



## RESISTENCIA IN VITRO AL PLOMO Y MERCURIO POR LA COMUNIDAD BACTERIANA DE LAS AGUAS DEL RÍO RAMIS – PUNO, PERÚ

### IN VITRO RESISTANCE TO LEAD AND MERCURY FOR THE BACTERIAL COMMUNITY IN THE WATERS OF THE RIVER RAMIS – PUNO, PERU

Eric Dandy Quispe Machaca<sup>1,\*</sup> Víctor Benito Guevara Guerra Juan Jose Pauro Roque

<sup>1</sup>Universidad Nacional del Altiplano, Escuela Profesional de Biología, Av. Floral N° 1153, Ciudad Universitaria, Puno, Perú, [eric.dandy.7@gmail.com](mailto:eric.dandy.7@gmail.com)

#### RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la resistencia *in vitro* al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis - Puno, Perú. Se realizó tres muestreos de agua, y se aisló las bacterias en medio Agar Müeller Hinton para realizar el recuento bacteriano; la identificación bacteriana, se realizó mediante sus características culturales, tinción Gram, prueba de la catalasa, cultivo en medios selectivos y diferenciales, y pruebas bioquímicas para enterobacterias: TSI, LIA, Citrato de Simmons, Urea y SIM; la resistencia se evaluó en medio de cultivo con Pb y Hg a diferentes concentraciones de: 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml, la cantidad de inoculación se hizo a través de la escala de McFarland estándar de turbidez 0,5. Los recuentos bacterianos de las muestras de agua fue de  $1,09 \times 10^3$  UFC/ml en el borde del afluente, de  $1,58 \times 10^3$  UFC/ml a 10 cm de profundidad del agua que discurre a dos metros del borde, y de  $2,55 \times 10^5$  UFC/ml a 40 cm de profundidad del agua de esta última zona ( $p < 0,0001$ ); se identificó seis géneros bacterianos: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*. Estas bacterias presentaron resistencia al Pb y Hg en todas las concentraciones, pero los recuentos bacterianos fueron variables en los tratamientos, siendo estadísticamente diferentes entre todos los factores ( $p < 0,0001$ ).

**Palabras clave:** Comunidad bacteriana, in vitro, mercurio, plomo, resistencia.

#### ABSTRACT

The objective of the research was to determine the in vitro resistance to lead and mercury for the bacterial community in the waters of the River Ramis - Puno, Peru. Three water samples were taken, and the bacteria were isolated in Müller Hinton Agar medium to perform the bacterial count; Bacterial identification, was performed through its cultural characteristics, Gram stain, catalase test, culture in selective and differential media, and biochemical tests for enterobacteria: TSI, LIA, Simmons citrate, Urea and SIM; The resistance was evaluated in culture medium with Pb and Hg at different concentrations of 200, 500, 1000 and 2000 µg/ml, the amount of inoculation was done through the standard McFarland 0.5 turbidity scale. The bacterial counts of the water samples were  $1.09 \times 10^3$  CFU/ml at the edge of the tributary,  $1.58 \times 10^3$  CFU/ml at 10 cm depth of water running two meters from the edge, and  $2.55 \times 10^5$  CFU/ml at 40 cm depth of water in the latter zone ( $p < 0.0001$ ); Six bacterial genders were identified: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* and *Enterobacter*. These bacteria showed resistance to Pb and Hg at all concentrations, but bacterial counts were variable in treatments, being statistically different among all factors ( $p < 0.0001$ ).

**Key words:** Bacterial community, in vitro, lead, mercury, resistance

\*Autor para Correspondencia: [eric.dandy.7@gmail.com](mailto:eric.dandy.7@gmail.com)





## INTRODUCCIÓN

La contaminación del ambiente con metales tóxicos y radionúcleos aparece como consecuencia de actividades humanas industriales, fuentes como la agricultura y la eliminación de residuos; las cuales son liberados a la atmósfera y a los ambientes acuáticos y terrestres (Ara *et al.*, 2007), las actividades humanas originan vertidos de diferentes tipos, que en los sedimentos fluviales aumentan la concentración de metales pesados (Rosas, 2005), las consecuencias han conllevado a la degradación de los recursos hídricos, a la disminución de la calidad de las aguas disponibles para el suministro de la población, así como para el uso agrícola e industrial (Martínez *et al.*, 2010). En el Perú son varios los afluentes que presentan contaminación por metales pesados y en Tacna todos los afluentes presentan este problema, de ahí surge la necesidad de generar mecanismos que permitan su descontaminación (Ara *et al.*, 2007).

