



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A METALES PESADOS OBTENIDAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS CON DERIVADOS DE HIDROCARBUROS EN LA CIUDAD DE RIOBAMBA

Trabajo de titulación para optar por el título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: LORENA ELIZABETH RODRÍGUEZ URQUIZO

DIRECTOR: PhD. GERARDO EMILIO MEDINA

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Lorena Elizabeth Rodríguez Urquiza

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A METALES PESADOS OBTENIDAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS CON DERIVADOS DE HIDROCARBUROS EN LA CIUDAD DE RIOBAMBA” de responsabilidad de la señorita: Lorena Elizabeth Rodríguez Urquiza, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

PhD. GERARDO MEDINA

DIRECTOR DEL TRABAJO DE -----

TITULACIÓN

MSc. PAOLA CHILUIZA

MIEMBRO DEL TRIBUNAL -----

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Lorena Elizabeth Rodríguez Urquizo, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 09 de marzo de 2017

Lorena Elizabeth Rodríguez Urquizo

0605808252

Yo, Lorena Elizabeth Rodríguez Urquizo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Proyecto de Titulación y el patrimonio intelectual del Proyecto de titulación, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

LORENA ELIZABETH RODRÍGUEZ URQUIZO

DEDICATORIA

A Dios por ser fuente de bondad, amor y por guiarme hasta cumplir mis objetivos. A mis padres, hermano y familia por ser mi ejemplo y por brindarme su amor, apoyo constante y sacrificio incondicional. A Byron y mi princesita Luciana Salomé, motivación e inspiración en mi vida.

Lorena

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme dado salud y las fuerzas necesarias para culminar mi carrera con éxito, además por brindarme varios aprendizajes y momentos de felicidad a lo largo de mi vida.

A mis padres Edgar y Fanny por brindarme todo su apoyo, por darme la oportunidad de educarme y por ser mi ejemplo a seguir en cada momento.

A mi hermano Lennyn por ser parte importante de mi vida y por llenar de alegría muchos momentos.

A Byron por haberme apoyado en todo momento, por su paciencia y amor incondicional.

A mi princesita Luciana por inspirarme a culminar esta etapa.

A mi tutor Dr. Gerardo Medina y mi asesora Ing. Paola Chiluzza por su tiempo, conocimiento y paciencia en la elaboración de este trabajo.

Lorena

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
INDICE DE TABLAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPITULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1 Identificación del problema.....	1
1.2 Justificación de la Investigación.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
CAPITULO II	
MARCO TEÓRICO	
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	5
2.2 Marco conceptual.....	6
2.2.1 Contaminación.....	6
2.2.1.1 Contaminación atmosférica.....	6
2.2.1.2 Contaminación del agua.....	6
2.2.1.3 Contaminación del suelo.....	7
2.2.2 Metales pesados.....	7
2.2.2.1 Características y toxicidad de los principales metales pesados.....	7
2.2.2.2 Fuentes de generación y emisión de los metales pesados.....	9
2.2.2.3 Sistemas para la eliminación de metales pesados.....	10
2.2.3 Biorremediación.....	11
2.2.3.1 Algunos métodos biológicos para remediar ambientes contaminados con metales pesados.....	11
2.2.4 Bacteria.....	14
2.2.4.1 Bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	15
2.2.4.2 Bacterias resistentes a metales pesados.....	15
2.2.4.3 Mecanismos de resistencia a metales.....	16
2.2.4.4 Crecimiento bacteriano.....	17

2.2.5	Medios de cultivo.....	18
2.2.5.1	Por su estado físico.....	18
2.2.5.2	Por su utilización.....	18
2.2.5.3	Por su composición.....	19
2.2.5.4	Por su origen.....	19
2.2.6	Técnicas de inoculación.....	20
2.2.6.1	Diseminación en placa.....	20
2.2.6.2	Inoculación de medios semisólidos en tubo.....	20
2.2.6.3	Inoculación en medios líquidos.....	20
2.2.6.4	Inoculación en medios sólidos (tubo): Pico de flauta o cola de pescado.....	21
2.2.7	Caracterización macroscópica de los microorganismos.....	21
2.2.8	Pruebas bioquímicas de identificación.....	22
2.2.8.1	Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar, con lectura inmediata.....	22
2.2.8.2	Pruebas lentas con lectura de 18 a 48 horas.....	23
2.2.9	Ambientes contaminados con derivados de hidrocarburos.....	28
2.2.9.1	Estaciones de combustible.....	28
2.2.9.2	Lubricadoras.....	29
CAPITULO III: METODOLOGÍA		
3.1	Metodología de la Investigación.....	31
3.2	Lugar del desarrollo de la investigación.....	31
3.2.1	Lugar de muestreo.....	31
3.2.2	Lugar de recolección de datos.....	32
3.3	Fases de la Investigación.....	32
3.3.1	Fase I: Muestreo.....	32
3.3.1.1	Procedimiento del muestreo.....	32
3.3.2	Fase II: Aislamiento.....	33
3.3.2.1	Procedimiento.....	33
3.3.2.2	Siembra de los aislados por agotamiento en superficie.....	36
3.3.3	Fase III: Caracterización.....	37
3.3.4	Fase IV: Evaluación de resistencia a metales pesados.....	38
3.3.5	Fase V: Identificación.....	40
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
4.1	Fase I: Muestreo.....	43
4.2	Fase II: Aislamiento.....	44
4.2.1	Conteo microbiológico inicial.....	44

4.2.2	Selección de clones bacterianos.....	46
4.2.3	Estabilización de colonias.....	47
4.3	Fase III: Caracterización de los clones bacterianos.....	47
4.3.1	Tinción Gram.....	47
4.3.2	Caracterización macroscópica.....	49
4.3.2.1	Forma.....	50
4.3.2.2	Borde.....	51
4.3.2.3	Elevación.....	52
4.3.2.4	Color.....	53
4.4	Fase IV: Evaluación de la resistencia bacteriana a metales pesados (Hg, Cd, Cr y Pb).....	53
4.4.1	Evaluación de resistencia de los aislados en medio TSA con Hg, Cd, Cr y Pb.....	53
4.4.2	Evaluación de resistencia de los aislados en medio M9 con Hg, Cd, Cr y Pb.....	62
4.4.3	Resistencia a Hg.....	68
4.4.4	Resistencia a Cd.....	69
4.4.5	Resistencia a Cromo.....	70
4.4.6	Resistencia a Plomo.....	71
4.4.7	Producción de pigmentos en los clones aislados.....	72
4.5	Fase V: Identificación bacteriana por pruebas bioquímicas.....	74

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2	Interacción entre metales pesados y microorganismos.....	13
Figura 2-2	Mecanismos de eliminación de metales pesados por bacterias.....	17
Figura 3-2	Reproducción bacteriana por fisión binaria.....	17
Figura 4-2	Forma de las colonias.....	21
Figura 5-2	Bordes de las colonias.....	22
Figura 6-2	Elevación de las colonias.....	22
Figura 7-2	Resultados de la prueba del citrato.....	23
Figura 8-2	Resultados de la prueba de ureasa.....	24
Figura 9-2	Resultados de la prueba de SIM.....	26
Figura 10-2	Resultados de la prueba de Kligler.....	27
Figura 1-4	Puntos de muestreo.....	43
Figura 2-4	Características macroscópicas de los aislados bacterianos en presencia de plomo.....	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-4	Conteo microbiológico en TSA.....	45
Gráfico 2-4	Conteo microbiológico en M9.....	45
Gráfico 3-4	Clones aislados de medio TSA.....	48
Gráfico 4-4	Clones aislado de medio M9.....	49
Gráfico 5-4	Forma macroscópica de los clones aislados.....	51
Gráfico 6-4	Borde de los clones aislados.....	52
Gráfico 7-4	Elevación de los clones aislados.....	52
Gráfico 8-4	Color de los clones aislados.....	53
Gráfico 9-4	Resistencia a Mercurio.....	68
Gráfico 10-4	Resistencia a Cadmio.....	69
Gráfico 11-4	Resistencia a Cromo.....	70
Gráfico 12-4	Resistencia a Plomo.....	71
Gráfico 13-4	Clones aislados en medio TSA.....	75
Gráfico 14-4	Clones aislados en medio M9.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2	Fuente de generación de metales pesados.....	9
Tabla 2-2	Características generales de las tecnologías empleadas para la descontaminación de metales pesados.....	10
Tabla 3-2	Microorganismos identificados con la prueba del citrato.....	24
Tabla 4-2	Microorganismos identificados con la prueba de SIM.....	26
Tabla 5-2	Microorganismos identificados con la prueba de manitol.....	28
Tabla 6-2	Niveles de contaminantes permitidos en los aceites usados.....	30
Tabla 1-3	Metodología de la investigación.....	31
Tabla 2-3	Composición de Triptona Soya Agar.....	33
Tabla 3-3	Composición del medio M9.....	34
Tabla 4-3	Concentraciones usadas para la prueba de resistencia en medio TSA y M9.....	39
Tabla 1-4	Conteo microbiológico inicial.....	44
Tabla 2-4	Clones seleccionados.....	46
Tabla 3-4	Tinción Gram de los clones seleccionados de medio M9 y TSA.....	47
Tabla 4-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (50 ug/ml), Cr (100 ug/ml) y Pb (250 ug/ml).....	54
Tabla 5-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (100 ug/ml), Cr (200 ug/ml) y Pb (500 ug/ml).....	55
Tabla 6-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (200 ug/ml), Cr (400 ug/ml) y Pb (750 ug/ml).....	56
Tabla 7-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (400 ug/ml), Cr (800 ug/ml) y Pb (1000 ug/ml).....	57
Tabla 8-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg (500 ug/ml), Cd (800 ug/ml), Cr (1600 ug/ml) y Pb (1500 ug/ml).....	58
Tabla 9-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cd (1200 ug/ml), Cr (2000 ug/ml) y Pb (2500 ug/ml).....	59
Tabla 10-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cd (1500 ug/ml), Cr (3000 ug/ml) y Pb (3500 ug/ml).....	60
Tabla 11-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cr (3500 ug/ml) y Pb (4000 ug/ml).....	61
Tabla 12-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cr (4000 ug/ml) y Pb (4500 ug/ml).....	61

Tabla 13-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (50 ug/ml), Cr (100 ug/ml) y Pb (250 ug/ml).....	63
Tabla 14-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (100 ug/ml), Cr (200 ug/ml) y Pb (500 ug/ml).....	63
Tabla 15-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cd (200 ug/ml), Cr (400 ug/ml) y Pb (750 ug/ml).....	65
Tabla 16-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cd (400 ug/ml), Cr (800 ug/ml) y Pb (1000 ug/ml).....	65
Tabla 17-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb (1500 ug/ml).....	66
Tabla 18-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb (2500 ug/ml).....	66
Tabla 19-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb (3500 ug/ml).....	67
Tabla 20-4	Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb (4000 ug/ml).....	67
Tabla 21-4	Producción de pigmentos en los clones aislados en medio TSA con Mercurio.....	73
Tabla 22-4	Producción de pigmentos en los clones aislados en medio TSA con Plomo.....	73

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar bacterias resistentes a metales pesados obtenidas de ambientes contaminados con derivados de hidrocarburos en la ciudad de Riobamba y que puedan ser consideradas como potenciales agentes biorremediadores de ambientes contaminados con metales, mercurio (Hg), cadmio (Cd), cromo (Cr) y plomo (Pb). Para lo cual se aislaron bacterias de muestras de agua residual de las trampas de grasas de los talleres del Municipio de Riobamba y de la trampa de grasas de la Estación de Combustible de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, usando 2 medios de cultivo, uno alto en nutrientes (TSA) y el otro mínimo (M9), ambos medios fueron utilizados con y sin la adición de una presión selectiva que fue acetato de plomo en 25 ppm. Se aislaron un total de 65 clones, 35 obtenidos de medio TSA y 30 de medio mínimo. Una vez aisladas, purificadas y caracterizadas macroscópica y microscópicamente, dichos clones fueron sometidos a concentraciones crecientes de metales pesados, de lo cual 3 clones crecieron hasta la concentración de 500 ppm, 5 clones en cadmio a 1500 ppm, 4 clones en cromo a 4000 ppm y 5 clones en plomo a 4500 ppm, estos clones crecieron en medio TSA. En medio M9 1 clon creció en mercurio hasta 100 ppm, 2 clones en cadmio a 400 ppm, 1 clon en cromo a 800 ppm y 2 clones en plomo a 4000 ppm. Mediante pruebas bioquímicas se identificaron un total de 12 clones que tuvieron resistencia a metales pesados *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Pseudomonas*, *Neisseria* y *Klebsiella oxytoca*. Se concluyó que en nuestro medio es posible encontrar bacterias resistentes a metales pesados, abriendo paso a estudiar dichas bacterias como potenciales agentes para biorremediación para lo cual se recomienda realizar investigaciones en esta área con dichas bacterias encontradas.

PALABRAS CLAVES: <TECNOLOGIA Y CIENCIAS DE LA INGENIERIA>
<MICROBIOLOGIA> <METALES PESADOS> <BACTERIA (*Proteus vulgaris*)>
<BACTERIA (*Klebsiella ozaenae*)> <BACTERIA (*Pseudomonas*)> <BACTERIA (*Neisseria*)>
<BACTERIA (*Klebsiella oxytoca*)>

ABSTRACT

The main purpose of this research was to isolate and characterize bacteria which are resistant to heavy metals, and coming from environments contaminated with hydrocarbon derivatives in Riobamba city, and that can be considered as potential bio-remediating agents of environments contaminated with metals, mercury (Hg), Cadmium (Cd), Chromium (Cr) and lead (Pb). In order to carry out this process, bacteria were isolated from wastewater samples of the grease traps of the Riobamba Municipality workshops, and from the grease trap of the fuel station of the Polytechnic High School of Chimborazo by using 2 culture media: The first one, high in nutrients (TSA), and the another one minimum in nutrients (M9). These two media were used with and without the addition of a selective pressure, which was lead acetate at 25 ppm (parts per million). A total of 65 clones were isolated, 35 coming from TSA medium and 30 coming from minimal medium. Once isolated, purified and characterized macroscopically and microscopically, these clones were subjected to increasing concentrations of heavy metals, which showed that 3 clones were grew up to the concentration of 500 ppm, 5 clones in cadmium at 1500 ppm, 4 clones in chromium at 4000 ppm, and 5 clones in lead at 4500 ppm, these clones grew in TSA medium. In the other hand, in M9 medium; 1 clone in chromium at 800 ppm and 2 clones in lead at 4000 ppm. Biochemical tests identified a total of 12 clones, which showed resistance to heavy metals: *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Pseudomonas*, *Neisseria* and *Klebsiella oxytoca*. It is concluded that in our environment it is possible to find bacteria resistant to heavy metals, which foster to the study of these bacteria as potential agents for bioremediation so that it is recommended to conduct researches in this area involving the bacteria found.

KEY WORDS: <Technology an Engineering Sciences>, <Microbiology>, <Heavy Metals>, <*Proteus vulgaris* bacteria>, <*Klebsiella ozaenae* bacteria>, <*Pseudomonas* bacteria>, <*Neisseria* bacteria>, <*Klebsiella oxytoca* bacteria>

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Identificación del problema

El aumento de las industrias y la descarga de sus desechos a ríos, suelo y atmósfera han provocado un fuerte problema de contaminación por sus componentes. Uno de ellos son los metales pesados que se encuentran distribuidos en una gran variedad de compuestos derivados de las actividades antropogénicas como las actividades industriales, la minería, los combustibles, lubricantes, incineración de la basura, el crecimiento vehicular en las ciudades, etc.

La presencia de metales pesados en el ambiente constituye un problema de salud pública debido a que ocasionan enfermedades, tanto en las personas que están trabajando en ambientes contaminados con éstos, como en aquellas que tienen contacto de alguna manera con estos ambientes sin que tengan una permanencia total. Los principales órganos del cuerpo humano que se ven afectados por la acumulación de metales pesados son los riñones, hígado y pulmones, así como el sistema nervioso y neurológico, causando enfermedades como la esclerosis, pérdida de habilidades cognitivas, patologías congénitas, insuficiencia renal, etc. (Romero, 2009)

Una de las principales causas de la contaminación por metales pesados en el Ecuador es la actividad minera que por años ha sido llevada de manera artesanal en el país, sobretodo en áreas como Zaruma, Portovelo, Nambija, entre otras. (Agua, 2013)

En un estudio de la Fundación Salud y Ambiente realizado en los ríos Puyango y Esmeraldas, se analizaron sus sedimentos encontrando niveles altos de mercurio y plomo en el primero y aluminio en el segundo, produciendo a su vez bioacumulación sobre distintos organismos vivos (plantas, animales y el ser humano). (Agua, 2013)

En Riobamba se tienen datos de contaminación por Boro, Vanadio, Bario y Cobre en los sedimentos de la Laguna San Antonio, en los cuales los niveles de estos metales pesados se encuentran fuera del límite establecido por la legislación. (Cazorla, 2014. p. 136)

El crecimiento vehicular en las ciudades, ha implicado el uso excesivo de combustibles y lubricantes, generando desde hace años una contaminación ambiental con metales pesados que resulta perjudicial para el medio ambiente pudiendo incluso causar importantes desequilibrios en los ecosistemas.

Las estaciones de combustible y las lubricadoras constituyen ambientes donde se pueden encontrar bacterias resistentes a metales pesados debido a que en ellas se manipulan recipientes, filtros, agua contaminada con derivados de hidrocarburos, aceites lubricantes usados, etc. Estos residuos se acumulan por varios días o semanas permitiendo el desarrollo de microorganismos adaptados a este medio y a las condiciones climáticas de la ciudad.

Para la eliminación de los metales pesados que puedan estar presentes en el medio ambiente se puede recurrir a los procesos de Biorremediación que consisten en utilizar organismos vivos, o cualquier derivado de ellos, para transformar sustancias nocivas para el medio ambiente en elementos inocuos o menos contaminantes (ArgenBio, 2007). Para la realización de estos procesos es muy importante la búsqueda, aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de biodegradar o bioacumular altos niveles de metales pesados, que podrían ser utilizados como herramientas de Biorremediación. En la elección de bacterias que sean resistentes a metales pesados, la primera característica a tener en cuenta es la resistencia a altas concentraciones de éstos, aunque posteriormente se debe comprobar que efectivamente esta característica de resistencia pueda ser utilizada en procesos de biorremediación.

1.2 Justificación de la Investigación

Los metales pesados en altas concentraciones resultan tóxicos para el ecosistema y la salud de las personas, por eso la eliminación mediante procesos de biorremediación constituye una alternativa que es limpia y amigable con el ambiente basada en el aprovechamiento de ciertas características de algunas bacterias. (Vullo, 2003)

El presente trabajo de investigación se enfoca en encontrar bacterias capaces de soportar altas concentraciones de metales pesados sobre las que posteriormente se puedan realizar nuevos estudios que demuestren su capacidad de eliminarlos del medio. Por tal razón se han escogido lugares que muestran contaminación con hidrocarburos dentro de la ciudad de Riobamba, por ser un residuo que contiene metales pesados dentro de su composición, para su aislamiento.

Las bacterias obtenidas podrían ser utilizadas como herramientas biotecnológicas para biorremediar ambientes contaminados con metales pesados, lo cual beneficiaría a una gran cantidad de la población del Ecuador que pueden estar en contacto sin saberlo con metales pesados, ya sea mediante alimentos, agua o aire contaminados. El aislamiento e identificación de estas bacterias contribuiría además a enfocar investigaciones futuras que utilicen estas bacterias como punto de partida para el estudio de los mecanismos de resistencia frente a metales y su aplicación para remediar ambientes contaminados con estos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar bacterias resistentes a metales pesados obtenidas de ambientes contaminados con derivados de hidrocarburos en la ciudad de Riobamba y que puedan ser consideradas como potenciales agentes biorremediadores de ambientes contaminados con metales.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Aislar las cepas bacterianas que muestren resistencia a metales pesados.
- Determinar la resistencia de las cepas aisladas a concentraciones crecientes de metales pesados.
- Identificar las cepas bacterianas que muestren resistencia a mayor concentración de metales pesados.

CAPITULO II

1. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

Los metales pesados constituyen una parte fundamental de todas las actividades antropogénicas como las industrias, la agricultura, la minería, el uso de vehículos a motor, las actividades en hogares, etc. Los diversos métodos empleados para el tratamiento de los metales pesados no siempre son efectivos y suponen un costo alto, por eso es importante desarrollar nuevas técnicas eficientes, que sean fáciles de aplicar y amigables con el ambiente. (Areco, 2011. pp. 17)

En el ámbito biológico, se han realizado diferentes estudios en todo el mundo en relación al aislamiento de microorganismos resistentes a metales pesados, por la importancia de su identificación. Martínez *et al.* (2010) estudiaron la resistencia a antibióticos y metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares, permitiendo la identificación de 23 cepas resistentes a plomo (Pb), cromo (Cr), cadmio (Cd) y antibióticos, entre las cuales estuvieron los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*. Todas las cepas aisladas se sometieron a tres concentraciones diferentes de Pb, Cr y Cd (0.5 mM, 1.0 mM y 1.5 mM), presentándose similar resistencia en todos los casos frente a las concentraciones de Pb y Cr ensayadas, mientras que para el Cd el género *Micrococcus* fue el más resistente seguido de *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Neisseria*.

Acevedo & Severiche (2013) encontraron 9 cepas resistentes a di-bromo-mercurio, de las cuales ocho correspondían a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Salmonella sp*, *Acinetobacter sp*) y 1 a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus sp*). Todos estos géneros fueron sometidos a concentraciones crecientes de di-bromo-mercurio (10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 45 ppm, 60 ppm, 75 ppm, 90 ppm, 105 ppm, 120 ppm, 135 ppm, 150 ppm y 180 ppm) formando biopelículas en todas las concentraciones.

Espinoza *et al.* (2015) en un estudio de bacterias resistentes y transformadoras de cromo (VI) aisladas a partir de sedimentos del río Lerma en México obtuvieron 6 cepas resistentes de las cuales 4 correspondían al género *Pseudomonas*, y las otras dos restantes correspondían a *Comamonas testosteroni* y *Enterobacter cancerogenus*. Tres cepas de las mencionadas anteriormente resistieron concentraciones superiores a 207 mg/L de Cr (VI) en el siguiente orden de resistencia: *Pseudomonas entomophila* > *Pseudomonas cedrina* > *Pseudomonas graminis*.

