

Universidad Autónoma de Chiriquí
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Escuela de Biología

**Aislamiento y caracterización de microorganismos con alta capacidad
para tolerar metales pesados procedentes de la actividad industrial**

Elaborado por:

Aura Chávez

4-748-452

Yoriel Morales Q

4-749-2281

**Trabajo de graduación para optar al título de
Licenciado en Tecnología Médica**

Asesores: Prof. Luis González

Prof. Marco Tem

Prof. Tamara Romero

David, Chiriquí

República de Panamá

2013

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres Rosa Quintero Lezcano y Darío Morales Guerra. A ustedes dos debo todo lo que soy y he querido ser. Porque fue gracias a su apoyo incondicional lo que me ha permitido salir adelante a través del estudio y el esfuerzo. Para ustedes todo mi amor y admiración, porque siempre creyeron en mí. A mis Padres las mejores palabras de la vida los quiero mucho este logro es de y por ustedes.

A mis hermanos Yorlenis, Albanis y Arelsi Morales, quiero decirles lo mucho que significan y lo importante que son en mi vida. Gracias por ser parte de ella.

Yoriel Morales Quintero

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado primeramente a Dios, por haberme dado salud para lograr mis objetivos y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

A mis padres, Lesbia Castillo y Miguel Chávez, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaron. Todo esto se lo debo a ustedes.

A mis hermanos, Miguel y Eduina Chávez, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mis abuelos, por quererme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

A mis amigos por el apoyo incondicional y por compartir los buenos y malos momentos.

Aura Chávez Castillo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecerle a Dios por la vida, por permitirnos llegar hasta dónde estamos y por las innumerables bendiciones que a nuestras vidas has regalado. A nuestras familias por el amor incondicional que siempre nos brindan.

A nuestros padres gracias por inculcarnos valores y ser un ejemplo para nosotros, por cuidarnos y en cada momento hacernos sentir especiales y por brindarnos ánimos para salir adelante y poder superarnos.

Al profesor Luis González, por aceptar el compromiso de ser nuestro asesor de tesis y a la vez, por brindarnos todos sus conocimientos y experiencias, así como algunos materiales para el desarrollo de esta investigación.

Al profesor Marco Tem, por brindarnos los conocimientos para la realización de la estadística de los datos de esta investigación, como también por sus consejos y por prácticas soluciones brindadas.

A la profesora Tamara Romero, por ser un ejemplo para nosotros y brindarnos su apoyo incondicional siempre.

De manera muy especial, agradecemos a la señora Dayra Rodríguez, por su atención, generosidad, amabilidad, ayuda prestada y por su colaboración en todo lo que necesitamos.

A nuestros compañeros de la carrera por el apoyo brindado en los momentos buenos y malos. Siempre serán importantes para nosotros.

A todos los profesores por brindarnos sus enseñanzas para formarnos como profesionales. Agradecemos a todas aquellas personas que colaboraron en el desarrollo de esta investigación.

Aura Chávez Castillo y Yoriel Morales Q.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	19
2. ANTECEDENTES.....	20
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	23
CAPÍTULO I	
4.1. JUSTIFICACIÓN.....	E
IMPORTANCIA.....	25
4.2. OBJETIVOS.....	27
CAPÍTULO II	
5. MARCO TEÓRICO.....	28
5.1. Contaminación.....	28
5.2. Suelos contaminados.....	30
5.3. Contaminación del agua.....	31
5.4. Metales pesados.....	31

5.5. Las bacterias y su capacidad de adaptación.....	34
------------------------------------------------------	----

5.6. Biorremediación.....	35
---------------------------	----

CAPÍTULO III

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
------------------------------	----

6.1. Área de estudio.....	39
---------------------------	----

6.2. Toma de muestra.....	41
---------------------------	----

6.3. Procesamiento de las muestras.....	42
-----------------------------------------	----

6.4. Aislamiento de las colonias.....	42
---------------------------------------	----

6.5. Identificación de los aislados.....	43
------------------------------------------	----

6.5.1. Bacterias.....	43
-----------------------	----

6.5.2. Método de identificación mediante paneles de MicroScan para bacterias.....	43
-----------------------------------------------------------------------------------	----

6.5.3. Hongos filamentosos y levaduras.....	45
---------------------------------------------	----

6.5.4. Método de identificación mediante paneles de MicroScan para levaduras.....	46
-----------------------------------------------------------------------------------	----

6.6. Método de difusión en pocillo.....	47
-----------------------------------------	----

6.7. Determinación de la CMI de Pb ⁺² , Cu ⁺² , Co ⁺² , Zn ⁺² , Mn ⁺⁷ y Ag ⁺¹	47
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

6.8. Análisis estadísticos.....	48
---------------------------------	----

CAPÍTULO IV

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
7.1. Determinación de los niveles de tolerancia de los microorganismos aislados a metales pesados, plomo (II), zinc (II), cobre (II), cobalto (III), plata (I), manganeso (VII).....	50
7.3. Determinación de la sensibilidad de los microorganismos a la plata Ag (I).....	52

CAPÍTULO V

8. CONCLUSIONES.....	59
9. RECOMENDACIONES.....	61

CAPÍTULO VI

10. BIBLIOGRAFÍA.....	62
11. ANEXOS.....	69
12. GLOSARIO.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AARG: L-Arginil-L -Arginina β -Naftilamida

AGAL: p-Nitrofenil- α -D-Glactopiranósido

AGL2: p-Nitrofenil- α -D-Glucopiranósido

Ag: plata

ALA: L-Alanina-4-Metoxi- β -Naftilamida

Al: aluminio

ARG: arginina

As: arsénico

BAC: bacitracina

BDF: p-Nitrofenil- β -D-Fucopiranósido

BHI: infusión de cerebro corazón

BNAC: control- β -naftilamida

° C: grados celsius

CC: cepa control

Cd: cadmio

CELL: p-Nitrofenil- β -D-Celobiosa

CET: ceftrimida

Cf 8: cefalotina

Cl 4: colistina

CMI: concentración mínima inhibitoria

Cm: centímetros

CO₂: dióxido de carbono

CV: violeta cristal

DCB: base descarboxilasa

Fd 64: nitrofurantoína

Fig: figura

g: gramos

GGLY: Glicilglicina- β -Naftilamida

GLAR: Glicil-L-Arginina- 4-Metoxi- β -Naftilamida

GLPR: Glicil-L-Prolina- 4-Metoxi- β -Naftilamida

GLU: glucosa

GLY: Glicina- β -Naftilamida

Hg: mercurio

HIS: L-Histidina- β -Naftilamida

H₂S: sulfuro de hidrógeno

HPR: Hidroxiprolina- β -Naftilamida

IDX: 3-Indoxil fosfato

ILE: L-Isoleucina- β -Naftilamida

K 4 : kanamicina

LYAL: L-Lisil-L-Alanina-4-Metoxi- β -Naftilamida

LYS: lisina

m: metros

mg.L -1: miligramos por litro

mL: mililitros

mm: milímetros

MS: análisis de micrococos

NACL: cloruro sódico

NAG: p-Nitrofenil-N-Acetil- β -D-Glucosamina

Na OH: hidróxido de sodio

NGAL: p-Nitrofenil-N-Acetil- β -D-Galactosaminida

Ni: níquel

NIT: nitrato

NOV: novobiocina

NPC: control nitrofenilo

ORN: ornitina

OPT: optoquina

P 4: penicilina

Pb: plomo

PEP: peptidasa

PRO: L-Prolina- β -Naftilamida

PYR: pirrolidonil- β -Naftilamida

SD: saboraud dextrosa

STY: L-Seril-L-Tirosina- β -Naftilamida

TDA: triptófano desaminasa

To 4: trobamicina

TYR: L-Tirosina- β -Naftilamida

UFC: unidad formadora de colonias

URE: urea

VP: voges-proskauer

%: porciento

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes de elementos tóxicos.....	29
Tabla 2. Elementos tóxicos en el ambiente.....	33
Tabla 3. Cepas colectadas en los distintos sitios de muestreos.....	49
Tabla 4. Diámetro del halo de inhibición en especies de levadura que no toleraron la plata Ag (I) en (mm).....	53
Tabla 5. Diámetro del halo de inhibición en especies de hongos sensibles a la plata Ag (I) en (mm).....	54
Tabla 6. Diámetro del halo de inhibición en especie de alga sensible a la plata Ag (I) en (mm).....	55
Tabla 7. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis entre los tipos de especies y la susceptibilidad.....	57
Tabla 8. Efecto de la concentración sobre la inhibición de las especies bacterianas.....	58

Tabla 9. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados en especies bacterianas.....69

Tabla 10. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados en especies de hongos.....70

Tabla 11. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados en especies de levaduras.....71

Tabla 12. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados en especies de algas.....71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa del Vertedero Municipal de David.....40
- Figura 2.** Talleres automotrices Electro y la Feria (David).....40
- Figura 3.**Taller Nuevo Canadá (David).....41
- Figura 4.** *Escherichia coli*. **A.** Panel de MicroScan reacciones bioquímicas.**B.** Colonias aisladas en agar Mac Conkey.**C.** Halos de sensibilidad a la plata.**D.** Tolerancia de metales pesados como el plomo, cobalto, zinc, manganeso y cobre.....72
- Figura 5.** *Pseudomona sp.* **A.** Panel de MicroScan reacciones bioquímicas.**B.**Colonias aisladas en agar Mac Conkey y reacción oxidasa positiva. **C.** Halos de sensibilidad a la plata. **D.** Tolerancia de metales pesados como el plomo, cobalto, zinc, manganeso y cobre.....74
- Figura 6.** *Candida paralopsis*. **A.** Panel de MicroScan para la identificación de levaduras mediante pruebas bioquímicas. **B.** Colonias de levadura cremosas de color blanco amarillento en agar Sabouraud. **C.** vista microscópica que muestra células redondas u ovaladas. Frotis fresco 100x. **D.** Halos de sensibilidad a la

Figura 7. *Prototheca* sp. **A.** Reacciones bioquímicas en el panel de MicroScan. **B.** Colonias de levadura en agar Sabouraud colonias suaves, húmedas de color blanco. **C.** Halos de sensibilidad a la plata. **D** Tolerancia de metales pesados como el plomo, cobalto, zinc, manganeso y cobre.....78

Figura 8. *Penicillium* sp. **A.** Colonias de crecimiento rápido, pulverulentas de color verde. **B** y **C.** vista microscópica que muestra conidióforos rectos, hialinos, con fialides que nacen sobre métulas. Azul de lacto fenol, 40x. **D.** halo de sensibilidad a la plata.....80

Figura 9. *Geotrichum* sp. **A.** Colonias blancas a beige, aterciopeladas, con el tiempo pueden tomar un aspecto veloso oscuro, radiado, plegado y húmedas. **B** y **C.** Vista microscópica hifas septadas, fragmentadas en artroconidias rectangulares, dispuestas una tras otra. Azul de lacto fenol, 40x, **D.** Halo de sensibilidad a la plata.....82

Figura 10: *Cladosporium* sp. **A.** Las colonias son de crecimiento lento, llegando a 3-4 cm diámetro, con un compacto de gamuza gusta superficie suave y son oliváceo a negro en color, **B.** Vista microscópica hifas gruesas, septadas, dematiáceas. Conidióforos indiferenciados. Conidias unicelulares, dematiáceas, en cadenas. Azul de lacto fenol, 40x, **C.** Tolerante a metales pesados como el plomo, zinc, cobalto, cobre, magnesio.....84

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1.Cepas colectadas en los distintos sitios de muestreos.....50

RESUMEN

Todos los organismos vivos están expuestos en la naturaleza a diversos metales pesados, principalmente los que están dispersos en formas de iones.

Estas formas ionizadas tienen una alta capacidad de producir diferentes efectos tóxicos en los microorganismos. Por el contrario, la exposición de las variedades microbianas a metales pesados que actúan de forma selectiva, generan una alta capacidad para tolerar los efectos nocivos generados por estos.

Mediante investigaciones científicas se han logrado identificar diversos mecanismos eficientes de resistencias en diferentes especies de bacterias, levaduras y hongos.

El estudio de las interacciones de los microorganismos y los metales puede ser útil para el entendimiento de las relaciones de los metales tóxicos con organismos superiores como mamíferos y plantas. Algunos sistemas microbianos de tolerancia a metales tienen el potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos, como la biorremediación de la contaminación ambiental por metales tóxicos, o la recuperación de metales valiosos.

Por lo que el propósito principal de este trabajo de investigación fue dirigido a identificar las principales especies de microorganismos provenientes de agua y suelos contaminados con metales pesados, para determinar la capacidad de tolerancia.

Las cepas fueron aisladas a partir de muestras de suelo y agua contaminadas provenientes del Vertedero Municipal de David y 3 talleres automotrices. Estos suelos y aguas han sido sometidos a derrames de residuos generados por la deposición de basura y derrames de hidrocarburos.