El plomo produce riqueza económica tanto en la actividad minera como industrial (Lacasaña *et al.*, 1996), siendo el 11,4% de la producción mundial de plomo que contribuye América Latina y el Caribe, teniendo en cuenta que Perú y México son los productores más importantes (Mielke y Reagan, 1998); en ecosistemas acuáticos contaminados el plomo presente tiende a sedimentar y acumularse en el fondo en forma de sulfuro, carbonato y fosfato, esto casi en su totalidad; pero en ocasiones una parte menor del elemento persiste disuelta en el agua (Sánchez, 2011). La producción de mercurio no sólo incluye su extracción de betas minerales (producción primaria), sino también de la denominada producción secundaria que viene a ser dada por el reciclaje, la recuperación y la reutilización del mercurio en procesos industriales (Gaona, 2004); otra de las aplicaciones más importantes actualmente es su empleo en la extracción de oro y plata, debido a la capacidad que posee el mercurio de amalgamar estos metales y la facilidad que este presenta para separarse posteriormente por calentamiento. Esta aplicación unido con la de la industria cloro-alcalina son las que más problemas han causado al medio ambiente (Sánchez, 2011); pese a la gran variedad de aplicaciones, las principales fuentes de liberación del mercurio elemental hacia el medio ambiente son los procesos naturales de volatilización, principalmente a partir de depósitos minerales y volcanes, el cual posteriormente se introduce al agua y al suelo (Moreno, 2003); la presencia del mercurio en el aire es eventual, ya que se asienta en el suelo de donde puede fluir al agua, y una vez depositado aquí, quienes pueden transformarlo a mercurio metílico son los microorganismos (Toro, 2013).

La presencia de mercurio en los cuerpos de agua en la cuenca del río Ramis, se debe específicamente a la actividad minera desarrollada en la zona, ya que no existe indicios de presencia natural de minerales que contengan este elemento caso del cinabrio (HgS) en la zona. El Hg por su peso específico y atracción por el oro, es utilizado como insumo principal para la recuperación de oro mediante el proceso de amalgamación (Comisión Multisectorial para la Prevención y Recuperación Ambiental del Lago Titicaca y sus Afluentes, 2014).

Diversos estudios se han realizado sobre resistencia a metales pesados. En un estudio con el objetivo de determinar la población bacteriana autóctona del río Maure - Tacna, que tolera o que utiliza el arsénico (As), lograron aislar 18 morfotipos coloniales con una sola morfología celular: bacilos grampositivos tolerantes a diferentes concentraciones de As bajo la forma de arsenito de sodio a 100, 120, 200, 400 y 600 mg/ml. Cuatro de los morfotipos crecieron quimioautotróficamente en medio M9 + NaAsO<sub>2</sub> (600µg/ml) a diferentes velocidades (MA<sub>3</sub>, MA<sub>6</sub>, MA<sub>9</sub> y MA<sub>10</sub>), lo cual significa que se trataría de diferentes especies (Ara *et al.* 2007). En otro





estudio con el objetivo de estudiar la resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Demostraron que de la totalidad de bacterias gramnegativas no fermentadoras, principalmente del género: *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, hallaron niveles variables de resistencia a los metales pesados (Moraga *et al.* 2003), en otro similar estudio con el objetivo de determinar la resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. Los 23 aislamientos fueron clasificados en los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*; resultando el género *Bacillus* el más frecuente. El 96% de las cepas resultaron ser multiresistentes a los compuestos químicos, al mostrar resistencia a cuatro o más antibióticos y a los tres metales (Martínez *et al.* 2010).

Las bacterias que se encuentran más frecuentemente en el agua son las bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de la materia fecal (Craun *et al.*, 1997), estas bacterias no suelen sobrevivir en el medio acuático ya que están sometidas a un estrés fisiológico, su velocidad de mortalidad depende de la temperatura del agua, los efectos de la luz solar, las poblaciones de otras bacterias presentes, y la composición química del agua (Fernández *et al.*, 2001); además el contenido bacteriano es muy variable y depende del tipo de agua (Marín, 2003).

Los microorganismos están expuestos a diversos tipos de metales y metaloides en el ambiente, por lo que es de esperarse diversos mecanismos de interacción específicos de acuerdo al tipo de especie de microorganismo y de metal; la interacción es compleja y variada; ésta depende de factores como las características de los metales, del metabolismo microbiano y de la estructura de la pared celular (Bautista, 2008); dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales los cuales son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes (Vullo, 2003). Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005), actualmente existe una gran cantidad de información sobre genes que codifican transportadores de metales pesados que están caracterizados a niveles bioquímico y estructural, esto gracias a la disponibilidad de las secuencias de genomas completos (Cervantes *et al.*, 2006).