En la ciudad de Riobamba se realizó la obtención de un consorcio bacteriano de los sedimentos de la Laguna San Antonio, identificando las bacterias *Xenorhabdus nematophilys* y *E. coli*, que redujeron la concentración de Bario de 40ppm a 27,58ppm, en el caso del Cobre de 5ppm a 0,32ppm y de 6ppm de Vanadio a 0,30ppm. (Cazorla, 2014.p. 136)

2.2 Marco conceptual

2.2.1 Contaminación

Según el Libro VI Anexo 6 Manejo Desechos Sólidos no Peligrosos del TULSMA se define el término contaminación como “la presencia de uno o más contaminantes o cualquier combinación de ellos, en concentraciones y permanencia superiores a las establecidas en la legislación vigente”. (TULSMA, 2003)

Los contaminantes pueden ser cualquier agente físico, químico o biológico que han sido introducidos a un medio al cual no pertenecen, cuya presencia sea perjudicial para la salud humana, la flora y la fauna, causando desequilibrio en el entorno. (Romero, *et al.*, 2006, p. 1) La contaminación se produce en los tres componentes abióticos: aire, agua y suelo.

2.2.1.1 Contaminación atmosférica

Se denomina contaminación atmosférica a la emisión de sustancias peligrosas en el aire, que pueden ser de origen natural o antropogénico en concentraciones que no pueden ser transformados por los procesos naturales. Entre ellos se encuentran: gases, aerosoles, partículas sólidas y líquidas en suspensión, gases, vapores, compuestos fotoquímicos, sulfatos, etc. (Romero, *et al.*, 2006, pp. 2, 3)

2.2.1.2 Contaminación del agua

Es la presencia de elementos no deseables y tóxicos en las fuentes de agua, influenciado por el ciclo del agua y afectado por las actividades humanas como el vertido de aguas residuales que pueden ser de origen doméstico, industrial, agrícola y cuya carga contaminante no puede ser depurada naturalmente. (Barceló & López, 2008, p.1)

2.2.1.3 Contaminación del suelo

Es la presencia de elementos contaminantes en el suelo provenientes de distintas actividades antropogénicas como la industria, vertederos, explotaciones mineras, la agricultura (fertilizantes, plaguicidas, etc.), tráfico, lodos de depuradoras, disposición de material particulado, etc., que afectan a zonas cerca y lejos de la fuente de exposición generando gran impacto a los seres vivos que se desarrolla sobre el suelo y contaminando el agua por la infiltración. (Silva & Correa, 2009, pp. 18, 19)

2.2.2 Metales pesados

Los metales pesados son un grupo de elementos que tienen una densidad superior a 4 g/cm³ y que tienen vital importancia a nivel ambiental y sanitario por su alta toxicidad. Se bioacumulan en la cadena trófica, llegando a ocasionar daños irreversibles. (Salomons, 1995)

Según la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) se denomina a los metales pesados como “elementos tóxicos” entre los que se encuentran: Arsénico, cobre, cromo, cobalto, cadmio, níquel, zinc, plata titanio, selenio, mercurio y plomo. (INECC, 2009)

2.2.2.1 Características y toxicidad de los principales metales pesados

Mercurio (Hg).

Es un metal color plateado. A temperatura ambiente lo podemos encontrar en estado líquido (Martin, 2008. p. 18). La exposición a mercurio incluso en concentraciones pequeñas puede causar graves daños a la salud, afectando principalmente el sistema neurológico, nervioso, al aparato digestivo, los ojos, riñones y pulmones. Cuando mujeres embarazadas se encuentran expuestas a altas concentraciones de mercurio puede causar alteraciones en el feto causando trastornos congénitos y cognitivos (leve retraso mental). (OMS, 2016)

Plomo (Pb).

Es un metal pesado color gris mate y flexible, con bajo punto de fusión, y con valencia 2 y 4. (Martin, 2008. pp. 19). La exposición al plomo causa daños en el cerebro, el hígado, riñones, huesos y el sistema nervioso, afectando principalmente a los niños por su mayor capacidad de absorción que los adultos (entre 4-5 veces mayor). Una exposición de mujeres embarazadas a este

metal puede producir un aborto natural, daños cognitivos al niño o hasta la muerte fetal. (OMS, 2015)

Cromo (Cr).

Es un metal de color gris acerado y muy resistente a la corrosión, que se encuentra principalmente en forma de Cr (III) y Cr (VI). La toxicidad del cromo depende del estado de oxidación en el que se encuentre. El Cr (III) no es tan tóxico como el Cr (VI) que resulta perjudicial para animales, plantas y el ser humano, una pequeña dosis puede resultar letal. En el organismo se transforma de Cr (VI) a Cr (III) pero una parte llega a la sangre y puede causar daños en el ADN y riesgo carcinogénico. (Martin, 2008. p. 23-24).

Cadmio (Cd).

El Cadmio es de color blanco azulado y poco abundante. Es muy tóxico y se puede encontrar en estado iónico +2 y +1. (Martin, 2008. p. 26). La exposición a este metal afecta principalmente a los riñones, hígado, pulmones, huesos, testículos y placenta. Además se ha asociado con una alta mortalidad por cáncer. Los problemas en la salud por cadmio dependen de la dosis, fuentes y tipo de exposición. (Martínez, 2012. pp.33-34). Junto con el plomo y el mercurio forma el llamado “big three”. (Martin, 2008. p. 26).

Cobre (Cu).

Es de color rojizo y se le emplea en varias aplicaciones técnicas. Es buen conductor de la electricidad por lo que se lo utiliza para formar cables eléctricos. La exposición a cobre provoca tos, dolor de cabeza, mareos y efectos gastrointestinales. (Martin, 2008. p. 28-29).

2.2.2.2 Fuentes de generación y emisión de los metales pesados.

Los metales pesados se encuentran de forma natural en la corteza terrestre pero cuando se encuentran en concentraciones tóxicas se les considera contaminantes. La actividad antropogénica ha contribuido mayoritariamente a la dispersión de éstos en diferentes ambientes, principalmente por: la descarga a los ríos de efluentes por parte de las industrias, las emisiones hacia la atmósfera, la actividad minera, las emisiones de los vehículos, la síntesis de hidrocarburos, la elaboración de distintos productos de metal y la pintura. (INECC, 2009). Otro

problema en el vertido de metales son las curtiembres cuyos residuos contienen altos niveles de Cr (VI). (Medina, 2010. pp. 1-2)

Las principales fuentes de emisión de algunos de los metales pesados se muestran en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2 Fuente de generación de metales pesados

Metal Pesado	Fuente de generación
Mercurio (Hg)	<ul style="list-style-type: none"> • Actividades mineras de extracción de oro, plata y cobre. • Fundición de metales. • Incineración de residuos peligrosos y biológicos infecciosos. • Producción de carbón.
Cobre (Cu)	<ul style="list-style-type: none"> • Efluentes industriales • Industria de la minería • Industria del papel • Industria del petróleo • Galvanoplastia.
Plomo (Pb)	<ul style="list-style-type: none"> • Fundición de metales • Producción de pintura • Industria electrónica. • Uso de combustible con Pb. • Revestimiento de cables • Fabricación de anticorrosivos
Cadmio (Cd)	<ul style="list-style-type: none"> • Baterías recargables de Ni/Cd. • Fertilizantes fosfatados • Amalgamas dentarias • Lámparas incandescentes • Pigmentos estabilizantes • Aleaciones. • Elaboración de pinturas. • Galvanización. • Industria del plástico.

Cromo (Cr)	<ul style="list-style-type: none"> • Curtiembre • Productos químicos • Producción de colorantes y pigmentos • Textiles • Fotocopiadoras
------------	--

Realizado por Lorena Rodríguez

Fuente: (INECC, 2009) (Areco, 2011. pp. 19-21)

2.2.2.3 Sistemas para la eliminación de metales pesados

Numerosas industrias, como las de galvanizado, farmacéutica e industria electrónica, producen gran cantidad de residuos que se descargan a cuerpos de agua y suelos. Algunos procesos como la adsorción en carbón activo, electrolisis, intercambio iónico, filtración a través de membrana, o precipitación en forma de hidróxidos o sulfuros, son utilizados para el tratamiento de estos metales. (Ver tabla 2-2) (Vilchez, 2005. p. 7)

Tabla 2-2 Características generales de las tecnologías empleadas para la descontaminación de metales pesados.

Tecnología aplicada	Tolerancia a los campos de pH	Selectividad a los metales	Influencia de los solidos en suspensión	Tolerancia a sustancias organicas	Niveles de metales óptimos soportables mg/L
Adsorción sobre carbón activo	Baja	Moderada	Muy alta	Pueden inactivar el carbon	< 10
Electrólisis	Alta	Moderada	Baja	Alta	>10
Intercambio iónico	Baja	Alta	Muy alta	Inactivan la resina	< 100
Filtración por membrana	Baja	Moderada	Muy alta	Intolerancia	>10

Precipitación por hidróxidos	Alta	Baja	Baja	Alta	>10
Precipitación por sulfuros	Baja	Depende del Ph	Baja	Alta	>10
Extracciones orgánicas	Media	Alta	Muy alta	Intolerancia	>100

Realizado por Lorena Rodríguez

Fuente: (Vilchez, 2005. p.8)

2.2.3 Biorremediación

La biorremediación es una tecnología que utiliza organismos vivos (microorganismos), o cualquier derivado de ellos, para transformar contaminantes en compuestos inocuos para el medio ambiente. Se utiliza para tratar agua, suelos y aire contaminados con metales pesados, residuos orgánicos, hidrocarburos, pesticidas, etc. (ArgenBio, 2007)

Este proceso constituye un método amigable con el ambiente y de menor costo en relación a los métodos químicos, y sus productos representan menor peligro medioambiental. Para aplicar esta tecnología se lo puede hacer de dos maneras: *in situ* y *ex situ*, es decir, en el lugar de la contaminación o trasladando el medio contaminado a otro lugar para su tratamiento. (Sánchez, 2003. pp. 12-13)

La biorremediación suele ser de tres tipos: degradación enzimática (utilizando enzimas), remediación microbiana (uso de microorganismos) y fitorremediación (uso de plantas). (ArgenBio, 2007)

2.2.3.1 Algunos métodos biológicos para remediar ambientes contaminados con metales pesados

La remediación por métodos biológicos consiste en utilizar el potencial de los microorganismos y plantas para transformar, precipitar, movilizar y acumular metales pesados para ayudar a descontaminar los ambientes donde se encuentran. (Vullo, 2003)

Fitorremediación.

La fitorremediación es la utilización de plantas para absorber, acumular, volatilizar o estabilizar contaminantes a través de procesos bioquímicos que se realizan en las plantas, este proceso se puede realizar in situ y ex situ. (Delgadillo *et al.*, 2011. p. 597)

Movilización de los metales pesados en microorganismos

La movilización de los metales pesados es el paso de un estado insoluble a un estado soluble del metal que se da por la acción del agua y la interacción sólido-líquido. Dicha movilidad depende de la disponibilidad del metal y es diferente dependiendo si es de origen natural o antrópico, además de ciertas condiciones medioambientales como la temperatura, humedad, acidez, etc. (Vullo, 2003)

-*Biolixiviación.* Este proceso consiste en mantener los metales en una solución acuosa. Se usa principalmente en la industria minera y metalúrgica para la recuperación de metales como Cu, Ni, Zn y Cd, siendo mediado por bacterias oxidadoras del hierro o sulfuros de las especies *Thiobacillus ferroxidans* o *Thiobacillus thiooxidans*. Pueden actuar en medio aerobio o anaerobio ya que pueden utilizar el Fe^{3+} como último aceptor de electrones en lugar del O_2 . Otra bacteria utilizada es *Alcaligenes eutrophus* que acumula metales pesados una vez que éstos hayan sido solubilizados a través de la liberación de sideróforos (péptidos con capacidad de formar complejos). (Vullo, 2003)

Inmovilización de metales pesados.

La inmovilización de los metales pesados consiste en el paso de un estado soluble en fase acuosa del metal a uno insoluble en fase sólida. (Soto *et al.*, 2010. pp. 196-197)

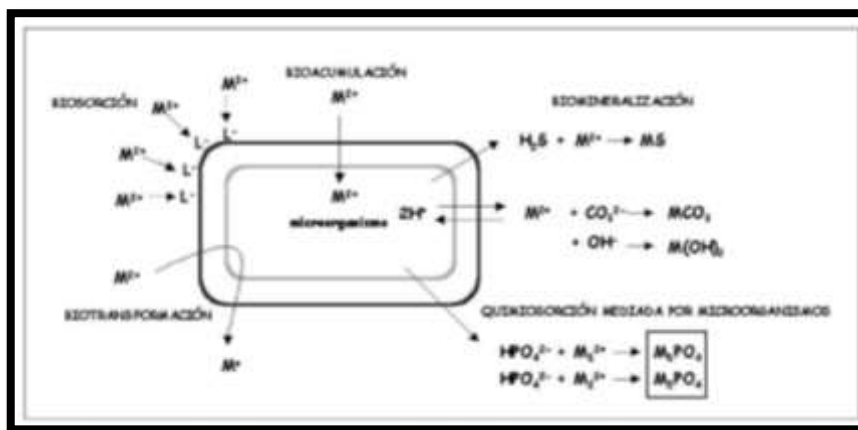


Figura 1-2 Interacción entre metales pesados y microorganismos.
 Fuente: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA14_ARTORIG6.pdf

En los procesos de biorremediación, la inmovilización de los metales pesados se puede producir mediante 4 procesos distintos:

-Biosorción. Es la captación de metales a través de biomasa viva o inerte por la adsorción o intercambio iónico. Se da por la interacción de los metales con ligandos que se encuentran en la superficie celular donde interviene una fase acuosa y una fase sólida como se observa en la figura 2-1. Los elementos de la fase acuosa, por su afinidad, son captados hacia el sólido para después ser separados por distintos mecanismos. El género *Bacillus* sp. ha sido utilizado para eliminar del medio ambiente Cu, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, U y Z. Otros microorganismos también utilizados en este proceso son *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger* y *Streptomyces nursei*. (Cañizares, 2000. pp. 134-137). Aquellas bacterias que son capaces de producir biosorción, como son *Escherichia. coli*, *Alcaligenes* sp. y *Desulfovibrio* sp., para poder resistir las altas concentraciones de metales pesados que se acumulan dentro de ellas utilizan mecanismos de expulsión de metales pesados. En algunas células microbianas se han desarrollado sistemas enzimáticos en los cual el metal se pone en contacto con las enzimas presentes en el interior de la célula involucrando procesos redox para aumentar o disminuir el estado de oxidación, mediante el cual será transformado y excretado al exterior, como es el caso de la enzima mercúrico-reductasa de la *Pseudomonas putida*, que le confiere resistencia al mercurio. (Vilchez, 2005. p. 18)

-Bioacumulación. Este proceso consiste en la acumulación del metal en el citoplasma de la célula por medio de un transporte de membrana a través del sistema H⁺-ATPasa, un esquema de este proceso se observa en la figura 2-1. La utilización de este mecanismo se ha reportado en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y *Saccaromyces cerevisiae* que acumulan el Uranio. (Vullo, 2003)

-Biomineralización. Es un proceso mediante el cual los organismos vivos (procariotas y eucariotas) son capaces de producir minerales (Ver figura 2-1). Los microorganismos pueden generar estos minerales por dos vías: la mineralización controlada biológicamente (BCM) y la mineralización inducida biológicamente (BIM). La BIM posee mecanismos activos y pasivos de mineralización. El primero ocurre por cambios en la sobresaturación del sistema ocasionados por la captación o la excreción de diferentes metabolitos. El segundo se produce por el aporte de núcleos de cristalización tales como superficies celulares (pared celular, membranas, orgánicos, restos celulares y de lisis) que favorecen la precipitación. (Pérez *et al.* 2004. pp. 58-59). Algunos microorganismos son capaces de alcalinizar y precipitar metales pesados mediante mecanismos de resistencia codificados en plásmidos. Esta información genética da lugar a la formación de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior de la célula a contracorriente de una entrada de H^+ , lo cual induce una alcalinización localizada en la superficie celular externa que produce la precipitación de estos metales una vez que han sido expulsados. Otra forma de precipitar los metales es por la formación sulfuros o fosfatos como resultado de alguna actividad enzimática celular, presente en bacterias como *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Vullo, 2003)

-Biotransformación. Este proceso consiste en cambiar el estado de oxidación de los metales de un estado tóxico a otro menos tóxico (Ver figura 2-1). Un ejemplo es el Cr que en su estado de Cr (VI) puede resultar mutagénico o carcinogénico, y una vez transformado a Cr (III) pierde estas características. Otro ejemplo es el que produce la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* sobre el mercurio cambiando su estado de 2^+ a 0. Sin embargo, otros organismos pueden metilarlo y producir compuestos aún más tóxicos. (Vullo, 2003)

2.2.4 Bacteria

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas y microscópicos que carecen de un núcleo verdadero. Éstas pueden o no poseer flagelos otorgándole la característica de móviles o inmóviles, generalmente la mayoría de las bacterias tienen menos de 4 micras de largo. Se reproducen rápidamente por fisión binaria, evolucionando para sobrevivir y adaptarse a nuevos ambientes de estrés ambiental. Las bacterias están en todos los lugares aun en los más inimaginables, se estima que aproximadamente el 1% de todas las bacterias existentes en la Tierra han sido identificadas y estudiadas, esto nos da una idea de la diversidad microbiana. Entre las formas de clasificación se encuentra la tinción en Gram positivas y Gram negativas. (Egas & Tinajero, 2016, pp. 4-5)

Las bacterias tienen una amplia aplicación industrial como el cuidado del medio ambiente, la producción de alimentos, la biotecnología, la genética molecular, etc. (Egas & Tinajero, 2016, pp. 4-5)

2.2.4.1 Bacterias Gram positivas y Gram negativas

La técnica de coloración diferencial denominada tinción de Gram fue desarrollada por el bacteriólogo Hans Christian Joachim Gramen en 1844, se fundamenta en la estructura de la pared celular de las bacterias, la tinción es color violeta para las Gram positivas y color rosa para las Gram negativas. (Mollinedo & González, 2014, pp. 2010)

En la pared celular de las Gram negativas la capa de peptidoglicano es delgada y soluble en solventes orgánicos por lo que no pueden retener el complejo cristal violeta/yodo y es decolorado por alcohol/cetona tiñéndose de la coloración rosácea de la safranina, por el contrario en las Gram positivas la capa de peptidoglicano es gruesa y resistente a los solventes orgánicos por lo que mantiene el color azul/violácea. (Guedea, 2007)

Mediante la tinción Gram pueden distinguirse la forma de las bacterias, los cocos que son de forma esférica (micrococos, diplococos, estreptococos, estafilococos) y bacilos de forma alargada (estreptobacilos). (Guedea, 2007)

2.2.4.2 Bacterias resistentes a metales pesados

Ciertas bacterias, al encontrarse en ambientes contaminados con metales pesados, pueden desarrollar estrategias para resistir altas concentraciones de los mismos. Algunos de estos metales son esenciales para el metabolismo de algunas de ellas, mientras que otras son capaces de proliferar en dichos ambientes porque han adoptado características de tolerancia y resistencia que les permiten captar o expulsar a estos metales para transformarlos o eliminarlos. (Cervantes, 2000)

En estudios realizados sobre aislamiento e identificación de bacterias resistentes a metales pesados se han obtenido varios géneros de Gram+ (*Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Bacillus* spp.) y de Gram- (*Pseudomonas* spp., *Neisseria* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Klebsiella* spp, *Vibrio* spp, *Salmonella* spp y *Acinetobacter* spp.) (Acevedo & Severiche, 2013. pp 75-76.; Martínez et al. 2010. p.1)

Espinoza *et al.* (2015) aislaron 6 cepas resistentes al Cr (VI) de las cuales 4 correspondieron al género *Pseudomonas* y las otras dos restantes a *Comamonas testosteroni* y *Enterobacter cancerogenus*. Vilchez (2005) determinó en un estudio de eliminación de metales pesados de aguas subterráneas mediante sistemas de lechos sumergidos que *Escherichia coli*,

Flavobacterium sp. y *Methanobacterium* sp. eran capaces de reducir el arsénico a otros compuestos tóxicos (arsina y metalarsina).

2.2.4.3 Mecanismos de resistencia a metales

La resistencia que presentan las bacterias a los metales pesados se debe a múltiples sistemas con especificidad de sustratos diferentes. Estos sistemas le confieren protección a la célula contra metales que le puedan causar daño. (Marrero, *et al.*, 2010. p. 69)

Entre estos sistemas se encuentran: (Marrero, *et al.*, 2010. p. 69)

Componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad: La membrana, el espacio periplasmático y el interior de la célula son lugares donde se acumulan los iones metálicos, son las proteínas periplasmáticas las que actúan capturando el metal dentro del citoplasma. Un ejemplo de este proceso ha sido descrito en *Pseudomona aeruginosa* y *Saccharomyces cerevisiae* que acumularon uranio solo dentro del citoplasma. (Marrero, *et al.*, 2010. p. 69)

Enzimas que modifican el estado redox de los metales transformándolos en menos tóxicos: La oxidación, reducción, metilación y demetilación son procesos que se encuentran mediados por enzimas. Ejemplos de este proceso son las enzimas mercurio reductasa y organomercurio liasa capaces de reducir el Hg (II) a Hg⁰, en *Pseudomonas ambigua* se ha descrito la reducción del Cr (VI) a Cr (III) eliminando su toxicidad y haciéndolo menos soluble. (Marrero, *et al.*, 2010. p. 69)

Transportadores que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular: Las ATPasas tipo P y los transportadores compuestos por miembros de la familia de resistencia, nodulación, división celular (RND) están presentes en varias bacterias resistentes a metales pesados que actúan en el flujo activo de iones metálicos. Las ATPasas tipo P actúan como importadoras o exportadoras de su sustrato desde el periplasma al citoplasma o viceversa, lo que también pueden hacer con los metales pesados. (Marrero, *et al.*, 2010. p. 69)

Los transportadores (RND) son proteínas que pueden exportar los metales pesados desde el citoplasma, la membrana citoplasmática o el periplasma directamente a exterior, lo que lo constituye como el sistema de resistencia a metales pesados de mayor importancia en bacterias. (Marrero, *et al.*, 2010. p. 69)

El mecanismo que poseen las bacterias para eliminar metales pesados se encuentra explicado en la figura 2-2, donde se observa los procesos de reducción-oxidación del metal y viceversa, así

como las proteínas que se encuentran unidas al metal para ser expulsadas al exterior del citoplasma y las transformaciones del metal mediadas por enzimas.

