el grado de vacío en el esqueleto de la pared celular de los microorganismos presentes en el suelo (Le Cloirec y Andrés, 2005).

www.bdigital.ula.ve

Mecanismos de acción de los hongos

El mecanismo de acción de los hongos sobre contaminantes, de diversas índoles como metales pesados, fenoles, pesticidas, compuestos orgánicos emergentes es un proceso complejo. Las estructuras químicas de estos compuestos son muy diversas, esto significa que los mecanismos imperantes en la acción de los hongos dependen del tamaño molecular, carga, solubilidad, hidrofobicidad y reactividad del contaminante, así como de la composición del agua residual. La bioadsorción y biodegradación se reportan como los procesos fundamentales en la interacción de los hongos con los contaminantes presentes en el suelo (Pérez, 2019).

En la primera etapa de estos procesos interviene la pared celular la cual interacciona con el medio exterior, definiendo la interfase entre el microorganismo y su entorno. La pared celular constituye más del 30% del peso del hongo. Su composición varía marcadamente entre varias especies fúngicas. Estudios realizados demuestran que la pared celular del micelio fúngico contiene principalmente quitina;

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

polímero de *n*-acetilglucosamina entre un 25–30% de peso seco celular, además contiene 29% glucano, 31% manosa, 13% proteína, 8,5% lípidos. Estos polímeros contienen varios grupos metálicos unidos a aminas, imidazol, fosfatos, sulfatos, sulfihídrilos e hidroxilos (Gadd, 2009). Grupos aminos, amida e hidroxilos se han encontrado en la superficie celular. Es por esta razón que los hongos presentan la propiedad única de enlazar tanto cationes como aniones a su pared celular.

Metales Pesados de Interés

Cobre

Entre las propiedades más importantes de este metal según Gómez y Sánchez (2008), resaltan que es un metal con punto de fusión de 1083 ºC y un punto de ebullición de 2300 ºC. Es el elemento químico de símbolo Cu, número atómico 29 y peso atómico 63,54 g/mol. Su bajo potencial de oxidación indica que no es demasiado activo, el cobre origina compuestos en los estados de oxidación +1 y +2. El cobre metálico es maleable, dúctil y gran conductor del calor y de la electricidad, por ello es ampliamente usado en cables desviadores y conmutadores. En la naturaleza se pueden encontrar no menos de 165 compuestos que contienen cobre. Sin embargo, casi todos ellos se pueden clasificar en dos grupos:

www.bdigital.ula.ve

- Minerales oxidados
- Minerales sulfurados.

El cobre se encuentra en cantidades relativamente grandes; por lo tanto, nunca llega a ser demasiado escaso. Su extracción y procesamiento permitieron su utilización desde épocas prehistóricas. El cobre forma parte del magma o masa candente que constituye el interior del planeta. Sometido a presiones y temperaturas altísimas, este magma suele aflorar a la superficie a través de grietas y fisuras de la corteza terrestre, dando origen a los yacimientos. En ocasiones, el cobre puede aflorar por estas hendiduras y al solidificarse, crea filones o vetas siempre muy estrechas (a veces de sólo centímetros), pero de gran pureza metálica (Beltrán y Gómez, 2009).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Zinc

El Zinc es el elemento químico de símbolo Zn, número atómico 30 y peso atómico 65,37g/mol. Es un metal maleable, dúctil y de color gris. El zinc puro y recientemente pulido es de color blanco azuloso, lustroso y moderadamente duro (2,5 en la escala de Mohs). El aire húmedo provoca su empañamiento superficial, haciendo que tenga color gris. El zinc puro es dúctil y maleable pudiéndose enrollar y tensar, pero cantidades pequeñas de otros metales como contaminantes pueden volverlo quebradizo. Se funde a 420ºC y hierve a 907 ºC. Su densidad es 7,13 veces mayor que la del agua, ya que un pie cúbico (0,028m^3) pesa 445 Ib (200 Kg). El zinc es buen conductor del calor y la electricidad. Como conductor del calor, tiene una cuarta parte de la eficiencia de la plata. A 0,91ºK es un superconductor eléctrico. El zinc puro no es ferromagnético (Gómez y Sánchez, 2008).

Es un metal químicamente activo. Puede encenderse con alguna dificultad produciendo una flama azul verdosa en el aire y liberando óxido de zinc en forma de humo. El zinc metálico en soluciones ácidas reacciona liberando hidrógeno para formar iones zinc, Zn^{2+}. Se disuelve también en soluciones fuertemente alcalinas para formar iones dinegativos de tetrahidroxozincatos, $Zn(OH)_4$, escrito algunas veces como ZnO_2.en las fórmulas de los zincatos. Los usos más importantes del zinc los constituyen las aleaciones y el recubrimiento protector de otros metales. El zinc es uno de los elementos menos comunes; se estima que forma parte de la corteza terrestre en un 0,0005-0,02%. Ocupa el lugar 25 en orden de abundancia entre los elementos. Su principal mineral es la blenda, marmatita o esfalerita de zinc, ZnS (Gómez y Sánchez, 2008).

De manera tal que el Zinc es un elemento esencial para el desarrollo de muchas clases de organismos vegetales y animales. La deficiencia de zinc en la dieta humana deteriora el crecimiento y la madurez y produce también anemia. La insulina es una proteína que contiene zinc. El zinc está presente en la mayor parte de los alimentos, especialmente en los que son ricos en proteínas. En promedio, el cuerpo humano contiene cerca de dos gramos de zinc (Beltrán y Gómez, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El límite permitido de concentración de Cu es de 0,02 mg/L para ecosistemas de agua dulce. En cambio, el valor máximo permitido para Zn en ecosistemas de agua dulce es de 1 mg/L. Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA), la toxicidad de los metales pesados depende de la dureza expresada como carbonatos de calcio ($CaCO_3$). Para concentraciones de dureza de 50, 100 y 200 mg/L, la concentración de zinc no debe exceder los 180, 320 y 570 μg/L respectivamente (Tabora, 2017).

En cambio, para concentraciones de dureza de proporciones 50, 100 y 200 mg/L, la concentración de cobre no debe exceder los 12, 22 y 43 μg/L respectivamente. Un estudio realizado sobre metales pesados en el río Arkansas en Colorado, muestra concentraciones de Zn en un rango de 1 – 1,000 μg/L y de 0,1 – 15 μg/L con respecto al Cu. En ese mismo estudio, el citado autor también midió metales en el sitio de origen, California Gulch, y se encontraron concentraciones de hasta 1,300 mg/L de Cu y 14,000 de Zn (Tabora, 2017).

www.bdigital.ula.ve

Definición Operacional de Términos

Mesófilos

Presentan una temperatura óptima de crecimiento de 20ºC a 45ºC; los Mesófilos se encuentran en animales de sangre caliente, en entornos terrestres y acuáticos en altitudes templadas y tropicales (Ramírez y cols., 2006).

Veta mineral

Son filones de mineral puro que se encuentran en hendiduras rocosas aflorados en la superficie por acción de la actividad magmática que atraviesa grietas y fisuras de la corteza terrestre solidificándose con el cambio brusco de temperatura y presión. Estos filones se denominan veta y por lo general son ricos en un determinado compuesto mineral de donde se extrae el elemente de interés (Bautista, 2008).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Microbiota

Es la gran variedad de microorganismos del suelo formada por una mezcla microscópica de miles y millones de bacterias, actinomicetos, hongos, protozoos, etc., por cada gramo de suelo. La cual cumple un rol especial en los procesos bioquímicos de la materia (AVS, 2005).

Filogenético (a)

De la filogenia. Es la relación de parentesco entre especies o taxones en general (Ramírez y cols., 2006).

Extremoenzimas

Son enzimas responsables de catalizar reacciones químicas en ambientes extremos (Zavala, 2005).

www.bdigital.ula.ve

Antropogénica

Es el impacto humano sobre el medio ambiente. Es el conjunto de efectos producidos por las actividades humanas en el ecosistema (AVS, 2005).

Rizósfera

Es la zona próxima a las raíces de las plantas, se caracteriza por poseer una gran cantidad de compuestos que son exudados por las plantas. Se estima que los exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10 y 44% del carbón asimilado y otras series de compuestos, los que contribuyen generalmente a un incremento de las densidades poblacionales de los microorganismos (Rossi y cols., 2003).

Bioacumulación

Ésta interacción se refiere a la absorción intracelular de los iones metálicos y su posterior inmovilización. El transporte es dependiente de energía y mediado por acción enzimática. La movilización de metal dentro de la bacteria, puede empezar

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

con interacción pasiva con los ligandos de la superficie celular (bioadsorción) o por una quelación específica, seguida de un transporte lento al interior de la célula. Los mecanismos de transporte del metal a través de las membranas pueden llevarse a cabo por los siguientes mecanismos: bombas de iones, canales de ión, impregnación compleja e impregnación de lípidos (Bautista, 2008).