La resistencia a metales pesados es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustrato diferentes, pero que comparten las mismas funciones (Brown *et al.*, 2006); otros están muy especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas, confiriéndoles esta capacidad (Nies, 2003). Se ha observado que los plásmidos aislados de diferentes bacterias grampositivas y gramnegativas codifican la resistencia a los metales pesados, pero el mecanismo de resistencia varía para cada metal en concreto (Madigan *et al.*, 2009), es preciso mencionar que los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en elementos móviles como plásmidos o transposones o en ambos (Marrero *et al.*, 2010).

Por lo mencionado, los objetivos de la investigación fueron: cuantificar mediante las unidades formadoras de colonias (UFC) e identificar cualitativamente la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, y determinar la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, resistentes *in vitro* al plomo y al mercurio, a concentraciones de: 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml.





## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue realizada en el río Ramis, distrito de San Antón, provincia de Azángaro, región de Puno. En las coordenadas UTM 19L 0359635 8386935, a una altura de 3967 msnm, donde se recolectaron tres muestras de agua en contracorriente provenientes del río Ramis; una del borde del afluente, otra a 10 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde del río y otra a 40 cm de profundidad de esta última zona; las cuales se procesaron en el Laboratorio de Microbiología, de la Universidad Nacional del Altiplano.

**Aislamiento y cuantificación bacteriana** Para aislar la comunidad bacteriana a partir de las muestras de agua, se aplicó la metodología propuesta por Camacho *et al.*, (2009), primero se inoculó por triplicado 1 ml de la dilución correspondiente en cada placa Petri con una pipeta estéril. Luego, se agregó de 15 a 20 ml del medio preparado con agar Müeller Hinton (elevándose el pH del medio a 8 con hidróxido de sodio midiéndolas a través de tiras reactivas de pH). Finalmente, se dejó solidificar y se incubó las placas en posición invertida durante 4 días a temperatura de 25°C. Para la cuantificación bacteriana, se aplicó la metodología propuesta según Ara *et al.*, (2007), primero se realizó el método de vertido en placa, usando como medio Agar Müeller Hinton. Cada muestra se trabajó por triplicado, y la incubación fue a 25°C por 4 días. Trascurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento en las diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Se realizó de manera similar a la metodología propuesta por Moraga *et al.*, (2003), donde se seleccionó las colonias al azar y se cultivó mediante la técnica de estría cruzada en placas contenidas de agar Müeller Hinton. Después de ser incubados por 4 días a temperatura de 25°C, las colonias se identificaron mediante tinción Gram, prueba de la catalasa, cultivo en medios específicos y diferenciales, y pruebas bioquímicas: TSI, LIA, Citrato de Simmons, Urea, SIM (se identificó mediante la tabla de reacciones bioquímicas de enterobacterias del INS).

Se realizó el análisis de varianza y prueba de medias Tukey (P 0.05) con el fin de comparar entre los recuentos bacterianos de las muestras de agua, todos los análisis estadísticos fueron realizados con un nivel de confianza del 95%. Los valores se procesaron en el Paquete Estadístico InfoStat-Versión libre 2016 para Windows.

*Determinación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, resistentes in vitro al plomo (Pb) y al mercurio (Hg), a concentraciones de: 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml.*

### *Preparación de las soluciones de metales pesados*

Se trabajó con Nitrato de plomo [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ] y con Cloruro de mercurio [ $\text{HgCl}_2$ ], primero se realizó el cálculo de las soluciones diluidas de plomo, a partir de una solución stock y de la misma manera se realizó para el mercurio. Sabiendo que el peso molecular del [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ], fue de 331.2 g/mol, se pesó 1.60 g de [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ], para luego aforarlo a 1000 ml de agua destilada, obteniéndose del tal modo, una solución de 1 g/l de plomo. Posteriormente, se obtuvieron las siguientes soluciones de 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml de concentración de Pb; a través de la ecuación:  $C_1V_1 = C_2V_2$ .

### *Experimentación de la resistencia bacteriana al plomo y al mercurio*

La determinación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis que es resistente *in vitro* al plomo y al mercurio, se realizaron tres tratamientos, dos para cada metal y uno para la combinación





de los dos metales (Pb, Hg, Pb y Hg). Cada tratamiento se hizo con cuatro concentraciones: 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml. Y cada bacteria aislada e identificada se sometió a las cuatro concentraciones mencionadas por separado. La cantidad de inoculación de bacterias por placa y para cada microorganismo, se hizo ajustando y comparando a la escala de McFarland estándar de turbidez 0.5, que posee una densidad celular aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml.