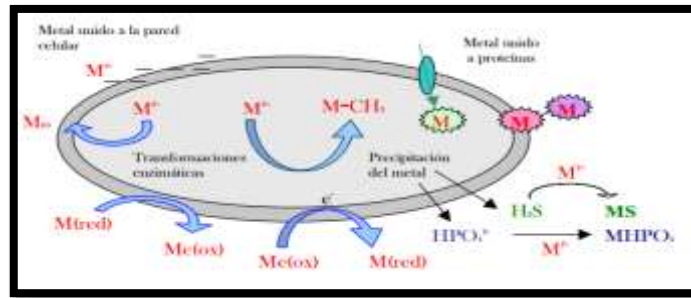


Figura 2-2 Mecanismos de eliminación de metales pesados por bacterias
Fuente: (Vilchez, 2005, p. 19)

2.2.4.4 Crecimiento bacteriano

El crecimiento microbiano implica el aumento de una población total, más no el aumento de la masa de un organismo aislado. El aumento del número de células de una población bacteriana se da por el proceso de reproducción que en el caso de los organismos procariontes es asexual y se da por fisión binaria. (García, 2005, pp. 52-53)

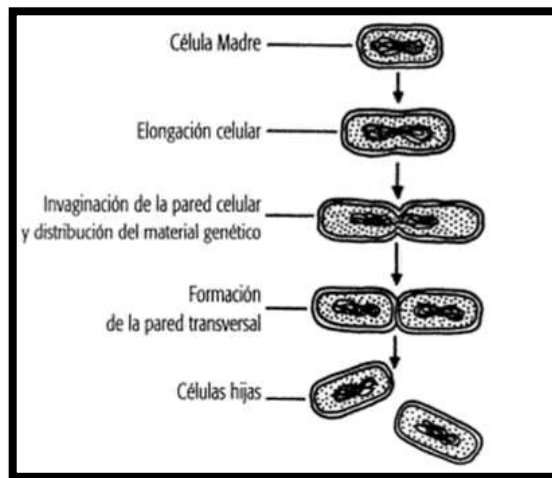


Figura 3-2 Reproducción bacteriana por fisión binaria
Fuente: (García, 2005, pp. 52-53)

Para que el crecimiento de las bacterias se realice, se necesita de requerimientos nutricionales como macronutrientes que son carbono, hidrógeno, nitrógeno y fósforo, además de factores de crecimiento como vitaminas del complejo B, minerales, aminoácidos, ciertos iones orgánicos (potasio, magnesio, calcio, cinc, hierro, manganeso, cobre y cobalto) y condiciones óptimas de temperatura, pH y del potencial de oxidación-reducción. (Koneman, *et al.*, 2008, pp. 189-191)

2.2.5 Medios de cultivo

Un medio de cultivo proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos en el laboratorio, desde nutrientes como el N, C y P, hasta los conocidos micronutrientes K, Cu, Ni, Cr, Ni, Mo, Se y Zn. Cuando estos nutrientes aparecen en altas concentraciones pueden resultar tóxicos e inhibir el crecimiento de microorganismos. (Latorre, 2007. pp. 27-28)

Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo a las siguientes características:

- Por su estado físico
- Por su utilización
- Por su composición
- Por su origen

2.2.5.1 Por su estado físico

-Sólido y Líquido: Son muy útiles para aislar, identificar y conservar cualquier microorganismo. La diferencia entre los dos radica en la consistencia que para el medio sólido se otorga por una sustancia llamada “Agar” que solidifica el medio. Además el medio líquido se utiliza para cultivar bacterias que se encuentren en poca cantidad y el medio sólido para detectar los distintos tipos de bacterias de una muestra. (Casado, *et al.*, 2012, pp. 8-9)

-Semisólido: es útil para estudiar la movilidad de los microorganismos, se utiliza con la misma sustancia gelificante del medio sólido, pero en menor proporción. (Casado, *et al.*, 2012, p. 10)

2.2.5.2 Por su utilización

-Medios comunes: No poseen ningún requerimiento especial, es decir tiene los componentes mínimos para el crecimiento de bacterias. Por ejemplo: agar nutritivo, agar tripticase de soja, etc. (Casado, *et al.*, 2012, p. 10)

-Medios de enriquecimiento: Son medios que requieren algunos factores necesarios para el crecimiento de bacterias exigentes como: sangre, suero, leche, etc. (Casado, *et al.*, 2012, p. 10)

-Medios selectivos: Se utiliza para el crecimiento de poblaciones microbianas específicas, favorecen el desarrollo de éstas y frenan el de otras. (Casado, *et al.*, 2012, p. 10)

-*Medios inhibidores*: Estos medios inhiben completamente el crecimiento de una determinada población microbiana, un ejemplo es el MacConkey que frena totalmente el desarrollo de bacterias Gram positivas. (Casado, *et al.*, 2012, p. 10)

-*Medios diferenciales*: Son medios que revelan características específicas de ciertos microorganismos y que permite distinguir un género de otro. (Casado, *et al.*, 2012, pp. 10-11)

-*Medios de identificación*: Son utilizados para identificar un microorganismo, comprobando alguna cualidad específica del mismo, estos crecen en un sustrato específico del cual se espera obtener el resultado. Ejemplo de este tipo de medio es el Kligler, Citrato de Simmons, entre otros. (Casado, *et al.*, 2012, p. 11)

-*Medios de multiplicación*: Se utiliza para obtener gran cantidad de células a partir de un solo aislado. (Casado, *et al.*, 2012, p. 11)

-*Medios de conservación*: Este medio es utilizado para conservar una cepa en estado viable, que va a ser utilizada posteriormente. (Casado, *et al.*, 2012, p. 11)

-*Medios de transporte*: Se utiliza para el transporte inmediato de muestras. (Casado, *et al.*, 2012, p. 11)

2.2.5.3 Por su composición

-*Medios complejos*: Son medios preparados a partir de tejidos animales, dan excelentes resultados en la práctica y son los más utilizados. (Casado, *et al.*, 2012, p. 12)

-*Medios sintéticos*: Tiene una composición perfectamente definida porque en su composición tiene sustancias químicas conocidas. (Casado, *et al.*, 2012, p. 12)

-*Medios semisintéticos*: Está formado por parte del medio sintéticos, además de extractos orgánicos complejos como extracto de levadura, extracto de tejidos, etc. (Casado, *et al.*, 2012, p. 12)

2.2.5.4 Por su origen

-*Naturales*: Estos medios son aquellos preparados a partir de sustancias naturales de animales y vegetales. (Casado, *et al.*, 2012, p. 12)

-*Sintéticos*: Son aquellos que tienen una composición química definida para alcanzar resultados que se puedan reproducir. (Casado, *et al.*, 2012, p. 12)

-*Semisintéticos*: Son aquellos donde se adiciona factores de crecimiento en forma de un extracto orgánico complejo. (Casado, *et al.*, 2012, p. 12)

2.2.6 Técnicas de inoculación

Debido al tamaño reducido de las bacterias no pueden ser estudiadas en forma individual, por lo que se los estudia en medios de cultivo, la elección de los mismos depende del propósito de estudio, pudiéndose escoger entre medio de cultivo líquido, el cual puede pasar a sólido o semisólido adicionando agar. (Olivas, 2012, p.10)

Las bacterias se cultivan en recipientes de vidrio estériles tales como: tubos de ensayo, cajas Petri, matraces Erlenmeyer y tubos de fermentación. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 26) La siembra puede realizarse con hisopos, asas u otros dispositivos adecuados.

2.2.6.1 Diseminación en placa

-*Estría*: Se realiza por estría cruzada, en Z, simple (en ángulos rectos) y masiva. Su objetivo es diluir colonias para obtener posibles colonias sobre la superficie del agar. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 26)

-*Vaciado en placa*: Se obtiene placas con un número apropiado de colonias, se basa en una dilución aproximada cuantitativa de la muestra original. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 26)

2.2.6.2 Inoculación de medios semisólidos en tubo

-*Por picadura en forma vertical*: Es un medio adecuado para el desarrollo de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, donde se puede observar características como la formación de pigmentos. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 27)

2.2.6.3 Inoculación en medios líquidos

El crecimiento bacteriano en medios líquidos es evidenciado por el enturbamiento del medio, formación de velo o sedimentos en la parte inferior del tubo. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 28)

2.2.6.4 Inoculación en medios sólidos (tubo): Pico de flauta o cola de pescado

Se realiza por punción (picadura), por estría, y por punción y estría. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 29)

2.2.7 Caracterización macroscópica de los microorganismos

Para la caracterización macroscópica se requiere de la observación de las colonias sobre la superficie del medio agarizado. Generalmente el tamaño, aspecto y forma son constantes para cada género. (Peña, 2010)

Las características que se toman en cuenta son las siguientes: (Peña, 2010)

-Tamaño de las colonias.

-Color de las colonias

-Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular. (Ver figura 4-2)

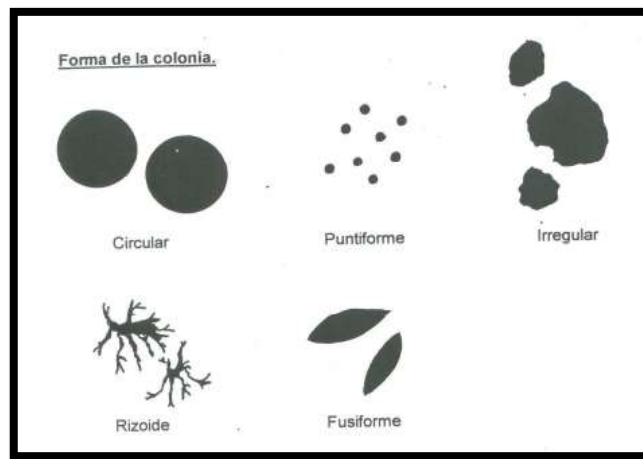


Figura 4-2 Forma de las colonias

Fuente: <https://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>

-Superficie: lisa, rugosa, granular.

-Aspecto: húmedo, seco.

-Bordes: entero, lobulado, filamentoso, ondulado, etc. (Ver figura 5-2)

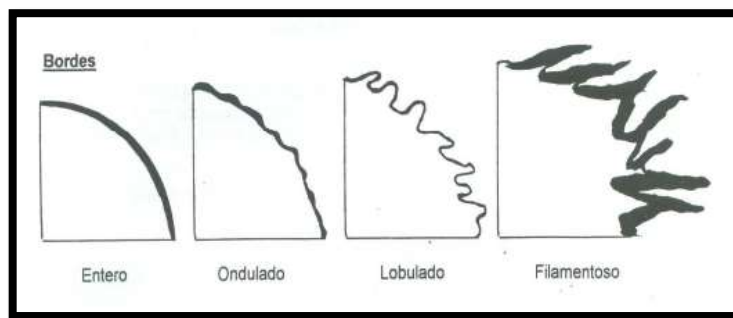


Figura 5-2 Bordes de las colonias

Fuente: <https://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>

-Elevación: plana, convexa, cóncava, plana, elevada, etc. (Ver figura 6-2)

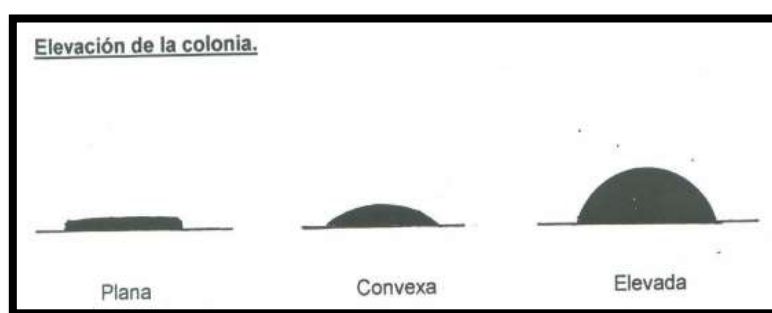


Figura 6-2 Elevación de las colonias

Fuente: <https://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>

2.2.8 Pruebas bioquímicas de identificación

Las pruebas bioquímicas se basan en determinar las características metabólicas de la bacteria que se estudia. Algunas de estas pruebas son de lectura rápida, es decir se puede evaluar su resultado en pocos segundos, otras requieren la incubación por 18 a 48 horas para su lectura, en estas generalmente se expresa alguna capacidad metabólica de la bacteria. (Fernández, *et al.*, 2010. p. 6)

2.2.8.1 Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar, con lectura inmediata.

a. Catalasa

Las bacterias que sintetizan catalasa son las que poseen citocromos, hidrolizan el peróxido de hidrógeno observándose desprendimiento de oxígeno gaseoso en forma de burbujas. Los resultados sirven por ejemplo para separar *Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.*(negativa). (Fernández, *et al.*, 2010. p. 6)

b. Oxidasa

Sirve para determinar la presencia del sistema citocromooxidasa que generalmente se encuentran solo en las bacterias aerobias y algunas anaerobias facultativas. Este sistema oxida el citocromo por medio del oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrogeno según la especie bacteriana. (Fernández, *et al.*, 2010. p. 6)

2.2.8.2 Pruebas lentas con lectura de 18 a 48 horas

a. Prueba del Citrato

En esta prueba se determina si cierto microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de energía para sus funciones metabólicas. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 42)

Resultados (Ver figura 7-2)

Positivo: Si existe crecimiento aunque no haya cambio de color. Si existe crecimiento y cambio de color en el pico de flauta de verde a azul intenso.

Negativo: No existe crecimiento y el medio mantiene su color original.



Figura 7-2 Resultados de la prueba del citrato
Fuente: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 45)

Los microorganismos que se pueden diferenciar con esta prueba se presentan en la tabla 3-2:

Tabla 3-2 Microorganismos identificados con la prueba del citrato

Positivos	Negativos
<i>Salmonella</i>	<i>Edwardsiella</i>
<i>Arizona</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Shigella</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>
<i>Serratia licuefaciens</i>	<i>Otras especies de Moraxella</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Proteus morganii</i>

Realizado por Lorena Rodríguez
Fuente: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 47)

b. *Prueba de ureasa*

Determina si un organismo posee la enzima ureasa que desdobra la urea formando dos moléculas de amoníaco. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 69)

Resultados: (Ver figura 8-2)

Positivo: Cambio de color del medio a rojo intenso en el pico de flauta.

Negativo: Medio de color amarillo.



Figura 8-2 Resultados de la prueba de ureasa
Fuente: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 71)

Esta prueba permite diferenciar por ejemplo *Proteus* ureasa positivo de otros organismos de la familia de las enterobacterias: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 72)

Klebsiella (+)

Escherichia coli (-)

Proteus (+ rápido)

Providencia (-)

c. Prueba de Sulfuro, Indol, Movilidad (SIM)

Con esta prueba se puede determinar si un organismo es capaz de producir ácido sulfúrico produciendo una reacción de color negro, si es móvil o inmóvil y si es capaz de desdoblar el indol de la molécula de triptófano. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 92)

Resultados: (Ver figura 9-2)

Producción de ácido sulfúrico: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 100)

Positivo: Ennegrecimiento del medio.

Negativo: Sin ennegrecimiento del medio.

Indol: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 100)

Positivo: Formación de un anillo rojo en la superficie del medio.

Negativo: No se produce color o se forma un color naranja en la superficie del medio.

Movilidad: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 100)

Positivo: Se forma turbiedad alrededor de la línea de siembra.

Negativo: El crecimiento se mantiene solo en la línea de siembra.



Figura 9-2 Resultados de la prueba de SIM
 Fuente: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 99)

Entre los microorganismos que se pueden identificar se encuentran (Ver tabla 4-2):

Tabla 4-2 Microorganismos identificados con la prueba de SIM

Bacterias	Producción de H ₂ S	Producción de movilidad	Indol
<i>Salmonella typhi</i>	+ 0 -	-	+
<i>Salmonella</i>	+ 0 -	-	+
<i>E. coli</i>	-	+	+ 0 -
<i>Klebsiella</i>	-	+ 0 -	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	+	-	+
<i>Shigella</i>	-	+ 0 -	+ 0 -

Realizado por: Lorena Rodríguez
 Fuente: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 101)

d. Prueba de KLIGLER

Con esta prueba se puede determinar si un organismo es capaz de metabolizar glucosa, sacarosa o ambas, la producción o no de gases como el CO₂ o H₂ y la producción de H₂S. (Fernández, 2010. p. 11)

Resultados: (Ver figura 10-2)

-Rojo en pico de flauta: alcalino; degradación aeróbica de glucosa.

Amarillo en capa profunda: ácido; degradación anaeróbica de la glucosa.

-Amarillo en pico: ácido

Amarillo en capa profunda: ácido.

-Rojo en pico de flauta: alcalino

Sin cambio de color en capa profunda: alcalina

-Producción de H₂S: precipitado negro.

-Producción de gases: Producción de burbujas, descomposición del medio, ligera muesca del medio sobre el costado del tubo o desplazamiento del medio del fondo, dejando un espacio libre.



Figura 10-2 Resultados de la prueba de Kligler

Fuente: (Bailón, *et al.*, 2003. p. 107)

Los microorganismos que se pueden identificar son los siguientes:

-Pico de flauta alcalino / profundidad alcalina: Bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa*. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 109)

-Pico de flauta alcalino / Profundidad acida: Bacterias no fermentadoras de lactosa como *Shigella*. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 109)

-Pico de flauta alcalino / profundidad acida: Bacterias no fermentadoras de lactosa y productoras de H₂S como: *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter* y algunas especies de *Proteus*. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 109)

-Pico de flauta acido / profundidad acida: Coliformes que fermentan lactosa como *E. coli* y *Klebsiella-Enterobacter*. (Bailón, *et al.*, 2003. p. 110)

e. *Prueba de manitol:*

Este es un medio selectivo para el crecimiento y diferenciación de estafilococos. (Fuente: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/manitolsalagar.htm>)

Resultados: (Ver tabla 5-2)

Tabla 5-2 Microorganismos identificados con la prueba de manitol

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Excelente	Amarilla
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	Bueno	Roja
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibido	Inhibida
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Inhibido	Inhibida

Realizado por Lorena Rodríguez

Fuente: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/manitolsalagar.htm>

2.2.9 Ambientes contaminados con derivados de hidrocarburos

Son todos los ambientes donde se utilizan directa o indirectamente derivados de hidrocarburos y que están en contacto con metales pesados dentro de su actividad ya sea por la bioacumulación o por los materiales que se manipulan, y donde la concentración y persistencia de éstos pueden llegar a contaminar el agua, suelo y/o aire. En la presente investigación consideramos los siguientes:

2.2.9.1 Estaciones de combustible

Una estación de servicio de combustible es aquel lugar encargado de vender combustible o lubricantes para todo vehículo a motor. Generalmente se asocian a las grandes distribuidoras de combustible. (Urquiza, 2013. pp. 1-2)

Principales desechos producidos: Los desechos que se producen en una estación de servicio de combustible son:

Residuos sólidos (CAMSLOG, 2014, p. 55)

- Del tipo reciclable: papel, cartón, vidrio.
- No reciclable: basura común.
- Contaminantes sólidos: filtros, latas contaminadas con residuos de aceites.

Residuos líquidos (CAMSLOG, 2014, p. 55)

- Agua contaminada resultante del lavado de las pistas con mezcla de hidrocarburos, y desechos resultantes de la trampa de grasas.

2.2.9.2 Lubricadoras

Son lugares donde se cambian y se expenden aceites para la lubricación de los vehículos a motor. Los aceites usados recogidos se consideran como residuos peligrosos, ya que una pequeña cantidad puede contaminar gran parte del área expuesta a ellos. Entre los componentes contaminantes que poseen estos aceites usados se incluyen: partículas metálicas, compuestos con plomo, aditivos, hidrocarburos, etc. (CEMPRE, 2013)

Aceite Lubricante

Los aceites lubricantes están constituidos por una base, la cual puede ser de origen mineral, vegetal o sintética, su función es evitar el contacto directo entre superficies en movimiento. (Barrera & Velecela, 2015, p. 1)

-Contaminación por aceites lubricantes: En el Ecuador existe una gran demanda de vehículos, lo que a su vez hace que se incremente los residuos del aceite automotriz. En la mayoría de ciudades no existe un control ni un tratamiento a estos aceites, y el vertido de este tanto al aire, agua o suelo causa daño a las plantas, personas y todo ser vivo que se encuentre a su alrededor. (Barrera & Velecela, 2015, p. 18)

La EPA ha establecido valores de referencia para contaminantes permitidos en los aceites lubricantes usados que se presentan en la siguiente tabla: (Barrera & Velecela, 2015, p. 19)

Tabla 6-2 Niveles de contaminantes permitidos en los aceites usados

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN MÁXIMA PERMISIBLE(mg/Kg-ppm)
Bifenilos policloronados (PCBs)	50
Halógenos orgánicos totales (como cloro)	1000
Arsénico	5
Cadmio	2
Cromo	10
Plomo	100
Azufre	1.7% en peso

Realizado por Lorena Rodríguez
Fuente: (Barrera & Velecela, 2015. p. 19)

-Efectos causados por el aceite usado automotriz: El aceite automotriz usado tiene efectos peligrosos para el ambiente y la salud de los seres vivos porque afecta a todo el entorno: aire, agua y suelo por vertidos o por derrames, además cuando se encuentra en contacto con el aire y se encuentra expuesto a la luz solar se emiten compuestos tóxicos como: Pb, Zn y Cr. (Barrera & Velecela, 2015. p. 20)

Las lubricadoras, mecánicas, talleres automotrices que vierten el aceite en coladeras, terrenos o recipientes metálicos hacen que aumente la contaminación por el contacto del aceite con el suelo generando por ejemplo infertilidad del mismo. (Barrera & Velecela, 2015. p. 21)

En el agua ciertas partículas de los aceites usados se disuelven, causando la muerte de los seres que habitan en los ríos, lagos y océanos, además producen una capa impermeable que impide que entre el oxígeno a los cuerpos de agua. (Barrera & Velecela, 2015. p. 22)

La relación entre la capacidad degradativa de los hidrocarburos y la resistencia bacteriana a metales pesados ha sido reportada en varios estudios y se debe a la acumulación de los metales en los sedimentos de hidrocarburos y en diversos ambientes, propia de las actividades industriales (Dupontt *et al.* 2001. p. 245)

CAPITULO III

2. METODOLOGÍA

3.1 Metodología de la Investigación

Tabla 1-3. Metodología de la investigación

CONSIDERACIONES	NOMBRE	EXPLICACIÓN
Tipo de Investigación	De laboratorio	Se realiza una recopilación de datos en un ambiente controlado.
Diseño de Investigación	Experimental	Se manipula la variable independiente, es decir se varía la concentración de metales pesados.
Nivel de la investigación	Descriptiva	Porque se realiza una recolección de datos hasta formular un conocimiento importante para la utilización posterior de la investigación, además describe los hechos tal como los vamos a encontrar.
Enfoque	Cuantitativo	Cuantitativamente porque los resultados de la investigación serán medibles numéricamente en cuanto al número de colonias que crecen.

Realizado por: Lorena Rodríguez

3.2 Lugar del desarrollo de la investigación

3.2.1 Lugar de muestreo

El muestreo se realizó en los talleres del Municipio de Riobamba y en la estación de combustible ESPOCH.