Biorremediación

Son estrategias de remediación basadas en procesos microbianos (microremediación) que pueden minimizar la toxicidad y la biodisponibilidad de los metales pesados presentes en los suelos. Dentro de estas técnicas se encuentran la bioestimulación en donde se activa a la población microbiana nativa; la bioaumentación que involucra la introducción artificial de poblaciones viables, la bioacumulación utilizando células vivas y la biosorción mediante biomasa microbiana muerta. Estas técnicas se caracterizan por ser tecnologías de remediación promisorias desde el punto de vista económico y de efectividad para la recuperación de suelos altamente contaminados (Rajendran y cols., 2003).

www.bdigital.ula.ve

Operacionalización de las Variables

Un sistema de variables consiste en una serie de características por estudiar, definidas de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores o unidades de medida (Álvarez, 2008), de este modo, en el Tabla 4, se muestra la operacionalización de las variables en estudio.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 4.

Operacionalización de las Variables

Variable	**Tipo**	**Definición Conceptual**
Metales pesados Cobre y Zinc	Independiente	Los metales pesados conforman un grupo de alrededor de 40 elementos en la tabla periódica. Dentro del grupo de los metales más tóxicos se encuentran el mercurio (Hg), cobalto (Co), cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), zinc (Zn), plomo (Pb) y níquel (Ni) (Tábora, 2017). Corresponde a un grupo de elementos con características químicas semejantes: un mismo estado de oxidación, igual distribución electrónica de las capas externas y pesos atómicos comprendidos entre 63,55 a 200,59 g/mol (Escobar, 2014).
Definición Operacional	**Dimensiones**	**Indicador**
Ya determinado según los reactivos utilizados para el suplemento de los cultivos.	Concentración de metales de Cu y Zn en los cultivos.	Variación de la concentración de los metales Cu y Zn en los cultivos.
Variable	**Tipo**	**Definición Conceptual**
Resistencia de microorganismosa metales pesados	Dependiente	Existen dos causas de la resistencia de microorganismos a metales, la primera es cuando los microorganismos han sido expuestos a estos contaminantes por períodos prolongados de tiempo y generan un grado de tolerancia hacia ellos mediante una transformación fisiológica. La segunda es cuando los microorganismos evolucionan genéticamente para obtener esta resistencia por selección natural de genes resistentes (Klerks y Weis, 1987).
Definición Operacional	**Dimensiones**	**Indicador**
Incubación de inóculos en medios de cultivo sólido bajo condiciones específicas de microorganismos Metalófilos	Unidades Formadoras de colonias (UFC). Identificación de microorganismos	Inhibición o crecimiento de microorganismos en cultivos suplementados con metales y cruce de estos. Tinción.

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hipótesis

El municipio Rivas Dávila del estado Mérida posee depósitos de mineral fosfato con altas concentraciones de metales pesados. Se considera que en estos suelos existen biomasas resistentes a algunos metales pesados constituyentes de este tipo de suelo. Por lo tanto, se aislarán microorganismos de muestras de suelo del municipio Rivas Dávila del estado Mérida, sometidos a la influencia de materiales pesados y resistentes a Cu y Zn hasta la concentración máxima tolerable.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación está relacionada con la interrogante de estudio, la cual enfatiza lo que se quiere saber. De esta manera se puede identificar el logro general de lo que se busca obtener durante el proceso de la investigación (Hurtado, 2010). Concretamente, esta investigación fue de tipo confirmatoria, ya que se pretendió confirmar la presencia de microorganismos extremófilos en suelos sometidos a explotaciones mineras en el municipio Rivas Dávila de estado Mérida.

www.bdigital.ula.ve

Diseño de la Investigación

En el diseño de investigación se describen las estrategias que se utilizaron para recolectar los datos en correspondencia con el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se requiere recolectar, en relación a ello Méndez (2001), establece que: Dentro de este diseño se encuentra el enfoque experimental que es una herramienta del método científico, el cual se puede entender como la observación dedicada y constante de un fenómeno objeto de estudio al cual se le modifican sus variables de acuerdo a un plan determinado, con la finalidad de analizar sus posibles cambios e inferir un conocimiento.

En este sentido, la presente investigación empleó el diseño experimental de datos primarios de muestras de suelo para analizar la presencia de microorganismos extremófilos sometidos a condiciones extremas de metales pesados de los elementos cobre y zinc (Cu y Zn).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Población y Muestra

Para Hernández, Fernández y Baptista (2010), la población es el conjunto de individuos que conforman el universo de donde se tomarán los datos para efectos de cálculos y mediciones. El autor citado previamente opina que cuando la población es muy grande y no puede ser manejada en los ensayos de campo, es necesario tomar una muestra que es una parte representativa de la población.

Para la presente investigación, la población estuvo conformada por los microorganismos presentes en el suelo de importantes formaciones geológicas del municipio Rivas Dávila del Estado Mérida, las cuales contienen depósitos de metales de Cu y Zn en altas concentraciones, en donde se encuentran las minas de Bailadores.

Unidad de Investigación

www.bdigital.ula.ve

Una vez definida las variables a estudiar, fue necesario determinar en qué o en quienes se va a investigar ese evento, esto se conoce como unidad de investigación (Hernández y cols., 2010). En consecuencia, con lo expresado, la unidad de investigación estuvo determinada por las minas de la localidad de Bailadores, las cuales están ubicadas en el sector denominado Las Tapias con más del 80 % del área dentro de los linderos del Parque Nacional General Juan Pablo Peñaloza, los Páramos Batallón y La Negra a 10 Km al sur de Bailadores y a una altitud de 2.520 msnm del Estado Mérida.

Selección del Tamaño de la Muestra

Según Hurtado (2015), existen técnicas de muestreo no probabilístico, en las cuales no se conoce la probabilidad que cada elemento tiene de formar parte de la población y los criterios para la selección de la muestra responde a criterios no basados al azar. En efecto, hay criterios de selección en donde la muestra se escoge

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

en términos teóricos, que de alguna manera sugieren que ciertas unidades son las más convenientes para acceder a la información que se requiere. La lógica utilizada para el muestreo no es la lógica de la representatividad (porque ninguna unidad puede representar a las demás), sino la lógica de la significatividad.

Por consiguiente, la selección de muestra se realizó a conveniencia, por tratarse de buscar muestras de suelos con alto contenido de metales pesados como zinc y cobre. Las muestras se recolectaron en un área aproximada de 100 m^2 en la ubicación geográfica de interés. Se delimitó el espacio en un cuadrante de 10 x 10 metros y se tomaron las muestras de suelo en cada vértice del mismo. Por ende, se recolectaron 4 muestras de suelo (Tabla 5).

Tabla 5.

Muestras recolectadas

www.bdigital.ula.ve

Muestra	Procedencia	Peso Kg
1	De suelos afectados por Cu y Zn	1
2	De una Roca	1
3	Suelo de una veta mineral	1
4	Otra veta mineral	1

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, (2023).

Sistema de Variables

En toda investigación es importante plantear variables, debido a que éstas permiten relacionar algunos conceptos y hacen referencia a las características que el investigador va a estudiar. Aunque el concepto de "evento", es más amplio pero el mismo incluye el término variable (Hurtado, 2015). De este modo, las variables son los elementos o eventos que se van medir, controlar y estudiar dentro del problema formulado, de allí que se requiera la posibilidad real y cierta de que se puedan

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

cuantificar. Por lo tanto, es una propiedad que puede variar y cuya variación es susceptible de medirse (Hernández y cols., 2010).

Es importante señalar que los tipos de variables de una investigación se pueden clasificar y distinguir de diversas maneras dependiendo de los tipos de valores que toman las mismas. Las variables de acuerdo a Hurtado (2015), pueden clasificarse de acuerdo a su capacidad o nivel en que permitan medir los objetivos y depende de sus propias características o propiedades, entre las que se pueden distinguir las siguientes: variables independientes, dependientes e intervinientes (Álvarez, 2008).

Variable Independiente

Se refiere a aquella donde el investigador puede manipular ciertos efectos; en otras palabras, supone la causa del fenómeno estudiado (Arias, 2015). Para la presente investigación se planteó como variable independiente las condiciones de los medios de cultivo para obtener microorganismos metalófilos aislados, presentes en muestras de suelos con altos niveles de concentración de metales pesados de Cu y Zn.

www.bdigital.ula.ve

Variable Dependiente

Hurtado (2015), la define como aquella que se modifica por la acción de la variable independiente. Para dicha investigación estuvo determinada por la resistencia de microorganismos a metales mediante el crecimiento en los diferentes medios de cultivo a distintas concentraciones de Cu y Zn.