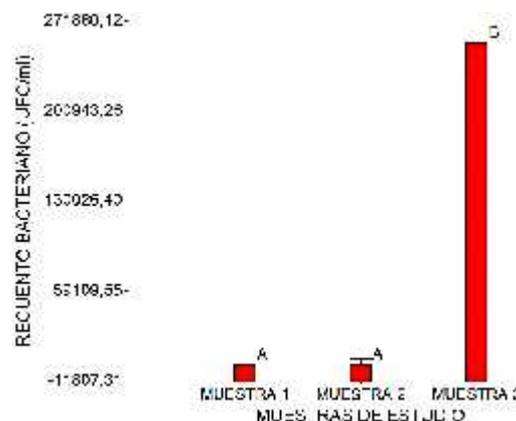
### Análisis estadístico

Se realizó el análisis con estructura factorial de tratamientos (3x4x6) y su interacción, prueba de medias Tukey (P 0.05) con el fin de comparar los recuentos bacterianos obtenidos entre bacterias, concentraciones, y metales. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con un nivel de confianza del 95%. Los valores se procesaron en el Paquete Estadístico InfoStat-Versión libre 2016 para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Cuantificación mediante las unidades formadoras de colonias (UFC) e identificación cualitativa de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis.*

El recuento bacteriano en las muestras de agua provenientes del río Ramis, oscilan entre los promedios con valores de  $1,09 \times 10^3$  UFC/ml en la muestra 1 (del borde del afluente),  $1,58 \times 10^3$  UFC/ml en la muestra 2 (a 10 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde), y  $2,55 \times 10^5$  UFC/ml en la muestra 3 (a 40 cm de profundidad de esta última zona). El recuento bacteriano superior encontrado en la muestra 3, se debe probablemente a que esta parte ya está en contacto directo con el sedimento; y debido a ello hay una mayor comunidad bacteriana que habita en esta parte del río, además de las mejores condiciones para que las bacterias puedan habitar en ella (Tabla1). De acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey realizado al recuento bacteriano obtenido a partir de las muestras de agua provenientes del río Ramis, las tres muestras que fueron evaluadas presentaron diferencia estadística significativa ( $F_c = 1157,27$ ;  $gl = 2$ ;  $p\text{-valor} = <0,0001$ ), donde en ella se observa que la muestra 3 correspondiente a 40 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde del río presentó el mayor promedio de recuento bacteriano, seguidas de las muestras 2 y 1 correspondiente a 10 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde del río y del borde del afluente respectivamente, que son prácticamente similares y en proporción son prácticamente iguales y menores (Figura1).



*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Figura 1.** Comparación del recuento bacteriano de las muestras de agua del río Ramis.





**Tabla 1.** Cuantificación bacteriana de las muestras de agua del río Ramis. (UFC/ml)

	Repetición	Repetición II	Repetición III	(UFC/ml)		
Muestra 1	1,23 x	1.11 x 10 <sup>3</sup>	0.92 x 10 <sup>3</sup>	1,09 x	0,16	14,
Muestra 2	1,67 x	1,61 x 10 <sup>3</sup>	1,46 x 10 <sup>3</sup>	1,58 x	0,11	6,8
Muestra 3	2,69 x	2,51 x 10 <sup>5</sup>	2,44 x 10 <sup>5</sup>	2,55 x	0,13	5,0
Promedio		Desviación estandar	coeficiente de variacion			

Se obtuvo un recuento bacteriano muy bajo en las aguas del río Ramis, comparado con lo reportado por Ara *et al.*, (2007), que encontró en seis muestreos recuentos bacterianos promedios muy elevados que fueron en el orden de  $9 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$  y  $4 \times 10^3$  UFC/ml provenientes de las aguas del río Maure de Tacna (Perú); por otro lado, Moraga *et al.* (2003), encontró en 8 muestreos recuentos bacterianos promedios que fueron en el orden de  $4,4 \times 10^4$ ,  $6,2 \times 10^4$ ,  $4,0 \times 10^4$ ,  $11,7 \times 10^4$ ,  $2,7 \times 10^4$ ,  $2,0 \times 10^4$ ,  $16,2 \times 10^4$  y  $0,6 \times 10^4$  UFC/ml provenientes de las aguas de la bahía de Iquique (Chile).

Las diferencias de recuentos bacterianos presentes en aguas de río probablemente se deba a la diversa flora bacteriana que habita en el agua, ya sea nativa o procedente de otros lugares debido a factores ambientales o a causa del ser humano. Esto se apoya con lo que afirma Marín, (2003) la flora bacteriana de cualquier agua la conforman dos grupos típicos: las bacterias autóctonas con hábitat en el agua y que sólo pueden desarrollarse óptimamente aquí, y las bacterias procedentes de otros biótupos, especialmente bacterias procedentes de la tierra; además, sobre las aguas superficiales cae constantemente una lluvia de bacterias procedentes del aire.