3.2.2 Lugar de recolección de datos

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, que se encuentra localizado en el área de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

3.3 Fases de la Investigación

Los distintos procedimientos y análisis llevados a cabo en la investigación se desarrollaron en las fases que se citarán a continuación:

- Fase de muestreo
- Fase de aislamiento
- Fase de caracterización
- Fase de evaluación de resistencia a metales pesados.
- Fase de identificación

3.3.1 Fase I: Muestreo

En esta investigación se utilizó muestras de agua residual provenientes de las trampas de grasas de 2 puntos en los talleres del Municipio de Riobamba y 1 punto en la estación de servicio de combustible de la ESPOCH. Estos puntos de muestreo fueron considerados por ser de descarga y de estancamiento del agua residual.

3.3.1.1 Procedimiento del muestreo

1. Se etiquetó 5 botellas de vidrio limpias y estériles para el muestreo.
2. Se colocó el equipo de protección personal.
3. Se identificó el lugar de ubicación de la trampa de grasas, la cual contaba con 2 tanques y mostraba una contaminación compleja por todas las actividades realizadas en los talleres municipales.
4. Se tomó una muestra de la parte superficial del primer tanque en un recipiente y se colocó aproximadamente 300 mL directamente en la botella.
5. Se tomó otra muestra del segundo tanque recogiendo la muestra desde la mitad del tanque, se colocó 300 mL en la botella.
6. Se realizó el mismo proceso para la muestra en la estación de combustible de la ESPOCH.

3.3.2. Fase II: Aislamiento

3.3.2.1. Procedimiento

a. Preparación de medios de cultivo

Para la presente investigación se seleccionaron cuatro medios de cultivo: Un medio rico Triptona Soya Agar (TSA), un medio mínimo (M9), TSA+ presión selectiva y M9 + presión selectiva. Se utilizó plomo y mercurio como agente de presión selectiva.

-Triptona Soya Agar (TSA): Es un medio rico en nutrientes que favorece el desarrollo de gran cantidad de microorganismos. (<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tripteinasoyagar.htm>)

Tabla 2-3 Composición de Triptona Soya Agar

Compuesto	Cantidad
Tripteina	15.0 g/L
Peptona de soya	5.0 g/L
Cloruro de sodio	5.0 g/L
Agar	12.0 g/L
pH 7.3 ±0.2	

Realizado por Lorena Rodríguez

Fuente: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tripteinasoyagar.htm>

-Medio mínimo (M9): Es un medio líquido que contiene los nutrientes mínimos para el crecimiento de una bacteria, para este estudio se utilizó este medio sólido por lo cual se añadió Agar al 1.5% como agente solidificante y parafina como fuente de carbono. (Orozco, *et al.*, 2007. p. 97)

Tabla 3-3 Composición del medio M9

Compuesto	Cantidad
NH ₄ Cl	2.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L
Na ₂ HPO ₄	6.0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.49 g/L
CaCl ₂	0.01 g/L
Parafina	6.0 g/L

Realizado por Lorena Rodríguez
Fuente: (Orozco, *et al.*, 2007, p. 97)

-TSA + presión selectiva: Se encuentra constituido por los mismos compuestos del medio TSA con la adición de una solución de plomo (25 µg/mL) y una solución de mercurio (10 µg/mL) como agentes de presión selectiva.

-M9 + presión selectiva: Constituido por los mismos compuestos del medio M9 con la adición de una solución de plomo (25 µg/mL) y una solución de mercurio (10 µg/mL) como agentes de presión selectiva.

b. Recuento en placa de bacterias presentes en la muestra:

Materiales

- Agua destilada
- Medio de cultivo sólido Triptona Soya Agar (TSA)
- Medio de cultivo mínimo (M9)
- Medio de cultivo TSA + solución de Pb
- Medio de cultivo TSA + solución de Hg
- Medio de cultivo mínimo (M9) + solución de Pb
- Medio de cultivo mínimo (M9) + solución de Hg
- Agar Bacto agar

Procedimiento

- Se preparó 600 mL de medio de cultivo TSA repartido en 3 matraces, siguiendo las instrucciones: disolver 37 gramos en un litro de agua destilada.
- Se preparó 800 mL de medio de cultivo M9 repartido en 4 matraces y se solidificó con bacto agar al 1.5%
- Se preparó cajas Petri para los siguientes medios:
 - TSA
 - TSA + Pb (25µg/mL)
 - TSA + Hg (10 µg/mL)
 - M9 + aceite
 - M9 + aceite (fuente de carbono) + Pb (25µg/mL)
 - M9 + parafina (fuente de carbono) + Pb (25µg/mL)
 - M9 + aceite (fuente de carbono) + Hg (10µg/mL)
- Se realizó diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en agua estéril y se dejó reposar por 10 minutos.
- Se extendió 100 µL de aceite lubricante estéril en las placas de medio M9.
- Se tomó 100 µL de cada dilución y se sembró por la técnica de extensión en placa en las cajas Petri etiquetadas para cada dilución.
- Se dejó incubar las placas con medios TSA con y sin presión selectiva a temperatura ambiente por 24 horas y las placas con medio M9 con y sin presión selectiva a 28°C por 48 horas
- Una vez pasado este periodo, se realizó el recuento de colonias de cada placa para determinar el número de microorganismos existentes.

c. Aislamiento de colonias:

Este proceso se realizó en medios de cultivo TSA y M9 suplementados con Pb (25 µg/mL) cada uno.

Procedimiento

- Se diferenciaron visualmente las colonias y se escogieron 35 colonias al azar de las que crecieron en medio TSA + presión selectiva y 30 de las que crecieron en M9 + presión selectiva.
- Se prepararon cajas Petri con TSA + Pb (25 µg/mL) y M9 + Pb (25 µg/mL).
- Se dividió las placas utilizadas para repicar con una cuadrícula dividida en cuadros de 1 cm x 1 cm.

- Se repicó las colonias seleccionadas con la ayuda de un palillo de madera estéril en las cajas preparadas con TSA y M9 manteniendo la presión selectiva de Pb, a temperatura ambiente para los clones de TSA por 24 horas y a 28°C en los clones de M9 por 48 horas.
- Una vez repicadas las colonias se las mantuvo para realizar las pruebas siguientes.

d. Estabilización de las colonias:

Para asegurarnos que las colonias bacterianas se adaptan al medio de cultivo suplementado con el metal es necesario repicarlas hasta estabilizar su crecimiento en un medio igual para garantizar que no sobreviven por la reserva de nutrientes que tienen y para su utilización en las pruebas posteriores.

Procedimiento

- Se preparó dos cajas, una con medio TSA y otra con M9, ambas suplementadas con Pb a 25 ppm.
- En la cámara de flujo se procedió a tomar una muestra de cada colonia con un palillo de madera estéril y se sembró en la placas con la ayuda de una cuadrícula, etiquetando cada colonia.
- Se incubó por 24 horas a temperatura ambiente las colonias en medio TSA y por 48 horas a 28°C en medio M9.
- Se reportó los resultados del crecimiento de las colonias.
Este proceso se realizó al menos 3 veces hasta asegurar el crecimiento de todos los clones aislados.

3.3.2.2 Siembra de los aislados por agotamiento en superficie

Una vez que se tuvieron colonias adaptadas al medio con el metal pesado (Pb) fue necesario purificar las mismas para poder identificar correctamente tanto macroscópicamente, microscópicamente y para las pruebas bioquímicas.

Para este proceso se utilizó la técnica de agotamiento en superficie y se realizó en medios de cultivo suplementados con Pb a la misma concentración de la cual provenían las colonias (25 µg/mL). (Cano, 2006. pp. 9)

Procedimiento

- Se preparó cajas Petri con medios TSA y M9 con 25 µg/mL de acetato de Pb.
- Se dividió las placas en 2 cuadrantes.
- Se etiquetó cada cuadrante con el número de colonia que se iba a sembrar.
- En la cámara de flujo, se tomó un inóculo de cada colonia con un asa estéril y se procedió a sembrar mediante la técnica de agotamiento en superficie.
- Se incubó por 24 horas a temperatura ambiente las colonias en medio TSA y por 48 horas a 28°C en medio M9.
- Una vez que transcurrió el tiempo se tomó una colonia aislada de la siembra en cada cuadrante y con un palillo estéril se sembró en los medios correspondientes divididos en cuadrículas y se procedió a su caracterización.

3.3.3 Fase III: Caracterización

a. Características macroscópicas

Las colonias bacterianas presentan características en cuanto a su forma y aspecto, mismas que pueden ser valoradas mediante observación ayudando a su identificación. Las características evaluadas son: forma, elevación, margen, coloración y la pigmentación que presenta en el medio que se desarrolla.

Procedimiento

- Se visualizó macroscópicamente cada una de las colonias mediante una imagen de referencia de sus características forma, elevación, margen y coloración.

b. Tinción Gram

Una vez que las colonias se encuentran purificadas, mediante el proceso de tinción se visualiza su morfología y si pertenecen a las Gram positivas o Gram negativas. (Santambrosio, 2009)

Procedimiento

- Se colocó una gota de suero fisiológico en un porta objetos.
- Se tomó un inóculo de una colonia purificada con la ayuda de un asa estéril.
- Se colocó la muestra sobre la gota de suero fisiológico.
- Se homogenizó la muestra con la gota de suero fisiológico.

- Se fijó la muestra con calor flameándolo sobre el mechero.
- Se colocó una gota de cristal violeta durante un minuto.
- Se lavó inmediatamente con agua sin exponer directamente la muestra.
- Se colocó una gota de lugol durante un minuto.
- Se lavó inmediatamente con agua.
- Se realizó la decoloración con alcohol cetona por 30 segundos.
- Se lavó inmediatamente con agua.
- Se colocó una gota de safranina durante un minuto.
- Se lavó inmediatamente con agua.
- Se secó la muestra.
- Se colocó una gota de aceite de inmersión en la muestra.
- Se observó la placa en el microscopio con un lente de 100x.

c. Capacidad de crecimiento a 28°C y 8°C

La evaluación del crecimiento bacteriano se desarrolló a temperatura ambiente obteniendo buen crecimiento, para poder ser utilizadas posteriormente en experimentos de biorremediación. En este ensayo se evaluó la capacidad de crecimiento de las bacterias que crecieron a 8°C en 28°C y viceversa, se llevó a cabo en los dos medios que se ha realizado la investigación TSA y M9, ambas con una concentración de Pb a 25 µg/mL.

Procedimiento

- Se preparó cajas Petri con medios TSA y M9 con Pb a 25 µg/mL.
- En la cámara de flujo, con la ayuda de una asa estéril se tomó una muestra de las colonias en medio TSA y se sembró primero en medio M9 y luego en medio TSA sin volver a tocar la colonia nuevamente.
- Se realizó el mismo procedimiento anterior con las colonias del medio M9, se sembró en medio TSA y luego M9.
- Se dejó aproximadamente por 48 horas a la temperatura evaluada hasta observar crecimiento significativo de las colonias.

3.3.4 Fase IV: Evaluación de resistencia a metales pesados

Una vez purificadas y caracterizadas las colonias bacterianas se procedió a evaluar la resistencia que presentan a crecer en un medio hostil, con concentraciones crecientes de metales pesados, la evaluación se realizó para cuatro metales: plomo, mercurio, cadmio y cromo.

Procedimiento

- Se preparó 400 mL de medio TSA y M9 repartidos en 5 matraces cada medio.
- Se esterilizó los medios y se añadió las sales de cada metal para formar soluciones con los siguientes metales:
 Nitrato de Cadmio $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 Acetato mercurico $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
 Nitrato de Cromo $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$
 Acetato de Plomo PbCH_3COO
- Se colocó los medios en las cajas Petri.
- En la cámara de flujo y con la ayuda de un palillo de madera estéril, se tomó una muestra de cada colonia purificada del medio TSA y de M9, se sembró sin volver el palillo a la colonia original en el siguiente orden: Hg, Cd, Cr, Pb en concentraciones crecientes para cada experimento (Ver tabla 3-3) y por último el medio con plomo a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el crecimiento en esta última sería la prueba de que se sembró en los medios anteriores.
- Se incubó las placas con medio M9 + sales metálicas a 28°C y del medio TSA + sales metálicas a temperatura ambiente.
- Se reportó los resultados de medio TSA a las 24 y 48 horas y de medio M9 a las 72 horas.
- Se realizó el mismo procedimiento con las siguientes concentraciones:

Tabla 4-3 Concentraciones usadas para la prueba de resistencia en medio TSA Y M9

Metal	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
	Medio (TSA)								
Hg	50	100	200	400					
Cd	50	100	200	400	800	1200	1500		
Cr	100	200	400	800	1600	2000	3000	3500	4000
Pb	250	500	750	1000	1500	2500	3500	4000	4500
Pb	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Metal	Medio (M9)								
Hg	50	100	200						
Cd	50	100	200	400					
Cr	100	200	400	800					
Pb	250	500	750	1000	1500	2500	3500	4000	
Pb	25	25	25	25	25	25	25	25	

Realizado por: Lorena Rodríguez

3.3.5 Fase V: Identificación

Para este proceso fue necesario reactivar las colonias y pasar nuevamente a placas para contar con suficiente inóculo para realizar todos los ensayos.

a. Reactivación de los clones

- Se preparó 60 mL de Caldo Trypticase de Soya siguiendo las instrucciones de uso, 30 g para 1 litro de agua destilada.
- Se repartió dicha cantidad en 12 tubos de ensayo, 5 mL para cada tubo.
- Se esterilizó los tubos de ensayo con el medio.
- En la cámara de flujo, se tomó una pequeña muestra de masa bacteriana con la ayuda de un asa estéril y se introdujo en los tubos con Caldo Trypticase de Soya etiquetando cada tubo.
- Se agitó suavemente y se incubó a 35°C por 24 horas.
- Se preparó 200 mL de medio TSA y 200 mL de medio Eosina.
- Se colocó en cajas Petri.
- Se introdujo un isopo estéril en cada tubo etiquetado y se sembró en las placas con medio TSA y Eosina.
- Se dejó incubar a 35°C por 24 horas.

b. Prueba de oxidasa

- Se tomó un inóculo de la colonia seleccionada con un palillo de madera estéril.
- Se impregnó el inóculo en una tira de papel impregnada con reactivo de Kovac.
- Se esperó el resultado de cambio de color a morado de la tira de papel en un lapso de tiempo no mayor a 30 segundos.

c. Prueba de catalasa

- Se tomó un inóculo de la colonia seleccionada con un palillo de madera estéril.
- Se colocó el inóculo sobre un porta objetos.
- Se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.
- Se observó el desprendimiento o no de burbujas inmediatamente.

d. Prueba del citrato

- Se disolvió 0,9 g de Agar Simons Citrato en 40 mL de agua destilada.
- Se esterilizó el medio.
- Se colocó el medio en 12 tubos de ensayo de 5 mL, repartidos 3 mL en cada tubo.
- Se dejó enfriar con una inclinación de 15° para formar pico flauta.
- Se tomó una muestra de masa bacteriana con un asa estéril y se sembró desde el fondo y en estría en el pico de flauta.
- Se inoculó a 35°C por 24 horas.

e. Prueba de movilidad, producción de indol y H₂S

- Se disolvió 1,2 g medio SIM en 40 mL de agua destilada, se esterilizó en el autoclave.
- Se colocó el medio en 12 tubos de ensayo de 5 mL, repartidos 3 mL en cada tubo.
- Se dejó enfriar verticalmente.
- Se tomó una muestra de masa bacteriana con un asa estéril y se sembró por punción profunda en el tubo.
- Se inoculó a 35°C por 24 horas.

f. Prueba de fermentación de glucosa, lactosa y producción de H₂S

- Se disolvió 2,2 g medio Hierro Kligler Agar en 40 mL de agua destilada, se esterilizó en el autoclave.
- Se colocó el medio en 12 tubos de ensayo de 5 mL, repartidos 3 mL en cada tubo.
- Se dejó enfriar con una inclinación de 15° para formar pico flauta.
- Se tomó una muestra de masa bacteriana con un asa estéril y se sembró desde el fondo y en estría en el pico de flauta.
- Se inoculó a 35°C por 24 horas.

g. Prueba de ureasa

- Se disolvió 0,84 g de Agar base para urea en 40 mL de agua destilada, se esterilizó en el autoclave.
- Se disolvió 4 g de urea en 10 mL de agua destilada estéril para conseguir una solución de urea al 40%.

- Se colocó 2 mL de la solución de urea en el Erlen meyer con el medio estéril, se homogenizó suavemente.
- Se colocó el medio en 12 tubos de ensayo de 5 mL, repartidos 3 mL en cada tubo.
- Se tomó una muestra de masa bacteriana con un asa estéril y se sembró desde el fondo y en estría en el pico de flauta.
- Se inoculó a 35°C por 24 horas.

h. Prueba de manitol

- Se disolvió 12,96 g de Agar Manitol en 120 mL de agua destilada, se esterilizó en el autoclave.
- Se dejó enfriar y se colocó en cajas Petri.
- Se tomó con un hisopo una muestra de masa bacteriana y se sembró sobre las cajas Petri.
- Se inoculó a 35°C por 24 horas.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fase I: Muestreo

Las muestras utilizadas para la investigación fueron seleccionadas del sistema de trampa de grasas de los talleres del Municipio del cantón Riobamba (muestra 1, 2, 3 y 4) y de la estación de combustible de la ESPOCH (muestra 5) como se observa en la figura 1-4, por ser lugares de vertido de diversos contaminantes por las actividades desarrolladas como el lavado de carros recolectores de basura, volquetas y vehículos pequeños, incluido el cambio de aceite de todos ellos, por lo que se considera lugares idóneos, de estancamiento y de gran variedad microbiana adaptada a las condiciones del vertido.



Figura 1-4 Puntos de muestreo
Realizado por: Lorena Rodríguez

4.2 Fase II: Aislamiento

Para la evaluación inicial de este proceso se utilizaron 4 medios de cultivo: TSA, TSA + presión selectiva, M9 y M9 + presión selectiva, el plomo fue incorporado a los medios como agente que proporcione una presión selectiva ya que es un componente de los hidrocarburos como los aceites usados. Esta presión selectiva se consideró con 25 µg/mL.

4.2.1 Conteo microbiológico inicial

Para hacer una evaluación preliminar de la cantidad de bacterias presentes en las muestras se procedió a sembrar 100 y 50 µL de cada muestra sin diluir, obteniéndose en todos los casos un número incontable de bacterias, lo que evidenció la presencia de un alto nivel de resistencia a los metales (Pb a 25 µg/mL) en la microbiota de los lugares muestreados.

Para poder evaluar la cantidad inicial de microorganismos fue necesario realizar diluciones seriadas de 10^{-1} y 10^{-2} , además de la adición de mercurio y aceite lubricante estéril como presión selectiva con la finalidad de rescatar bacterias resistentes para el experimento.

Tabla 1-4 Conteo microbiológico inicial

Medio de cultivo	Muestra	Resultados (UFC/mL)
TSA	3	4.4×10^5
	4	6.3×10^5
TSA+Pb (25 µg/mL)	3	3.2×10^5
	4	3.6×10^5
TSA+Hg (10 µg/mL)	3	1.0×10^5
	4	1.2×10^5
M9 + aceite lubricante (100 µg/mL)	3	1.9×10^5
	4	2.5×10^5
M9+Parafina+Hg(10 µg/mL)	3	1.4×10^5
	4	2.3×10^5
M9+Parafina+Pb(25 µg/mL)	3	1.4×10^5
	4	2.6×10^5
M9+ parafina	3	3.8×10^5
	4	4.3×10^5

Realizado por: Lorena Rodríguez

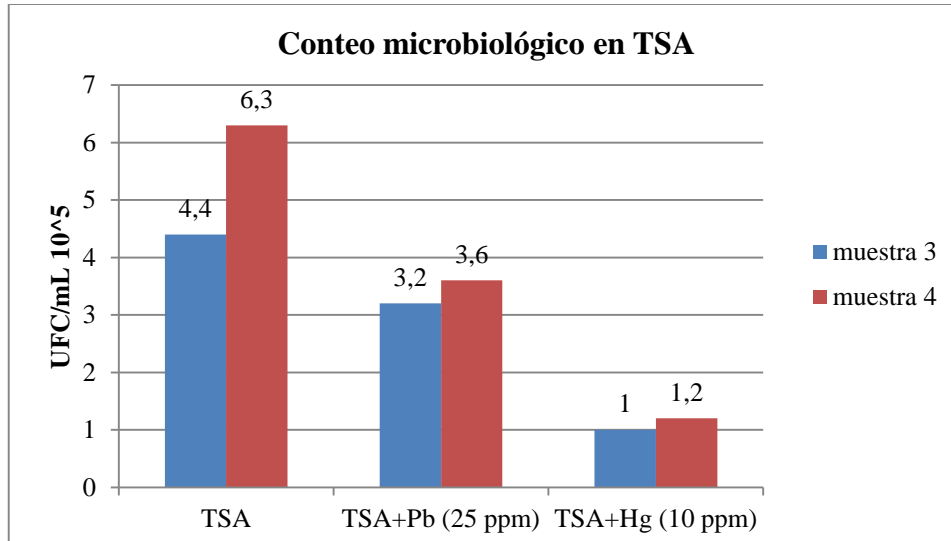


Gráfico 1-4 Conteo microbiológico en TSA
Realizado por: Lorena Rodríguez

En el gráfico 1-4 se muestra el crecimiento de las bacterias de acuerdo a la muestra y a la presión selectiva utilizada, evidenciándose que en la muestra 4 existe mayor crecimiento que la muestra 3 y que tanto para las dos muestras el medio sin presión selectiva tiene mayor cantidad de bacterias, siendo el elemento más tóxico el mercurio.

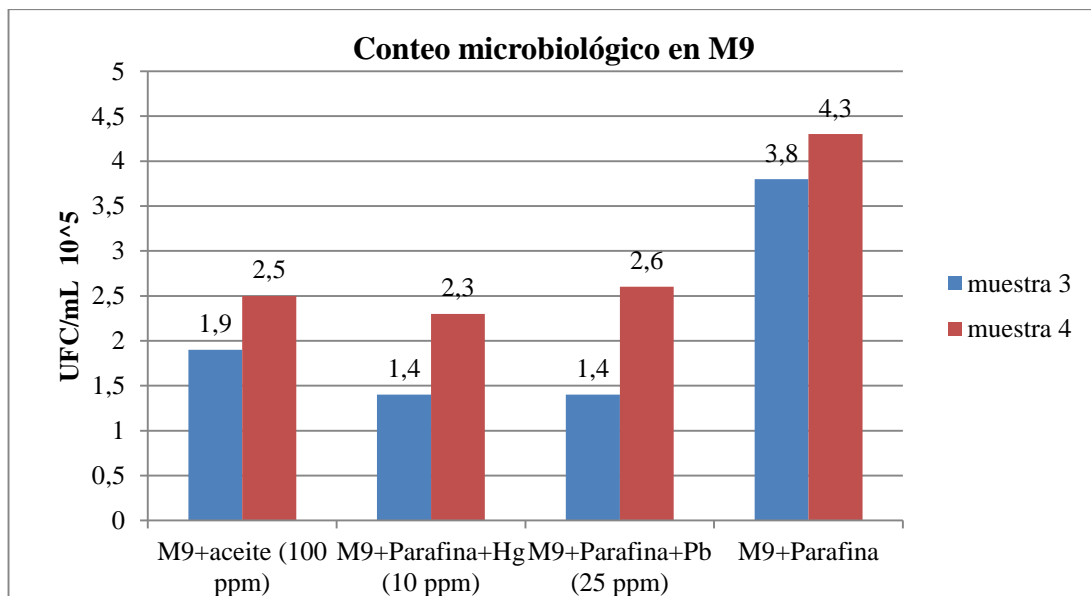


Gráfico 2-4 Conteo microbiológico en M9
Realizado por: Lorena Rodríguez

Los resultados obtenidos en medio M9 son similares a los obtenidos en el medio TSA, en relación a la muestra 4 que tiene mayor cantidad de bacterias que la 3, además se evidencia que en presencia de Pb y Hg no existe diferencia en la muestra 3 y una mínima diferencia en la muestra

4. Además la adición de parafina al medio mínimo como fuente de carbono permitió el desarrollo de un número mayor de bacterias que las obtenidas al suplementar con aceite lubricante, otorgándole una ventaja en presencia del metal.