Se obtuvo como resultado que las 54 cepas aisladas presentaron multirresistencia a la mayoría de los metales pesados a los que fueron expuesto. Logrando tolerar concentraciones mayores a 3800 mg.L-1 de plomo, zinc, cobalto, manganeso y cobre. A su vez, se demostró la incapacidad de estos microorganismos de poseer un mecanismo de resistencia cuando están expuestas a iones de plata, los cuales no pudieron tolerar a concentraciones superiores a 475 mg.L-1 de este metal. Se concluye que a partir de los datos obtenidos se abren las puertas a futuras investigaciones que permitirán la generación de nuevos conocimientos con el fin de mejorar las condiciones ambientales.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de aguas y suelos por metales pesados es un problema ambiental cada vez mayor, incluso cuando están presentes en pequeñas cantidades, debido a la persistencia y al fenómeno de bioacumulación. El concepto de bioacumulación se refiere a la acumulación de contaminantes en los organismos y el índice de bioacumulación se expresa por la relación entre la cantidad de un contaminante en el organismo y la concentración de ese contaminante en el suelo. (Hudson, 2006).

Aproximadamente el 10% de la basura está compuesta de metales. Uno de los problemas más serios de las sociedades modernas es cómo deshacerse de este volumen de basuras. Las dos alternativas son enterrar o incinerar. El enterramiento puede contaminar las aguas subterráneas, mientras que la incineración puede contaminar la atmósfera al liberar algunos de los metales volátiles (Valdés, 2005).

La biotecnología ofrece nuevas posibilidades para eliminar iones metálicos, empleando la capacidad que tiene diferentes bacterias y otros microorganismos de captar cationes, a este proceso se llama biosorción de metales. Frente a las tecnologías tradicionales, la biosorción se presenta como una alternativa eficiente y de bajo costo, especialmente a bajas concentraciones (Muñoz *et al* 2012).

2. ANTECEDENTES

Un problema creciente mundial son las descargas de grandes cantidades de metales pesados directamente a los medios acuáticos y sistemas sanitarios, problema que se ha incrementado por el crecimiento demográfico e industrial. Elementos metálicos tales como arsénico, mercurio, cadmio, cromo, níquel, zinc, cobre, plomo y otros, son peligrosos para el medio ambiente debido a sus efectos tóxicos. La pirámide alimentaria los recibe como consecuencia de la actividad humana. A diferencia de los compuestos orgánicos, los metales no son biodegradables, trayendo como consecuencia su acumulación en la naturaleza y como en la cúspide de la pirámide se encuentra el hombre, este es quien recibe los metales de forma preconcentrada (Volesky, 1999).

Existe un variado número de métodos químicos para la eliminación de metales pesados contaminantes de medios líquidos. Estos incluyen: precipitación, evaporación, intercambio iónico, tratamiento electroquímico y tecnologías de membrana. Estos procesos suelen ser costosos e inefectivos, especialmente cuando se aplican en ambientes con concentraciones de metales por debajo de 100 mgL⁻¹ (Zhou, 1991).

Los métodos biológicos son más eficientes, rápidos y económicos que los métodos químicos y pueden ser aplicados a sistemas con bajas concentraciones de metales. Los métodos biológicos minimizan la generación de desechos tóxicos

y permiten la recuperación del metal, lo que significa un ahorro económico (Wase, 1997).

A pesar de la toxicidad, en la naturaleza existen organismos que tienen la capacidad de crecer en medios que contienen contaminantes peligrosos, de transformarlos en sustancias menos tóxicas e incluso de acumularlas dentro de sus células, ello permite disminuir la concentración del contaminante en el medio (Peña, 2001).

El empleo de los niveles de resistencia bacteriana a metales como bioindicadores del efecto de la contaminación metálica a corto y medio plazo sobre las comunidades biológicas del suelo se ha descrito ampliamente (Barkay, 1988; Burton *et al.*, 1987). La biorremediación consiste en emplear microorganismos y manipular sus actividades metabólicas, para eliminar los contaminantes o al menos convertirlos en especies químicas menos agresivas, minimizando el compromiso ambiental y facilitando la continuidad de los procesos biodegradativos enzimáticos responsables de la acción autodepurativa del ambiente (Peña, 2001).

De los metales pesados biológicamente relevantes se consideran que el arsénico (As), plata (Ag), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) tienen una actividad biológica muy limitada por lo que son considerados básicamente como contaminantes tóxicos (He *et al.*, 2005).

Estudios anteriores sobre el contenido de plomo en muestras de orina de una población en Panamá y estudios sobre la determinación de plomo en sangre en

niños menores de 10 años en dos sitios (La escuela San Antonio del Distrito de San Miguelito y la Escuela Tomás Gabriel Altamirano Duque del Distrito de Chepo), indican el grado de contaminación con metales pesados y la necesidad de realizar investigaciones sobre las nuevas tecnologías para remediar ambientes contaminados (Guerra, 1984).

En el Golfo de México, especialmente en la Laguna de Campeche, Tamaulipas, Tabasco y Veracruz; se han encontrado concentraciones elevadas de algunos metales como: plomo, cromo, níquel, zinc, cadmio y cobre (Botello *et al.*, 1998), lo que ha conducido a un deterioro de los recursos acuíferos en la medida que la población ha crecido.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En la provincia de Chiriquí hay una urgente necesidad de reducir los crecientes daños producidos por la contaminación industrial con metales, sin embargo, aún no se ha concretado una estrategia integral para controlar los principales contaminantes atmosféricos.

A diario se observa en cualquier punto del distrito de David gran cantidad de chatarras a orillas de la interamericana y en las riberas de los ríos; desechos que emanan de los hospitales y que desembocan en las quebradas que pasan por la parte trasera de los mismos; las malas condiciones de los vertederos; la erosión de los suelos; el humo que despiden los medios de transporte viejos, entre otros.

Los vertederos urbanos suelen estar formados por desechos de papel, vidrio, metal, madera, etc., siendo su composición 55-65% doméstico y 35-45% comercial en los cuales se depositan de forma esporádica y furtiva, materiales tóxicos y peligrosos altamente contaminantes. En algunos casos se ha detectado la presencia de metales pesados como mercurio (Hg), cromo (Cr), níquel (Ni), plomo (Pb), aluminio (Al), cadmio (Cd), zinc (Zn), pinturas y amalgamas dentales, debido a vertidos no controlados (Daughton, 2001).

También aunado a esto la gran mayoría de los talleres mecánicos, no están regularizados debido a que descargan aceites con metales pesados y residuos

peligrosos a los alcantarillados, lo que genera un grave problema de contaminación al medio ambiente.

Recientemente, se ha establecido bien el potencial de adaptación de algunos microorganismos en zonas contaminadas con metales pesados, y el uso de su biomasa viva y/o muerta para tratar de eliminarlos de los diferentes nichos acuáticos contaminados (Cañizares, 2000).

Cervantes *et al.*, (1990) reporta el aislamiento de microorganismos resistentes a metales pesados procedentes de ambientes contaminados como los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus*.

CAPÍTULO I

4.1. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Algunos microorganismos son capaces de resistir y reproducirse en ambientes con elevados contenidos de metales pesados. Esta capacidad puede ser aprovechada por el hombre para el desarrollo de procesos biotecnológicos y constituyen en la actualidad un reto para la comunidad científica, en su intento de mitigar al máximo el impacto ambiental que ocasionan los metales pesados (Volesky, 1999).

En algunas partes de Panamá, principalmente en la Zona del Canal, el desarrollo industrial y el manejo inadecuado de los residuos que contienen metales pesados, ha generado una problemática muy grave, por ende es necesario investigar la capacidad de microorganismos de tolerar concentraciones elevadas de metales pesados y utilizar estas características para futuros proyectos de biorremediación de sitios altamente contaminados con estos elementos (Garcias, 2002).

Nuestra propuesta radica en generar datos sobre la efectividad del empleo de los niveles de resistencia bacteriana a metales como bioindicadores de la capacidad de remoción de los mismos. Además, de su utilización como elementos determinantes para la selección de cepas con capacidad biorremediadora.

El impacto socioeconómico y ambiental de este proyecto se podrá constatar al implementar las posibles tecnologías de biorremediación que serán probadas en futuras investigaciones. Al aislar y caracterizar microorganismos capaces de acumular y degradar metales pesados y su posible utilización en la remoción de estos de diferentes ecosistemas, nos abre las puertas a una nueva era de manejo

de desechos potencialmente peligrosos y la posibilidad que permitan reducir la contaminación ambiental por desechos sólidos en un porcentaje considerable de la generación actual.

Con el desarrollo de esta investigación se establecerá una colección microbiana autóctona con valor académico y de investigación con potencialidad de uso en el campo de la interacción microorganismo – metal.

El proyecto beneficiará primeramente a los habitantes de la ciudad de David por la reducción de la contaminación ambiental y los riesgos de enfermedades asociados a la exposición con metales pesados y luego a toda la población del país.

4.2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la resistencia y posible capacidad de microorganismos de remover metales pesados de ambientes contaminados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⇒ Aislar microorganismos de diferentes sitios con contaminación aparente por metales pesados.
- ⇒ Determinar la susceptibilidad de los microorganismos aislados a seis sales de metales pesados, mediante el método de difusión en pocillo.
- ⇒ Establecer los patrones de susceptibilidad y resistencia (resistotipos) que pudieran presentarse.

CAPÍTULO II

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Contaminación

Las actividades industriales generan diariamente distintos productos que por descuido y mal manejo de ellos, trae como consecuencia una acumulación de estos, provocando daños al ambiente y a la salud.

Una sustancia tóxica, es un componente que se encuentra en cantidades mayores a lo que el ambiente tiene capacidad de controlar; su definición está relacionada con aspectos que involucran dosis y tiempo.

Tanto los compuestos químicos naturales como sintéticos, traen consigo problemas de contaminación. Según Peterle (1991), existen varios tipos de contaminantes:

1. Compuestos químicos naturales, los cuales se encuentran naturalmente en la tierra; nitritos, nitratos, elementos como metales pesados y minerales. Muchos compuestos inorgánicos, como los metales pesados, pueden acumularse en las plantas u otros organismos, trayendo consigo efectos tóxicos en animales y humanos.
2. Toxinas naturales de plantas y hongos, como aflotoxinas.
3. Mezclas orgánicas e inorgánicas en el aire, agua y sustancias volátiles.
4. Compuestos químicos sintéticos como los utilizados en la agricultura: pesticidas, aditivos alimenticios y compuestos químicos industriales.

Tabla 1. Fuentes de elementos tóxicos

Elemento/Compuesto	Fuente
Arsénico	Minería, fundidora, pesticidas
Asbestos	Industria, cartón de yeso, aislamiento
Bario	Pruebas clínicas y pruebas de radiación
Berilio	Industria, naturaleza
Cadmio	Industria, minería y pesticidas
Cromo	Industria
Cobre	Industria
Plomo	Minería, industria automovilística
Manganeso	Minería
Mercurio	Minería, fuentes naturales
Níquel	Minería, polvo de óxido
Selenio	Descargas agrícolas y minería
Zinc	Industria

(Datos obtenidos de Peterle, 1991).

5.2. Suelos contaminados

En síntesis, un suelo contaminado es aquel que representa una amenaza para la salud humana y el medio ambiente, debido a las sustancias presentes en o bajo el suelo, generalmente debido a un mal uso previo. Además se puede decir que un sitio contaminado es "aquel con presencia de componentes que no son atribuibles a la condición natural del sitio". (Volke *et al.*, 2002).

La introducción de contaminantes o material exógeno al suelo puede traducirse en un daño o pérdida de algunas o varias de las funciones antes mencionadas, repercutiendo directamente en la calidad del suelo y su función. Además no solo perjudica al suelo, sino también puede tener implicancias en aguas superficiales y subterráneas al ser arrastrados los contaminantes de ese lugar ya sea por medio de lluvias o simple infiltración. (Volke *et al.*, 2002).

Además, la presencia de contaminantes por sobre ciertos niveles implica múltiples consecuencias negativas para la cadena alimenticia y por lo tanto para la salud humana. Existe también un efecto estético de la contaminación, más allá de la pérdida de capacidad de soporte al crecimiento vegetal, que impacta negativamente sobre el valor económico, debido a que el uso que se le dará a este suelo está restringido a la capacidad de éste, y si está contaminado, su calidad y por tanto capacidad, se ve disminuida. (Volke *et al.*, 2002).

La contaminación de suelos donde se desarrollan actividades industriales, agrícolas y humanas en general, es consecuencia directa de una inadecuada utilización del mismo. (Volke *et al.*, 2002).

5.3. Contaminación del agua

La contaminación del agua es la adición de sustancias extrañas que se diluyen o filtran y producen un cambio que impiden su uso como recurso. Las aguas contaminadas se depositan en los llamados cuerpos de agua (ríos, cuencas, cauces, aguas marinas, etc.) y provocan la degradación de sus condiciones naturales con el consiguiente riesgo para la salud y el bienestar de la población (Félix y Sevilla, 2003).

El agua disuelve lo soluble, diluye lo tóxico, desplaza todo aquello que flota y disimula lo que se hunde; por ello se emplea para eliminar cuanto molesta en el hogar, la industria, comercio, oficinas, etc., y se transforma en agua residual (Félix y Sevilla, 2003).

El indiscriminado uso del agua por las industrias, de las cuales la mayoría, necesitan grandes cantidades de agua limpia en sus procesos de producción; trae consigo la contaminación del vital líquido.