Variable Interviniente

Es aquella que puede influir en la variable dependiente, pero que no está sometida a consideración como variable de investigación (Álvarez, 2008). En torno a ello, se consideró que aspectos fisicoquímicos y ambientales de la propia muestra influyeron

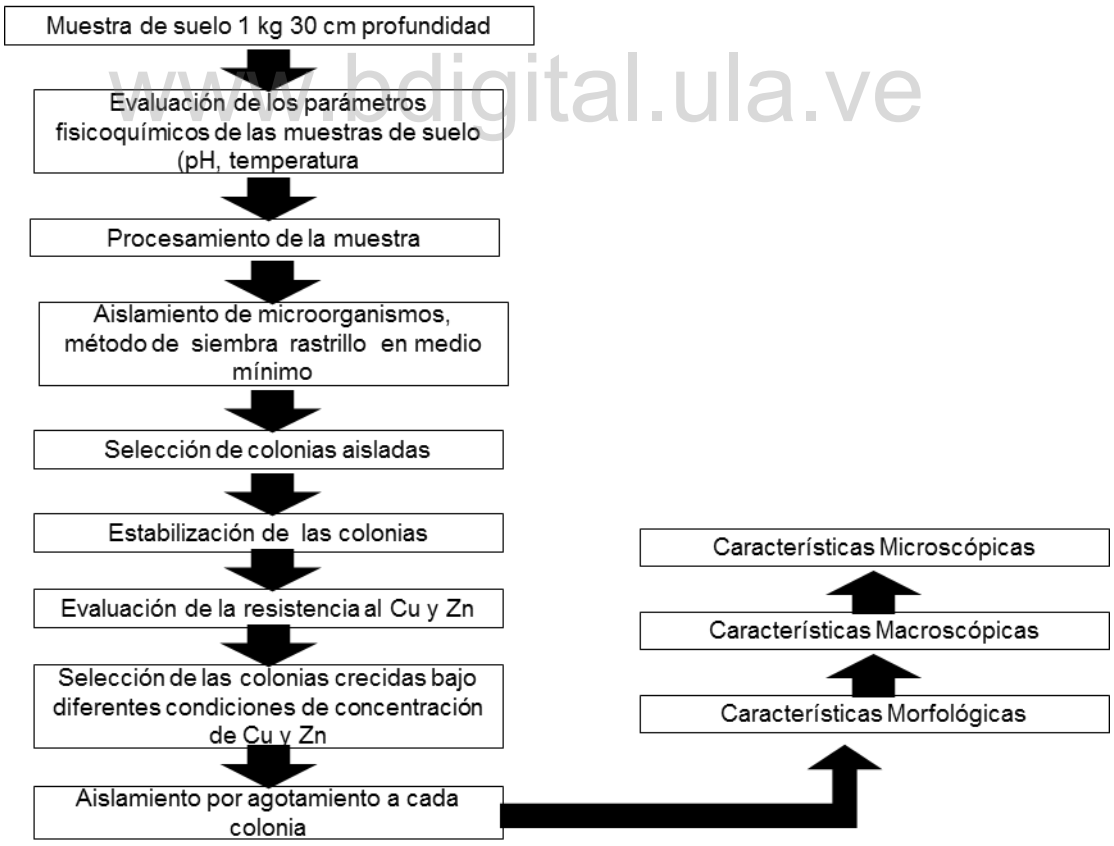
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

sobre los resultados de la investigación, mas no fueron evaluados en el presente estudio, por lo tanto, comprendieron las variables intervinientes de la investigación.

Procedimientos de la Investigación

Los procedimientos según Arias (2015), permiten orientar las acciones durante un proceso de investigación; en la presente investigación se describieron en detalle la operación del proceso experimental, con la descripción de las condiciones y métodos utilizados para determinar las características morfológicas en microorganismos expuestos a la influencia de metales pesados en los suelos de las minas de Bailadores (Figura 6).

Figura 9. Proceso del desarrollo experimental de la investigación.



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Tomado y modificado de Escobar, (2014) y Castaño y Márquez, (2009).

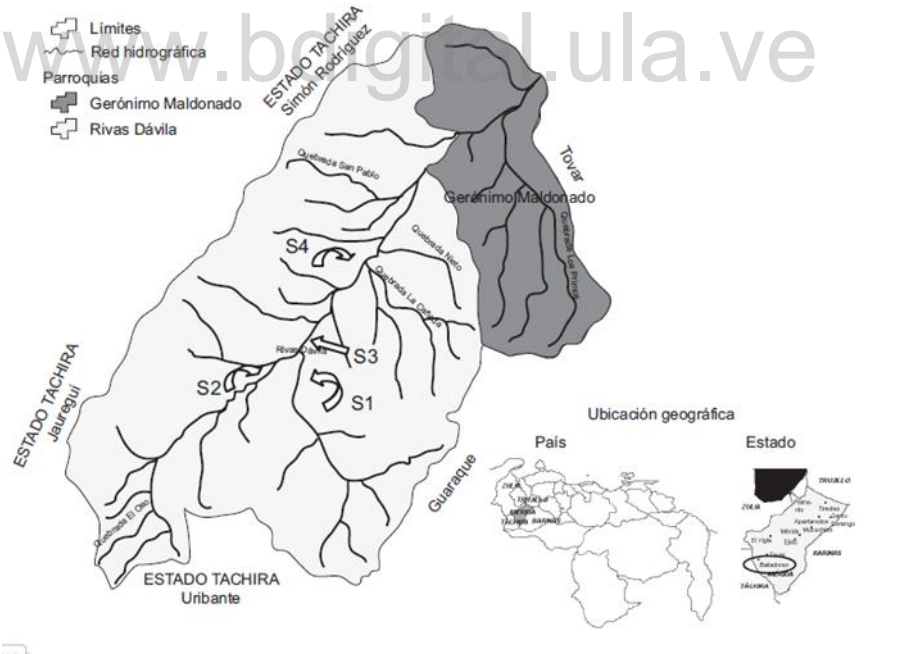
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Ubicación del sitio de Obtención de muestras

El área de estudio está situada en la localidad de Bailadores a 7 km de la población homónima en el límite norte del parque nacional Juan Pablo Peñalosa, en el estado Mérida-Venezuela, a una altitud 2400-2800 msnm(Contreras y cols., 2004).Las muestras con las cuales se realizó este estudio procedieron de la zona de las Tapias en la región geográfica del municipio Rivas Dávila (Figura 7), con una temperatura promedio de 18ºC, de coordenadas geográficas 8°11'55.1"N 71°50'09.2"W (proporcionado por Whatsapp: https://maps.google.com/?q= 8.198642,-71.835903).

Figura 10. Mapa del municipio Rivas Dávila del Estado Mérida, Venezuela

www.bdigital.ula.ve



Fuente: Tomada y modificada de Molina y cols. (2012).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Recolección de la muestra

Se recolectaron 4 muestras de suelo provenientes de una mina de bailadores. **Muestra 1:** provenientes de suelos afectados por Cu y Zn. **Muestra 2:** provenientes de una roca. **Muestra 3**: suelo de una veta mineral. **Muestra 4:** suelo de otra veta mineral; cada muestra con un peso de un kilogramo. Para evitar la contaminación con materiales de la superficie del suelo (plantas, restos vegetales, desechos), se eliminó la capa del suelo y se recolectó el material hasta una máximo de 30 centímetros, luego se almacenó en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Evaluación de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo

www.bdigital.ula.ve

Las muestras tomadas se procesaron en el laboratorio tres horas y media después de su recolección debido al tiempo de viaje para su recolección.

Determinación de la temperatura del suelo

Al momento de la recolección de las muestras, se procedió a introducir un termómetro en el suelo a una profundidad aproximada de 15 centímetros, luego de cinco minutos se midió la temperatura (Escobar, 2014). Este procedimiento se efectuó para conocer las condiciones de temperatura en las cuales se debía incubar los inóculos.

Determinación del pH de la muestra

Se preparó una dilución 1:2 (p/v) de las muestras de suelo en agua destilada de la siguiente manera:

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- Se pesaron 5 gramos de la muestra.
- Se le agregaron 10 mL de agua destilada estéril.
- Se mezcló y dejó en reposo dos horas.

Con un pHmetro se procedió a medir el pH del sobrenadante y de un control (agua).Una vez conocido el grado de acidez del suelo se estandarizó, según el pH del suelo obtenido, el pH de los medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos. La medición de este parámetro es importante debido a que los metales pueden precipitar con componentes del medio de cultivo, a causa del pH ó unirse a las paredes de los matraces y los tubos de prueba, y como consecuencia disminuir su concentración en los medios (Liu, Xu, Yang y Tay, 2003).

Procesamiento de la muestra

www.bdigital.ula.ve

Las muestras de suelo se procesaron inmediatamente al llegar al laboratorio, después de su recolección, siguiendo el protocolo realizado por Escobar (2014), para sembrar las placas de agar y poder aislar los microorganismos presentes en las muestras.

Se pesaron 5 g de cada muestra de suelo.

Se agregaron 10 mL de agua destilada estéril.

Se mezcló y se dejó en reposo durante 24 horas.

Se utilizó 100 µL del sobrenadante para la siembra.

Aislamiento de microorganismos

Este procedimiento se realizó siguiendo el método descrito por Castaño y Márquez (2009):

Primero, se prepararon ocho (8) placas de Agar Cerebro-corazón (MTS ó BHI por sus siglas en inglés), suplementadas con sales de sulfato de cobre ($CuSO_4$-$5H_2O$) y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

sulfato de zinc ($ZnSO_{40}$), al 3 % (3 mg/mL), cuatro placas para cada sal respectivamente.