En todos los casos se evidenció que en la muestra 4 existe un mayor número de bacterias resistentes a los metales usados como presión selectiva (Pb y Hg), siendo el más tóxico el Hg. Como se indica en la tabla 1-4 en los medios TSA se puede observar que el crecimiento bacteriano fue mayor en el medio que no tenía presión selectiva, seguido del medio que contenía Pb y el que tenía Hg, por lo que podemos afirmar que los metales pesados utilizados como presión selectiva ejercen un efecto negativo sobre parte de la población bacteriana del lugar, sin embargo, de acuerdo a los resultados encontrados podríamos decir que existe una gran cantidad de bacterias resistentes a los metales pesados empleados, siendo el Pb el menos tóxico.

En las cajas con medio TSA + Hg y M9+ Hg (gráfico 2-4 y 3-4) a pesar de tener la misma concentración del metal, el crecimiento fue mayor en el medio mínimo en comparación con el TSA lo que podría estar indicando que el medio TSA constituye una presión resistiva para el crecimiento de estas bacterias.

En las cajas con medio TSA + Pb y M9+ Pb, con 25 ppm del metal se observa notoriamente que existió mejor crecimiento en el medio rico, es decir que posiblemente las bacterias se ven afectadas por la baja concentración de nutrientes del medio mínimo.

4.2.2 Selección de clones bacterianos

Para la selección de clones se dividió en 2 grupos, el primero (Grupo A) obtenido en la primera siembra sin realizar las diluciones donde se seleccionaron 25 clones bacterianos del medio TSA y 25 del medio M9; el segundo grupo (Grupo B) se obtuvo en la segunda siembra realizada para el conteo microbiológico del cual se seleccionaron 30 clones del medio TSA y 30 de M9.

Una vez seleccionados todos los clones se obtuvieron un total de 55 clones del medio TSA y 55 clones del medio M9, atendiendo a las características de las colonias y al mejor crecimiento de cada una de ellas se realizó una post selección, obteniéndose 35 clones del medio TSA y 30 clones del medio M9, con esta última selección se realizaron los demás experimentos de la investigación.

Tabla 2-4 Clones seleccionados

Medio	Clones seleccionados		
	Grupo A	Grupo B	Ultima selección
TSA	25	30	35

M9	25	30	30
TOTAL	50	60	65

Realizado por: Lorena Rodríguez

4.2.3 Estabilización de colonias

La fase de estabilización se realizó con un total de 65 clones repicando sobre los medios en los cuales habían venido creciendo, manteniéndose la presión selectiva de 25 µg/mL de acetato de Pb con el objetivo de rescatar colonias adaptadas al medio.

Las 35 colonias repicadas en medio TSA + presión selectiva sobrevivieron en los 3 repiques, de la misma manera que los 30 clones en medio M9 + presión selectiva, demostrando que el 100% de las colonias se encuentran adaptadas a los medios.

4.3 Fase III: Caracterización de los clones bacterianos

4.3.1 Tinción Gram

En la tabla 3-4 se presenta los resultados de la tinción Gram realizada a todos los aislados obtenidos en presencia medios de cultivo con plomo.

Tabla 3-4 Tinción Gram de los clones seleccionados de medio M9 y TSA

Clones aislados (medio TSA)			Clones aislados (medio M9)		
N° colonia	Gram	Forma	N° colonia	Gram	Forma
1	-	Cocos	1	+	Cocos
2	-	Bacilos	2	-	Cocos
3	-	Bacilos	3	-	Bacilos
4	-	Bacilos	4	+	Cocos
5	-	Bacilos	5	+	Cocos
6	-	Cocos	6	-	Cocos
7	-	Cocos	7	-	Cocos
8	-	Cocos	8	-	Cocos
9	-	Bacilos	9	-	Cocos
10	-	Bacilo	10	-	Bacilo
11	+	Bacilo	11	-	Bacilo

12	-	Cocos	12	-	Bacilo
13	-	Cocos	13	+	Cocos
14	-	Cocos	14	-	Bacilo
15	-	Cocos	15	+	Bacilo
16	-	Cocos	16	+	Cocos
17	-	Cocos	17	-	Cocos
18	-	Cocos	18	+	Cocos
19	-	Bacilo	19	+	Cocos
20	-	Bacilo	20	+	Cocos
21	-	Cocos	21	-	Cocos
22	-	Bacilos	22	-	Bacilos
23	-	Cocos	23	+	Cocos
24	-	Cocos	24	-	Cocos
25	-	Cocos	25	-	Bacilo
26	-	Cocos	26	-	Bacilo
27	-	Cocos	27	+	Cocos
28	-	Cocos	28	-	Bacilo
29	-	Bacilo	29	+	Cocos
30	-	Bacilo	30	+	Bacilo
31	+	Bacilo			
32	+	Bacilo			
33	-	Bacilo			
34	-	Bacilo			
35	+	Bacilo			

Realizado por: Lorena Rodríguez

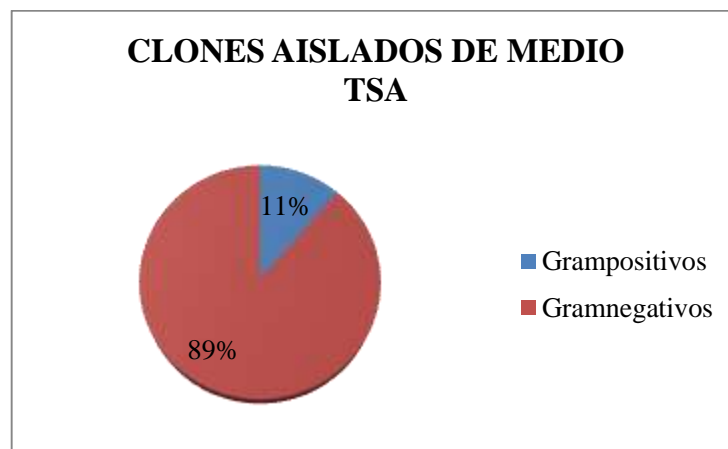


Gráfico 3-4 Clones aislados de medio TSA

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el gráfico 3-4 se observa que un 89% de los clones aislados en medio TSA fueron Gram negativas y un 11% Gram positivas. Por el contrario en el medio M9 se observa un desarrollo más equilibrado de los tipos bacterianos con un 57% de clones Gram negativos y un 43% Gram positivas, como se observa en el gráfico 4-4.

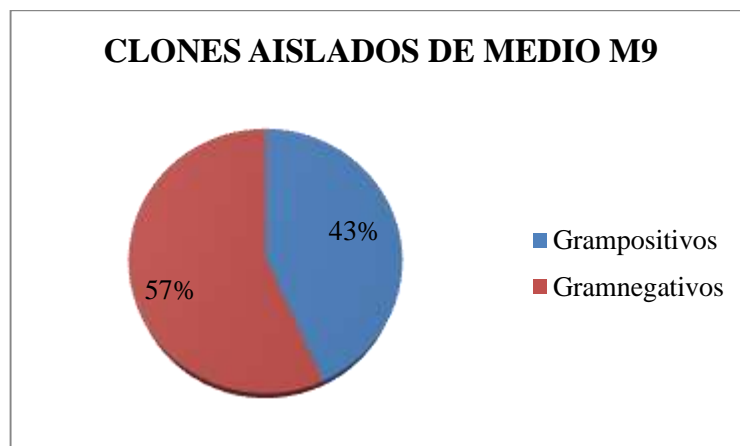


Gráfico 4-4 Clones aislados de medio M9
Realizado por: Lorena Rodríguez

Este resultado pareciera indicar que el medio TSA favoreció el desarrollo de bacterias Gram negativas en esta investigación, posiblemente los aislados bacterianos Gram negativos que se adaptaron a los medios con plomo tuvieron cierta preferencia por el medio TSA, dichos resultados podrían deberse a la composición del medio con la adición de plomo, pues la bibliografía no reporta que el medio TSA por si solo favorezca el crecimiento de bacterias Gram negativas, por el contrario permite el cultivo de todo de microorganismos. (Calvillo, 2014, p. 28)

4.3.2 Caracterización macroscópica

Para las características macroscópicas de los clones se tomó en cuenta 4 aspectos: forma, borde, elevación y color; observándose que la forma predominante es la circular, seguido de filamentosa e irregular. En cuanto a los bordes el predominante es el entero y pocas son de borde ondulado.

En la elevación se puede observar que se presentan de dos tipos convexa y plana, siendo la predominante la convexa y en el color presentaron blanco y crema en medios de cultivo sin metal y en medios de cultivo con metal presentaron crema, café, amarillo, plomo y blanco que se puede deber a que el medio contenía plomo, como se observa en la figura 2-4.



Figura 2-4 Características macroscópicas de los aislados bacterianos en presencia de plomo.

4.3.2.1 Forma

La forma de los clones aislados en el medio TSA y M9 presentó diferencias en su morfología, siendo para los clones de medio TSA la forma circular la predominante y encontrando un porcentaje similar entre la filamentosa e irregular, mientras que para los clones de M9 existió una amplia variación, siendo la irregular la predominante con un 96,7% y un 3% filamentosa, la forma circular no se observó en este grupo, como se muestra en el gráfico 5-4.

Los resultados en cuanto a esta característica demostraron que la forma de los clones depende del medio de cultivo utilizado, pues el tipo de medio constituye un criterio importante en el desarrollo de las formas bacterianas (López & Torres, 2006), lo cual fue observado en el presente trabajo, ya que al sembrar los clones de M9 en TSA, éstos adoptaron las formas predominantes encontradas en TSA y viceversa.

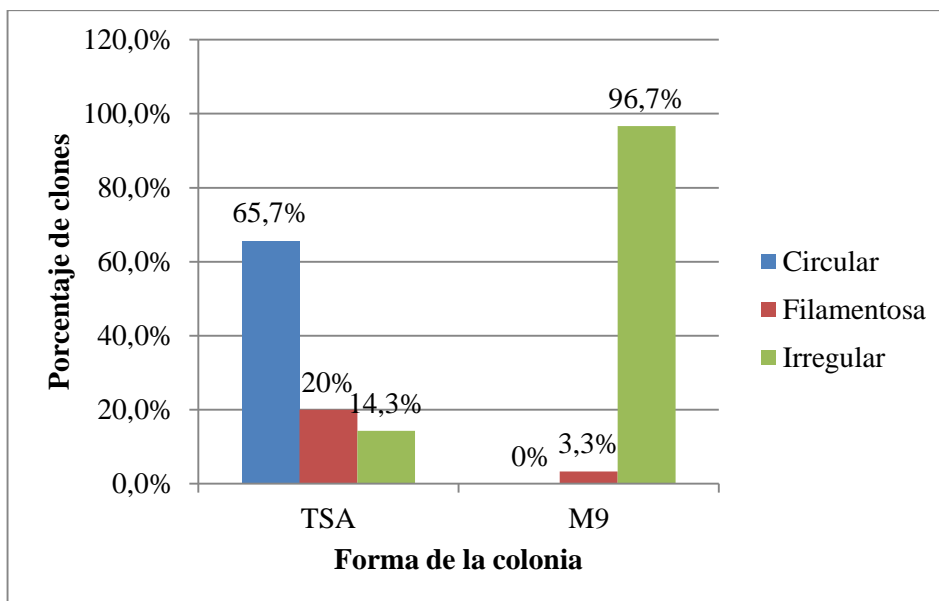


Gráfico 5-4 Forma macroscópica de los clones aislados
Realizado por: Lorena Rodríguez

4.3.2.2 Borde

La observación de los bordes para las colonias bacterianas en TSA mostró 2 tipos: entero y ondulado, siendo el predominante el entero con un 65,7%; para las colonias de M9 predominó en casi todos los clones el entero con un 96,7% y solo 3,3% de borde lobulado, en este grupo no se observó el borde ondulado como se detalla en el gráfico 6-4.

Los resultados obtenidos no tienen mayor interferencia del medio de cultivo, puesto que en ambos casos el borde dominante es el entero, es decir no existió una diferenciación notable por el proceso de adaptación al medio mínimo como en el caso de la forma de las colonias que varió en relación al medio en el cual se sembró.

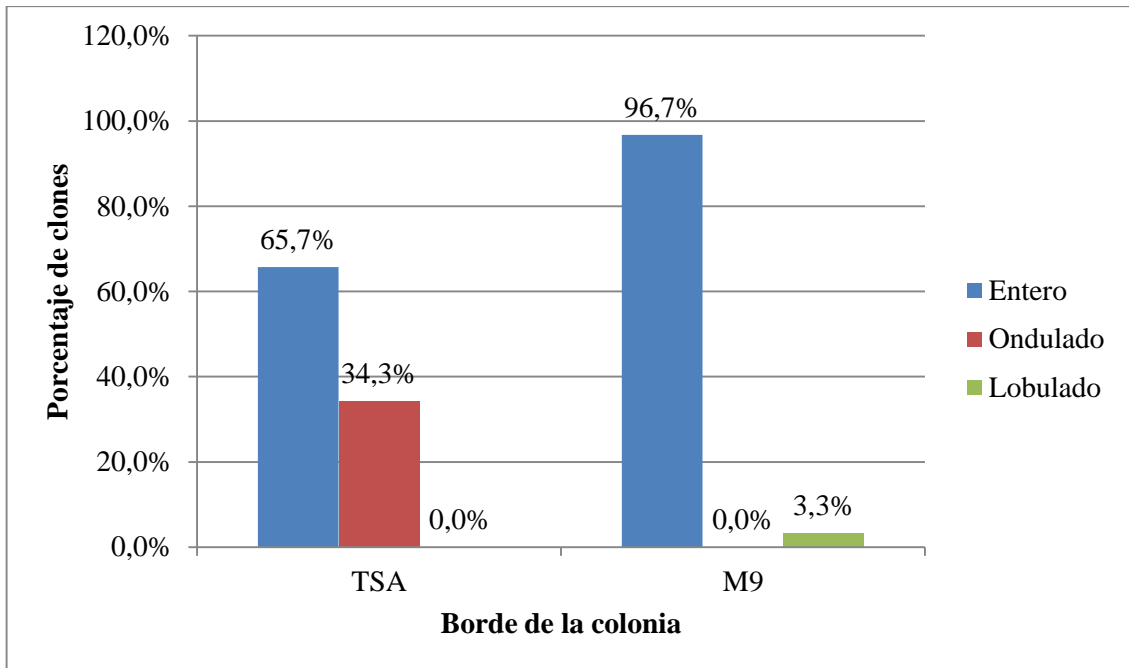


Gráfico 6-4 Borde de los clones aislados
Realizado por: Lorena Rodríguez

4.3.2.3 Elevación

La observación de la elevación de las colonias mostró que en el medio TSA existió 3 tipos: convexa, plana y elevada, siendo la predominante la convexa, mientras que en medio M9 se presentó la plana en la totalidad de los clones como se indica en el gráfico 7-4.

Estos resultados mostraron que esta característica también depende del medio de cultivo, puesto que al sembrar los clones de TSA en M9, todos los clones adoptaron la elevación plana.

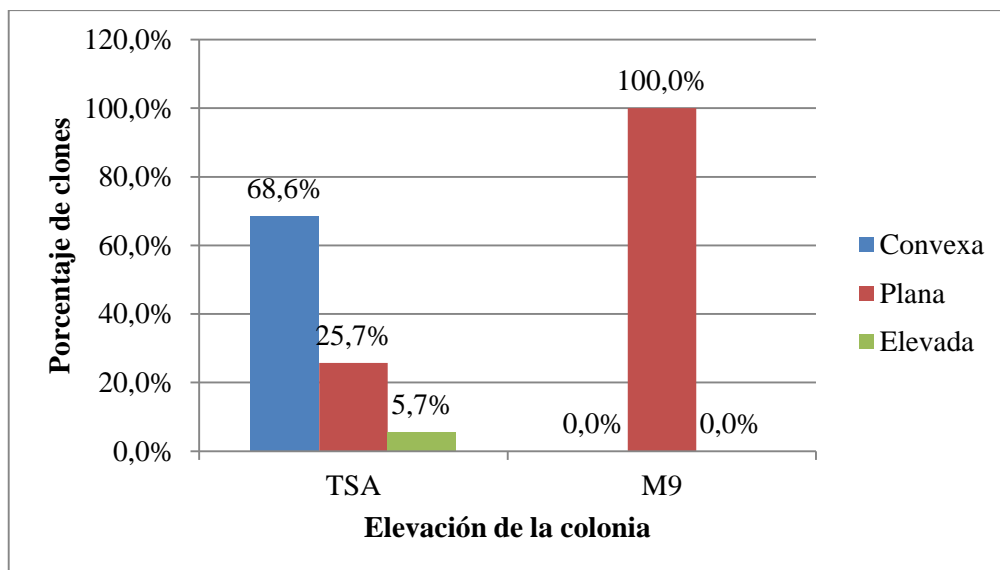


Gráfico 7-4 Elevación de los clones aislados
Realizado por: Lorena Rodríguez

4.3.2.4 Color

La observación del color de los clones aislados en TSA mostró 2 colores el blanco y crema, mientras que para los clones de M9 blanco y transparente, siendo el predominante el color blanco en ambos grupos.

Estos resultados también se ven afectados por el medio de cultivo debido a que los clones de TSA que mostraron color crema al ser sembrados en M9 adoptaron todos el color blanco.

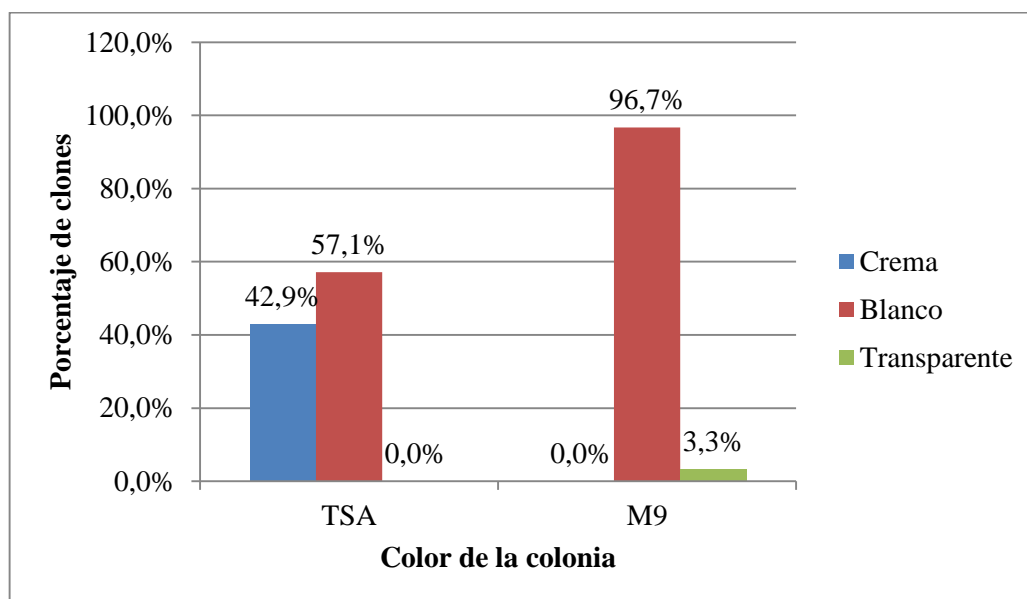


Gráfico 8-4 Color de los clones aislados
Realizado por: Lorena Rodríguez

Los resultados obtenidos indican que la morfología observada en los clones está directamente relacionado con el medio de cultivo donde fueron sembrados (López & Torres, 2006), con este comportamiento de los clones podríamos afirmar que adoptan estas características en relación a la composición del medio de cultivo y como una forma para sobrevivir a un medio con pocos nutrientes que es el M9, ya que una misma bacteria puede formar distintos tipos de colonias según el medio, ejemplo de aquello es el cambio de color de un medio a otro debido a la producción de algún pigmento o por la utilización de algún sustrato del medio por parte de la bacterias. (Peña, 2010)

4.4 Fase IV: Evaluación de la resistencia bacteriana a metales pesados (Hg, Cd, Cr y Pb)

4.4.1 Evaluación de resistencia de los aislados en medio TSA con Hg, Cd, Cr y Pb

Primer experimento

Para determinar la resistencia de los clones aislados a los metales evaluados se procedió a sembrarlos en concentraciones crecientes de los metales, iniciándose en 50 ug/ml para Hg y Cd, 100 ug/ml para Cr y 250 ug/ml para Pb. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4-4.

Tabla 4-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (50 ug/ml), Cr (100 ug/ml) y Pb (250 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
Hg	50	C1;C2;C3;C4;C5;C6; C7;C9;C11;C12;C14; C15;C16;C17;C18;C19; C20;C21;C22;C23;C24; C25;C26;C27;C28;C29; C30;C31; C32;C33;C34;C35	Mismas colonias que a las 24 h.	C8;C10;C13
Cd	50	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7; ;C8;C9;C10;C12;C13; C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22;C23; C24;C25;C26;C27;C28; C29;C30;C31;C32;C33; C34;C35	Mismas colonias que a las 24 h.	C11
Cr	100	Todas tienen crecimiento	Mismas colonias que a las 24 h.	Ninguno
Pb	250	Todas tienen crecimiento	Mismas colonias que a las 24 h.	Ninguno

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el primer experimento hubo muy poca mortalidad de los clones, como se muestra en la tabla 4-4, tres clones no crecieron en Hg a 50 ppm incluso a las 48 horas, el clon 11 no resistió a Cd a 50 ppm, mientras que los aislados no se vieron afectados por la presencia de Cr y Pb a 100 ppm y 250 ppm respectivamente, todos los clones que crecieron lo hicieron a las 24 horas.