Muchos de los contaminantes encontrados en la atmósfera o el suelo también se pueden hallar en el agua. Entre los venenos que pueden contaminar el agua están los metales pesados, como el arsénico (que procede de muchos tipos de insecticidas), el cadmio (plantas eléctricas), cromatos (procesos industriales), mercurio (producción de fertilizantes y otros), cianuro, selenio, cobre, cinc, plomo. (Félix y Sevilla, 2003).

5.4. Metales pesados

Todos los materiales que nos rodean, incluyendo a los seres vivos, están constituidos de átomos derivados de los elementos químicos presentes en la

naturaleza. De aquí se derivan los esenciales para la vida; encontrando en mayor proporción los siguientes: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); y en proporción menor al calcio (Ca), hierro (Fe), cobre (Cu) y aluminio (Al).

Junto a ellos hay otros elementos que, aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por orígenes y comportamientos tóxicos asociados; es este el caso de arsénico (As), boro (B), bario (Ba) y selenio (Se).

De acuerdo a los requerimientos en la célula, los metales pesados se clasifican en dos grupos:

- Oligoelementos o micronutrientes. Necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen As, B, cobalto (Co), cromo (Cr), Cu, molibdeno (Mo), manganeso (Mn), níquel (Ni), Se y zinc (Zn).
- Sin función biológica conocida. Son altamente tóxicos, e incluyen Ba, Cd, mercurio (Hg), plomo (Pb), antimonio (Sb), bismuto (Bi). (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007).

Sin embargo aunque los metales están presentes naturalmente en el medio ambiente, las aportaciones más importantes de estos al medio, especialmente a suelo son causadas por actividades antropogénicas, como actividades industriales y prácticas agrícolas; abono con residuos urbanos, aguas residuales, residuos ganaderos productos fitosanitarios. (Pomares, 1998).

Gran parte de los ríos ricos en metales pesados, están relacionados con descargas de aguas contaminadas provenientes de minas, o bien, descargas de desechos viejos contaminados. (Mance, 1987). Otra de las principales fuentes de

descarga de metales son las aguas de desechos industriales; así mismo como aguas que provienen de la salida de vertederos urbanos de basura sólida.

Es muy frecuente que el agua proveniente de estas fuentes, sea utilizada para riego de campos agrícolas, con lo que se logra una posterior contaminación de estos suelos.

Según Peterle (1991), existen 14 elementos de los que se tiene gran preocupación debido a su toxicidad y disponibilidad en el ambiente. Estos incluyen arsénico, boro, cromo, cobalto, cobre, níquel, aluminio y vanadio; además del antimonio, berilio, cadmio, plomo, mercurio y selenio que son considerados elementos con mayor toxicidad.

Tabla 2. Elementos tóxicos en el ambiente

	No críticos		Altamente tóxicos y muy accesibles				Tóxicos, pero poco disponibles o insolubles		
Na	C	F	Be	As	Au	Ti	Ga	Hf	
K	P	Li	Co	Se	Hg	La	Zr	Os	
Mg	Fe	Rb	Ni	Te	Cu	W	Rh	Nb	
Ca	S	Sr	Pd	Pb	Zn	Ir	Ta	Ru	
H	Cl	Al	Ag	Bi	Sn	Re	Ba		
O	Br	Si	Cd	Sb	Pt				
N									

(Datos obtenidos de Peterle, 1991).

El registro continuo mediante monitoreo de estos elementos, ayuda a obtener información respecto a una amenaza de alarma en efectos tóxicos provocados por distintos ecosistemas; así como áreas de impacto y distintos sitios donde las concentraciones comienzan a ser elevadas, con el fin de prevenir daños irreversibles en el medio ambiente.

5.5. Las Bacterias y su capacidad de adaptación

La creciente preocupación de la contaminación ambiental, ha dado como resultado un aumento en la investigación y el desarrollo de tecnologías sustentables, así como una normativa cada vez más estricta. Como resultado, la introducción de tecnologías limpias en los procesos industriales ha logrado disminuir las descargas de sustancias contaminantes al medio ambiente (Reyes *et al.*, 2006).

A partir de la década de los ochentas se empezaron a demostrar las capacidades que tienen varios microorganismos para remover grandes cantidades de metales pesados de efluentes líquidos. Estas capacidades han sido estudiadas con la finalidad de desarrollar nuevos sistemas de tratamiento que puedan reemplazar de una manera eficiente a los métodos de tratamiento convencionales. (Waste y Forester, 1997).

Las bacterias se encuentran en el ambiente en exposición permanente con los metales, unos buenos y otros malos (esenciales y tóxicos). Las cantidades de metales pesados presentes en ciertos sitios pueden ser tan elevadas que no permiten la subsistencia de ningún ser vivo. Esto ha forzado a los microorganismos, a desarrollar estrategias variadas y eficientes para resistir la toxicidad de los metales nocivos (Cervantes, 2006).

Un solo mecanismo de resistencia quizá no sea suficiente para la supervivencia microbiana en entornos hostiles. Es común entonces encontrar bacterias que combinan más de una estrategia de defensa, entre estas estrategias (Cervantes, 2006) menciona tres; la primera, en donde las células, para tolerar la presencia de metales los transforman en formas menos tóxicas, no se pretende decir que esta transformación sea de un metal a otro, los microorganismos aprovechan que algunos metales existen en distintas formas, o especies químicas es decir como iones con carga positiva o forma metálica carente de carga, la cual es menos reactiva y tóxica, algunas veces inocua. No obstante, algunos metales dañinos, como se comentó antes, comparten propiedades químicas con los metales esenciales, como su tamaño o sus cargas eléctricas.

Otra estrategia que menciona consiste en emplear el sistema de transporte de la membrana para expulsar los compuestos tóxicos, impidiendo dañar los compuestos celulares.

La última que menciona es la producción de compuestos químicos por parte de las bacterias, que atrapan los metales intrusos. En esta técnica se emplea el principio en el que cargas opuestas se atraen.

5.6. Biorremediación

La remediación de sitios contaminados con metales, puede realizarse a través de métodos fisicoquímicos, térmicos y/o biológicos.

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos

inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía (Van Deuren *et al.*, 1997).

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y tolerantes a los metales. Los primeros, se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, e inducidos por la presencia de un metal; los microorganismos tolerantes, son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Ambos tipos de microorganismos son de particular interés como captores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes de una matriz contaminada. (Volesky y Holan, 1995).

En el proceso de biorremediación, existen distintos objetivos a evaluar:

- Se busca evitar un efecto nocivo a largo plazo a otros organismos así como a recursos naturales.
- Se busca recuperar el equilibrio ecológico existente en el medio ambiente.
- Se busca lograr que la zona contaminada, con un posterior tratamiento mediante dichos procesos biológicos, puede ser reutilizada con fines recreativos o productivos.

Para ello no solo se propone el aislamiento físico de la zona en estudio que pueda provocar daños a distintas especies, además se espera lograra la corrección del efecto contaminante (Bonetto y López, 2001).

Según Bonetto y López (2001), además de metabolizar y degradar compuestos orgánicos, los microorganismos tienen la capacidad de absorber compuestos

inorgánicos tóxicos, inmovilizándolos, así como de inhibir o catalizar diversas reacciones redox.

Según Vance (2002), existen distintas técnicas de inmovilización de metales pesados entre los que se encuentran:

1. Activas.

Este tipo de mecanismos opera directamente con el metal.

a. Precipitación. Como ejemplo, puede haber formación de sulfuros insolubles de ciertos metales, a partir de metales solubles, precipitando dichos sulfuros.

b. Acumulación intracelular. En este proceso ocurren dos pasos: primero existe una unión pasiva de los iones metálicos a la superficie de la pared celular por procesos físicos o químicos. Posteriormente estos iones son transportados al interior de la célula por sistemas energéticos microbianos.

c. Oxidación y reducción. Existen distintas reacciones redox de metales que son mediados por microorganismos.

2) pasivas.

a. Formación de quelatos extracelulares. La formación de quelatos ocurre a parte de interacciones de metales con polímeros extracelulares, como pueden ser proteínas y ácidos nucleicos, que son excretados por las bacterias o bien de materia orgánica acumulada a partir de microorganismos muertos.

Las bacterias autóctonas pueden ser estimuladas para producción de polisacáridos extracelulares.

b.Biosorción a la superficie celular. Uno de los mecanismos se lleva a cabo por reacciones de intercambio iónico con peptidoglicanos y ácidos teicoicos, que son componentes bioquímicos importantes de la pared celular. Las bacterias Gram +, especialmente especies del género Bacillus, tienen una alta capacidad de adsorción debido a la concentración tan alta de peptidoglicano y ácidos teicoicos existentes en su pared celular. Debido al bajo contenido de estos componentes en las paredes celulares de las bacterias Gram -, exhiben poca capacidad de adsorción metálica.

c.Destrucción de complejos ligandos. Algunos metales que están asociados con procesos de minería e industrias nucleares, son secretados al medio ambiente como complejos con ligandos orgánicos. Estos pueden ser biodegradados, destruyendo los ligandos e inmovilizando el metal.

CAPÍTULO III

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

El presente estudio se realizó en el distrito de David, el cual tiene una población de 120,000 habitantes (MINSA, 2008) y está situada sobre una planicie costera, llamada la Llanura de Chiriquí, en las coordenadas 8° 26' 0" N, 82° 26' 0" O (Google maps, 2012).

El clima del área en estudio, según la clasificación de Koppen, es el tropical húmedo, con una estación seca (diciembre a abril) y una lluviosa (abril a diciembre) con una temperatura promedio anual de 31 °C durante el día y 26 °C durante la noche.

El muestreo se realizó de septiembre a noviembre; con una sola visita al mes para coleccionar una muestra de agua y dos de suelo en las siguientes localidades:

- Vertedero Municipal de David (Fig.1).

- Talleres automotrices
 - Taller Electro y taller la Feria (Fig.2).

 - Taller Nuevo Canadá (Fig.3).

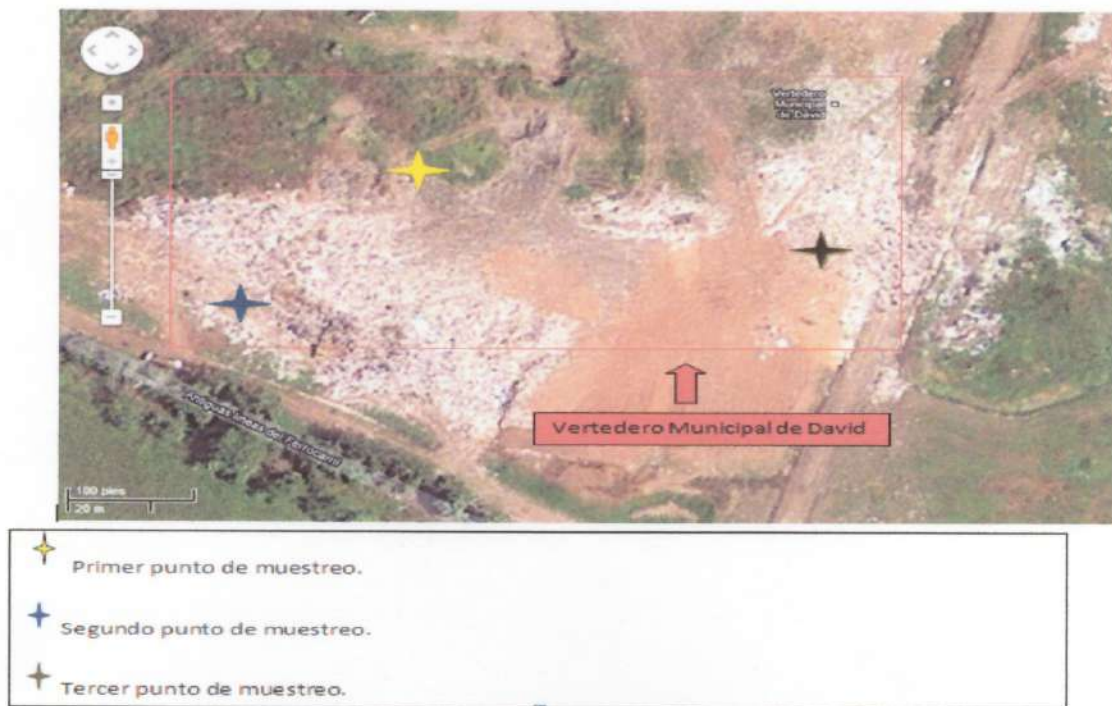


Figura 1. Mapa del Vertedero Municipal de David. (Fuente: Google Maps, 2012).