Se identificó seis géneros bacterianos, los cuales corresponden a *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*; comparado con lo reportado por Martínez *et al.*, (2010), donde obtuvieron 23 aislados a partir de muestras de agua provenientes del río Almendares (Cuba), los cuales se clasificaron en los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*; donde el género *Bacillus* resultó el más frecuente. Por otro lado, en una investigación similar reportado por Moraga *et al.*, (2003), aislaron dos géneros bacterianos distintos correspondientes a *Pseudomonas* y *Alcaligenes* a partir de muestras de agua provenientes de la bahía de Iquique (Chile).

Los diferentes géneros bacterianos obtenidos a partir de muestras provenientes de aguas probablemente se deban a la diversa comunidad bacteriana que habita en ella, o también debido a la posible contaminación de la misma a causa de las distintas actividades que realiza el hombre; así lo afirma Craun *et al.*, (1997), las bacterias que se encuentran más frecuentemente en el agua son las bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de la materia fecal, por otro lado, en contrariedad a lo mencionado Fernández *et al.*, (2001), menciona que las bacterias del tracto intestinal no suelen sobrevivir en el medio acuático, ya que están sometidas a un estrés fisiológico y pierden gradualmente la capacidad de producir colonias en medios diferenciales y selectivos; su velocidad de mortalidad depende de la temperatura del agua, los efectos de la luz solar, las poblaciones de otras bacterias presentes, y la composición química del agua. La gran diversidad bacteriana que habita en el agua probablemente también se vea reflejada debido a los diferentes ecosistemas acuáticos, ya sean ríos, lagos u océanos, así lo afirma Marín (2003), el contenido bacteriano es muy variable dependiendo del tipo



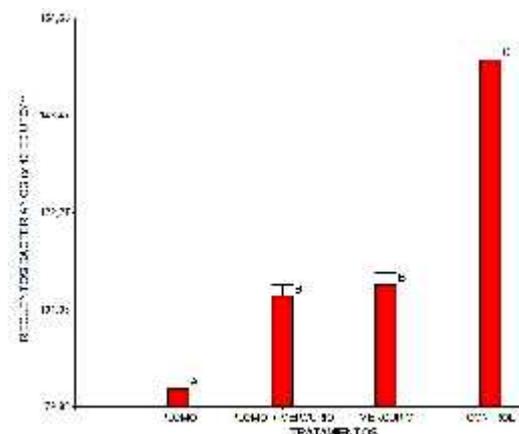


de agua, concentración de sales inorgánicas y sustancias orgánicas, enturbiamiento, iluminación y temperatura.

*Determinación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, resistentes in vitro al plomo (Pb) y al mercurio (Hg), a concentraciones de: 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml.*

En los tratamientos realizados con Pb, Hg, y en combinación de Pb y Hg, transcurrido los 4 días de la inoculación en los medios de cultivo consistente en agar Müeller Hinton con metales, se obtuvo crecimiento en todas las placas. La comunidad bacteriana aislada a partir de las aguas del río Ramis, fue resistente al plomo y al mercurio a concentraciones de 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml en el cual se obtuvo recuentos bacterianos promedios que oscilan entre 65-150 x 10<sup>6</sup> UFC/ml en *Serratia*, 60-145 x 10<sup>6</sup> UFC/ml en *Klebsiella*, 62-163 x 10<sup>6</sup> UFC/ml en *Staphylococcus*, 58-161 x 10<sup>6</sup> UFC/ml en *Escherichia*, 63-128 x 10<sup>6</sup> UFC/ml en *Streptococcus*, y 33-116 x 10<sup>6</sup> UFC/ml en *Enterobacter*.

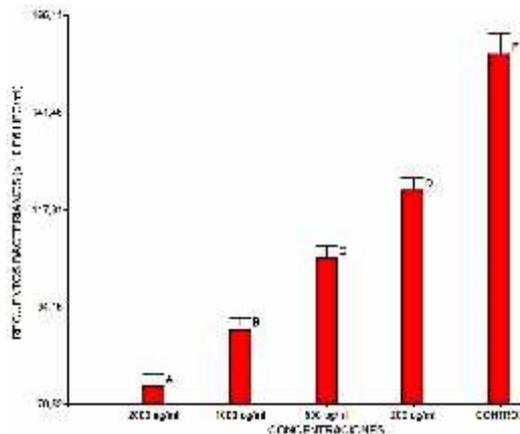
El análisis con estructura factorial de tratamientos de 3x4x6 y la prueba de Tukey a los recuentos bacterianos, demostró que en el tratamiento con Hg y el tratamiento en combinación de Pb y Hg presentan promedios casi similares, demostrando que estos tratamientos no presentan diferencia estadística significativa; pero estos tratamientos si presentan diferencia estadística significativa respecto al tratamiento con Pb, donde los resultados de sus promedios son menores y los recuentos bacterianos son muy bajos. Los tratamientos mencionados anteriormente a comparación con el tratamiento control donde los resultados de sus promedios son mayores, demuestran que si existe diferencia estadística significativa (Fc = 54,53; gl=3; p-valor = <0,0001) (Figura 2).