Segundo experimento

La resistencia bacteriana observada en el primer experimento hizo que se proceda a realizar una segunda evaluación considerando 100 ug/ml para Hg y Cd, 200 ug/ml para Cr y 500 ug/ml para Pb, como se muestra en la tabla 5-4.

Tabla 5-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (100 ug/ml), Cr (200 ug/ml) y Pb (500 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
Hg	100	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C9;C11;C12;C14;C15;C17;C18;C20;C23;C25;C28;C30;C31;C32;C33	Mismas colonias que a las 24 h.	C16;C19;C21;C22;C24;C26;C27;C29;C34;C35
Cd	100	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8;C9;C10;C12;C13;C14;C15;C16;C17;C18;C19;C20;C21;C22;C23;C24;C25;C26;C27;C28;C29;C30;C31;C32;C33;C34;C35	Mismas colonias que a las 24 h.	Ninguno
Cr	200	Todas tienen crecimiento	Mismas colonias que a las 24 h.	Ninguno
Pb	500	Todas tienen crecimiento	Mismas colonias que a las 24 h.	Ninguno

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el segundo experimento como se observa en la tabla 5-4 no se observó crecimiento para diez clones en presencia de Hg (100 ppm) incluso a las 48 horas, para Cd (100 ppm) todos los clones evaluados mostraron crecimiento, en el caso de Cr y Pb todos los clones tuvieron crecimiento sin mostrar afectación por la presencia del metal.

Tercer experimento

Con el comportamiento de los clones observado en el segundo experimento se realizó una tercera prueba considerando las siguientes concentraciones: Hg y Cd (200 ug/ml), Cr (400 ug/ml) y Pb (750 ug/ml) como se observa en la tabla 6-4.

Tabla 6-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (200 ug/ml), Cr (400 ug/ml) y Pb (750 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
Hg	200	C1;C2;C3;C5;C6;C7; C11;C12;C15;C17; C20;C25;C30;C31; C32;C33	Mismas colonias que a las 24 h.	C4;C9;C14; C18;C23;C28
Cd	200	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 ;C8;C12;C13;C14;C15; C16;C17;C20;C21;C22; C25;C26;C28;C29;C30; C31;C32;C33;C34;C35	C10;C19;C24; C27	C9;C18;C23
Cr	400	Todas tienen crecimiento	Mismas colonias que a las 24 h.	Ninguno
Pb	750	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 ;C8;C9;C10;C12;C13; C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22;C23; C24;C25;C26;C27;C28; C29;C30;C31;C32;C33; C34;C35	Mismas colonias que a las 24 h.	C11

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el tercer experimento como se muestra en la tabla 6-4 no se observó crecimiento para seis clones en presencia de Hg (200 ppm) al cabo de 48 horas, para el Cd (200 ppm) siete aislados bacterianos no crecieron a las 24 horas, sin embargo cuatro de ellos presentaron crecimiento a las 48 horas, en el caso de Pb (750 ppm) solo el clon 11 no mostró crecimiento incluso a las 48 horas.

En este experimento el Cr (400 ppm) mostró ser el menos tóxico ya que no inhibió el crecimiento de ninguno de los clones.

Cuarto experimento

La resistencia bacteriana observada en el tercer experimento hizo que se proceda a realizar una cuarta evaluación considerando 400 ug/ml para Hg y Cd, 800 ug/ml para Cr y 1000 ug/ml para Pb, como se muestra en la tabla 7-4.

Tabla 7-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (400 ug/ml), Cr (800 ug/ml) y Pb (1000 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
Hg	400	C2;C5;C15;C30	Mismas colonias que a las 24 h.	C1;C3;C6;C7; C11;C12;C17; C20;C25;C31; C32;C33
Cd	400	C2;C3;C4;C5;C7;C8; C12;C13;C14;C19; C20;C22;C26;C30; C31;C32;C33;C34; C35	C1;C17	C6;C10;C15;C16; C21;C24;C25; C27;C28;C29
Cr	800	Todas tienen crecimiento	Mismas colonias que a las 24 h.	Ninguno
Pb	1000	C1;C2;C3;C4;C5;C6; C7;C8;C9;C10;C12; C13;C14;C15;C16; C17;C18;C19;C20; C21;C22;C23;C24; C25;C26;C27;C28; C29;C30;C31;C32; C33;C34;C35	Mismas colonias que a las 24 h.	Ninguno

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el cuarto experimento como se muestra en la tabla 7-4 no se observó crecimiento para doce clones en Hg (400 ppm) incluso a las 48 horas de evaluación y solo cuatro clones de la totalidad

de clones evaluados mantuvieron crecimiento, para Cd (400 ppm), doce clones no presentaron crecimiento a las 24 horas, sin embargo dos de ellos crecieron a las 48 horas, en el caso de Cr (800 ppm) todos los clones evaluados inicialmente mantienen su crecimiento, es decir, no se muestra aún un efecto inhibitorio a esta concentración, para Pb (1000 ppm) treinta y cuatro clones evaluados mantuvieron el crecimiento, sin perder ningún clon en esta etapa.

Quinto experimento

Observada la resistencia de los clones aislados, se realizó un quinto experimento considerando las siguientes concentraciones, para Hg 500 ug/ml, Cd 800 ug/ml, Cr 1600 ug/ml y Pb 1500 ug/ml, como se detalla en la tabla 8-4.

Tabla 8-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg (500 ug/ml), Cd (800 ug/ml), Cr (1600 ug/ml) y Pb (1500 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
Hg	500	C2;C5;C30	Mismas colonias que a las 24 h.	C15
Cd	800	C1;C2;C3;C4;C5;C7;C12;C14;C20;C22;C30;C31;C34	C35	C8;C13;C19;C26;C33
Cr	1600	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C9;C10;C12;C13;C14;C15;C16;C17;C18;C19;C20;C21;C22;C23;C25;C26;C27;C28;C29;C30;C31;C34;C35	C11;C24	C8;C32;C33
Pb	1500	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8;C9;C10;C12;C13;C14;C15;C16;C17;C19;C20;C22;C23;C25;C26;C27;C28;C29;C31;C34;C35	C18;C21	C24;C30;C32;C33

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el quinto experimento como se observa en la tabla 8-4 no se observó crecimiento del clon 15 para Hg (500 ppm) incluso a las 48 horas y sólo tres clones (2, 5 y 30) mantuvieron crecimiento, mostrando un efecto inhibitorio para los clones en esta etapa, para Cd (800 ppm) seis clones no crecieron a las 24 horas sin embargo uno de ellos (35) mostró crecimiento a las 48 horas, en el caso de Cr (1600 ppm) cinco clones no crecieron a las 24 horas, no obstante dos de ellos crecieron a las 48 horas, reportándose a esta concentración de Cr el primer efecto inhibitorio para los clones evaluados, para Pb (1500 ppm) seis clones no tuvieron crecimiento a las 24 horas, pero dos de ellos lograron crecer a las 48 horas.

Sexto experimento

Se continuó con la evaluación de resistencia y se realizó un sexto experimento considerando las siguientes concentraciones para Cd 1200 ug/ml, Cr 2000 ug/ml y Pb 2500 ug/ml, no se realizó el experimento considerando al Hg debido a que se alcanzó una concentración tóxica para los clones.

Tabla 9-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cd (1200 ug/ml), Cr (2000 ug/ml) y Pb (2500 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
Cd	1200	C2;C4;C5;C7; C14;C22;C30	C34;C35	C1;C3;C12; C20;C31
Cr	2000	C1;C2;C3;C4;C5;C6; C7;C9;C10;C11;C12; C13;C14;C15;C16;C17; C18;C19;C20;C21;C22; C24C25;C26;C27;C28; C29;C30	C31;C34;C35	C23
Pb	2500	C1;C2;C3;C4;C5;C7; ;C12;C13;C14;C15;C16 ;C17;C22;C27;C31;C34 ;C35	Mismas colonias que a las 24 h.	C6;C8;C9; C10C18;C19; C20;C21;C23; C25;C26;C28; C29

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el sexto experimento como se observa en la tabla 9-4 no se observó crecimiento de siete clones para Cd (1200 ppm) en las 24 horas, sin embargo dos de ellos crecieron a las 48 horas, para Cr (2000 ppm) cuatro clones no crecieron a las 24 horas pero tres de ellos lo hicieron a las 48 horas

manteniendo el crecimiento gran parte de los aislados evaluados, en el caso de Pb (2500 ppm) un total de 13 clones no mostraron crecimiento incluso a las 48 horas.

Séptimo experimento

Para determinar la resistencia bacteriana se realizó un séptimo experimento considerando las siguientes concentraciones, para Cd 1500 ug/ml, Cr 3000 ug/ml y Pb 3500 ug/ml como se observa en la tabla 10-4.

Tabla 10-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cd (1500 ug/ml), Cr (3000 ug/ml) y Pb (3500 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
Cd	1500	C2;C4;C22;C30	C7	C5;C14;C34;C35
Cr	3000	C1;C2;C5;C12;C13;C14;C16;C17;C22;C24;C30;C35	C4;C7;C15;C20;C34	C3;C6;C9;C10;C11;C18;C19;C21;C25;C26;C27;C28;C29;C31
Pb	3500	C1;C2;C3;C4;C5;C7;C16;C17;C22;C30	C15	C12;C13;C14;C27;C31;C34;C35

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el séptimo experimento como se muestra en la tabla 10-4 no se observó crecimiento de cinco clones para Cd (1500 ppm) a las 24 horas , sin embargo uno de ellos (C7) creció a las 48 horas, en esta concentración cuatro clones de la totalidad evaluada mantuvieron su crecimiento mostrando los efectos inhibitorios de la concentración usada, para Cr (3000 ppm) diecinueve clones no crecieron a las 24 horas pero cinco de ellos sí lo hicieron a las 48 horas, en esta etapa ya se observó más cantidad de clones (14 clones) que no crecieron en relación a la concentración anterior de Cr usada, en el caso de Pb (3500 ppm) ocho clones no crecieron a las 24 horas, sin embargo uno de ellos (15) creció a las 48 horas y hasta esta etapa diez clones mantuvieron su crecimiento en esta concentración.

Octavo experimento

Se realizó un octavo experimento considerando el Cr y Pb, a 3500 ug/ml y 4000 ug/ml respectivamente, no se consideró Cd debido a que los clones evaluados alcanzaron la toxicidad a este metal.

Tabla 11-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cr (3500 ug/ml) y Pb (4000 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
Cr	3500	C1;C2;C5;C12;C14;C15 ;C16;C17;C22;C30	C13	C4;C7;C20; C24;C34; C35
Pb	4000	C1;C5;C15;C16;C17; C22;C30	C2;C3;C4;C7	Ninguno

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el octavo experimento se evaluó Cr y Pb, como se observa en la tabla 11-4 para Cr (3500 ug/ml) seis clones no crecieron a las 24 horas mientras que un clon (C13) lo hizo a las 48 horas, diez clones mantuvieron el crecimiento a esta concentración, en el caso de Pb (4000 ppm) todos los clones evaluados en esta etapa mostraron crecimiento.

Noveno experimento

Se realizó un noveno experimento para evaluar la resistencia de los clones a Cr y Pb, puesto que algunos de los clones aun mostraban crecimiento en el experimento anterior, para lo cual se consideró 4000 ug/ml para Cr y 4500 ug/ml para Pb como se observa en la tabla 12-4.

Tabla 12-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cr (4000 ug/ml) y Pb (4500 ug/ml)

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 24h)	Clones (crecimiento a las 48h)	Clones sin crecimiento
-------	-----------------------	--------------------------------	--------------------------------	------------------------

Cr	4000	C2;C5;C22;C30	Mismas colonias que a las 24 horas	C1;C12;C13;C14;C15;C16;C17
Pb	4500	C2;C30;C22	C3;C7	C1;C4;C5;C15;C16;C17

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el noveno experimento como se observa en la tabla 12-4 para Cr (4000 ppm) siete clones no tuvieron crecimiento incluso a las 48 horas, mientras que cuatro clones (C2, C5, C22 y C30) lograron crecer a esta concentración, en el caso de Pb (4500 ppm) ocho clones no crecieron a las 24 horas, pero los clones (C3 y C7) lo hicieron a las 48 horas, tres clones (C2, C22 y C30) de la totalidad evaluada inicialmente lograron crecer a esta concentración mostrando resistencia hasta esta etapa de evaluación.

En los 9 experimentos realizados se observa que los clones evaluados tuvieron menor resistencia a Hg, seguida de Cd y para Cr se mantuvo el crecimiento para todos los clones hasta los 800 ppm, puesto que en la concentración de 1600 ppm se observó la primera mortalidad de los clones, para Pb la primera pérdida se observó a 750 ppm del clon 11.

Para los 4 metales evaluados se observó la resistencia en común de los clones 2 y 30 en Hg, Cd, Cr y Pb, mientras que el clon 5 mostró resistencia en Hg y Cr, el clon 22 se repitió en Cd, Cr y Pb y el clon 7 para Cd y Pb, mientras que el clon 4 presentó resistencia solo para Cd y el clon 3 solo para Pb.

4.4.2 Evaluación de resistencia de los aislados en medio M9 con Hg, Cd, Cr y Pb

Para determinar la resistencia de los aislados a los metales evaluados se procedió a evaluarlos en concentraciones crecientes de los metales de igual manera que se realizó con el medio TSA, con la excepción de que el reporte de los resultados se realizó a las 72 horas de haber realizado la siembra considerando que se utilizó un medio mínimo que dificultó el crecimiento de los clones.

Primer experimento

La concentración inicial considerada fue de 50 ug/ml para Hg y Cd, 100 ug/ml para Cr y 250 ug/ml para Pb como se observa en la tabla 13-4.

Tabla 13-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (50 ug/ml), Cr (100 ug/ml) y Pb (250 ug/ml).

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 72 h)	Clones sin crecimiento
Hg	50	C1;C2;C3;C4;C5;C8;C9;C10;C11; C12;C13;C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22;C23;C24;C25; C26;C27;C28;C29;C30	C6; C7
Cd	50	C1;C2;C3;C4;C5;C8;C9;C10;C11; C12;C13;C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22;C23;C24;C25; C26;C27;C28;C29;C30	C6; C7
Cr	100	C1;C2;C3;C4;C5;C8;C9;C10;C11; C12;C13;C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22;C23;C24;C25; C26;C27;C28;C29;C30	C6; C7
Pb	250	C1;C2;C3;C4;C5;C8;C9;C10;C11; C12;C13;C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22;C23;C24;C25; C26;C27;C28;C29;C30	C6; C7

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el primer experimento se mostró resistencia de todos los clones para las concentraciones evaluadas con excepción de los clones 6 y 7 que no lograron crecer en presencia de ningún metal evaluado, como se detalla en la tabla 13-4.

Segundo experimento

Para determinar la resistencia de los clones se dobló la concentración usada inicialmente evaluándose Hg y Cd a 100 ug/ml, para Cr 200 ug/ml y Pb 500 ug/ml.

Tabla 14-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Hg y Cd (100 ug/ml), Cr (200 ug/ml) y Pb (500 ug/ml).

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 72 h)	Clones sin crecimiento
Hg	100	C14	C1;C2;C3;C4;C5;C8;

			C9;C10;C11;C12;C13;C15; C16;C17;C18;C19;C20;C21; C22;C23;C24;C25;C26;C27; C28;C29;C30
Cd	100	C1;C3;C10;C12;C14; C28;C30	C2;C4;C5;C8;C9;C11; C13;C15;C16;C17;C18;C19; C20;C21;C22;C23;C24;C25; C26;C27;C29
Cr	200	C1;C3;C5;C8;C9;C10; C12;C14;C15;C18;C24; C25;C26;C28;C29;C30	C2;C4;C11;C13;C16; C17;C19;C20;C21;C22; C23;C27
Pb	500	C1;C2;C3;C4;C5;C8;C9; C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19; C20;C21;C22;C23;C24; C25;C26;C27;C28;C29;C30	Ninguno

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el segundo experimento como se observa en la tabla 14-4 no se observó crecimiento en Hg (100 ug/ml) de veintisiete clones y tan solo el clon 14 se mantuvo con crecimiento a las 72 horas, mostrando el efecto inhibitorio de estos clones para esta concentración y en este medio de cultivo, para Cd (100 ppm) el efecto inhibitorio no fue tan drástico como con el Hg, veintiún clones no mostraron crecimiento y tan solo siete clones lograron crecer, en el caso de Cr (200 ppm) doce clones no crecieron, cantidad menor que para Cd, y para Pb (500 ppm) a diferencia de los demás metales todos los clones evaluados presentaron crecimiento, lo que muestra que a esta concentración de Pb no se ven afectados.

Tercer experimento

En esta etapa de la evaluación se consideró realizar las pruebas con 200 ug/ml para Cd, 400 ug/ml para Cr y 750 ug/ml para Pb, no se consideró utilizar Hg puesto a que los clones alcanzaron la toxicidad a este metal como se observa en la tabla 15-4.

Tabla 15-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cd (200 ug/ml), Cr (400 ug/ml) y Pb (750 ug/ml).

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 72 h)	Clones sin crecimiento
Cd	200	C3;C28	C1;C10;C12;C14;C30
Cr	400	C1;C5;C9;C25	C3;C8;C10;C12;C14;C15; C18;C24;C26; C28;C29;C30
Pb	750	C1;C2;C3;C4;C5;C8;C9;C10; C11;C12;C13;C14;C15;C16; C17;C18;C19;C20;C21;C22; C23;C24;C25;C26;C27;C28; C29;C30	Ninguno

Realizado por: Lorena Rodríguez

Para el tercer experimento como se observa en la tabla 15-4 no se observó crecimiento en Cd (200 ug/ml) para cinco clones y tan solo dos clones (C3, C28) mostraron crecimiento, para Cr (400 ppm) doce clones no crecieron y cuatro mantuvieron su crecimiento, en el caso de Pb (750 ppm) crecieron todos los clones evaluados hasta esta etapa, mostrándose que aún no se ven afectados por la presencia del metal.

Cuarto experimento

Para el cuarto experimento se consideró las siguientes concentraciones, para Cd 400 ug/ml, Cr 800 ug/ml y Pb 1000 ug/ml como se observa en la tabla 16-4.

Tabla 16-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Cd (400 ug/ml), Cr (800 ug/ml) y Pb (1000 ug/ml).

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 72 h)	Clones sin crecimiento
Cd	400	C3;C28	Ninguno
Cr	800	C9	C1;C5;C25
Pb	1000	C1;C2;C3;C4;C5;C8;C9;C10; C11;C12;C13;C14;C15;C16; C17;C18;C19;C20;C21;C22; C23;C24;C25;C26;C27;C28;C29	C30

Realizado por: Lorena Rodríguez

Para el cuarto experimento como se observa en la tabla 16-4 los clones 3 y 28 mostraron crecimiento en Cd (400 ppm), para Cr (800 ppm) tan solo el clon 9 logró crecer, en el caso de Pb solo un clon no mostró crecimiento.

Quinto experimento

Para el quinto experimento solo se evaluó el crecimiento en presencia de Pb debido a que los aislados alcanzaron la toxicidad en Cr, considerándose una concentración de 1500 ug/ml para Pb como se observa en la tabla 17-4.

Tabla 17-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb (1500 ug/ml).

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 72 h)	Clones sin crecimiento
Pb	1500	C1;C2;C3;C5;C8;C9;C10; C11;C12;C13;C14;C15; C18;C19;C20;C21;C24; C25;C26;C27;C28;C29	C4;C16; C17;C22; C23;

Realizado por: Lorena Rodríguez

Para el quinto experimento como se observa en la tabla 17-4 no se observó el crecimiento de 5 clones.

Sexto experimento

Para el sexto experimento se consideró evaluar el crecimiento a una concentración de 2500 ug/ml de Pb como se observa en la tabla 18-4.

Tabla 18-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb (2500 ug/ml).

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 72 h)	Clones sin crecimiento
Pb	2500	C5; C9;C10;C11;C12; C25;C26;C27;C28;C29	C1;C2;C3;C8;C13;C14;C15; C18;C19;C20;C21;C24

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el sexto experimento como se muestra en la tabla 18-4 se observó la inhibición de doce clones.

Séptimo experimento

Para el séptimo experimento se utilizó la concentración de 3500 ug/ml para Pb como se observa en la tabla 19-4.

Tabla 19-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb (3500 ug/ml).

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 72 h)	Clones sin crecimiento
Pb	3500	C12; C25;C26;C27;C28	C5; C9;C10;C11;C29

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el séptimo experimento cinco clones no presentaron crecimiento en Pb a una concentración de 3500 ppm, como se detalla en la tabla 19-4.

Octavo experimento

Para el octavo experimento se utilizó la concentración de 4000 ug/ml para Pb como se observa en la tabla 20-4.

Tabla 20-4 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb (4000 ug/ml).

Metal	Concentración (ug/ml)	Clones (crecimiento a las 72 h)	Clones sin crecimiento
Pb	4000	C12;C28	C25;C26;C27

Realizado por: Lorena Rodríguez

En el octavo experimento, tres clones no presentaron crecimiento en Pb a una concentración de 4000 ppm, como se observa en la tabla 20-4.

La evaluación de la resistencia a metales de los clones aislados a partir del medio M9 se realizó en 8 experimentos observándose que los clones 6 y 7 fueron los que menos resistieron a los 4 metales, mientras que los clones 3, 9, 12, 14 y 28 fueron los más resistentes.

El Hg mostró un fuerte efecto inhibitorio sobre los clones evaluados, seguido por el Cd que permitió el crecimiento hasta los 400 ppm y el Cr hasta los 800 ppm. El elemento menos selectivo fue el Pb el cual permitió el crecimiento de los clones 12 y 28 hasta los 4000 ppm.

4.4.3 Resistencia a Hg

Las pruebas de resistencia a Hg en forma de acetato mercúrico mostraron una mejor adaptación de los clones en medio TSA en comparación con el medio M9, observándose que un 8,6% de los clones alcanzaron crecimiento hasta una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los clones de medio M9 presentaron una importante disminución en su crecimiento alcanzando el 3,3% de los clones una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, como se visualiza en el gráfico 9-4, esta diferencia en los resultados demuestra que los clones que crecieron en medio TSA tienen mejor adaptabilidad que los de M9, lo que se puede deber a que el primero es un medio rico en nutrientes ayudando a los clones a resistir, mientras que el medio M9 es bajo en nutrientes y las bacterias tuvieron que desarrollarse en estas condiciones de crecimiento además de la adición de mercurio como presión para su crecimiento.