Posteriormente, a partir del extracto preparado previamente, se tomaron alícuotas de 100 µL del sobrenadante y se inocularon en cada una de las placas con BHI. Los inóculos se extendieron por la superficie de las placas con un tubo de vidrio en "L", previamente esterilizado con una flama, según el método de siembra con rastrillo(Bautista, 2008).

Seguidamente, las placas se incubaron bajo condiciones de temperatura similares a las del ambiente natural de donde se tomaron las muestras (21 y 25 °C). El registro del crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de microorganismos se tomó cada 24 horas por cuatro días consecutivos (96 horas de incubación). Las colonias crecidas cuantificaron, se eligieron al azar y se seleccionaron UFC con las mejores características de crecimiento considerando color, aspecto, consistencia y tamaño. Luego, las colonias que crecieron más rápido en presencia de la concentración selectiva del metal se repicaron en nuevas placas con BHI e incubaron en las mismas condiciones preestablecidas.

www.bdigital.ula.ve

Por último, se obtuvieron colonias aisladas, las cuales se repicaron en nuevas placas de agar y reproducir los resultados de crecimiento de las colonias aisladas. Además, se almacenaron y conservaron por separado en cuñas del mismo agar, suplementado con $CuSO_4$-$5H_2O$ y $ZnSO_{40}$ bajo las mismas condiciones de incubación.

Evaluación de la resistencia al Cu y Zn

Este procedimiento se realizó según protocolo seguido por Escobar (2014), en donde se evaluó el crecimiento de las colonias aisladas frente a $CuSO_4$-$5H_2O$ y $ZnSO_{40}$,Para esto se emplearon placas de agar Tripticasa de soya, suplementadas con 100 µL de la solución de las sales con concentraciones crecientes de cada una3, 9, 15, 25 y 40 mg/mL, a fin de conocer la máxima tolerancia de los microorganismos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

aislados para estas sales, hasta no obtener crecimiento en 7 días de incubación a temperatura ambiente.

Caracterización Morfológica de las Colonias

A partir de las colonias aisladas en el medio de cultivo BIH utilizado, se procedió a realizar un repique de cada una de esas colonias con el objeto de purificarlas. Para ello, se sembraron en medio de cultivo de Agar Sabouraud dextrosa con antibiótico el cual se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Estos se incubaron a temperatura de 25 ºC, por espacio de 5 a 7 días.

Caracterización Macroscópica

Según Arias, (2015), se evaluaron las siguientes características de las colonias:

www.bdigital.ula.ve

- **Tamaño:** se identificaron como pequeñas, medianas y grandes.
- **Formas:** pueden ser circulares, puntiforme, irregulares, filamentosas.
- **Color:** Pueden ser variados.
- **Aspecto:** Brillante, Translúcida, Opaca y Mucosa
- **Consistencia:** puede ser viscosa, seca, quebradiza, rugosa y aterciopelada.
- **Pigmentación:** puede ser endopigmentación o exopigmentación, de acuerdo a la forma de irradiación del color de los productos de desecho de las colonias microbiológicas.

Para la identificación de las cepas fúngicas purificadas se procedió a la descripción macroscópica de cada una de ellas basada en aspectos tales como: Rapidez de crecimiento, color de la colonia (endo y exopigmento), tomando como baso lo expresado por Arena R. (2014).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Caracterización Microscópica

De cada una de las colonias anteriormente estructuradas, se realizó un examen directo entre lámina y laminilla, utilizando para cada preparado el colorante de azul de lactofenol. Para ello, se utilizó un asa en gancho, se tomó un pedacito de la colonia a estudiar, se colocó en la lámina porta objeto con una o dos gotas de azul de lactofenol y se le colocó una lámina cubre objeto (Arena R. 2014) .

Morfología microscópica

Una vez realizadas las láminas, se observaron al microscopio con objetivo de 10x y 40x para determinar la morfología fúngica de cada cepa y así poder identificar el agente etiológico. (Arena R. 2014).

www.bdigital.ula.ve

Diseño de Análisis

Una vez realizado la descripción de las colonias y determinar su morfología microscópica, se identificaron los siguientes agentes etiológicos:

-Hormodendrum Sp.
- Penicillium Sp
-Fusarium Sp
-Scytalidum Sp

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

La presente investigación buscó aislar microorganismos extremófilos metalófilos en suelos expuestos a altas concentraciones de metales pesados como cobre y zinc, correspondientes a un yacimiento mineral ubicado en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida, en la localidad de las Tapias del pueblo de Bailadores. En esta investigación se cumplió con la serie de pasos planificados y expuestos en la sección anterior.

Determinación de los parámetros fisicoquímicos del suelo

www.bdigital.ula.ve

En relación con la evaluación de los parámetros fisicoquímicos del suelo en el cual se tomaron las muestras, en la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos con respecto a la medición de la temperatura a una profundidad de 30 cm por debajo de la capa vegetal. Nótese la variación de hasta 4 °C del punto 3 con respecto al 4. Igualmente, se muestran los niveles de acidez del suelo de las muestras estudiadas. Se pudo constatar que la uno y dos mostraron una similitud con respecto al grado de acidez, sin embargo, la variación del pH de la muestra 4 es significativa.

Tabla 6.

Evaluación de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo

Muestra	Temperatura °C	pH
1	23	6,4
2	23	6,4
3	25	5,8
4	21	5

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Se evidenció que entre los vértices 1 y 2 las condiciones del suelo no variaron en su totalidad, más las condiciones para el suelo recolectado en los vértices 3 y 4 del área seleccionada eran muy distintos, pudiera explicarlo el grado de concentración de los metales en cada área, ya que el cobre y el zinc por ser buenos conductores del calor pueden inducir un cambio de temperatura en el medio (Madigan y Marrs, 1997). De modo que la temperatura de incubación seleccionada para el crecimiento de los cultivos microbianos fue a temperatura ambiente, entre los 18 y 25 °C. Asimismo, la variación de 1,4 en el pH del suelo puede deberse al drenaje ácido de las minas en el agua con pH menor a 5 proveniente de los residuos de las minas. Esta acidificación del suelo se da cuando el potencial ácido de los componentes es mayor al potencial de neutralización de los mismos. Para la generación de ácidos con altas concentraciones de metales se requiere de minerales, agua o un ambiente húmedo y un agente oxidante, el cual en la mayoría de los casos es el oxígeno. Cuando una mina está activa, este proceso no es de mucha importancia, sin embargo, en minas cerradas y abandonadas, el nivel freático puede incrementar y causar una descarga de agua contaminada con ácidos y metales pesados (Tabora, 2017).

www.bdigital.ula.ve

Aislamiento y obtención de colonias puras de microorganismos presentes en muestras de suelo

En la Tabla 7 se muestra el comportamiento de los cultivos durante el tiempo de crecimiento. Se puedo notar que a las 24 horas no se apreció crecimiento ni de bacteria ni para hongo. Este comportamiento se mantuvo por 48 horas seguidas en ocho ensayos realizados en las mismas condiciones de siembra. Según Tabora (2017), el cobre y zinc son metales pesados que, en altas concentraciones, pueden tener alta toxicidad para los ecosistemas. Las bacterias son de los primeros organismos afectados por la presencia de estos metales pesados.

Y según Field (2004), la concentración típica en el suelo de Cu y Zn en mg/mL es de 0,292 y 0,490 respectivamente, en cuyas concentraciones la microbiota normal del

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

suelo no se encuentra alterada. Sin embargo, para la primera siembra la concentración de las sales utilizada fue mucho mayor a la concentración de metal que suele encontrarse en el tópico normal del suelo. Por lo tanto, el crecimiento de bacterias resistentes a esta concentración de metal (3mg/mL) es nula. Considerándose entonces que en las muestras seleccionadas no se encontraron bacterias extremófilos resistentes a metales pesados (Cu y Zn) sobre la concentración inicial utilizada.

Tabla 7.
Crecimiento de las cepas a las 24, 48, 72 y 96 horas según el suplemento con las sales de metales

	$CuSO_4$ (3mg/mL)				**$ZnSO_4$ (3mg/mL)**			
Muestra	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
M1	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**+**	**++**
M2	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**+**	**++**
M3	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**+**	**++**
M4	**X**	**X**	**+**	**++**	**X**	**X**	**+**	**++**

X: crecimiento nulo. + Crecimiento fúngico escaso, ++ crecimiento fúngico moderado

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023

No obstante, trascurridas las 72 horas de incubación a temperatura ambiente, se observó crecimiento fúngico en la placa de la muestra 4 con BHI/Cu y en las placas de todas las muestras en BHI/Zn. El crecimiento fue progresivo a las 96 horas de incubación. Este crecimiento se observó igualmente para los ocho ensayos efectuados en las mismas condiciones de siembra e incubación.

Una vez corroborado el crecimiento de las mismas colonias en los diferentes ensayos realizados, se procedió a evaluar los microorganismos crecidos. En la Tabla 8 se muestran las cantidades de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada una

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de las placas donde se evidencio crecimiento, tanto en las 72 horas como para las 96 horas.