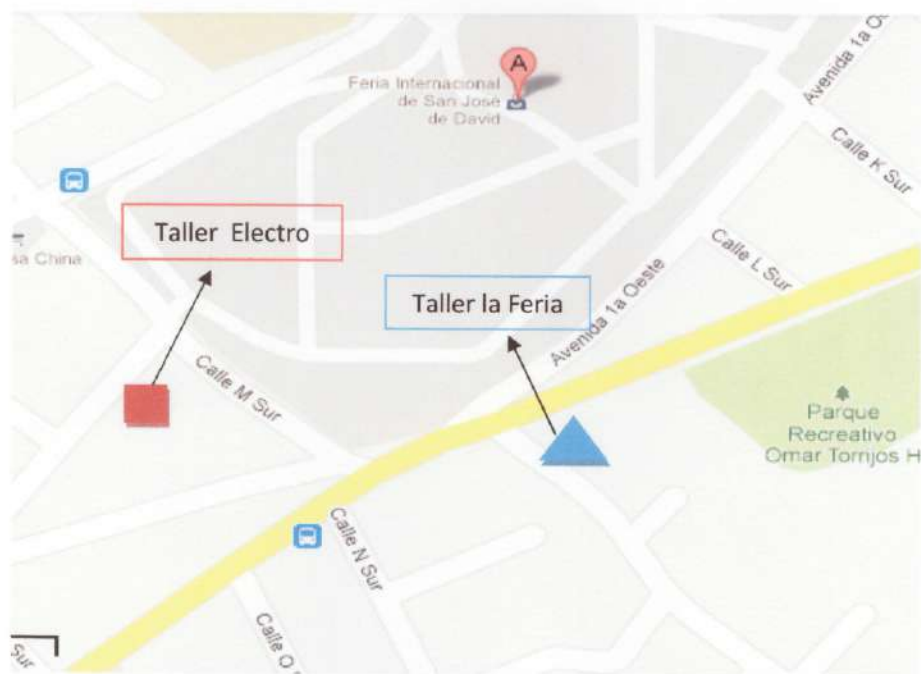


Figura 2. Talleres automotrices Electro y La Feria (David). (Fuente: Google Maps, 2012). Editado por: Aura Chávez.

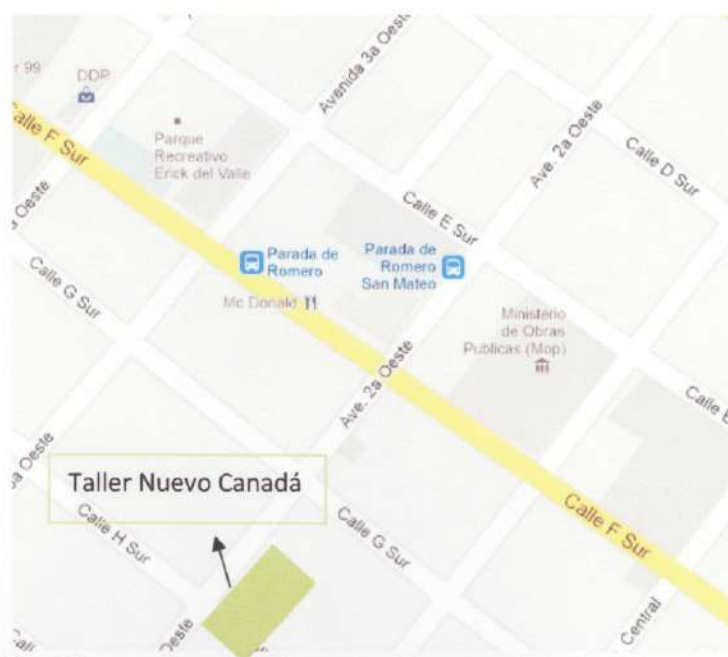


Figura 3. Taller Nuevo Canadá (David). (Fuente: Google Maps, 2012). Editado por: Aura Chávez.

6.2. Toma de muestra

En cada lugar de muestreo se delimitaron 3 triángulos (2.5 m x 2.5 m), seleccionados en puntos específicos de forma que estuvieran cerca de las fuentes de contaminación con metales. Por cada triángulo se tomaron asépticamente 3 submuestras (vértices y centro), en los 2 primeros se tomaron muestras de suelo utilizando un barreno de torsión a una profundidad aproximada de 15 cm y en el tercero se tomaron muestras de agua utilizando envases estériles de 100 mL. De cada submuestra de suelo aproximadamente 500 g fueron depositados en bolsas plásticas resellables estériles, debidamente rotuladas (fecha y número de cuadrante). El total de muestras de suelo en un evento de muestreo fue de 12 y de agua fue de 6.

6.3. Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron procesadas antes de 24 horas, de acuerdo a las normas internacionales (ISO 10381-1).

Cada muestra fue sembrada por triplicado en tubos que contenían 3 mL de caldo de infusión de Cerebro Corazón (BHI), tomando para ello aproximadamente 2 g de suelo y 2 mL de agua, se incubaron durante 24 horas a 35- 37 °C y se procedió con un asa estéril y previa flameada del tubo a sembrarlas en agar Sangre/Mac Conkey y Sabouraud incubándolas nuevamente a 24 horas de 35- 37 °C.

6.4. Aislamiento de las colonias

Posteriormente al crecimiento de los microorganismos en los medios de agar mencionados, se procedió al aislamiento de las colonias mediante el método de agotamiento que consiste en desplazar el asa por los medios de agar Sangre/Mac Conkey para bacterias y Sabouraud Dextrosa para hongos, levaduras y algas, haciendo un movimiento en forma de zeta desde un borde de la placa hacia el opuesto y cuando se llega al centro de la placa, se levanta el asa y se repite el movimiento empezando por el otro extremo de la misma.

Cada colonia se sembró por triplicado en cada medio selectivo con un asa estéril y previa flameada entre cada siembra. Los cultivos de bacterias se incubaron 24 horas a 35-37 °C y los hongos se incubaron a temperatura ambiente, durante 8 - 10 días.

6.5. Identificación de los aislados

6.5.1. Bacterias

La identificación de los aislados de bacterias se realizó atendiendo las características macroscópicas de las colonias, así como por tinción de Gram y mediante baterías de identificación del panel CIM/Combo de MicroScan tanto para las bacterias Gram positivas y Gram negativas .

6.5.2. Método de identificación mediante paneles de MicroScan® para bacterias

1) Preparación de la suspensión: Se debe mantener el tubo de inoculación del sistema Prompt, perpendicular a la superficie del agar y tocar tres colonias aisladas grandes o más grandes que la punta del tubito. Se retira el collar y se coloca el tubito de inoculación en la botella del sistema Prompt luego de haber desprendido el tapón de la botella. Se agita vigorosamente la botella para crear una suspensión de bacterias en los 30 mL de Pluronic-D acuosa estabilizada. (Siemens, 2006).

2) Rehidratación de los paneles: Con una micropipeta se añade a cada pocillo del panel de identificación 100 µL de la suspensión de Pluronic-D acuosa estabilizada. Debe lograrse una concentración final en pocillo de $3-7 \times 10^5$ UFC/mL. (Siemens, 2006).

3) Cubiertas bioquímicas para pocillos: Se recubre los pocillos GLU, URE, H₂S, LYS, ARG, ORN y DCB con 3 gotas de aceite mineral, en los paneles para Gram negativos. (Siemens, 2008). Los pocillos ARG y URE se recubren con 3 gotas de

aceite mineral, en los paneles para Gram positivos. (Estos pocillos aparecen subrayados en el panel). El medio de los pocillos debe cubrirse completamente con aceite mineral, pero el aceite no debe rebasar los pocillos en sí. (Siemens, 2009).

4) Incubación: Para asegurar una distribución homogénea durante la incubación, se apilan los paneles en grupos de 3 a 5. Coloque una tapa limpia en la parte superior de cada grupo de paneles para evitar la evaporación. (Siemens, 2008).

5) Lectura de los paneles Gram negativos: Al cabo de 16 a 20 horas de incubación a 37 °C, se extraen los paneles de la incubadora. Antes de la lectura, añada los reactivos de la siguiente manera:

- Añada 1 gota del reactivo VP1 (hidróxido potásico 40%) y después una gota del reactivo VP2 (alfa-naftol 5%) al pocillo VP. Espere al menos 20 minutos para que se desarrolle la reacción VP.
- Añada 1 gota del reactivo TDA (cloruro férrico 10%) al pocillo TDA. El color se desarrollará inmediatamente.
- Añada 3 gotas del reactivo IND (Kovac) al pocillo IND. El color se desarrollará inmediatamente.
- Para todos los no fermentadores de CC y clínicos, añada 1 gota de NIT1 (ácido sulfanílico 0.8%), seguida de 1 gota de NIT2 (N, N-dimetil-alfa-naftilamina 0.5%) al pocillo NIT. Espere al menos 5 minutos antes de leer, para que se desarrolle la reacción NIT.

Leer todos los sustratos de identificación usando un fondo blanco, excepto la CET y los antimicrobianos usados para la identificación (Cl4, Cf8, P4, K4, Fd64, To4), los cuales deben leerse usando un fondo negro (luz indirecta). (Siemens, 2008).

6) Lectura de los paneles Gram positivos: Al cabo de 16 a 20 horas de incubación a 37 °C, se extraen los paneles de la incubadora. Antes de la lectura, añada los reactivos de la siguiente manera:

- Agregar 1 gota del reactivo VP1 (hidróxido potásico 40%) y después una gota del reactivo VP2 (alfa-naftol 5%) al pocillo VP. Espere al menos 20 minutos para que se desarrolle la reacción VP.
- Agregar 1 gota de NIT1 (ácido sulfanílico 0.8%) y 1 gota de NIT2 (N, N-dimetil-alfa-naftilamina 0.5%) al pocillo NIT. Espere al menos 5 minutos antes de leer, para que se desarrolle la reacción NIT.
- Agregar 2 gotas de PEP (peptidasa) al pocillo de PYR. Esperar 2 minutos antes de la lectura.

Leer todos los sustratos de identificación usando un fondo blanco, excepto la CV, MS, NOV, OPT, NACL y BAC, que sólo deben leerse frente a un fondo negro (iluminado indirectamente). (Siemens, 2009).

6.5.3. Hongos filamentosos y levaduras

La ubicación taxonómica de los hongos se basa en la caracterización de los aislados según características macroscópicas de las colonias. Se prepararon montajes en azul de lactofenol y se realizaron microcultivos para definir las características de hifas, esporas y estructuras especializadas de las cepas. Posteriormente se consultaron los manuales de identificación (Barnett, 1999). Las levaduras se identificaron también por las características culturales, morfológicas, presencia de cápsulas, pruebas bioquímicas (Barnett, 2000) y mediante baterías de identificación del panel CIM/Combo de MicroScan para las levaduras.

6.5.4. Método de identificación mediante paneles de MicroScan® para levaduras.

1) Preparación del inóculo: Sacar una muestra de la placa de agar con un hisopo y emulsionar en 3 mL de agua para inóculo (agua desionizada esterilizada en un tubo de 13x 84 mm). Cada suspensión debe compararse y ser equivalente al patrón de turbidez de levaduras de MicroScan luego se mezcla la suspensión hasta que sea homogénea (Siemens, 2008).

2) Inoculación del panel: Se añade 50 µL de suspensión de levaduras en cada pocillo que contenga sustrato y en los pocillos control BNAC (control β-naftilamida) y NPC (control nitrofenilo), luego golpear suavemente en cada esquina del panel para conseguir una correcta homogeneización del sustrato.

3) Incubación: Apilar los paneles en grupos de 3 a 5 con una bandeja cubridora encima para evitar la evaporación e incubarlos por 4 horas a 35- 37 °C en un incubador sin CO₂.

4) Lectura de los paneles: Al cabo de 4 horas de incubación, se añade una gota del reactivo de peptidasa a los pocillos BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY e HIS y dejar que se desarrolle el color durante 30 segundos antes de registrar los resultados, debe interpretarse como positivo la presencia de cualquier tono rosa o rojo en todo el pocillo o en parte del mismo.

Añadir una gota de NaOH (hidróxido de sodio) 0,005 normal a los pocillos AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL y NGAL y esperar un mínimo de 5 segundos, sin exceder los 5 minutos para leer los resultados, debe interpretarse como positivo cualquier tono amarillo (Siemens, 2008).

6.6. Método de difusión en pocillo

Con el objetivo de hacer una pre-selección de bacterias y hongos capaces de crecer en presencia de plomo (II), cobre (II), zinc (II), cobalto (III), manganeso (VII) y plata (I) se utilizó el método de difusión en pocillo (Madigan *et al.*, 2003). Para ello se tomó 0.1 mL de suspensión bacteriana y se inoculó en placas Petri con 15 mL de Agar Mueller Hinton (bacterias) o en Agar Saboraud Dextrosa (hongos) y, se procedió a perforar pocillos en el agar donde se le colocaron 50 μ L de cada disolución metálica a concentraciones de 200 mg.L⁻¹ para bacterias y 500 mg.L⁻¹ para hongos.

Luego se incubaron según acápite anterior y el criterio de selección de tolerancia se estimará sobre la base de la intensidad del crecimiento alrededor de los pocillos.

6.7. Determinación de la CMI de Pb⁺², Cu⁺², Co⁺², Zn⁺², Mn⁺⁷ y Ag⁺¹

La CMI se determina como la concentración mínima del elemento metálico que inhiba el crecimiento microbiano (Madigan *et al.*, 2003). Se prepararon diluciones en tubos de ensayos con concentraciones crecientes de las sales de metales pesados desde 475 mgL⁻¹ hasta 3800 mg.L⁻¹ (bacterias, hongos, levaduras y algas).