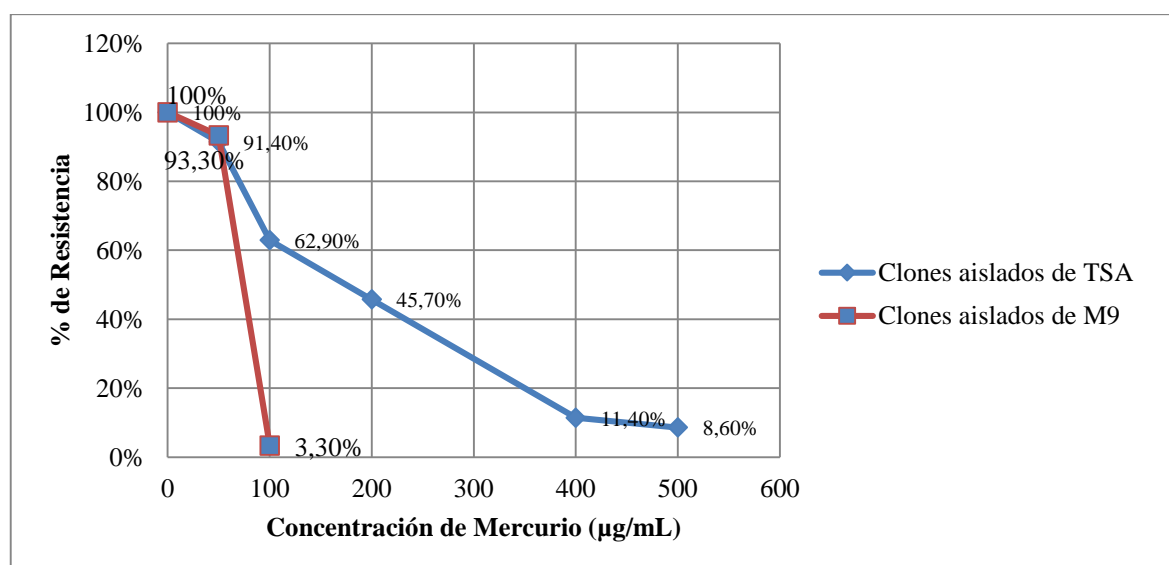


Gráfico 9-4 Resistencia a Mercurio

Realizado por: Lorena Rodríguez

Los resultados obtenidos concuerdan con Acevedo & Severiche (2013) quienes encontraron cepas resistentes a di-bromo mercurio en concentraciones desde 10 a 180 ppm obtenidas de muestras ambientales y con Dupontt et al. (2001) quienes encontraron resistencia bacteriana al cloruro mercúrico hasta una concentración de 500 ppm.

Acevedo & Severiche (2013) en su estudio de identificación de bacterias resistentes a di bromo mercurio aisladas de sedimentos de playas de Cartagena encontraron que la resistencia que presentan algunos clones bacterianos podría deberse a que algunos de ellos son capaces de utilizar como fuente de energía los compuestos organomercuriales y a la utilización de mecanismos de reducción enzimática o formación del HgS para precipitarlo, además esta resistencia genética podría estar asociada a los tóxicos ambientales y a la fuente de contaminación en dicho estudio,

por lo que se podría atribuir la misma explicación para la resistencia bacteriana en la presente investigación demostrando la presencia de Hg en el ambiente.

4.4.4 Resistencia a Cd

Las pruebas de resistencia a Cd en forma de nitrato de cadmio mostraron una mayor mortalidad para los clones crecidos en medio M9 donde se observó una drástica disminución del número de clones desde los 50 µg/mL hasta los 100 µg/mL, de 93,3% a 23,3% respectivamente, posteriormente se evidenció un 6,7% de clones capaces de soportar una concentración 400 µg/mL, mientras que los clones de medio TSA mostraron mayor resistencia y una mortalidad proporcional a la concentración del metal, alcanzando crecimiento solo un 14,3% de los clones a una concentración de 1500 µg/mL como se muestra en el gráfico 10-4, estos resultados demostraron que los clones de medio TSA muestran mejor adaptación a la presencia de Cd, lo cual posiblemente se debe a la alta disponibilidad de nutrientes presentes en el medio.

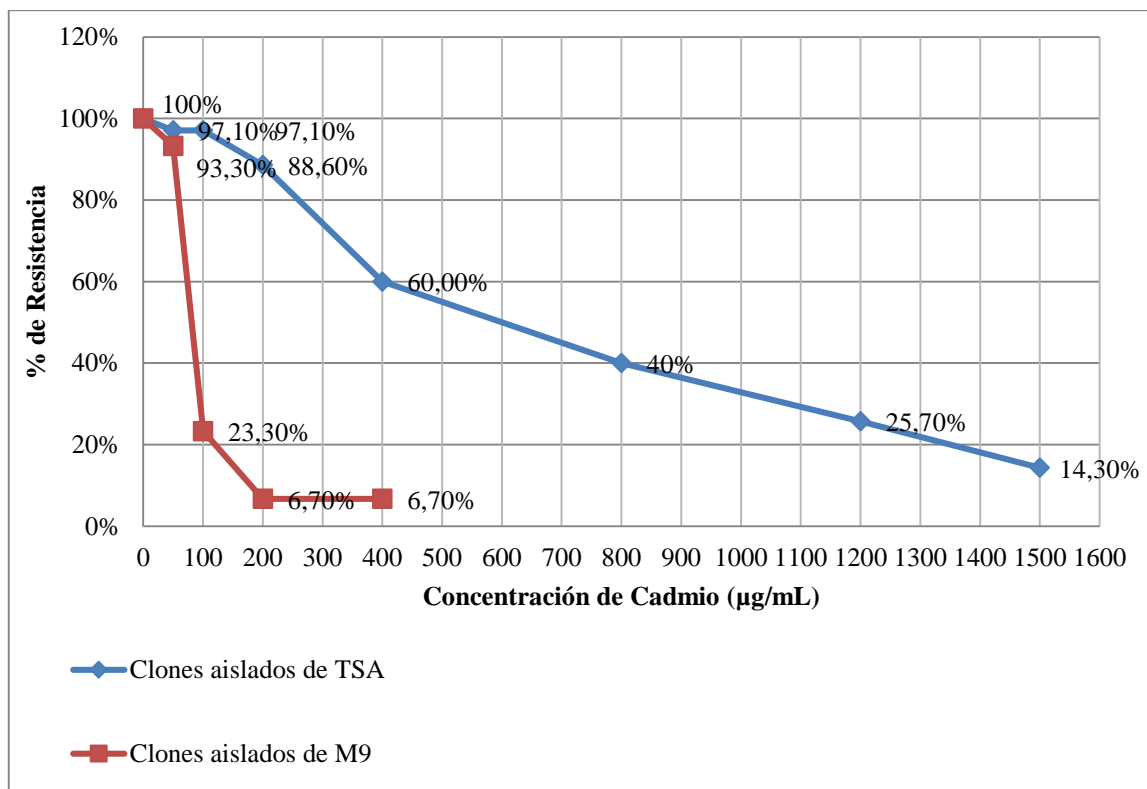


Gráfico 10-4 Resistencia a Cadmio
Realizado por: Lorena Rodríguez

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Dupontt *et al.* (2001) quienes encontraron resistencia bacteriana a cadmio en forma de cloruro de cadmio entre 50 y 1000 µg/mL, demostrando una capacidad de adaptación similar a lo encontrado en este trabajo en los

clones obtenidos en medio TSA, dicha resistencia podría deberse a que las bacterias desarrollan sistemas de expulsión como mecanismo de tolerancia al metal, sin embargo los clones de M9 no desarrollaron este mecanismo mostrando dificultades para crecer.

4.4.5 Resistencia a Cromo

La resistencia a cromo en forma de nitrato de cromo demostraron una mayor adaptación de los clones que crecieron en medio TSA, puesto que hasta una concentración de 800 $\mu\text{g/mL}$ no se evidenció mortalidad, posteriormente hasta 2000 $\mu\text{g/mL}$ la mortalidad fue leve, alcanzando a los 4000 $\mu\text{g/mL}$ un crecimiento del 11,4% de los clones evaluados como se observa en el gráfico 11-4, los clones evaluados en medio M9 mostraron una drástica disminución en el crecimiento entre las concentraciones de 100 a 400 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente se mantuvo una leve disminución hasta los 800 $\mu\text{g/mL}$ con un 3,3% de clones que crecieron, tales resultados muestran una mejor adaptación de los clones del medio TSA debido a la alta disponibilidad de nutrientes del mismo.

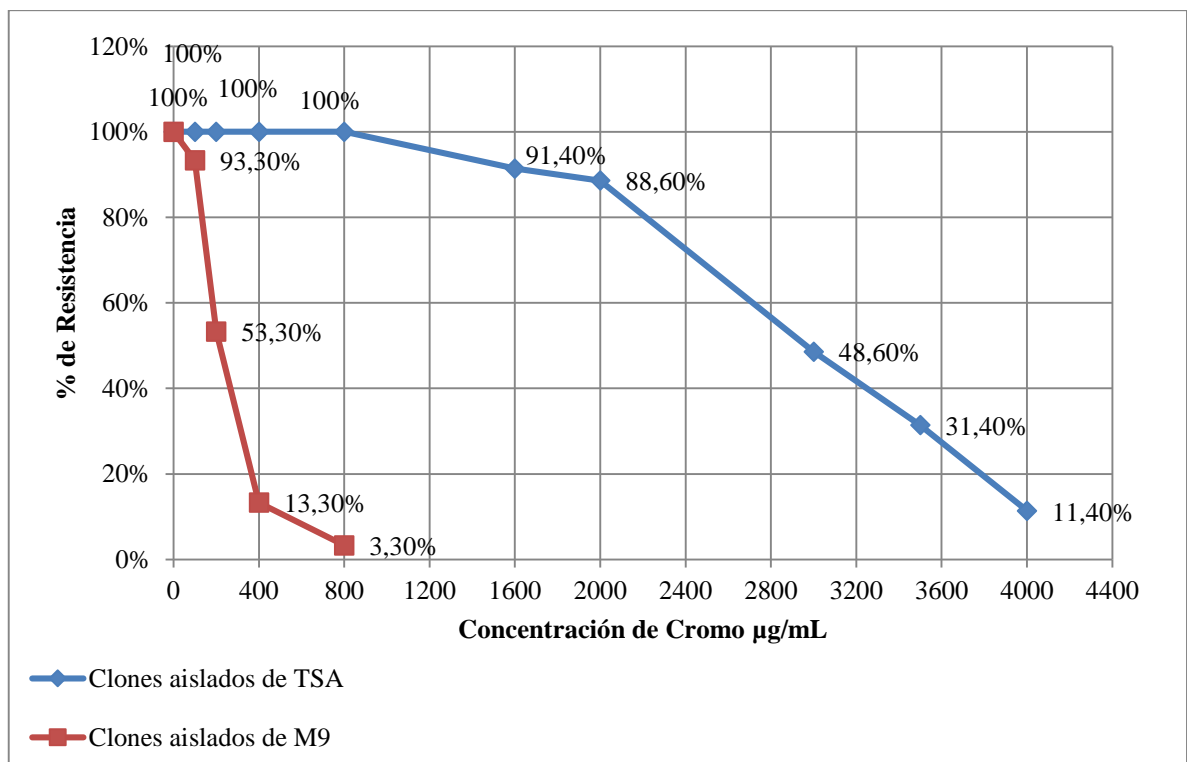


Gráfico 11-4 Resistencia a Cromo

Realizado por: Lorena Rodríguez

Los resultados obtenidos por Moraga *et al.* (2003) en un estudio de resistencia a metales de la bahía de Iquique evaluaron la resistencia a cromo (di cromato de potasio en concentraciones desde 100 a 1600 $\mu\text{g/mL}$), observándose una mejor adaptación de los clones obtenidos en este trabajo

debido a que se llegó hasta una concentración de 4000 $\mu\text{g/mL}$. La resistencia bacteriana observada podría atribuirse a que los clones pueden tener sistema enzimáticos capaces de reducir el cromo hasta una forma menos tóxica, mientras la poca resistencia de los clones de M9 podría deberse al efecto tóxico que produce el cromo para la mayoría de las bacterias en su ADN, lípidos y proteínas, formando radicales libres.

4.4.6 Resistencia a Plomo

Las pruebas de resistencia a plomo muestran una adaptabilidad similar entre los clones de los dos medios observándose que no existe una diferencia tan drástica entre el crecimiento en los dos medios (TSA y M9) como en los metales evaluados anteriormente, presentando un crecimiento casi lineal desde la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ hasta 1000 $\mu\text{g/mL}$, de esta concentración en adelante la disminución del crecimiento es considerable alcanzando los 4500 $\mu\text{g/mL}$ para el medio TSA y 4000 $\mu\text{g/mL}$ para el medio M9, tal como se muestra en el gráfico 12-4, tales resultados demuestran una capacidad de adaptación similar entre los clones aislados de los 2 medios, es decir las bacterias no se ven afectadas por la baja disponibilidad de nutrientes presentes en el medio M9.

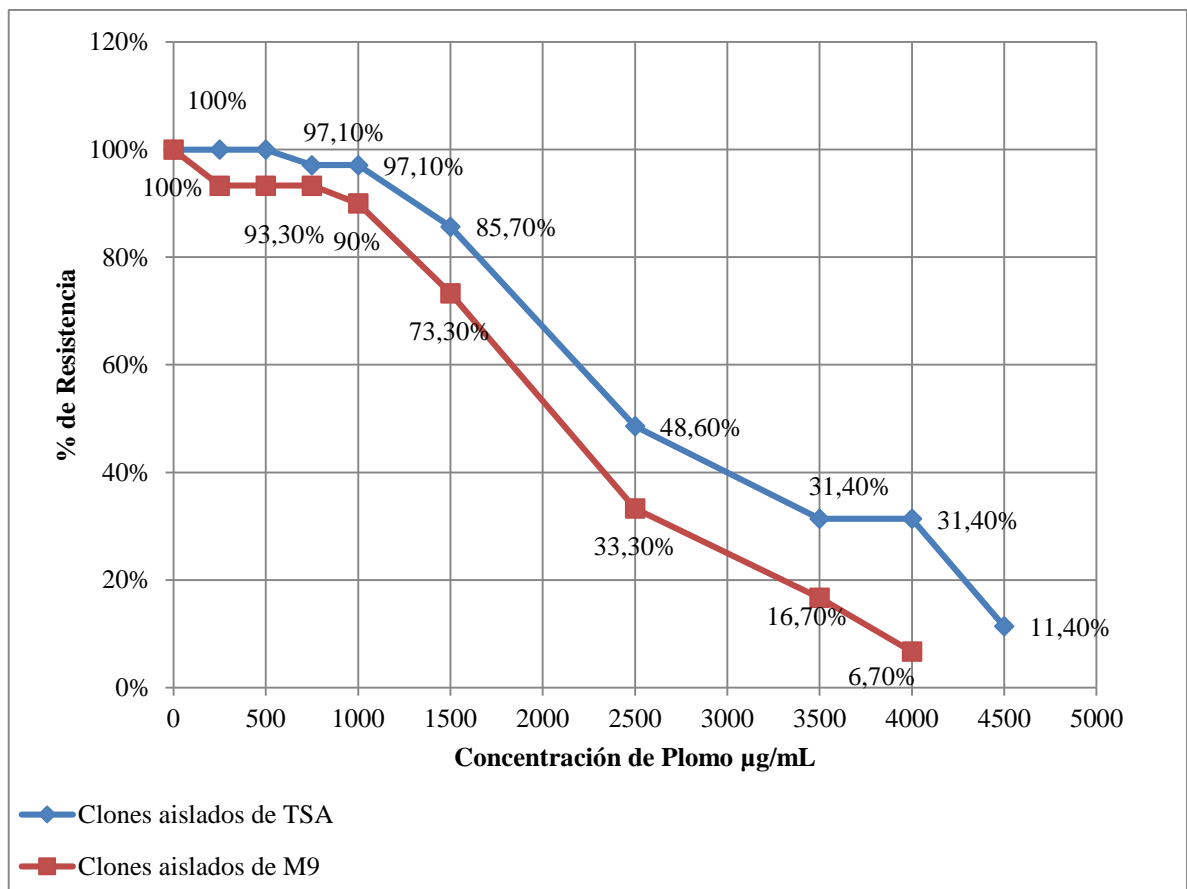


Gráfico 12-4 Resistencia a Plomo
Realizado por: Lorena Rodríguez

Los resultados obtenidos demostraron una adaptación similar de los clones reportados por Moraga *et al.* (2003) quienes aislaron clones capaces de resistir concentraciones de nitrato de plomo desde 200 a 3200 µg/mL, en la presente investigación se llegó hasta la concentración de 4500 µg/mL para el medio TSA y 4000 µg/mL para el M9, la resistencia obtenida podría atribuirse a que las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia como la acumulación del metal en el citoplasma, la excreción al exterior o la intervención de ATPasas de tipo P.

Todos los resultados obtenidos nos indican una resistencia mayor para Pb > Cr > Cd > Hg en ese orden, lo cual podría indicar que en el ambiente existe la presencia de Pb o de algún factor que indujo la selección de bacterias capaces de crecer en ambientes con altas concentraciones de Pb. Además es importante indicar que el metal que mostró mayor toxicidad fue el Hg, coincidente con lo que indican varios estudios.

Los clones provenientes del medio TSA demostraron mejor adaptabilidad que los clones del medio M9, lo cual puede atribuirse a la composición del medio, puesto que el primero es rico en nutrientes lo cual le conferiría a los clones cierta ayuda para desarrollarse en presencia del metal, otra razón puede deberse a que en el medio TSA la mayor parte de clones corresponden a bacterias Gram negativas, mientras que en el medio M9 no existe diferencia significativa entre Gram positivos y negativos, y se ha reportado resultados de que las bacterias Gram negativas son más resistentes a metales pesados que las Gram positivas, lo que podría atribuirse a la membrana externa que poseen las Gram negativas, misma que sirve como barrera protectora contra sustancias tóxicas que pueden dañar la bacteria. (Perez & Mota, 2009, p. 33)

Otro factor importante hacer notar es que en la evaluación de resistencia a metales pesados los clones crecidos en TSA fueron aislados a temperatura ambiente, mientras que los de M9 fueron evaluados a una temperatura de 28°C, evidenciando adaptación a bajas temperaturas en el primer caso; para los de M9 el crecimiento a temperatura ambiente fue más difícil, además todos los clones aislados fueron sometidos a pruebas de crecimiento en 8°C, observándose que los clones de TSA mantuvieron su crecimiento a pesar de la temperatura, mientras que los de M9 no crecieron, esta característica de los clones podría atribuirse a las condiciones climáticas a las que han estado expuestas las muestras y podrían ser beneficiosas para ser utilizados en procesos de biorremediación.

4.4.7 Producción de pigmentos en los clones aislados

Se realizó una evaluación cualitativa de la producción de pigmentos de los clones aislados, pues constituye una característica importante observada en el crecimiento de las colonias en algunos

de los metales evaluados, esta característica fue observada sólo en los clones en medio TSA en presencia de plomo y mercurio.

Tabla 21-4 Producción de pigmentos en los clones aislados en medio TSA con Mercurio

Mercurio		
Concentración (µg/mL)	Color	Clones
50	Café claro	C31;C32;C34;C35
100	Café claro	C1;C12;C14
	Plomo	C17
	Punto medio color negro, borde crema.	C4;C7
200	Crema	Todas las colonias con crecimiento.

Realizado por: Lorena Rodríguez

Los resultados obtenidos en la producción de pigmento en las colonias con mercurio muestran que muy pocos clones cambiaron de coloración, la cual se observó hasta la concentración de 100 µg/mL, a la primera concentración de 50 ppm solo cuatro clones mostraron un color café claro mientras las demás colonias con crecimiento se mantuvieron con sus colores iniciales detallados en el gráfico 8-4, al doble de concentración los clones 31, 32, 34 y 35 volvieron a su color inicial, mientras que los clones 1, 4, 7, 12, 14, y 17 adoptaron otro color como se observa en la tabla 21-4, esto podría deberse a que los clones tuvieron que desarrollar ciertas características para poder tolerar la presencia del metal, a la concentración 200 de µg/mL las colonias que mantuvieron crecimiento ya no desarrollaron esta característica.

Tabla 22-4 Producción de pigmentos en los clones aislados en medio TSA con Plomo

Plomo		
Concentración (µg/mL)	Color	Clones
250	Café oscuro	C1;C2;C3;C4;C7;C12;C13;C14
	Plomo	C15;C17;C22;C27;C39
	Amarillo	C23
500	Negro	C1;C3;C4;C12;C13;C14
	Plomo	C2;C7;C5;C15;C17;C20;C22;C25;C26;C27;C28;C30

750	Negro	C1;C3;C4;C12
	Plomo	C13;C14;C15
	Café oscuro	C2;C7;C17;C22;C27;C30
1000	Café oscuro	C1;C2;C3;C4;C7;C12;C13;C14
	Plomo	C15
	Café claro	C17
1500	Café oscuro	C1;C2;C3;C4;C7;C12;C13;C14;
2500	Café claro	C1;C2;C3;C4;C7;C14
3500	Café claro	C1;C2;C4;C7
4500		No hay producción de pigmento

Realizado por: Lorena Rodríguez

Los resultados obtenidos en la producción de pigmento de los clones en presencia de plomo demostraron que en gran cantidad de las colonias se observa cambio de color lo que podría deberse a la presencia del plomo. Este hecho particular no fue observado en Cr y Cd, los clones que mostraron un color más fuerte son el clon 1, 3, 4, 12 hasta una concentración de 750 µg/mL por mostrarse de color negro, de ahí en adelante el color de los clones fue cambiando a colores más claros a medida que se aumentó la concentración del metal, como se observa en la tabla 22-4 estos clones cambiaron de color hasta la concentración de 3500 µg/mL mientras que la resistencia de los mismos clones evaluados se mantuvo hasta la concentración de 4500 µg/mL, la producción de esta coloración podría deberse a que las bacterias formaron algún tipo de sustancia o utilizaron algún sustrato del medio de cultivo (Peña, 2010), sin embargo como esta característica fue observada particularmente en el crecimiento de bacterias en medio con plomo, podría atribuirse esta coloración a la presencia del metal.

4.5 Fase V: Identificación bacteriana por pruebas bioquímicas

Las pruebas de identificación bioquímica realizadas a siete clones desarrollados en el medio TSA y cinco clones en el medio M9. Se obtuvo la presencia de los géneros y especie *Proteus vulgaris*, y *Klebsiella ozaenae* y de los géneros *Pseudomonas*, *Neisseria* para los clones de TSA y *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Klebsiella ozaenae* y *Klebsiella oxytoca* para los clones de M9,

destacando entre los dos grupos en género *Klebsiella* que se repite en los dos medios, como se muestra en los gráficos 13-4 y 14-4.

Los géneros bacterianos obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Martínez *et al.* (2010) y Acevedo & Severiche (2013), considerando el tipo de muestra utilizada para desarrollar la investigación, puesto que los géneros *Klebsiella* y *Proteus*, forman parte del grupo de coliformes, causantes de infecciones respiratorias y urinarias, encontrándose de forma natural en el ambiente pero proliferan rápidamente en aguas con alta carga de nutrientes como las aguas residuales utilizadas, mientras que el género *Pseudomonas* se encuentran en variedad de ambientes, haciéndolas candidatas para ser utilizadas en procesos de biorremediación de metales pesados y otros derivados de hidrocarburos por su versatilidad metabólica.