Tabla8.

Cantidad de UFC de los hongos crecidos a las 72 y 96 horas de siembra

	$CuSO_4$ **(3mg/mL)**		$ZnSO_4$ **(3mg/mL)**	
Muestra	**72 h**	**96 h**	**72 h**	**96 h**
M1	**0**	**0**	**2**	**5**
M2	**0**	**0**	**3**	**9**
M3	**0**	**0**	**4**	**20**
M4	**5**	**9**	**9**	**63**

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023

www.bdigital.ula.ve

A las 72 horas de incubación, se pudo observar el crecimiento fúngico en las tres primeras muestras con agar suplementado con Zn y para la M4 en agar con Cu. A las 96 horas el crecimiento se aceleró sobre todo en la M3 y M4 con Zn, se pudo constatar que el BHI proporcionó condiciones favorables para el desarrollo de las colonias. De igual forma, no se evidencio crecimiento bacteriano a las 72 y 96 horas de incubación. En las muestras M1, M2 y M3 con suplemento de Cu no se presenció el crecimiento de ningún microorganismo hasta los 7 días de incubación. Por ende, no se encontraron microorganismos extremófilos resistentes al cobre en concentraciones iguales y mayores de 3 mg/mL de $CuSO_4$.

Una vez cuantificadas las colonias, se realizó una selección de acuerdo a las diferencias de las características morfológicas de la colonia (tamaño, color, consistencia, forma y aspecto). En cuanto a esto, en la M4/Cu se pudo notar el crecimiento de tres colonias diferentes, de las cuales aislamos a cada una por separado. De igual manera, seleccionamos las colonias diferentes de las M2, M3 y M4 con Zn, tomando una colonia macroscópicamente diferente en color, tamaño y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

forma, de cada muestra. Cabe resaltar que en la M1 se presenció el crecimiento de una colonia idéntica entre todas, por lo que de esta muestra se tomó una sola colonia representativa (Anexo 2). Las colonias seleccionadas se enumeraron del 1 al 10, las cuales fueron las identificadas en esta investigación (Tabla 9).

Tabla9.
Selección y aislamiento de las colonias crecidas a 96 horas según sus características macroscópicas

Enumeración de las colonias en $CuSO_4$	**Enumeración de las colonias en $ZnSO_4$**			
M4	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**
1, 2 y 3	**4**	**5 y 6**	**7 y 8**	**9 y 10**

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023

En la Tabla 10 se muestra el crecimiento de las colonias seleccionadas de acuerdo a las horas de crecimiento. En la cual se pudo observar, que las colonias 1, 2, y 3 mantuvieron el mismo comportamiento de crecimiento en ambos repiques, al igual que las colonias 4, 6, 7 y 8.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 10.
Crecimiento de las colonias seleccionadas

N° Col	**Primer Repique**			**Segundo Repique**		
	24 h	**48 h**	**72 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**
1	-	-	+	-	-	+
2	-	-	+	-	-	+
3	-	-	+	-	-	+
4	+	+	++	+	+	++
5	-	-	+	-	+	+
6	-	+	+	-	+	++
7	-	+	+	-	+	+
8	-	+	++	-	+	++
9	-	-	+	-	+	+
10	-	+	++	+	+	+

- crecimiento nulo. + Crecimiento fúngico escaso, ++ crecimiento fúngico moderado.

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Las colonias 5, 9 y 10 mostraron un comportamiento de crecimiento distinto con respecto al primer repique. En la muestra 10 se pudo observar que, a pesar de que en el segundo repique su crecimiento fue en menos tiempo, las colonias crecidas a las 72 horas fueron menores que las crecidas en el mismo periodo para el primer repique.

Determinación de la concentración máxima de sales de cobre y zinc en la que crecieron los microorganismos aislados

En la Tabla 11 se muestra el comportamiento del crecimiento de colonias de hongos. Se pudo observar que las muestras 1 y 3 crecieron hasta una concentración de 15 mg/mL, la muestra 2 mostró menor resistencia al cobre sin mostrar crecimiento a concentraciones mayores de 9 mg/mL.

Tabla 11.

Evaluación de resistencia de las colonias aisladas a metales pesados

www.bdigital.ula.ve

N°Col.		mg/mL				
		3	**9**	**15**	**25**	**40**
$CuSO_4$	1	+	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-
$ZnSO_4$	4	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	-
	8	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	-
	10	+	+	+	+	+

-Crecimiento nulo, + crecimiento fúngico escaso,++ crecimiento fúngico moderado

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Asimismo, se pudo constatar que uno de los microorganismos que mostró resistencia al zinc alcanzó un desarrollo hasta la máxima concentración evaluada de 40 mg/mL, no se pudo comprobar si este microorganismo fúngico presenta aún más resistencia a mayores concentraciones de la sal. Sin embargo, se evidenció que las muestras 4, 5, 7 y 9 mantuvieron un comportamiento similar, lo que constata, y por su similitud en las características macroscópicas, que se trataba del mismo microorganismo resistente al Zn en todas las muestras tomadas.

Este comportamiento en el crecimiento de microorganismos encontrados en muestras de suelo provenientes de una misma área que presentan gran variabilidad de resistencia a metales pesados puede deberse a los diferentes mecanismos de resistencia que presente el microorganismo. Así la exposición previa a un metal pesado no significa una mejor capacidad de supervivencia ante la presencia de otro metal pesado (Coyne, 2000).

www.bdigital.ula.ve

Identificación de los microorganismos aislados en las muestras de suelo

Una vez obtenidos las colonias aisladas según la concentración de metal al cual presentaron resistencia, se efectuó la identificación de las mismas de acuerdo a las características morfológicas tanto microscópicas como macroscópicas de las colonias crecidas. En la Tabla 12 se muestras las características morfológicas de las colonias aisladas de acuerdo a la asignación numérica para la evaluación de resistencia. Las colonias fueron descritas según los criterios sugeridos por Coyne (2000). Todas las colonias presentaron forma circular con variación de los bordes entre estriada y verrugosa. En relación al tamaño se observó diferencia significativa, variando desde 1 cm a 6 cm y la mayoría presento color blanquecino con un viraje no muy marcado entre amarillento y verdoso. El aspecto de la mayoría era algodonoso, aunque también se observaron aspectos aterciopelados. La pigmentación fue crucial a la hora de la identificación, ya que el endo y exo pigmento determino el microorganismo presente en las pruebas de resistencia.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 12.

Características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas con resistencia a metales pesados

N° Col.	Macroscópica					Microscópica
	Tamaño cm	Forma	Color	Aspecto	Pigmento	
1	2-4	Micelio verrugosa	Blanco-amarillento	Algodonoso		Macroconidias Hialosporas y fragmosporas. Microconidias e hifas tabicadas
2	1-4	Circular	Blanco	Algodonoso	Endo-negro	Hifas hialinas septadas de pared delgada y artroconidias septadas con pared gruesa
3	5-6	Circular estriada	Blanco	Algodonoso		Hifas septadas hialinas con conidióforos simples y conidias
4	1-3	Circular	Blanco verdoso	Aterciopelado	Exo-negro	Hifas tabicadas, restos de conidiófora y conidias
5	1-3	Circular	Blanco verdoso	Aterciopela-do	Exo-negro	Hifas tabicadas, restos de conidiófora y conidias
6	1-4	Circular	Blanco	Algodonoso	Endo-negro	Hifas hialinas septadas de pared delgada y artroconidias septadas con pared gruesa
7	1-3	Circular	Blanco verdoso	Aterciopelado	Exo-negro	Hifas tabicadas, restos de conidiófora y conidias
8	1-4	Circular	Blanco	Algodonoso	Endo-negro	Hifas hialinas septadas de pared delgada y artroconidias septadas con pared gruesa
9	1-3	Circular	Blanco verdoso	Aterciopelado	Exo-negro	Hifas tabicadas, restos de conidiófora y conidias
10	1-4	Circular	Blanco	Algodonoso	Endo-negro	Hifas hialinas septadas de pared delgada y artroconidias septadas con pared gruesa

www.bdigital.ula.ve

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023

Por otra parte, en la determinación de la morfología microscópica se procedió a realizar tinción con azul de lactofenol y posterior observación al microscopio (Tabla 12) en todas las colonias se observaron hifas hialinas tabicadas o septadas, presentaron estructuras de mohos. Según la descripción morfológica observada se

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

lograron identificar cuatros microorganismos: *Homodendrum* sp, *Penicillium*, *Scytalidium* y *Fusarium*(Tabla 13).