Se tomó 0.1 mL de suspensión bacteriana y se inoculó en placas Petri con 15 mL de Agar Mueller Hinton (bacterias) o en Agar Saboraud Dextrosa (hongos, levaduras y algas) y, se procedió a perforar pocillos en el agar donde se le

CAPÍTULO IV

colocaron 50 μ L de cada dilución. Luego se incubo por 24 horas 37 °C (bacterias) y por 8 - 10 días a temperatura ambiente (hongos, levaduras y algas).

Transcurrido este período de tiempo, se determino la CMI de cada metal midiendo el halo de crecimiento alrededor de la colonia (bacterias, hongos, levaduras y algas).

6.8. Análisis Estadísticos

Las variables medibles en el estudio fueron: la susceptibilidad de las especies bacterianas a la plata Ag(I) (cuantitativa) y Tipo de Sitio (cualitativa). Los datos obtenidos del muestreo se ordenaron y se elaboró una base de datos para las variables medibles utilizando el software Statistix ® 8.0. Se comprobará si los sitios de muestreos son un factor que influye sobre la susceptibilidad de las bacterias. Se analizarán los datos con el Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis al 95% de confianza y se interpretarán en resultados y discusión.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación del protocolo de búsqueda y selección permitió el aislamiento de 54 cepas (38 bacterias, 11 hongos, 4 levaduras y 1 alga). Siendo el número de aislados mayor en el vertedero (gráfico 1).

Tabla 3. Cepas colectadas en los distintos sitios de muestreos.

Sitios de muestreo	Bacterias	Hongos	Levaduras	Algas	Total	Porcentaje
Vertedero	19	7	2	1	29	53.7
Taller 1	7	2	1	0	10	18.5
Taller 2	6	1	0	0	7	13.0
Taller 3	6	1	1	0	8	14.8
Total	38	11	4	1	54	100.0

En esta tabla (3), se aprecia la cantidad de cepas colectadas de los diferentes sitios de muestreos, en donde se observa que el mayor número de aislados de microorganismos se obtuvo en el Vertedero Municipal de David lo que representa un 53.7%, siendo las diferencias escasas para el resto de los sitios de muestreos. Este resultado se da por posición geográfica y la acumulación de residuos sólidos en este sitio, que posibilitan el desarrollo de un gran número de especies de microorganismos, generando efectos negativos tanto para el ambiente como para la salud humana.

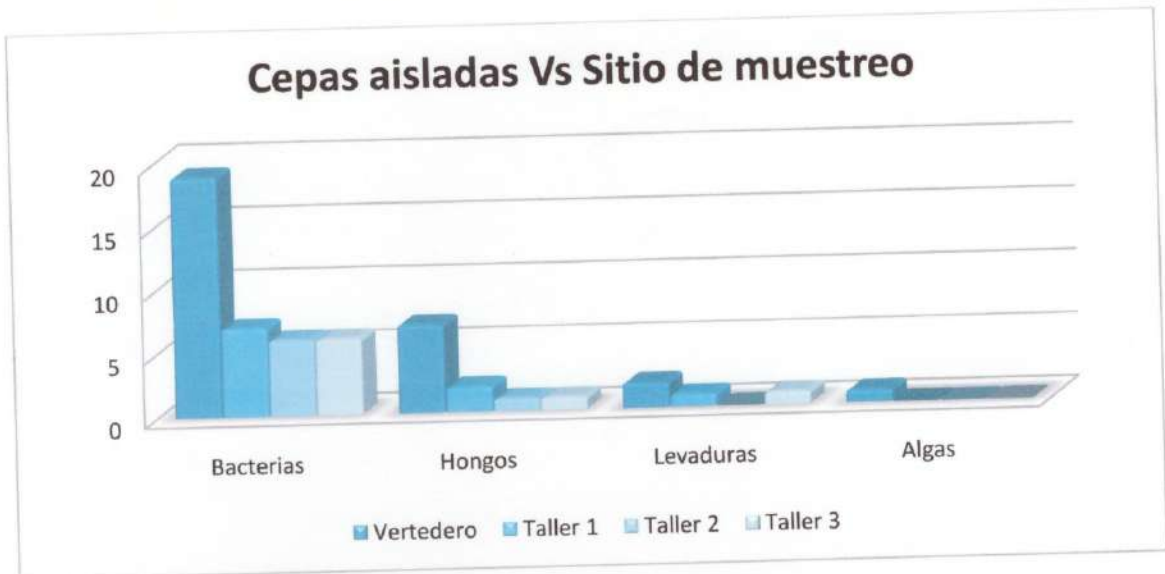


Gráfico 1. Cepas colectadas en los distintos sitios de muestreos.

7.1. Determinación de los niveles de tolerancia de los microorganismos aislados a metales pesados, Plomo (II), Zinc (II), Cobre (II), Cobalto (III), Plata (I), Manganeso (VII).

En el presente trabajo se estudiaron seis metales pesados los cuales fueron expuestos a todas las cepas aisladas en distintas concentraciones con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de estos metales sobre las bacterias, hongos, levaduras y alga utilizando el método de difusión en pocillo.

De un total de 38 aislados bacterianos, 32 corresponden a bacterias Gram negativas, de las cuales 8 fueron no fermentadoras, pertenecientes al género de las *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, 23 fermentadoras, pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Cedeceae*, 7 bacterias Gram positivas como *Micrococcus sp* y *Bacillus sp*, 11 hongos filamentosos, 4 levaduras y una alga, fueron capaces de tolerar las concentraciones máximas de metales utilizados en esta investigación. Las cuales se demostraron por el

crecimiento alrededor del pocillo que contenían concentraciones crecientes de 475 mgL⁻¹ hasta 3800 mgL⁻¹.

La CMI de las cepas estudiadas demostró que los niveles de resistencia frente a los metales pesados ensayados fueron iguales para cada cepa. Los resultados obtenidos nos indican que las especies que toleraron los metales pesados, pueden presentar mecanismos que les permiten resistir cuando estas se encuentran en presencia de dichos elementos. Así, tanto bacterias, ya sean Gram negativas o positivas, como hongos, disponen de componentes superficiales que pueden propiciar la adsorción/absorción de elementos metálicos (Gadd, 2004; Joo *et al.*, 2010).

De las cepas estudiadas, el 100% fue resistente al plomo (II), zinc (II), cobre (II), cobalto (III), manganeso (VII) y 0% a la plata (I). Se establecieron patrones de resistencia, los cuales pueden ser clasificados en cuatro biotipos principales. Mediante estos resultados obtenidos se observó que todas las cepas analizadas presentaron multirresistencia a casi todos los metales (Ver ANEXO, tabla 9).

Las cepas fueron aisladas de sitios en donde la exposición a metales pesados era evidente, por la segregación de desechos sólidos, el derrame de aceites y productos derivados de la actividad automotriz. Las cuales presentaron alta capacidad de tolerancia los que nos indica que pueden ser utilizadas como una herramienta importante en el tratamiento biológico de desechos contaminados con estos elementos. Por lo tanto estos microorganismos aislados constituyen una base la cual abre las puertas para el desarrollo de otros proyectos de investigación

que promueven la generación y aporte de nuevos conocimientos que permitan disminuir los efectos negativos de la contaminación ambiental que afectan la salud humana.

Investigaciones en el campo de la biotecnología ambiental indican que bacterias, hongos, levaduras y microalgas pueden remover metales pesados por biosorción (García-Meza y col., 2005).

7.2. Determinación de la sensibilidad de los microorganismos a la plata Ag (I)

No obstante, se apreciaron diferencias en el comportamiento de las cepas ensayadas, destacando especialmente la inferior capacidad en términos generales para tolerar la plata Ag (I) en comparación con los otros tipos de metales donde hubo resistencia por parte de ellas.

Ciertos metales funcionan como "venenos" metabólicos, ya que pueden reaccionar e inhibir una serie de sistemas enzimáticos; algunos iones de estos elementos (Hg^{2+} , Cd^{2+} y plata (Ag^{+})) forman complejos tóxicos inespecíficos en la célula, lo que produce efectos tóxicos para cualquier función biológica (Volke et al., 2005).

Los resultados obtenidos en este proceso indican que las cepas aisladas no han generado un mecanismo de resistencia lo suficientemente capaz para permitir la supervivencia microbiana en ambientes hostiles contaminados con plata Ag (I).

Para estudios estadísticos se procedió a medir los halos de inhibición en todos los pocillos dónde era evidente la sensibilidad por parte de las cepas para tolerar la plata (ver ANEXO, figura 4). Se observó que a medida que aumentaba la concentración del metal el halo de inhibición se hacía más grande indicándonos que a una mayor concentración disminuía la capacidad de los microorganismos para tolerar este metal.

Tabla 4. Diámetro del halo de inhibición en especies de levadura que no toleraron la plata Ag (I) en mm.

Sitio de muestreo	Género	3800 mgL-1	1900 mgL-1	950 mgL-1	475 mgL-1
Vertedero	<i>Geotrichum sp.</i>	1.6	1.5	1.5	1.4
Vertedero	<i>T.beigelli</i>	1.2	1.0	0.8	0.7
Taller 1	<i>C. parapsilosis</i>	2.1	2.0	2.0	1.6
Taller 3	<i>P. farinosa</i>	1.5	1.4	1.1	1.0

En esta tabla (4), se aprecia el diámetro del halo de inhibición producto de la sensibilidad de las especies de levaduras en presencia de la plata Ag(I) a distintas concentraciones de dicho metal (ver ANEXO , figura 6).

Como se puede observar este cuadro, muestra el grado de tolerancia de *Geotrichum sp*, *T.beigelli*, *C. parapsilosis* y *P. farinosa* que mediante los resultados obtenidos se determinó que dichas especies de levaduras son capaces de tolerar concentraciones superiores de 475 mgL-1 de Ag(I). Es decir que estas cepas son capaces de secuestrar y de acumular este tipo de metal por procesos fundamentales de tolerancia.

Los papeles fisiológicos y metabólicos de metales como el mercurio, cadmio, plata y otros, aun no han sido dilucidados completamente. A altas concentraciones los metales pesados resultan ser tóxicos para cualquier organismo (Sag y Kutsal, 2011), y el interés sobre ellos se incrementa continuamente debido a la contaminación del aire, suelo y agua.

Tabla 5. Diámetro del halo de inhibición en especies de hongos sensibles a la plata Ag(I) en mm.

Sitios de muestreo	Género	3800 mgL-1	1900 mgL-1	950 mgL-1	475 mgL-1
Vertedero	<i>Penicillium sp.</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
Vertedero	<i>Penicillium sp.</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
Vertedero	<i>Geotrichum sp.</i>	0.7	0.7	0.7	0.7
Vertedero	<i>Geotrichum sp.</i>	0.7	0.7	0.7	0.7
Vertedero	<i>Cladosporium sp.</i>	0.9	0.9	0.9	0.9
Vertedero	<i>Thielaviopsis bacicola</i>	0.8	0.8	0.8	0.8
Taller 1	<i>Penicillium sp.</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
Taller 2	<i>Thielaviopsis bacicola</i>	0.8	0.8	0.8	0.8
Taller 2	<i>Penicillium sp.</i>	1.2	1.2	1.2	1.2
Taller 3	<i>Penicillium sp.</i>	1.0	1.0	1.0	1.0

Como se observa en esta tabla (5), se aprecia el efecto de las altas concentraciones de la plata (I) sobre el crecimiento micelial del *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Cladosporium sp.*, *Thielaviopsis bacicola*. El criterio que se utilizó para determinar el grado de toxicidad de la plata fue el efecto del crecimiento, midiendo el diámetro en mm alrededor de los pocillos después de un periodo de incubación de 8 días a temperatura ambiente. Así que el estudio se enfocó en

determinar la concentración mínima inhibitoria de dicho metal en el cual se inhibe el crecimiento del microorganismo. Los resultados obtenidos nos indica que las especies de hongos utilizados en esta investigación para determinar el grado de tolerancia son susceptibles a concentraciones superiores de 475 mgL⁻¹ Ag (I) (ver ANEXO, figura 8).

El hongo, en este período, no pudo sintetizar componentes que lo protegen contra la toxicidad del metal, tal como la síntesis intracelular de metalotioninas, proteínas que tienen una función en la desintoxicación, almacenamiento y regulación de la concentración interna del metal (Cortés *et al.*, 1993; Volesky, 1995).

Tabla 6. Diámetro del halo de inhibición en especie de alga sensibles a la plata Ag(I) en mm.

Sitio de muestreo	Género	3800 mgL ⁻¹	1900 mgL ⁻¹	950 mgL ⁻¹	475 mgL ⁻¹
Vertedero	<i>Prototheca sp.</i>	1.2	1.1	1.0	0.9

En esta tabla (6), se aprecia el ensayo realizado para conocer la posibilidad de una cepa del alga *Prototheca sp* aislada mediante los procedimientos de cultivo en agar Sabouraud con cloranfenicol. La cual fue sometida a distintas concentraciones de plata Ag(I) con el fin de determinar la capacidad de este microorganismo de tolerar dicho metal.