El género *Neisseria* presentan similitud con el género *Pseudomonas* puesto que se les asocia por alterar los nutrientes utilizados en su metabolismo, además son causantes de enfermedades en los humanos. (Sánchez, 2004)

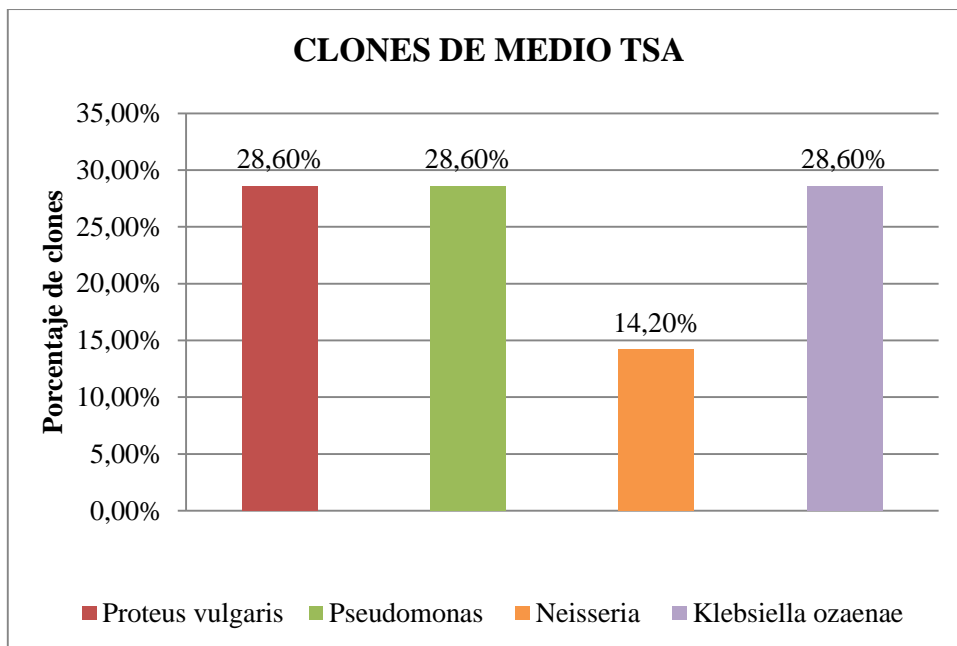


Gráfico 13-4 Clones aislados en medio TSA
Realizado por Lorena Rodríguez

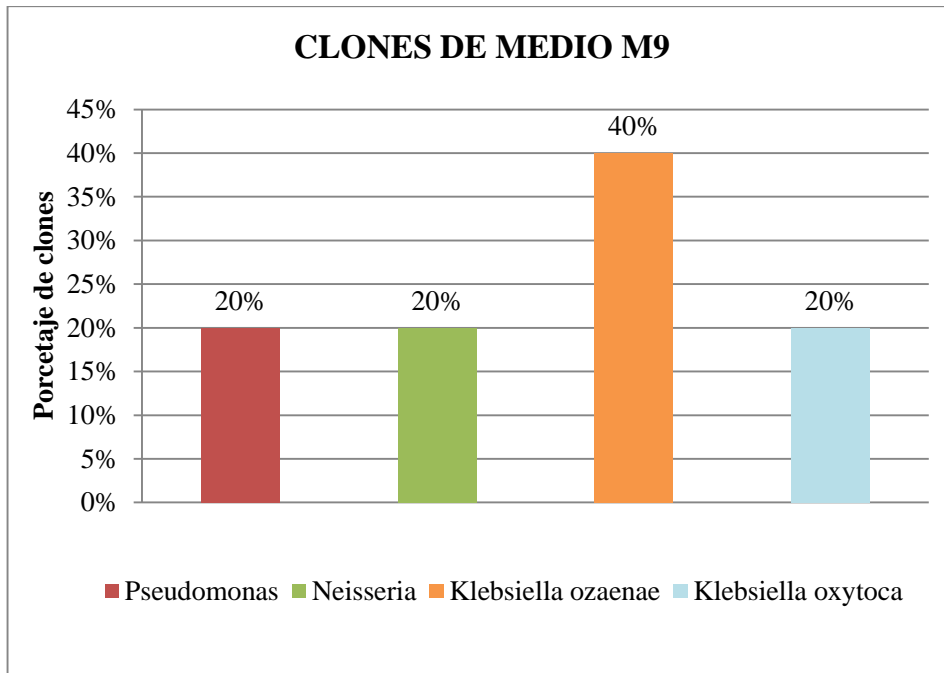


Gráfico 14-4 Clones aislados en medio M9
Realizado por Lorena Rodríguez

CONCLUSIONES

- Se aislaron un total de 65 colonias de muestras contaminadas con hidrocarburos que fueron estabilizadas y adaptadas a los medios utilizados, TSA y M9 y a la presencia de acetato de plomo como agente de presión selectiva.
- La evaluación de la producción de pigmentos demostró que algunos de los clones aislados tienen la capacidad de cambiar de coloración, característica observada de manera importante en la evaluación con plomo y solo en el medio TSA hasta una concentración de 3500 µg/mL.
- Las pruebas de resistencia a los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo, demostraron que tres clones fueron resistentes a mercurio hasta una concentración de 500 ppm, cinco clones a cadmio hasta 1500 ppm, cuatro clones a cromo hasta 4000 ppm y cuatro clones a plomo hasta 4500 ppm.
- Las pruebas bioquímicas permitieron identificar doce clones de los cuales dos pertenecieron a *Pseudomonas*, dos a *Proteus vulgaris*, dos a *Neisseria*, cuatro a *Klebsiella ozaenae* y uno a *Klebsiella oxytoca*.
- Los clones *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Pseudomonas* y *Neisseria* fueron los más resistentes a plomo y cromo; a cadmio *Proteus vulgaris* y *Neisseria* y para mercurio *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae* y *Pseudomonas*.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el estudio de los organismos identificados en la presente investigación para evaluar su eficacia como potenciales agentes biorremediadores de metales pesados.
- Se podría considerar secuenciar el DNA de los clones para conocer con mayor certeza las especies encontradas, además permitiría explicar mejor la adaptación a los medios y agentes de presión selectiva, así como la formación de pigmentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ACEVEDO, R., & SEVERICHE, C.** “Identificación de bacterias resistentes a di- bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano.” *Revista Avances*. [En línea]. 2013. Colombia Vol. 10. pp. 74-77. [Consulta: 15 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.unilibre.edu.co/revistaavances/avances-10-2/07-Identificacion+de+bacterias+resistentes+a+dibromomercurio.pdf>
2. **AGUA ECUADOR.** *Minería y contaminación del agua*. Ecuador. [En línea]. 2013. [Consulta: 15 de enero de 2016]. Disponible en: <http://agua-ecuador.blogspot.com/2013/07/mineria-y-contaminacion-del-agua.html>
3. **ARECO, M.** Métodos alternativos para el tratamiento de la contaminación ambiental por metales pesados. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 2011. pp. 17-21. [Consulta: 10 de enero de 2016]. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsd1-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_4811_Areco
4. **ARGENBIO.** *La Biorremediación*. Argentina. [En línea]. 2007. [Consulta: 20 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=202>
5. **BARCELÓ, D., & LÓPEZ, M.** *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. [En línea]. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC.2008 [Consulta 30 de octubre de 2016], p. 1. Disponible en: http://nuevaculturadelagua.es/phocadownload/P.CIENTIFICO/inf_contaminacion.pdf
6. **BAILÓN, L., CRUZ, R., & CERVANTES A.** *Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias*. [En línea]. Universidad Nacional Autónoma de México. 2003. pp. 26-29. [Consulta: 07 de noviembre de 2016]. Disponible en:

https://www.academia.edu/4858992/Atlas_de_pruebas_bioquimicas_para_identificar_bacterias

7. **BARRERA, L., & VELECELA, F.** *Diagnóstico de la contaminación ambiental causada por aceites usados provenientes del sector automotor y planteamiento de soluciones viables para el Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Azogues.* Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. (tesis) (Pregrado). 2015. pp. 1-22.
8. **CALVILLO, L.** *Análisis microbiológico del agua en la provincia de Jaén.* [En línea] (tesis) (Pregrado). Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales. 2014. p. 28. [Consulta: 22 de octubre de 2016] Disponible en: http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/562/1/TFG_CalvilloVillaverde%2cLorena.pdf
9. **CAMSLOG.** *Auditoría Ambiental para el licenciamiento Estación de Servicio Panorama.* [En línea]. Durán-Ecuador. p. 55. [Consulta: 20 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.guayas.gob.ec/dmdocuments/medio-ambiente/eia/2014/2014-julio/PANORAMA.pdf>
10. **CANO, S.** *Métodos de Análisis Microbiológico, Normas ISO, UNE.* [En línea]. 2006. p.9. [Consulta: 22 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi148anmic.pdf>
11. **CAÑIZARES, R.** Biosorción de Metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 2000. pp. 134-137. [Consulta: 12 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi003f.pdf>
12. **CASADO, M., TORRICO, G., & MEDINA, M.** *Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología.* [En línea]. 2012. pp. 8-12 [Consulta: 04 de noviembre de 2016]. Disponible en:

<https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>

13. **CAZORLA, E.** *Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna San Antonio del cantón Riobamba.* (Tesis Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Ingeniería en Biotecnología Ambiental. 2014. p. 136.
14. **CERVANTES, C.** Mecanismos de expulsión de metales tóxicos en bacterias. [En línea]. *Revista BEB Boletín de Educación Bioquímica.* 2000. vol. 19. n° 1. [Consulta: 23 de enero de 2016]. Disponible en: <http://biblat.unam.mx/es/revista/beb-boletin-de-educacion-bioquimica/articulo/mecanismos-de-expulsion-de-metales-toxicos-en-bacterias>
15. **DELGADILLO, A., et. al.** Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. Tropical and Subtropical Agroecosystems. [En línea] *Revista Scielo* Universidad Autónoma de Yucatán. 2011. vol. 14. p. 597. [Consulta: 22 de octubre de 2016]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200002
16. **DUPONTT, J., et. al.** Susceptibilidad a Hg²⁺ y Cd²⁺ en cepas bacterianas biodegradadoras de antraceno aisladas de la playa “Caimare Chico” estado Zulia. [En línea] Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. 2001. vol. 35. pp. 248-252. [Consulta: 13 de enero de 2017]. Disponible en: file:///C:/Users/usuario_pc/Downloads/3966-3965-1-PB.pdf
17. **EGAS, C., & TINAJERO, M.** Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador. (Tesis de Pregrado) Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. 2016. pp. 4-5.
18. **ESPINOZA, M., et al.** Aislamiento de bacterias resistentes y transformadoras de Cr (VI) y metil paratión. [En línea]. *Avances en Ciencia del Agua.* 2015. pp. 147-

153. [Consulta: 25 de enero de 2016]. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Capitulo%201.pdf>
19. **FERNÁNDEZ, A., et al.** *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. 2010. p. 6.
20. **GARCÍA, V.** *Introducción a la Microbiología*. Costa Rica 2005. 2da edición. pp. 52-53. [Consulta: 31 de octubre de 2016]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=K_ETVnqnMZIC&pg=PA52&dq=crecimiento+bacteriano&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjH-6vkmYbQAhUK5SYKHbO7CHMQ6AEIGjAA#v=onepage&q=crecimiento%20bacteriano&f=false
21. **GUEDEA, G.** *Tinción de Gram*. [En línea]. 2007. [Consulta: 30 de octubre de 2016]. ISBN EELPZEVKYKPMNCQXMD. Disponible en: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EELpZEVkykPMncqcmd.php>
22. **INECC.** *Metales Pesados*. [En línea]. 2009. [Consulta: 23 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>
23. **KONEMAN, E., et al.** *Diagnóstico microbiológico*. [En línea]. 2008. 6ta edición. pp. 189-191. [Consulta: 31 de octubre de 2016]. Disponible en: <https://books.google.co.ec/books?id=jyVQueKro88C&pg=PA191&dq=crecimiento+bacteriano&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjH-6vkmYbQAhUK5SYKHbO7CHMQ6AEIjAC#v=onepage&q=crecimiento%20bacteriano&f=false>
24. **LATORRE, N.** Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los Andes. [En línea]. Pontificia Universidad Javeriana. 2007. pp. 27-28. [Consulta: 23 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis112.pdf>

25. **LÓPEZ, L., TORRES, C.** *Microbiología General*. [En línea]. Universidad Nacional del Nordeste. 2006. [Consulta: 23 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>
26. **MARRERO, J., DIAZ, A., & COTO, O.** Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. 2010. vol. 41. n° 1. p.69.
27. **MARTIN, M.** Caracterización y aplicación de biomasa residual a eliminación de metales pesados. 2008. pp. 17-30.
28. **MARTÍNEZ, K., et al.** Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. [En línea]. *Scielo*. 2012. vol. 21. pp. 33-34 [Consulta: 24 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ata/v21n1/v21n1a04.pdf>
29. **MARTÍNEZ, A., et al.** Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almandares. [En línea]. *Revista CENIC*. 2010. vol. 41. pp. 1-10. ISSN: 0253-5688 [Consulta: 24 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509038.pdf>
30. **MEDINA, M.** Determinación de cromo hexavalente en descargas de aguas residuales de una curtiembre, ubicada en el sector de Izamba-Ambato en la provincia de Tungurahua, mediante espectrofotometría de absorción atómica. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. (Tesis de Pregrado). 2010. pp. 1-2. [Consulta: 24 de enero de 2016]. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/3162>
31. **MOLLINEDO, M., & GONZÁLEZ, C.** Bacterias Gram negativas. [En línea]. *Revista de actualización clínica*. 2014, vol.49 [Consulta: 30 de octubre de 2016], p. 2610. ISSN 2304-3768. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000005&script=sci_arttext

32. **MORAGA, R., MERINO, C. & MONDACA, M.** Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía Iquique. *Revista Scielo*. 2003, vol. 31.
33. **OMS.** *El mercurio y la salud*. [En línea]. 2016. [Consulta: 24 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/es/>
34. **OMS.** *Intoxicación por plomo y salud*. [En línea]. 2015. [Consulta: 24 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>
35. **OLIVAS, E.** Manual de Practicas Laboratorio de Microbiología. Academia de Microbiología y Parasitología. 2012. pp. 10.
36. **OROZCO, G., PINEDA, G., & SALGADO, R.** *Optimización de la degradación de la parafina P-1 por Pseudomonas aeruginosa MGP-1*. [En línea] Universidad Simon Bolívar. 2007. pp. 97. [Consulta: 02 de febrero de 2016]. Disponible en: file:///C:/Users/usuario_pc/Downloads/Dialnet-OptimizacionDeLaDegradacionDeLaParafinaP1PorPseudo-2695330.pdf
37. **PEÑA, M.** *Características macroscópicas de las colonias bacterianas observadas en un medio de cultivo sólido en caja Petri*. [En línea]. 2010. [Consulta: 08 de noviembre de 2016]. Disponible en: https://www.academia.edu/11785101/Caracteristicas_macroscopicas_de_bacterias
38. **PEREZ, M., MOTA, M.** *Morfología y estructura bacteriana*. [En línea]. 2009. [Consulta: 27 de enero de 2016], p. 33. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
39. **PÉREZ, T., VALVERDE, C., & JIMÉNEZ, C.** *Biomíneralización bacteriana de magnenita y aplicaciones*. [En línea]. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. 2004. p. 58-59. ISSN: 1698-5478 [Consulta: 22 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.ehu.eus/sem/seminario_pdf/SEMINARIO_SEM_7_058.pdf

40. **ROMERO, M., DIEGO, F., & ALVAREZ, M.** La contaminación del aire: su repercusión como problema de salud. [En línea]. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2006, vol.44, n.2 [Consulta: 30 de octubre de 2016], pp. 1-3. ISSN 1561-3003. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032006000200008&lng=es&nrm=iso>.
41. **SANCHEZ, I.** Microbiología clínica. 2004.
42. **SAMBROSIO, E.** *Tinción y observación de microorganismos*. [En línea]. 2009. [Consulta: 22 de junio de 2016]. Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf
43. **SILVA, S., & CORREA, F.** *Análisis de la contaminación del suelo*: [En línea]. Revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. Universidad de Medellín.. 2009, vol.12, n.23 [Consulta: 30 de octubre de 2016], pp. 18-19. ISSN 0120-6346. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/seec/v12n23/v12n23a2.pdf>
44. **SALOMONS.** Metales Pesados. Problemas y Soluciones. [En línea]. 1995. Berlin: Springer. [Consulta: 20 de enero de 2016]
45. **SÁNCHEZ, J.** Fundamentos y aspectos microbiológicos. Biorremediación. 2003. pp. 12-13.
46. **SOTO, C., GUTIÉRREZ, S., REY, A. & GONZÁLEZ, E.** Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. [En línea]. Universidad Antonio Nariño. 2010. pp.196-197. [Consulta: 21 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA14_ARTORIG6.pdf
47. **TULSMA.** Texto Único de Legislación Secundaria del Medio Ambiente. 2003.

48. **URQUIZO, M.** Diseño de un plan de manejo ambiental para la reducción de impactos ecológicos generados por la estación de servicio Estefany. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. 2003. pp. 1-2.
49. **VILCHEZ, R.** Eliminación de Metales Pesados de Aguas Subterráneas mediante Sistemas de Lechos Sumergidos: Estudio Microbiológico de las Biopelículas: [En línea]. Universidad de Granada. 2005. pp. 7-19. [Consulta: 21 de enero de 2016]. Disponible en: <http://hera.ugr.es/tesisugr/1542649x.pdf>
50. **VULLO, D.** Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. [En línea]. *Revista Química Viva*. 2003 vol. 2 .n° 3 [Consulta: 19 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>

ANEXOS

Anexo A: Puntos de muestreo



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo B: Primera siembra sin diluciones



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo C: Uso de la varilla de dispersión



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo D: Segunda siembra con diluciones



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo E: Agotamiento en superficie



Realizado por: Lorena Rodríguez

**Anexo F: Repiques
(TSA)**



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo G: Colonias seleccionadas puras



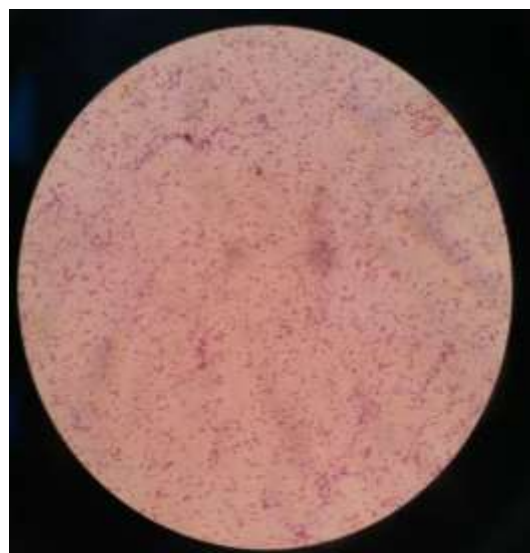
Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo H: Tinción Gram



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo I: Tinción Gram



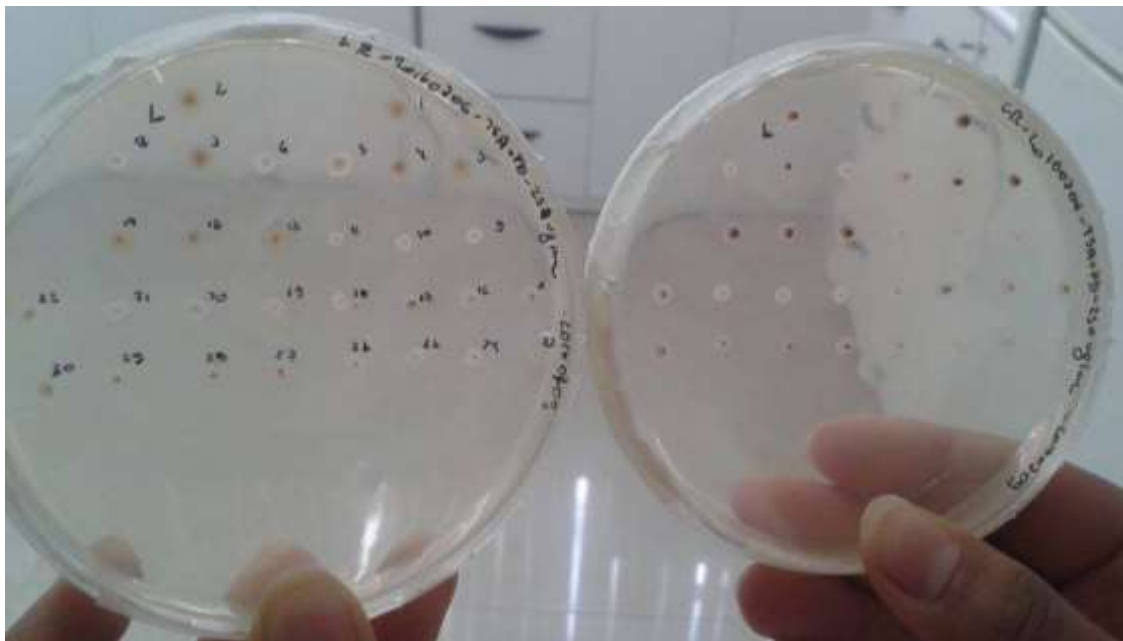
Realizado por: Lorena Rodríguez

ANEXO J: Siembra en medios con metales pesados



Realizado por: Lorena Rodríguez

ANEXO K: Resultados de la resistencia a Pb (250 ppm) en TSA



Realizado por: Lorena Rodríguez

ANEXO L: Resultados de la resistencia a Hg (50 ppm) en TSA



Realizado por: Lorena Rodríguez

ANEXO M: Resultados de la resistencia a Cr (100 ppm) en TSA



Realizado por: Lorena Rodríguez

ANEXO N: Resultados de la resistencia a Cd (50 ppm) en TSA



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo O: Resistencia a Hg (50 ppm) en M9 Anexo P: Resistencia a Cd (50 ppm) en M9



Realizado por: Lorena Rodríguez



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo Q: Resistencia a Cr (100 ppm) en M9 **Anexo R:** Resistencia a Pb (500 ppm) en M9



Realizado por: Lorena Rodríguez



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo S: Prueba de oxidasa



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo T: Prueba de catalasa



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo U: Prueba de manitol Urea



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo V: Prueba de SIM, Citrato, Fermentación,



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo W: Pruebas bioquímicas clones



Realizado por: Lorena Rodríguez

Anexo X: Pigmentación de algas



Realizado por: Lorena Rodríguez