Tabla 13.
Identificación de los microorganismos aislados y máxima concentración de metal a los que mostraron resistencia

N° Col.	Muestra	Microorganismo	[$CuSO_4$] mg/mL	[$ZnSO_4$] mg/mL
1	***M4***	***Fusarium sp.***	**15**	
2	***M4***	***Scytalidiumsp.***	**9**	
3	***M4***	***Penicilliumsp.***	**15**	
4	***M1***	***Hormodendrumsp.***		**25**
5	***M2***	***Hormodendrumsp***		**25**
6	***M2***	***Scytalidiumsp.***		**40**
7	***M3***	***Hormodendrumsp.***		**25**
8	***M3***	***Scytalidiumsp.***		**40**
9	***M4***	***Hormodendrumsp.***		**25**
10	***M4***	***Scytalidiumsp.***		**40**

www.bdigital.ula.ve

Fuente: Camacho, Carrero y Jiménez, 2023

Se determinó la presencia de hongos resistentes al Cu hasta concentraciones de 15 mg/mL; *Fusarium sp. Penicilliumsp.* de acuerdo con lo reportado por Muñoz-Silva y cols en 2019. Coyne (2000) plantea que la resistencia del *Penicillium* se explica por el hecho de que el ácido oxálico excretado por este hongo enlaza el cobre y evita su absorción, el microorganismo puede presentar una alteración en su permeabilidad, lo que significa que el Cu simplemente no se absorbe. Asimismo, estos dos microorganismos fúngicos no crecieron bajo ninguna concentración de Zn.

El *Scytalidiumsp* mostró resistencia a ambos metales, pero en menor concentración para el Cu (9mg/mL) y alcanzo la máxima concentración de Zn a la que fue sometido (40 mg/mL). Por su parte, el microorganismo *Scytalidium* puede inmovilizar rápidamente el Zn en la pared celular, de manera que no pueda ser transportado por la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

membrana celular. Esta suele ser una característica que altera la permeabilidad de la membrana frente a los metales (Arenas, 2014).

En el caso de *Hormodendrumsp*, dicho microorganismo solo creció bajo concentraciones de 25 mg/mL de Zn, este microorganismo también presento resistencia selectiva a un solo metal, el Cu, al igual que el *Fusarium y Penicillium*, como afirman Muñoz-Silva y cols. (2019).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El trabajo de investigación realizado y los resultados obtenidos permitieron a las investigadoras llegar a las siguientes conclusiones:

- En los suelos sometidos a explotaciones mineras en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida existen microorganismos extremofílos y mesófilos, resistentes a altas concentraciones de Cu y Zn con respecto a la concentración tópica normal del suelo.
- Los microorganismos aislados de estos suelos son pertenecientes al reino Fungí, no se aislaron bacterias con resistencia mayores o iguales a 3 mg/mL tanto de Cu como de Zn.
- *Scytalidiumsp.* aislado es resistente a ambos metales en concentraciones de 9 y 40 mg/mL de Cu y Zn respectivamente.
- *Hormodendrumsp.* es el único microorganismo fúngico que presentó resistencia selectiva al Zn en concentraciones de 25 mg/mL.
- *Fusarium sp* y *Penicilliumsp.*presentaron resistencia selectiva al Cu hasta una concentración de 15 mg/mL.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Recomendaciones

La presente investigación abre camino a amplios estudios en diversas áreas de la ciencia. La identificación de estos hongos extremófilos presentes en el suelo merideño puede implicar un avance para el estudio de la recuperación de suelos que han sido impactados negativamente por la deforestación y uso de contaminantes del suelo.

Por tanto, se recomienda expandir el área de estudio en busca de otros microorganismos, analizando rangos más amplios en las concentraciones de los metales para la evaluación de la resistencia a ellos. Asimismo, se recomienda que la concentración inicial de metales sea menor, para evaluar si existe presencia de bacterias en esta zona y a que concentración máxima pueden desarrollarse las mismas. En ese sentido se sugiere emplear como antecedente el trabajo de Pérez, sobre la evaluación de hongos extremófilos con potencialidades para el tratamiento y valorización de biosólidos municipales.

www.bdigital.ula.ve

Además, sería conveniente hacer estudios a nivel molecular para determinar la extremoenzima capaz de conferir la resistencia a estos microorganismos a tales concentraciones de metales pesados. Estos estudios podrían aportar soluciones para la implementación de un plan de biorremediación del suelo dentro y fuera del territorio nacional. Para ello, será necesario proponer mecanismos bioquímicos que contrarresten la toxicidad de metales pesados como lo exponen Beltrán y Gómez (2016), en su estudio acerca de Biorremediación de metales pesados.

La Facultad de Farmacia y Bioanálisis representada por el departamento de Microbiología, debería hacer experiencias con los hongos recuperados para incluir el tema dentro de la unidad curricular de la cátedra de micología o microbiología en general. A tal fin, se sugiere impulsar estudios e investigaciones que logren la caracterización de diferentes microorganismos presentes en suelos cultivables a objeto de iniciar un registro biológico de microorganismos que hayan sido aislados e

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

identificados con base en la determinación, tal como lo propuso Avellaneda en su tesis doctoral titulada caracterización de comunidades microbianas asociadas a prácticas agrícolas y usos de suelos en el estado, la región y el país.

De igual forma, es recomendable propiciar investigaciones sobre los efectos del cobre y del zinc en comunidades microbianas de fuentes hidrológicas, con la finalidad de determinar el efecto de estos metales en la cantidad de bacterias provenientes de dichas fuentes de agua, para la creación de perfiles de resistencia hacia el cobre y el zinc (genes de resistencia), como lo describió Tabora (2017) en su estudio sobre este tema.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez, W. (2008). La Naturaleza de la Investigación. 3ra Edición. Caracas: Editorial Biosfera.

Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramírez, A., Sánchez, K. y Velazco, E. (1999). Manual práctico de bacteriología. Velasco, J., (Coordinadora). Mérida-Venezuela: Publicaciones Vicerrectorado Academoco – Codepre.

Arenas, R. (2014). Taxonomía y clasificación. En R. Arenas, Micología médica ilustrada. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V.

Arenas, R. (2014). Micología médica ilustrada. 5ta ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. Cap. 5, pp. 56-57.

Arias, F. (2015). El Proyecto de Investigación. (5ª ed). Caracas. Venezuela. Editorial Episteme.

Arias, J. (2016). Aislamiento e Identificación de Bacterias Termófilas de la Fuente Geotermal Papallacta. (Tesis de Grado). Universidad de la Fuerzas Armadas. Ecuador.

Avellaneda, L. (2015). Caracterización de comunidades microbianas asociadas a prácticas agrícolas y usos del suelo de la vereda El Bosque - Parque Nacional Natural de los Nevados. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

AVS: Asociación Vida Sana. (s.f). Microorganismos del suelo y biofertilización. *CropsforBetterSoilLife;* 10 (471): 1-36

Bautista, D. (2008). Bioadsorción de Metales Pesados Mediante el Uso de Biomasa Bacteriana Aislada de Jales Mineros. (Tesis de Postgrado). Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Estado de México. Atizapán de Zaragoza, Estado México.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Beltrán, M. y Gómez, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética. *Facultad de ciencias básicas*; 12(2):172-197.

Benlloch, A., López, L. y Rodríguez, F. (2002). Archaeal Biodiversity in crystallizer pond s from a solar saltern: culture versus PCR. *MicrobiologyEcological*; 41: 12-19.

Bolan, N., Kunhikrishman, A., Thangarajan, R., y Kumpiene, J. (2014). Remediation of heavy metal (loid)s contaminated msoils-to movilize or to immobilize. *Journal of Hazardous Material*; 266: 141-166.

Cabrera, G., Pérez, R., Gómez, J., Abalos, A. y Canteros, D. (2006).Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp*. strains. *Journal of hazardo us materials*; 135 (1-3): 40–46.

Castaño, F. y Márquez, E. (2009). Aislamiento y caracterización de microorganismos resistentes a metales pesados. (Tesis de Grado). Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Castillo, F.(2005). Microorganismos extremófilos. En F. Castillo (coord.), Biotecnología ambiental. Madrid: España: Tébar.

Comerio, R.; Tarapow, M.; Vásquez, S. y Mac, W. (2007). Bacterias Adaptadas al Frío. *Revista Ciencia Hoy en Línea*; 17(99): 10-21.

Contreras, F.; Paolino, J. y Rivero, C. (2004). Efecto de la adición de enmiendas orgánicas sobre la actividad de la ureasa en suelos del municipio Rivas Dávila (estado Mérida). *Venesuelos*; 10(1 y 2):12-17.

Contreras, M. (2015). Evaluación de la resistencia a metales pesados en aislados bacterianos de muestras de agua obtenidas del rio Chama. (Tesis de Grado). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida.

Coyne, M. (2000). Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. 2da Ed. España: Editorial ITP-Paraninfo.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Escobar, I. (2014). Aislamiento y caracterización de microorganismos resistentes a metales pesados. (Tesis de Grado). Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Field, J. (2004). Bioremediación de Metales Pesados. (Tesis Doctoral). Departamento de Ingeniaría Química y Ambiental. Universidad de Arizona. Estados Unidos.

Ford T. y Mitchell R. (1992). *Microbial transport of toxic metals.* En: Environmental Microbiology, Ralph Mitchell (ed). Wiley-Liss, Inc. 605.USA New York.

Gadd, G. M. (2009). Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal Chemical Technologyand Biotechnology;*84, 13–28. doi:10.1002/jctb.1999.