Después de un período de incubación de 24 horas a 37°C se determino la sensibilidad de la *Prototheca sp* mediante la observación de los halos de inhibición en cada pocillo donde fue colocado el metal a distintas concentraciones. Obteniéndose como resultado que esta alga puede tolerar concentraciones

superiores a 475 mgL-1 Ag(I), lo que nos indica que ha sido capaz de generar un mecanismo que le permita secuestrar y acumular la plata Ag(I) por procesos ya sea de absorción o adsorción (ver ANEXO , figura 7).

Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis (K-W)

Se comparó las medias de las variables tipo de especies vs la susceptibilidad utilizando la prueba de K-W al 95 % de confianza para determinar si existe una diferencia estadística significativa entre ellas.

Hipótesis Estadísticas:

Ho= Todas las medias de las muestras son iguales.

Ha= Algunas de las medias muestrales son diferentes.

Criterios de Aceptación y Rechazo:

Se acepta la Ho, si la Probabilidad es mayor de 0.05.

Se rechaza la Ho y se acepta la Ha, si la probabilidad es menor de 0.05.

Análisis y conclusión

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Medicion by Especie

	Mean Sample	
Especie	Rank	Size
A.iwoffii	76.1	8
K.rinoscler	54.1	4
BacillusG+	61.1	20

E. coli	45.9	24
Pseudomona	92.8	24
E.gergoviae	35.6	4
E.aerogenes	26.0	8
E.vulneris	41.1	4
P.rettgeri	54.1	4
Klebsiella	99.1	4
Cedecea sp	26.0	4
K. pneumonia	82.0	12
Micrococcus sp	92.9	4
E.fergusoni	73.5	4
Total	64.5	128
Kruskal-Wallis Statistic		47.9578
P-Value, Using Chi-Squared Approximation		0.0000

Tabla 7. Resultados de la prueba de Kruskal-wallis entre los tipos de especies y la susceptibilidad.

Conclusión: Se registró una probabilidad de 0.0000 que permite rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alterna. De tal manera que las medias comparadas de las variables concentración e inhibición son distintas.

Para comprobar el grado de homogeneidad entre grupos de medias se aplicó la prueba de Scheffé de comparación de grupos que a continuación se presenta.

Prueba de Scheffé para determinar si las medias son diferentes.

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of MEDICION by SITIO		
Concentration	Mean	Homogeneous Groups
3800 mgL-1	85.266	A
1900 mgL-1	67.969	AB
950 mgL-1	60.438	B
450 mgL-1	44.328	B

Alpha 0.05
Critical Z Value 2.638 Critical Value for Comparison 42.267
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tabla 8. Efecto de la concentración sobre la inhibición de las especies bacterianas.

Conclusión: En la prueba de Scheffé de comparación de grupos se registra dos grupos homogéneos A y B para la inhibición donde se observa un grupo de alta concentración 3800 mgL-1, un grupo intermedio 1900 mgL-1 y las concentraciones que tuvieron una baja inhibición fueron 950 mgL-1 y 450 mgL-1. Se encontró que la concentración 3800 mgL-1 tiene un mayor efecto sobre la inhibición de las especies bacterianas aisladas.

CAPÍTULO V

8. CONCLUSIONES

- Se registró una alta capacidad para tolerar concentraciones superiores a 3800 mg.L-1 de metales pesados incorporados en el medio de cultivo, con especial intensidad en el caso del plomo, cobre, manganeso, cobalto y zinc en los aislados ensayados.
- Los microorganismos aislados a partir de ambientes contaminados que fueron utilizados para esta investigación, toleran las disoluciones de los metales a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con estos.
- De las 54 cepas aisladas: 38 bacterias, 11 hongos, 4 levaduras y 1 alga todas presentaron concentración mínima inhibitoria de plomo, cobalto, manganeso, zinc, cobre superiores a 3800 mg.L-1.
- La sensibilidad de las 54 cepas aisladas expuestas directamente a diluciones de plata presentaron concentración mínima inhibitoria inferiores a 475 mg.L-1.
- Todas las bacterias ensayadas tienen alta capacidad para tolerar metales pesados por lo que es útil para ser utilizadas en procesos de biorremediación.

- La prueba de Scheffé de comparación de los sitios de almacenamiento registra dos grupos homogéneos, lo que indica un grupo de alta inhibición y el otro de baja inhibición.
- Los resultados obtenidos permiten señalar posibles cepas capaces de funcionar en procesos de biorremediación.
- La obtención de cepas tolerantes a metales pesados, indican un alto grado de contaminación producto de los desechos generados durante las actividades automotrices y la acumulación de basura, siendo un riesgo para la salud humana.

9. RECOMENDACIONES

- Evaluar la capacidad de las bacterias ensayadas para determinar si son capaces de tolerar otros tipos de metales no utilizados en esta investigación.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de las cepas aisladas en esta investigación para conocer si son capaces de tolerar concentraciones superiores de 3800 mg.L-1 de metales como plomo, zinc, cobalto, cobre y manganeso.
- Acondicionar la temperatura óptima de incubación para que sea más adecuado el crecimiento de los hongos.
- Implementar la técnica de recuento en placa para facilitar un mejor aislamiento de las colonias.
- Los géneros bacterianos tolerantes identificados, así como las características del suelo y agua, tienen que ser tomadas como base para un proceso de biorremediación.
- Para ampliar y establecer condiciones óptimas de degradación de metales pesados, se debe realizar el estudio de biodegradación en suelos contaminados de diferentes clases texturales, utilizando las cepas identificadas en la presente investigación.
- Investigar los mecanismos de resistencias utilizados por los microorganismos para tolerar diferentes tipos de metales.

CAPÍTULO VI

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Barkay, T. & H., Pritchard. 1988. Adaptation of aquatic microbial communities to pollutant stress. *Microbiological Sciences*, 5: 165-169 p.
2. Barnett, H.L. & B.B., Hunter. 1999. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* 4th Ed. The American Phytopathological Society. St Paul Minnesota. 71-77 p.
3. Barnett, J.A.; R.W. Payne & D., Yarrow. 2000. *The Yeast*. Cambridge University. New York. 50-60 p.
4. Bonetto, J.P. & S.C., López. 2001. Posibilidades de aplicación de la fitorremediación en la minería de uranio. Disponible en: <http://www.cnea.edu.ar/las-ans/pdf/JPBonetto-trabajo-simposio.pdf>.
5. Botello, A. V.; J. C., Rojas; J. A., Benítez & L.D., Zárate. 1998. *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Epomex Serie Científica SEP. 2.345-356 p.
6. Burton, G.A.; T.H., Giddins; P., De Brine & R., Fall. 1987. High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium. *Applied and Environmental Microbiology*. 185-188 p.

7. Cañizares, R.O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42 (1):131-143 p.
8. Cervantes, C & S., Vaca .1990. Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos. *Ciencia y Desarrollo*, 27 (103): 86-96 p.
9. Cervantes, Carlos .2006. Las relaciones de las bacterias y los metales. *Carisma de la Ciencia*. (3): 1-4 p.
10. Cortés, C.; A., Obregón; S., Caracheo; G., Vázquez; F., Amézquita; M., Hernández; F.,Gutiérrez; C., Cano & L.,Sosa .1993. Mecanismos de Resistencia a Metales Pesados en *Trichoderma spp.* In: *Memorias del V Congreso Nacional de Biotecnología*. No. 1 y 2. México. 214 – 223 p.
11. Chen, J; D., Czajka; L., Lion;M., Shuler & W.,Ghiorse. 1995. Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ. Health Perspect.* 103: 53-58 p.
12. Daughton, C.G. 2001. *Pharmaceutical in the Environment: Overarching Issues and Overview*, American Chemical Society. Washington D.C. 2-38 p.

13. Gadd, GM. 2004. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals, and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 111, 3-49 p.
14. García-Meza, J.V.; W., Admiraal & C., Barrangue. 2005. Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (3), 573-581 p.
15. Garcias, D. & M., González. 2002. Métodos biológicos para el estudio de la calidad de las aguas. Aplicación a la cuenca del Canal de Panamá. 38-55 p.
16. Guerra, P.P. 1984. Determinación de plomo por espectrofotometría de absorción atómica. *Rev. Natura. Centro Regional Universitario de Chiriquí*. 35-45 p.
17. Google Maps. 2012. Disponible en: https://maps.google.com/maps?hl=es&q=vertedero+municipal+de+dauid&bav=on.2,or.r_gc.r_pw.r_qf.&bpcl=39314241&biw=1024&bih=499&um=1&ie=UTF-8&sa=N&tab=wl . Consultado el 15 de diciembre de 2012.

18. He, Z.L.; X.E., Yang & P.J., Stoffella. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Elemen. Med. Biol.* 19:125-140 p.
19. Hudson N. (2006). Conservación de suelos, primera edición, editorial reverté S.A. España. 335 p.
20. Félix, G & L., Sevilla. 2003. Ecología y salud. ED. Mc Graw Hill. Ed. 2°. 163-165 p.
21. ISO/DIS 10381-2:2002 .Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.30-40 p.
22. Joo, JH; SHA., Hassan & SE., Oh. 2010. Comparative study of biosorption of Zn²⁺ by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 734-741 p.
23. Madigan, M.T.; J.M., Martinko & J.,Parke. 2003. Biology of microorganisms. Prentice Hall. Southern Illinois University Carbondale.160-180 p.
24. Mance, Geoffrey, 1987. Pollution threat of heavy metals in aquatic environments *Pollution Monitoring Series*. Elsevier Applied Science Publishers. England.

25. Ministerio de Salud - MINSA (2008). Boletín Estadístico de Salud. Departamento de Registros y Estadísticas de Salud. República de Panamá. 29-31 p.
26. Navarro-Aviñó J. P.; I., Aguilar Alonso & J.R., López-Moya .2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas, Departamento de Biología Vegetal. *Ecosistemas* 16 (2) 46-56 p.
27. Peña, C. E. & col. 2001. Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. 142-160 p.
28. Peterle, T.J. 1991. Wildlife toxicology. Van Nostrand Reinhold Publication. U.S.A. 456-459 p.
29. Pomares, F. 1998. Estado de contaminación por metales pesados en suelos de cítricos con cultivo ecológico. Disponible en: <http://www.miliarium.com/Proyectos/suelos/DescontaminaciónSuelos/TecnicasInSitu/TecnicasBiologicas/Fitorremediación.asp>.
30. Reyes -Toriz E. D.; F. J., Cerino -Córdova & M. A. Suárez Herrera. 2006. Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*. 9 (31):59-64 p.

31. Sag, Y; & T., Kutsal. 2011. Recent Trends in the Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 6 (6), 376-385 p.
32. Siemens Healthcare Diagnostics. 2006. Simple Solutions to Streamline Workflow. Steps to Streamline ID/MIC Panel Inoculation. United States of America. 2 p.
33. Siemens Healthcare Diagnostics. 2008. MicroScan® Manual de procedimientos para Gram negativo deshidratado. Estados Unidos. 18 p.
34. Siemens Healthcare Diagnostics. 2009. MicroScan® Manual de procedimientos para Gram positivo deshidratado. Estados Unidos. 18 p.
35. Valdés M. & J. N., Medina .2005. Ecología microbiana del suelo. Primera edición. México. 130 p.
36. Vance, D.B. 2002. Metals and groundwater part II. In-situ biorremediation of metals contaminated groundwater 2. The 4 Technology Solutions. Disponible en: [http:// 2the4.net/metalbio.htm](http://2the4.net/metalbio.htm).
37. Van Deuren, J; Z., Wang & J., Ledbetter. 1997. Remediation technologies screening matrix and reference guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

38. Volesky, B. 1999. Biosorption for the next century. Chemical Engineering Department. Mc Gill University, Canadá. 173-191 p.
39. Volesky, B. 1995. Biosorption by Fungal Biomass. In: Biosorption of Heavy Metals. B. Volesky (Ed). CRC Press. 139-172 p.
40. Volesky, B & Z. R., Holan .1995. Biosorption of heavy metals. Biotechnology Progress. 11(3): 235-250 p.
41. Volke Sepúlveda, T & J. A., Velasco Trejo. 2002. "Tecnologías de remediación para suelos contaminados". México: Instituto Nacional de ecología INE-SEMARNAT. 64 p.
42. Volke Sepúlveda T., J. A., Velasco Trejo & D. de la Rosa Pérez .2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: Muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología, México D. F. 31-35 p.
43. Wase, J. & C., Forster. 1997. Biosorbents for metal ions, Taylor & Francis Publishers, Gran Bretaña. 167-195 p.
44. Zhou, J.L. & R.J., Kiff .1991. The uptake of copper from aqueous solution by immobilized fungal biomass. J. Chem. Technol. and Biotech. 52: 317-330 p.

11. ANEXOS

Tabla 9. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados en especies bacterianas.

Sitios de muestreos	Especies	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI mgL-1)					
		Co (III)	Mn (VI)	Zn (II)	Pb(II)	Cu(II)	Ag (I)
BACTERIAS							
Vertedero	<i>A.iwoffii</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>K.rhinoscler</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Bacillus G+</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>E.coli</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Pseudomona sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Pseudomona sp</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>E.coli</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>E.gergoviae</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Bacillus G+</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Pseudomona sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>E.aerogenes</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>E.vulneris</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>P.rettgeri</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>E.coli</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Klebsiella sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>E.aerogenes</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Bacillus G+</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>A.iwoffii</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 1	<i>Cedecea sp</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 1	<i>k.pneumoniae</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 1	<i>Pseudomona sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 1	<i>Micrococcus sp</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 1	<i>E.coli</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 2	<i>E.coli</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 2	<i>Pseudomona sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 2	<i>Bacillus G+</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 2	<i>E.fergusonii</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 2	<i>K.pneumoniae</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 3	<i>Bacillus G+</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 3	<i>Pseudomona sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 3	<i>E.coli</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 3	<i>K.pneumoniae</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475

Tabla 10: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados en especies de Hongos.