**Figura 2.** Comparación de los recuentos bacterianos en los tratamientos realizados.

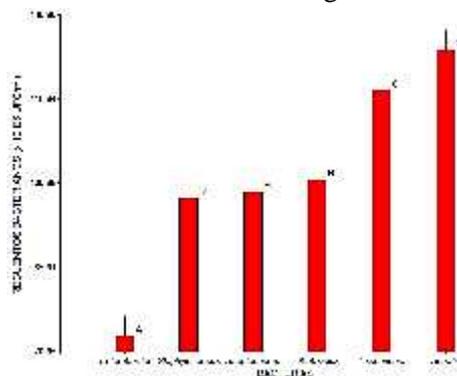
De acuerdo al análisis realizado, los recuentos bacterianos demuestran que las cuatro concentraciones de plomo y mercurio, siendo de 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml presentan diferencia estadística significativa entre ellas; el recuento bacteriano en la última concentración de 2000 µg/ml resultó ser el más menor respecto a las demás concentraciones. En el control, donde la concentración de estos metales es cero (medio de cultivo sin ningún metal) el recuento bacteriano resultó ser el más mayor y presenta diferencia estadística significativa respecto a las concentraciones con metales (Fc = 49,19; gl=2; p-valor = <0,0001) (Figura 3).





**Figura 3.** Comparación de los recuentos bacterianos en las concentraciones realizadas.

Los recuentos bacterianos respecto a las bacterias demuestran que entre los géneros *Serratia* y *Escherichia* no presentan diferencia estadística significativa; entre los géneros *Klebsiella*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* tampoco presentan diferencia estadística significativa, pero estos dos grupos de bacterias mencionados si presentan diferencia estadística significativa entre sí. El género *Enterobacter* es el único que presenta diferencia estadística significativa respecto a los dos grupos de bacterias mencionados anteriormente donde están incluidos los géneros restantes ( $F_c = 25,86$ ;  $gl=5$ ;  $p\text{-valor} = <0,0001$ ), los recuentos bacterianos con promedios más elevados los poseen *Serratia* y *Escherichia*, seguida de *Klebsiella*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, y siendo la menos elevada el género *Enterobacter* (Figura 4). La interacción realizada en el análisis con estructura factorial de tratamientos demostró que entre los factores: metales, concentración, y bacterias, existe diferencia estadística significativa entre todos los factores ( $F_c = 82,33$ ;  $gl = 77$ ;  $p\text{-valor} = <0,0001$ ). La comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis en su totalidad es resistente al Pb y al Hg en concentraciones de una mínima de 200 µg/ml y una concentración máxima de 2000 µg/ml, las bacterias que fueron inoculadas para los tratamientos con diferentes metales y concentraciones fueron ampliamente resistentes comparado con las bacterias inoculadas en una investigación similar reportada por Ara *et al.* (2007), donde aislaron dieciocho morfotipos que desarrollaron en placas con As, el 100% fueron bacilos grampositivos con crecimiento en medio Müeller Hinton con As bajo la forma de arsenito de sodio en concentraciones menores o iguales a 200 µg/ml, pero que a concentraciones mayores su comportamiento fue diferente; el 50% desarrollaron en la concentración más alta de 600 µg/ml y solo un 22% crecieron en medio M9 sólido suplementado con As como única fuente de energía.