Garbisuy, C. y Alkorta, I. (2003). Basic concept son heavy metal soil bioremediation.*EuropeanJournalof mineral processing and environmental protection*; 3: 58-66.

García, A. (2006). Ecología. Buenos Aires: Editorial Santillana.

Gómez J., Steiner W. (2004). The biocatalyticpotencial of extremophiles and extremozymes.*Food technology and Biotechnology*; 42: 223-235.

Gómez, E. y Sánchez, E. (2008). *Guía de prácticas de microbiología del suelo y metales presentes*. 4 Ed. Florida, CRC Press.

González M, González N. (2011). Manual de Microbiología Médica. 2da edición, Venezuela: Dirección de medios y publicaciones de la Universidad de Carabobo.

Guerrero, J., Egea, F., y Martínez, E. (2013). *Interdisciplinariedad en Biotecnología. En Jornadas Internacionales sobre Agricultura Intensiva*. España: Universidad de Almería.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. y Boudabous, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals.*Bioresource Technology*; 64 (1):7–15.

Henao A, CombaN, Alvarado E, Santamaría J. (2015). Bacterias autótrofas y heterótrofas asociadas a nieve marina lodosa en arrecifes con escorrentía continental. *Universitas Scientiarum* 2015, 20 (1): 9-16.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Herbert, R. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles.*Biotechnol*; 10: 395-402.

Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación* (5a. ed.). México: McGraw-Hill Interamericana, S. A.

Hurtado J. (2015). *El proyecto de Investigación: Comprensión Holística de la metodología y la investigación*. 8va edición. Caracas: Ediciones Quirón.

Johnson, A. y Thornton, I. (1987). Hydrological and chemical factors controlling the concentrations of Fe, Cu, Zn and As in a river system contaminated by acid mine drainage. *Water Research*; 21 (3):59–365.

Klerks, P. y Weis, J. (1987). Genetic Adaptation to Heavy Metals in Aquatic Organisms.*Environmental Pollution*; 45 (3): 73–205.

Kotrba P., Doleckova L., De Lorenzo V. y Ruml T. (1999). Enhanced Bioaccumulation of Heavy Metal Ions by Bacterial Cells Due to Surface Display of Short Metal Binding Peptides.*Appliedand Environmental Microbiology;* 65(3): 1092-1098.

www.bdigital.ula.ve

Le Cloirec P. y Andrés Y. (2005). *Bioremediation of heavy metals using microorganisms*. En: Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystem. Milton F. y Rachakonda N. (editors). Science Publishers.Pp.97- 140.India.

Liu Y., Xu H., Yang S. y Tay J. (2003). A general model for biosorption of Cd2+, Cu2+ and Zn2+ by aerobic granules.*Journalof Biotechnology;* 102: 233-239.New York.

López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G. y Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*; 3(1):10-18. Caracas, Venezuela.

López, J., Marulanda, M. y López, A. (2013). Climate factors and its influence on the expression if fungal diseases in cultivars of Heliconias. *Universitas Scientiarum*; 18 (1): 331-344

MacElroy, RD. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems,* 5: 74-75.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2003).Diversidad Procariótica: Archea. En: Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (eds). Brock Microbiología de los Microorganismos.Tenthedition. Ed. Pearson-Prentice Hall, Madrid.

Madigan, M.; y Marrs, J. (1997). Extremophiles. *Scientific American*; 276: 82-87.

Maier, R. (2006). *Biological Processes affecting contaminant transport and fate*. En: Environmental and Pollution Science. Ian L. P., Charles P., Gerba, M. L. y Brusseau (editor) 2nd. Ed. Academic Press Elsevier. Canadá.

Mata, G. (2006). Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia* y *Salipiger.*(Tesis Doctoral). Universidad de Granada. España.

Méndez, C. (2001). *Metodología de la Investigación*. Caracas: Editorial CEC, S. A. Venezuela.

Mergeay, M., Monchy, S., Janssen, P., Van Houdt, R., y Leys, N. (2003). *Ralstoniametallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-re-sponsive genes. FEMS *Microbiology Reviews*; 27: 385-410.

Mora, B. (2004). Análisis de La Estructura y Dinámica Territorial del Municipio Rivas Dávila. Bases para una Propuesta de Ordenación del Territorio y de Gestión Ambiental. (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Moraga, R., Merino, C. y Mondaca, M. (2003), Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigación marina*; 31 (1):91-95.

Morales, F. (2006). Propuesta del Plan de un proyecto de formación en ecoturismo de acuerdo a un diagnóstico de las características socioeducativas y económicas de la comunidad de las Tapias, municipio Rivas Dávila del Estado Mérida. (Tesis de Postgrado). Universidad Católica Andrés Bello. Ciudad Guayana, Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Muñoz, L., Olivera, P., Santillán, T., M., y Tamariz, C. (2019) Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú) *Revista peruana de Biología*; 26(1): 109 - 118

Navarro, J., Aguilar, I. y López, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistema*; 16(2): 10-25. Caracas, Venezuela.

Nessner, V.; y Esposito, E. (2010).Biotechnological strategies applied to the decontamination of soil polluted with heavy metals. *Biotechnology advances*; 28:61-89.

Núñez, B. (2015). Biodiversidad, materia orgánica y estructura del suelo: ciencia, técnica e ingeniería. (Tesis Doctoral). Universidad de Burgos. España.

Oliart, R.; Manresa, P. y Sánchez, M. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias,*11(1): 79-90.

www.bdigital.uia.ve

Pérez, H. (2019). Hongos extremófilos con potencialidades para el tratamiento y valorización de biosólidos municipales. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.

Rajendran, P., Muthukrishnan, J., Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*; 41: 935-944.

Ramírez, N., Serrano, J. y Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *RevistaMexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3): 56-71.

Reyes, I. y Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacterspp.Bioagro;* 19(3): 117-126.

Rodríguez, F. y Valera, R. (2008). Microbiología, características. Editorial CRC Press. Costa Rica.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Rossi M., Ciaramella, M., Cannio, R., Pisani, F., Moracci, M. y Bartolucci, S.(2003). Meeting Review (Extremophiles 2002). *Journal of Bacteriology*; 185: 3683-3689.

Rothschild, L. y Mancinnelli, R. (2001).Life in extreme environments.*Nature*;409 (6823): 1092-1101.

Sánchez, R. (2009). Manual de Microbiología de los metales pesados. Facultad de Ciencias Biológicas: Universidad Autónoma de Coahuila.

Singh, K. (2010). Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. *Trendsin Biotechnology*; 28(3): 111-116.

Soto, C., Gutiérrez, S., Rey, A. y González, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo, *NOVA* 8:195-205.

Tábora, S. (2017). Efecto del cobre y zinc en la comunidad microbiana del río Arkansas, Leadville, Colorado, Estados Unidos. (Tesis de Grado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

www.bdigital.ula.ve

Urbieta, M., González, E., Aguilera, A., Giaveno, M. y Donati, E. (2015). Comparison of the microbial communities of hot springs waters and the microbial biofilms in the acidic geothermal area of Copahue. *Extremophiles*; 19(2), 437-450.

Van-Den-Burg, B. (2003).Extremophiles as a source for novel enzymes.*Current opinion in microbiology*; 6(3): 213-218

Ventosa, A., Nieto, J. y Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria.*Microbiologyand Molecular Biology Reviews;* 62: 504-544.

Volesky B. (1999). Biosorption for the next century.(Documento en línea). Disponible en: http://biosorption.mcgill.ca/publication/BVspain/BVspain.htm. España.

Weber, N. (1982). Fungus Ants.En Social Insects.Vol. 4. H.R. Hermann (Ed.) Academic Press, London, Londres.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Wiegel, J., Keubrin, U.(2004). Alkalitermophiles.*Biochemical Society Transactions*; 32: 193-198.

Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L. yChengjiang, R. (2010). A critical review on the bioremoval of hazardous heavy metal from contaminated soil: Issues, progress, ecoenvironmental concerns and opportunities. *Journal Hazardous Materials;* 174:1-8.

Zavala, J. (2005). Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. Yucatán. México: UADY

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Anexo 1.