Sitios de muestreos	Especies	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI mgL-1)					
		Co (III)	Mn (VI)	Zn (II)	Pb(II)	Cu(II)	Ag (I)
Hongos filamentosos							
Vertedero	<i>Penicillium sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Penicillium sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Geotrichum sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Geotrichum sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Cladosporium sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>Thielaviopsis bacicola</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 1	<i>Penicillium sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 2	<i>Thielaviopsis bacicola</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 2	<i>Penicillium sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 3	<i>Penicillium sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475

Tabla 11. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados en especies de levaduras.

		Concentración Mínima Inhibitoria (CMI mgL-1)					
Sitio de muestreos	Especies	Co (III)	Mn (VI)	Zn (II)	Pb(II)	Cu(II)	Ag (I)
Levaduras							
Vertedero	<i>Geotrichum sp.</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Vertedero	<i>T.beigelli</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<950
Taller 1	<i>C. parapsilosis</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475
Taller 3	<i>P. farinosa</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475

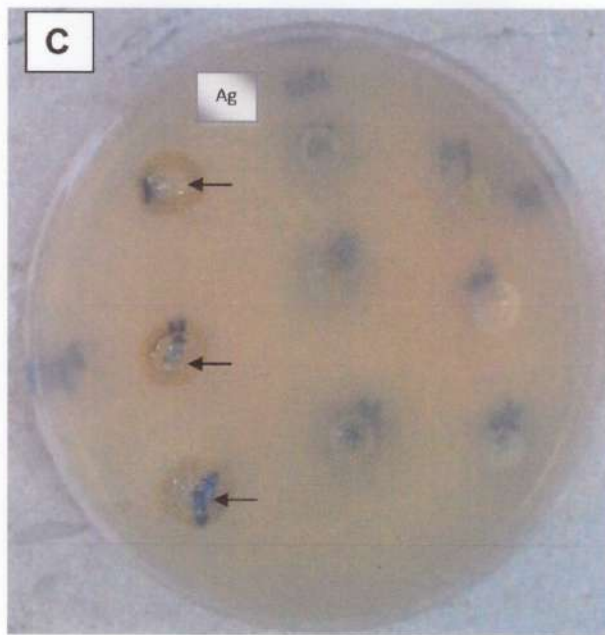
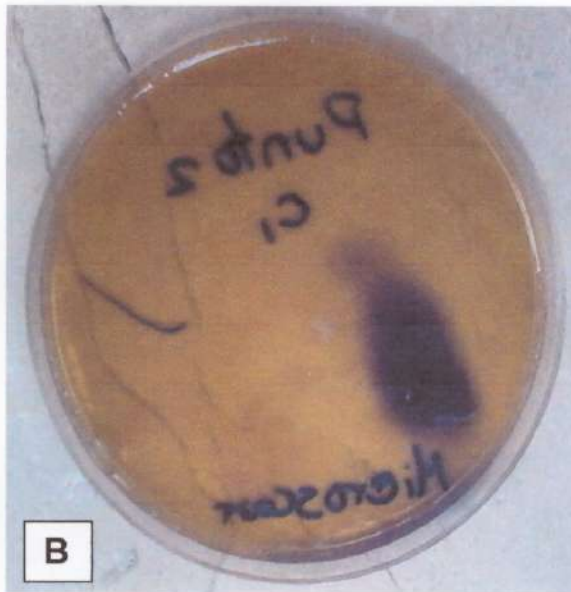
Tabla 12: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados en especies de algas.

		Concentración Mínima Inhibitoria (CMI mgL-1)					
Sitio de muestreo	Especie	Co (III)	Mn (VI)	Zn (II)	Pb(II)	Cu(II)	Ag (I)
Algas							
Vertedero	<i>Prototheca</i>	>3800	>3800	>3800	>3800	>3800	<475



Figura 4. *Escherichia coli*.

- A. Panel de MicroScan reacciones bioquímicas.
- B. Colonias aisladas en agar Mac Conkey.
- C. Halos de sensibilidad a la plata.
- D. Tolerancia de metales pesados como el plomo, cobalto, zinc, manganeso y cobre.



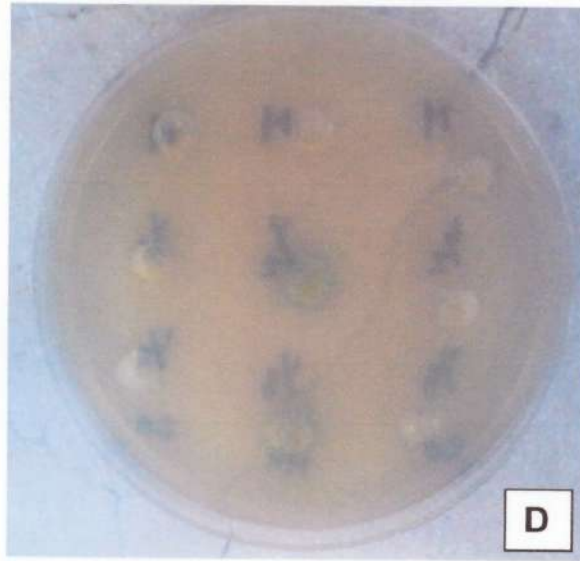


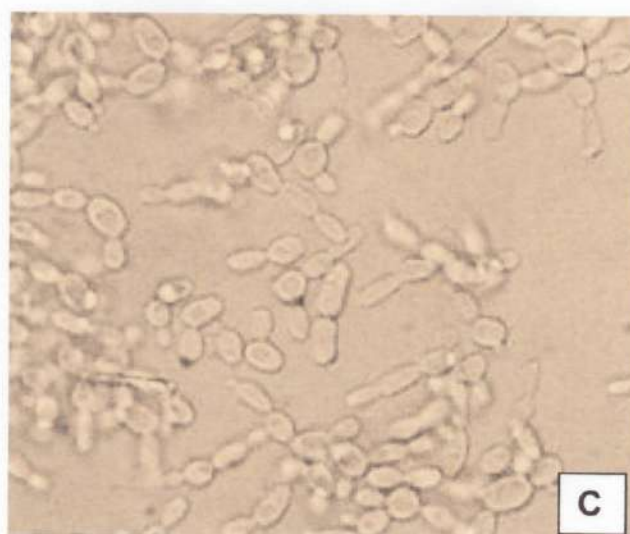
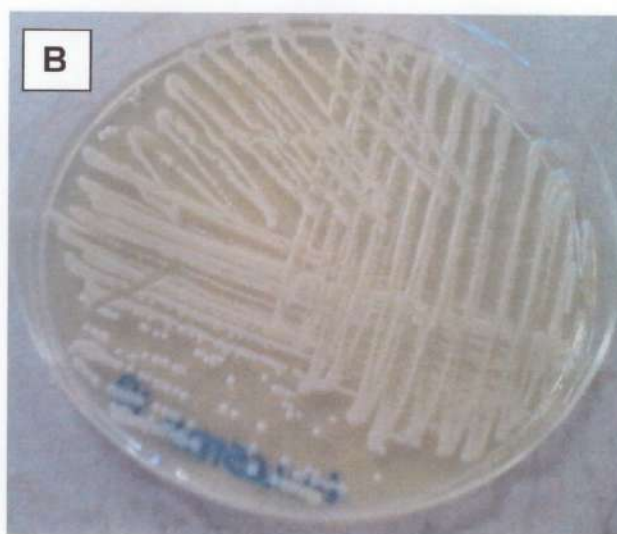
Figura 5. *Pseudomona sp.*

A. Panel de MicroScan reacciones bioquímicas.

B. Colonias aisladas en agar Mac Conkey y reacción oxidasa positiva.

C. Halos de sensibilidad a la plata.

D. Tolerancia de metales pesados como el plomo, cobalto, zinc, manganeso y cobre.



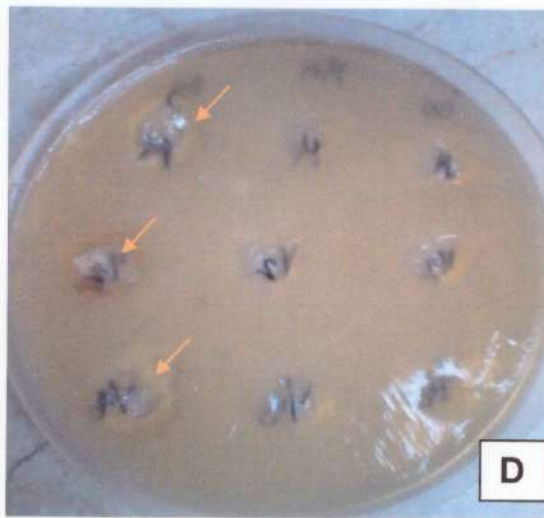


Figura 6. *Cándida parapsilosis*.

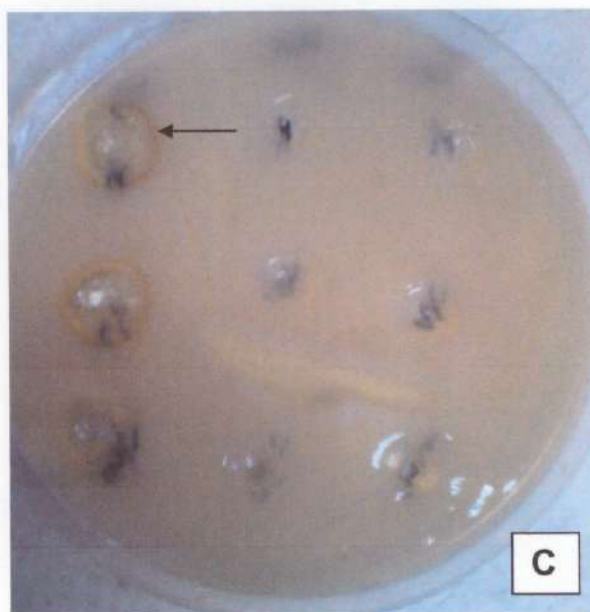
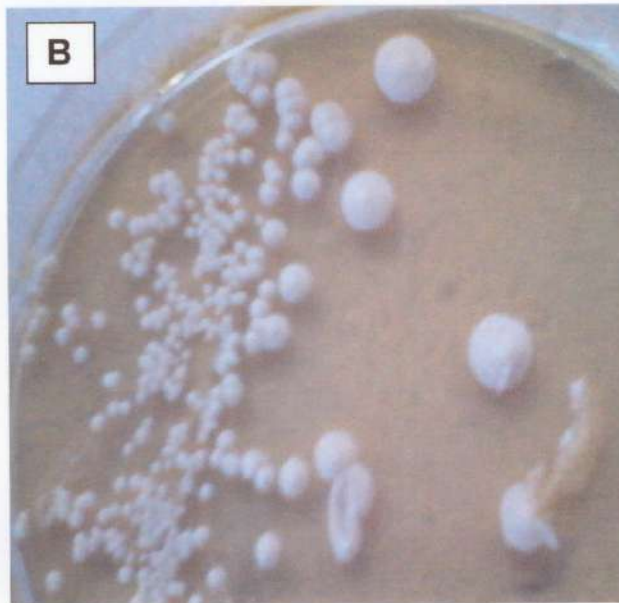
A. Panel de MicroScan para la identificación de levaduras mediante pruebas bioquímicas.