**Figura 4.** Comparación de los recuentos bacterianos en los géneros bacterianos.





Por otro lado, en una investigación reportada por Moraga *et al.* (2003), sobre resistencia a metales pesados donde trabajaron con bacterias aisladas de la bahía Iquique (Chile), de las cepas que fueron estudiadas el 100% fue resistente al Pb y As, el 77,7% al Cu y el 36,4% al Ni; en otra investigación reportada por Martínez *et al.* (2010), sobre resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares (Cuba), indican que la resistencia microbiana al Pb, Cr y Cd de las cepas que fueron estudiadas, en su totalidad presentaron resistencia a estos metales. Las que presentan mayor resistencia al Pb y Hg son *Serratia* y *Escherichia*, seguida de *Klebsiella*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, la de menor resistencia y probablemente la más sensible a los metales pesados es *Enterobacter*; por otro lado, según Martínez *et al.*, (2010), en su investigación indica que el género *Micrococcus* tuvo un comportamiento diferente frente al Cd donde le correspondió el máximo de resistencia frente a este metal, seguido de los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Neisseria*; por su parte, según Moraga *et al.*, (2003), en su investigación indica que solo bacterias no fermentadoras, pertenecientes al género *Pseudomonas*, principalmente *P. maltophilia*, y algunas correspondientes al género *Alcaligenes*, crecieron en un medio suplementado con Cu. La comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis no fue muy abundante al obtenerse recuentos por debajo en comparación con otras investigaciones realizadas en otros lugares. No obstante, esta comunidad bacteriana en su totalidad son capaces de tolerar concentraciones de Pb y Hg de hasta 2000 µg/ml, esto se debería probablemente al proceso de especiación y disolución por el largo período de tiempo que las aguas de este río han contenido a estos metales provenientes de fuentes mineras; así lo afirma Moreno (2003), las principales fuentes de liberación de mercurio elemental al medio ambiente son los procesos naturales de volatilización a partir de depósitos minerales y volcanes principalmente, se calcula que estos procesos liberan mercurio a la atmósfera, el cual pasa al agua y al suelo posteriormente; por otro lado, según Rosas (2005), menciona también que las actividades humanas producen diferentes tipos de vertidos que conllevan a incrementar la concentración de metales pesados en los sedimentos fluviales. La resistencia al Pb y Hg, de acuerdo a los resultados obtenidos, donde los géneros bacterianos resistentes a estos metales pesados en su mayoría 75% son bacterias gramnegativas clasificadas en su totalidad como enterobacterias, y solo un 25% son bacterias grampositivas; probablemente esto se deba a que en estas aguas, exista en mayor proporción bacterias provenientes del tracto intestinal del hombre como enterobacterias, y en menor proporción otras; esto es respaldado por Moraga *et al.* (2003), donde afirma que la presencia de bacterias entéricas en el agua se debe al efecto de la descarga de aguas servidas, lo que posibilita la ocurrencia de un intercambio génico entre éstas y la comunidad bacteriana autóctona, mediante la transferencia horizontal de determinantes de resistencia, como por ejemplo los plásmidos. En relación a la resistencia específicamente al Hg, diversos estudios demuestran que algunas bacterias son capaces de transformar el mercurio en otras formas menos tóxicas, y es probable que dicho proceso también la realicen las bacterias aisladas del río Ramis; tal como lo afirma Madigan *et al.* (2009), donde menciona que a concentraciones suficientemente altas, el Hg<sup>2+</sup> y el CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> son tóxicos no sólo para los organismos superiores, sino también para los microorganismos; a pesar de esto, algunas bacterias pueden llevar a cabo la biotransformación del mercurio tóxico en formas no tóxicas. En las bacterias gramnegativas resistentes al Hg, la enzima mercúrico-reductasa ligada a NADPH reduce el Hg<sup>2+</sup> a Hg<sup>0</sup>, que es volátil pero no resulta tóxico para los humanos ni los microorganismos.

Todas las bacterias que fueron sometidas a los tratamientos en la investigación presentaron resistencia a los dos metales pesados, esto se demuestra claramente en los recuentos bacterianos obtenidos, dicha resistencia probablemente se deba a la interacción del microorganismo con





el metal; tal como lo afirma Bautista (2008), donde menciona que los microorganismos están expuestos a diversos tipos de metales y metaloides en el ambiente, por lo que es de esperarse diversos mecanismos de interacción específicos de acuerdo al tipo de especie de microorganismo y de metal. A veces estos mecanismos pueden ser en beneficio y otros en perjuicio del organismo, ya que la naturaleza de la interacción del microorganismo con el metal es compleja y variada; la cual depende de factores como las características de los metales, del metabolismo microbiano y de la estructura de la pared celular.

Por otro lado, la resistencia que presentan estas bacterias, es probable que se deba también a los diversos mecanismos genéticos que posee la bacteria; tal como lo afirma Vullo (2003), donde menciona que dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes que se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal, y microorganismos tolerantes a los metales que son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes; por su parte Marrero *et al.* (2010), indica que los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en elementos móviles como plásmidos o transposones. Por último, también es probable que dicha resistencia al Pb y Hg, pueda deberse al metabolismo propio que tienen las bacterias o que posiblemente hayan desarrollado dentro de su hábitat; tal como lo afirma Silver y Phung (2005), donde indica que los sistemas desarrollados por las bacterias para que toleren los efectos nocivos de los metales tóxicos son diversos; por su parte Cervantes *et al.* (2006), menciona que estos sistemas, se encuentran involucrados a los componentes celulares que capturan los iones neutralizando su toxicidad, enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides que los convierte en formas menos tóxicas, y transportadores ubicados en la membrana que expulsan las especies nocivas desde el citoplasma celular; por otro lado, según Brown *et al.*, (2006), menciona que la resistencia a metales pesados es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustrato diferentes, pero que comparten las mismas funciones.