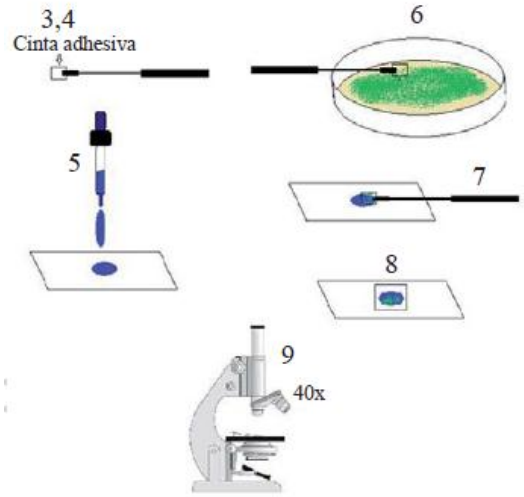
Tinción de azul algodón de lactofenol

Preparación de la coloración:

1. Colocar el material necesario en la campana de seguridad tipo 2A.
2. Seleccionar las colonias para realizar las improntas.
3. Cortar segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 cm^2
4. Pegar los segmentos de cinta en un asa micológica.
5. Poner una gota de azul de algodón en el portaobjetos.
6. Con el lado adhesivo de la cinta, tocar la parte superior de hongo.
7. Colocar la cinta sobre la gota de azul de algodón y poner otra gota de azul de algodón.
8. Poner un cubreobjetos sobre la preparación.
9. Observar en 40x (López y col., 2014).

www.bdigital.ula.ve

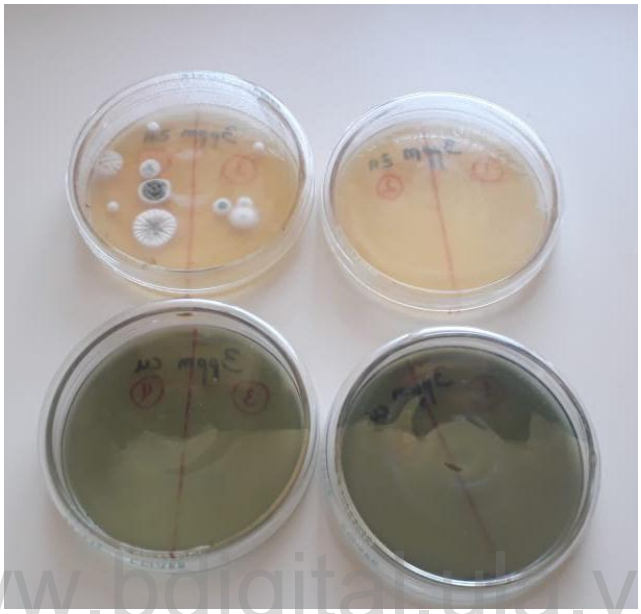
Representación esquemática de la preparación de la tinción con azul de lactofenol para hongos



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Anexo 2.

Crecimiento fúngico en placa con medio rico suplementado con $CuSO_4$a razón de 3mg/mL

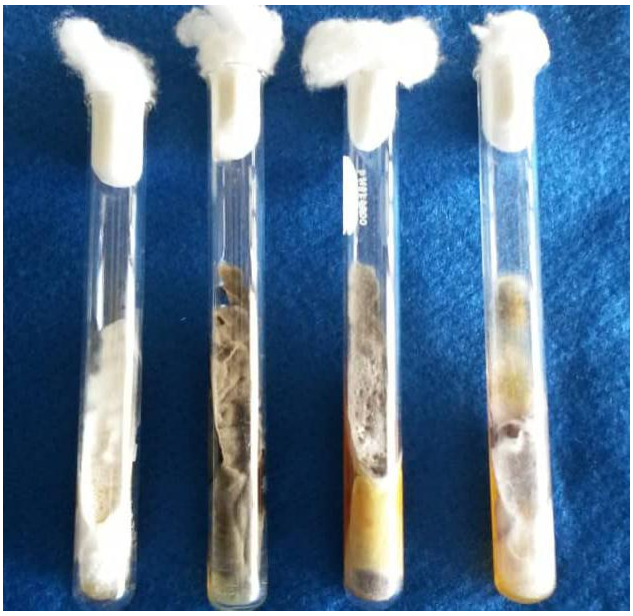


www.bdigital.ula.ve

Crecimiento fúngico en placa con medio rico, suplementada con $ZnSO_4$a razón de 3 mg/mL

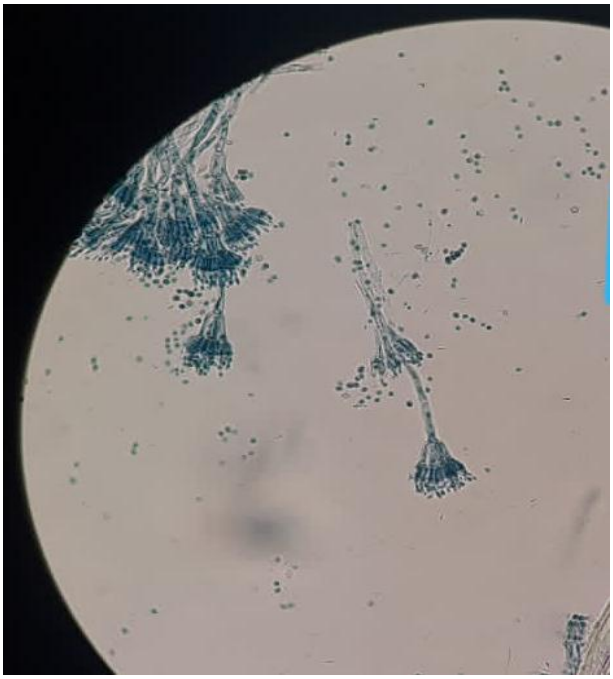
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Almacenamiento fúngico en cuñas con BHI



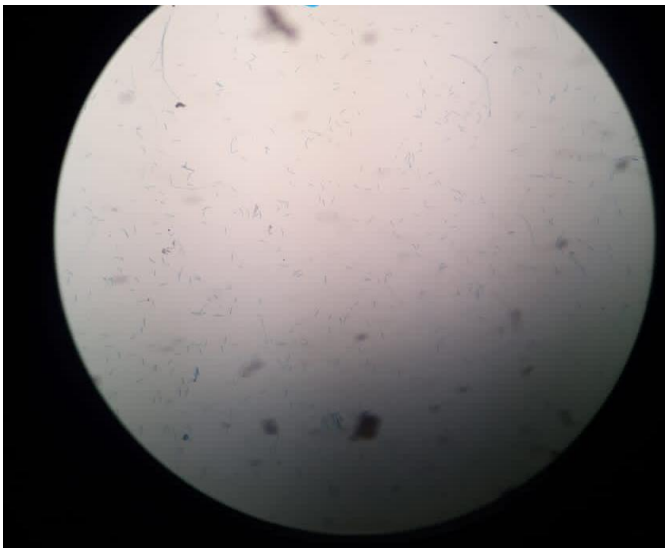
www.bdigital.ula.ve

Identificación microscópica de *Penicilliumsp*



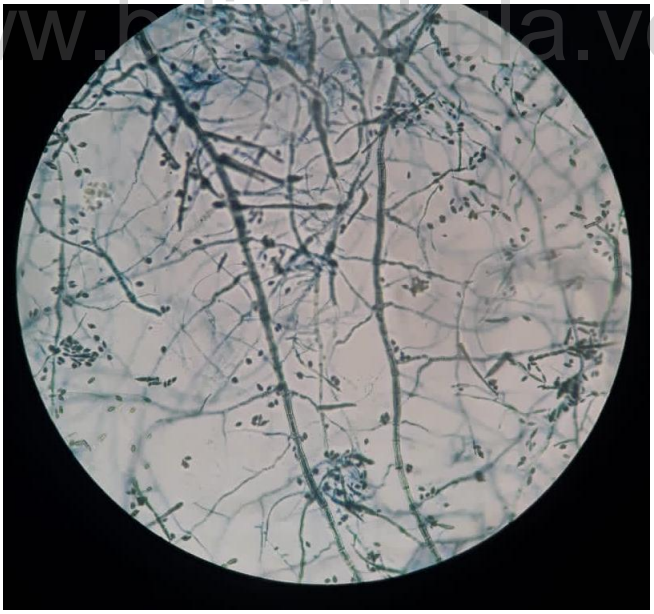
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Identificación microscópica de*Fusariumsp*



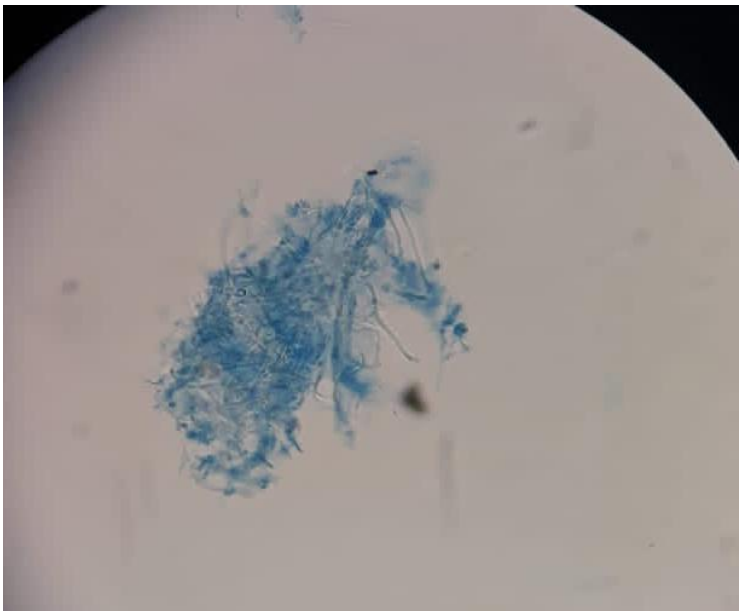
Identificación microscópica de*Hormodendrumsp*

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Identificación microscópica de *Scytalidium*



www.bdigital.ula.ve

Toma de muestra en la mina de bailadores

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)