B. Colonias de levaduras cremosas de color blanco amarillento en agar Sabouraud.

C. Vista microscópica que muestra células redondas u ovaladas. Frotis fresco 100x.

D. Halos de sensibilidad a la plata.

E. Tolerancia de metales pesados como el plomo, cobalto, zinc, manganeso y cobre.



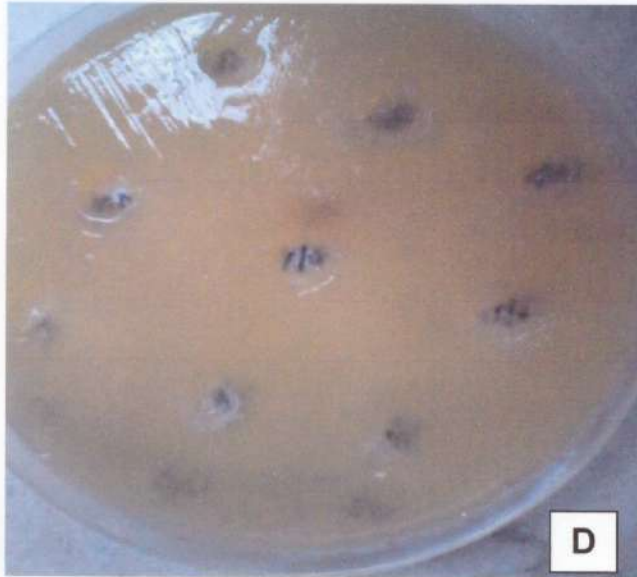


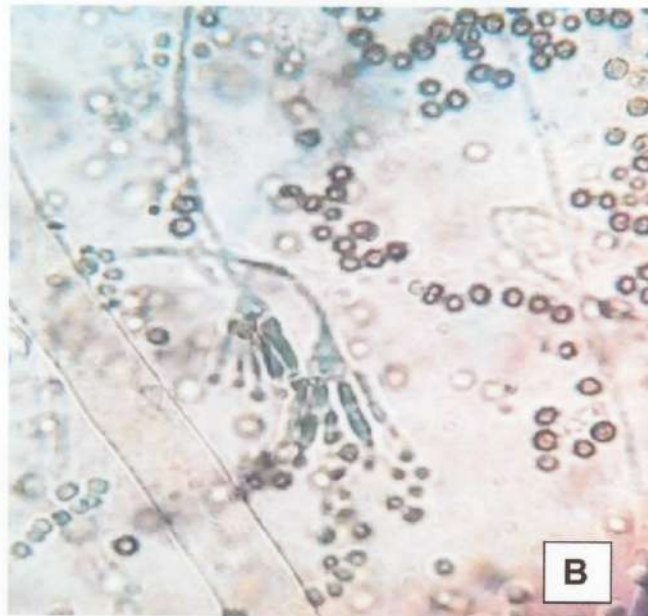
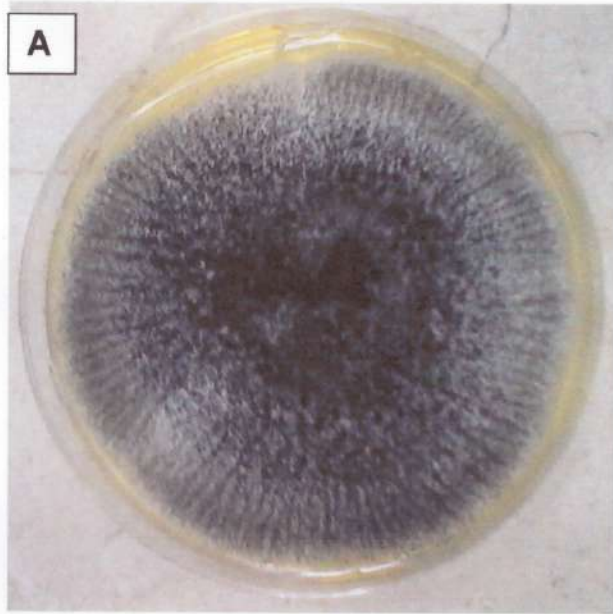
Figura 7 : *Prototheca sp.*

A. Reacciones bioquímicas en el panel de MicroScan.

B. Colonias de levadura en agar Sabouraud colonias suaves, húmedas de color blanco.

C. Halos de sensibilidad a la plata.

D. Tolerancia de metales pesados como el plomo, cobalto, zinc, manganeso y cobre.



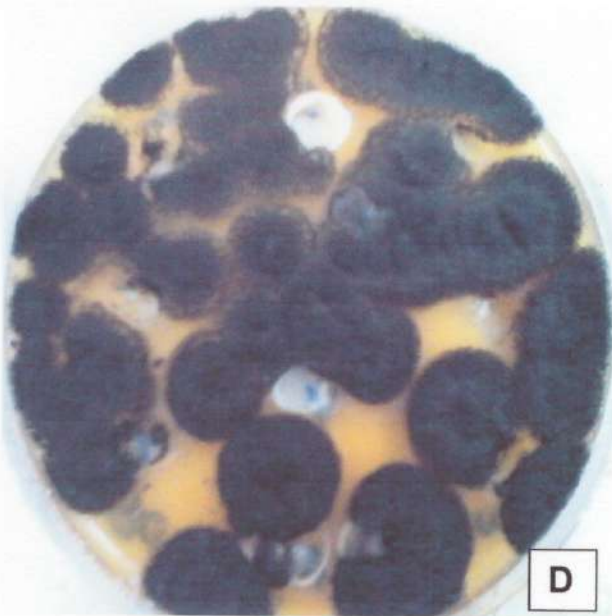
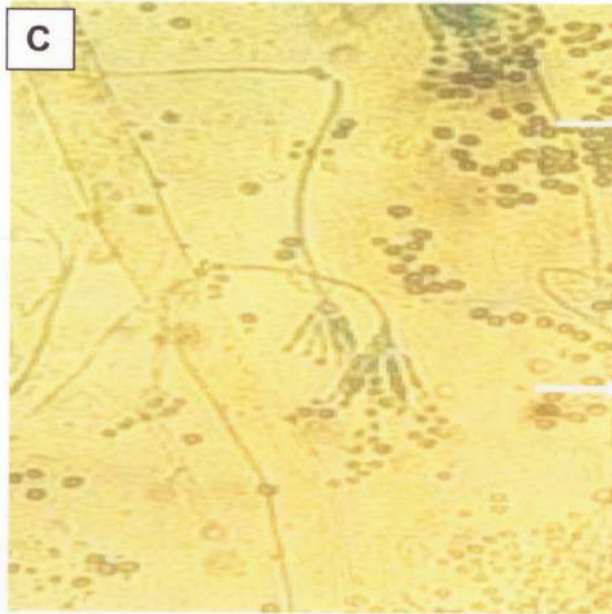
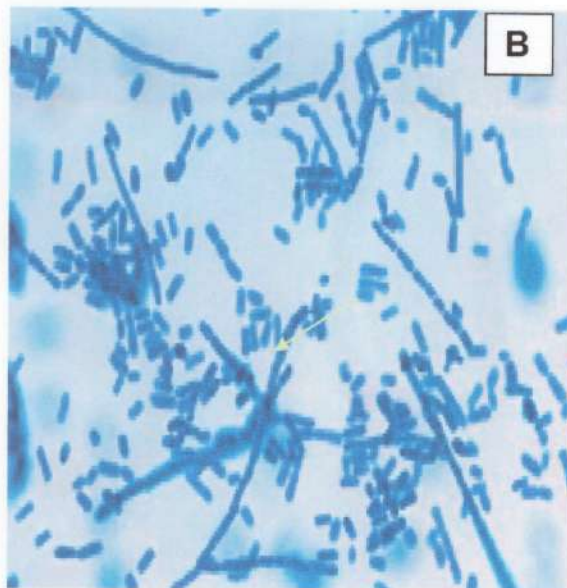


Figura 8. *Penicillium* sp.

A. Colonias de crecimiento rápido, pulverulentas de color verde.

B y C. Vista microscópica que muestra conidióforos rectos, hialinos, con fialides que nacen sobre métulas. Azul de lacto fenol, 40x.

D. Halo de sensibilidad a la plata.



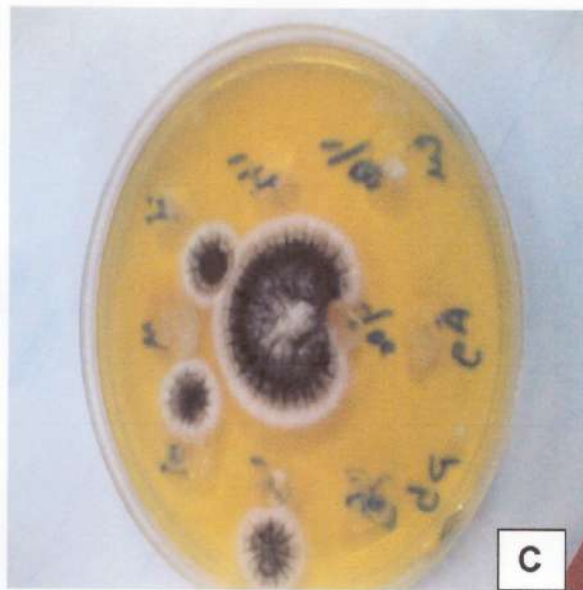


Figura 9. *Geotrichum sp.*

A. Colonias blancas a beige, aterciopeladas, con el tiempo pueden tomar un aspecto veloso oscuro, radiado, plegado y húmedas.

B. Vista microscópica de Hifas septadas, fragmentadas en arthroconidias rectangulares, dispuestas una tras otra. Azul de lacto fenol, 40x.

C. Halo de sensibilidad a la plata.

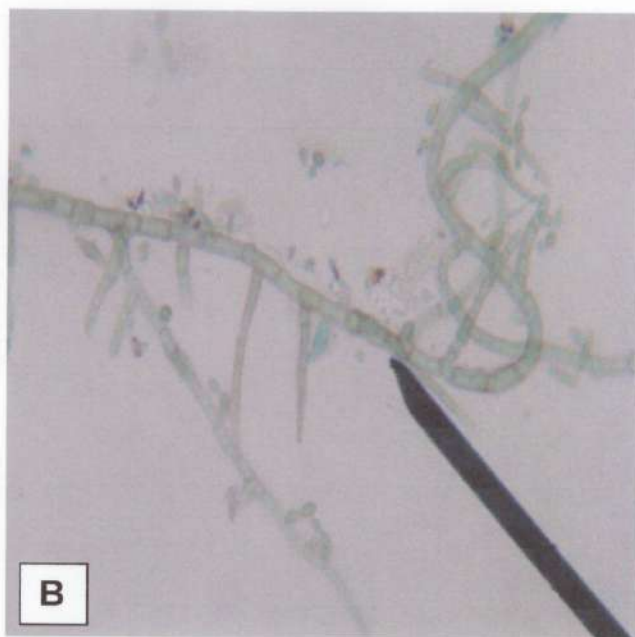
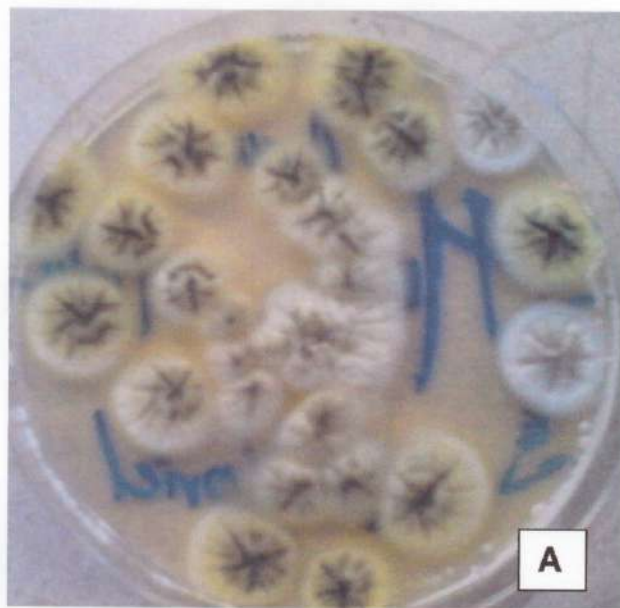




Figura 10. *Cladosporium* sp.

- A. Las colonias son de crecimiento lento, llegando a 3-4 cm diámetro, con un compacto de gamuza gusta superficie suave y son oliváceo a negro en color.
- B. Vista microscópica de hifas gruesas, septadas, dematiáceas. Conidióforos indiferenciados. Conidias unicelulares, dematiáceas, en cadenas. Azul de lacto fenol, 40x.
- C. Tolerante a metales pesados como el plomo, zinc, cobalto, cobre, magnesio.

12. GLOSARIO

1. **Agar:** es un elemento solidificante empleado para la preparación de medios de cultivo y por lo tanto no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.
2. **Bioacumulación:** es el proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en el medio ambiente o en los alimentos.
3. **Bioindicador:** es un indicador consistente en una especie vegetal, hongo o animal; o formado por un grupo de especies o agrupación vegetal cuya presencia o estado nos da información sobre ciertas características ecológicas, es decir, (físico-químicas, micro-climáticas, biológicas y funcionales), del medio ambiente, o sobre el impacto de ciertas prácticas en el medio.
4. **Biosorción:** es la propiedad de ciertas biomoléculas para fijar y concentrar iones selectos como metales pesados u otras moléculas.
5. **Cepa:** es una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.
6. **Crecimiento microbiano:** es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo.
7. **Cultivo:** es el crecimiento de los microorganismos.

- 8. Detoxicación biológica:** es la limpieza de un sistema u organismo que contiene sustancias nocivas para la vida mediante seres vivos, pueden ser bacterias, mohos, hongos e incluso algas.
- 9. Enriquecimiento:** proceso que incrementa los números de un agente patógeno desde menos de 10 células hasta cantidades detectables.
- 10. Inóculo:** suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación.
- 11. Microorganismo:** organismos microscópicos pertenecientes por regla general a virus, bacterias, algas, hongos o protozoos.
- 12. Medio de Cultivo:** es el material alimenticio en el que crecen los microorganismos y debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios.
- 13. Medios selectivos:** Son aquellos que favorecen por su diseño el crecimiento específico de un microorganismo particular o grupo de microorganismos.
- 14. Siembra por agotamiento:** tipo de siembra cuya finalidad es obtener colonias aisladas del microorganismo o microorganismos sobre el medio de cultivo sólido.
- 15. Suspensión bacteriana:** es un lisado de gérmenes en medio acuoso que presenta una composición cualitativa y cuantitativa establecida.