## CONCLUSIONES

La cuantificación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, fue de  $1,09 \times 10^3$  UFC/ml en el borde del afluente, de  $1,58 \times 10^3$  UFC/ml a 10 cm de profundidad del agua que discurre a dos metros del borde, y de  $2,55 \times 10^5$  UFC/ml a 40 cm de profundidad del agua que discurre a dos metros del borde, identificándose seis géneros bacterianos: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*. La comunidad bacteriana aislada a partir de las aguas del río Ramis, fue resistente al plomo y al mercurio a concentraciones de 200, 500, 1000 y 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

## LITERATURA CITADA

- Ara, S., Choque, A. y Avendaño, E. (2007). Resistencia y degradación de arsénico por la comunidad bacteriana de las aguas del río Maure - Tacna, Perú. *Revista Ciencia y Desarrollo*. 1(1), 1-4.
- Bautista, D. (2008). Bioadsorción de Metales Pesados mediante el Uso de Biomasa Bacteriana Aislada de Jales Mineros. Tesis de Maestría en Desarrollo Sostenible. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Campus Estado de México. Atizapán de Zaragoza, México. 108.
- Brown, S., Thompson, M., VerBerkmoes, N., Chourey, K., Shah, M. y Zhou, J. (2006). Molecular Dynamics of the *Shewanella oneidensis* Response to Chromate Stress. *Mol Cell Prot.* 5, 1054-71.





- Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2a Edición. Facultad de Química, UNAM. México. 10.
- Cervantes, C., Espino, A., Acevedo, F., León, I., Rivera, M., Ávila, M., Wróbel, K., Wróbel, K., Gutiérrez, J., Rodríguez, J. y Moreno, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2), 203-210.
- Comisión Multisectorial para la Prevención y Recuperación Ambiental del Lago Titicaca y sus Afluentes. (2014). Estado de la Calidad Ambiental de la Cuenca del Lago Titicaca. Ámbito Peruano. (D.S. N° 075-2013-PCM). 162.
- Craun, G., Berger, P. y Calderón, R. (1997). Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *J. Am. Water Works Ass.* 89: 96-104.
- Fernández, M., Álvarez, A. y Espigares, M. (2001). Transmisión feco-hídrica y virus de la hepatitis A. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 1: 8-24.
- Gaona, X. (2004). El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente. Tesis Doctoral. Departamento de Química. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 246.
- Lacasaña, M., Romieu, I. y MacConnell, R. (1996). Grupo de trabajo sobre el plomo de la OPS. El problema de exposición al plomo en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud. Metepec, México. 1-33.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. y Clark, D. (2009). Brock. Biología de los Microorganismos. 12a Edición. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 1263.
- Marín, R. (2003). Físicoquímica y Microbiología de los Medios Acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Ediciones Díaz de Santos, S. A. Madrid, España. 337.
- Marrero, J., Díaz, A. y Coto, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ciudad de La Habana, Cuba. 41(1), 67-78.
- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M., Salgado, I., Olivares, S., Lima, L. y Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Revista Centro Nacional de Investigaciones Científicas*. 41(1), 1-10.
- Mielke, H. y Reagan, P. (1998). Soil Is an Important Pathway of Human Lead Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 106(1), 217-229.
- Moraga, R., Merino, C. y Mondaca, M. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas*. 31(1), 91-95.
- Moreno, M. (2003). Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. McGraw Hill, Madrid, España.
- Nies, D. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 27, 313-39.
- Rosas, H. (2005). Contaminación de sedimentos del río Anioa por Metales Pesados (Barcelona - España). Investigación y Desarrollo. Universidad Privada Boliviana. 5: 75-89.
- Sánchez, A. (2011). Aplicación de materiales híbridos para la determinación electroquímica de metales pesados en aguas. Tesis Doctoral. Departamento de Química Inorgánica y Analítica. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid, España. 193.
- Silver, S. y Phung, L. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 587-605.
- Toro, P. (2013). Determinación de los metales pesados Cobalto, Mercurio y Plomo en la represa Daule Peripa por medio de Espectrómetro de emisión atómica con fuente de Plasma de argón con Acoplamiento Inductivo. Tesis de Pregrado. Facultad de Ingeniería Química. Universidad de Guayaquil. Ecuador. 93.
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. 3(2), 93-104.

