

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



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

TESIS

PRESENTADO POR:

Br. ERIC DANDY QUISPE MACHACA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



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

TESIS

PRESENTADO POR:

Br. ERIC DANDY QUISPE MACHACA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 09 DE JUNIO DEL 2017
APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE : 
Dr. NICANOR MIGUEL BRAVO CHOQUE

PRIMER MIEMBRO : 
Dr. HEBER NEHEMIAS CHUI BETANCUR

SEGUNDO MIEMBRO : 
Mg. MARÍA ISABEL VALLENAS GAONA

DIRECTOR /ASESOR : 
Dr. JUAN JOSÉ PAURO ROQUE

ÁREA : Microbiología y Laboratorio Clínico
LINEA : Biotecnología
TEMA : Biotecnología Ambiental

DEDICATORIA

A Nuestro Señor Dios.

Por haberme dado la vida, salud, sabiduría y fortaleza en los momentos de debilidad; para seguir siempre adelante con el fin de lograr mis objetivos y metas trazadas.

A mi querida madre

Elizabeth Machaca Nina.

Pilar fundamental en mi vida, por confiar siempre en mí y nunca dudar en apoyarme para que no desista de mis estudios. Con mucho amor y cariño, le dedico todo mi esfuerzo en reconocimiento a todo el sacrificio que hizo para que pueda estudiar, se merece esto y mucho más, es por ella que soy lo que soy ahora. Mi eterna gratitud.

A mis queridos abuelos

Sr. Luis Machaca y Sra. Irene Nina.

Por quererme y apoyarme siempre como mis segundos padres, por demostrarme esa fuerza invaluable y luchadora de nunca rendirse ante nada, siempre serán los mejores abuelos del mundo que Dios me permitió conocerlos.

De manera muy especial a

Lehidý Nilda Barrios Chino.

Compañera inseparable en cada día de mi vida, por su apoyo incondicional, paciencia, comprensión y amor; siendo el complemento perfecto en mi vida encaminada al éxito.

A mis familiares.

Por todo el apoyo incondicional que recibí de parte de ellos, en los momentos importantes de mi vida.

Eric Dandy Quispe Machaca

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Nacional del Altiplano, y los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus enseñanzas compartidas durante mi formación profesional.

De manera muy especial, a mi querida madre que me brindó su apoyo en todo momento para la culminación exitosa de mis estudios superiores.

Al Dr. Juan José Pauro Roque, por su dirección, asesoría, amistad y apoyo incondicional durante el desarrollo de la presente Tesis.

Al jurado conformado por los docentes, Dr. Nicanor Miguel Bravo Choque, Dr. Heber Nehemías Chui Betancur y Mg. María Isabel Vallenas Gaona, por sus sugerencias y revisión del Informe Final de Tesis.

Al Lic. Lorgio Palacios Frisancho, por sus valiosas sugerencias y recomendaciones para unos mejores resultados de este trabajo de investigación.

Al Blgo. Fredy Álvarez Quenallata, por su amistad y apoyo incondicional en facilitarme materiales y equipos para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Blgo. Hilver Charca Mamani, por su apoyo incondicional en facilitarme materiales y equipos para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis amigos y amigas de la Universidad, de manera especial a Javier, Cliver, Merleny, Merynia, Margaret, Anais, Gardy, y Maritza; por haber hecho de mi vida de universitario un trayecto de vivencias, anécdotas y experiencias que nunca las olvidare.

Y para terminar agradecer a toda mi familia, por su apoyo inestimable.

Mis más sinceros agradecimientos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1. ANTECEDENTES	15
2.2. MARCO TEÓRICO	19
2.2.1. Metales pesados.....	19
2.2.1.1. Metales pesados presentes en aguas y sedimentos.....	21
2.2.2. El Plomo	24
2.2.2.1. Origen de la contaminación por Plomo	25
2.2.2.2. El Plomo en disolución.....	26
2.2.2.3. Toxicidad del Plomo.....	27
2.2.3. El Mercurio.....	30
2.2.3.1. Origen de la contaminación por Mercurio.....	31
2.2.3.2. El Mercurio en disolución	33
2.2.3.3. Toxicidad del Mercurio	35
2.2.4. Resistencia e interacciones bacterianas a metales pesados	38
2.2.5. Microorganismos del medio acuático.....	40
2.2.4.1. Características generales de las bacterias	41
2.2.6. Bacterias presentes en el medio acuático	41
2.2.5.1. Género: <i>Staphylococcus</i>	42
2.2.5.2. Género: <i>Streptococcus</i>	44
2.2.5.3. Género: <i>Serratia</i>	46
2.2.5.4. Género: <i>Klebsiella</i>	46
2.2.5.5. Género: <i>Enterobacter</i>	47
2.2.5.6. Género: <i>Escherichia</i>	48
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49

3.1.	ÁMBITO DE ESTUDIO	49
3.2.	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	50
3.3.	POBLACIÓN Y MUESTRA	50
3.4.	METODOLOGÍA.....	50
3.4.1.	Cuantificación mediante las unidades formadoras de colonias (UFC) e identificación cualitativa de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis.	50
3.4.1.1.	Aislamiento y cuantificación bacteriana.....	50
3.4.1.2.	Aislamiento a cultivo puro e identificación bacteriana	52
3.4.1.3.	Análisis estadístico	59
3.4.2.	Determinación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, resistentes <i>in vitro</i> al plomo (Pb) y al mercurio (Hg), a concentraciones de: 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml.	61
3.4.2.1.	Preparación de las soluciones de metales pesados	61
3.4.2.2.	Experimentación de la resistencia bacteriana al plomo y al mercurio ...	62
3.4.2.3.	Análisis estadístico	63
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
4.1.	Cuantificación mediante las unidades formadoras de colonias (UFC) e identificación cualitativa de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis.....	65
4.1.1.	Cuantificación bacteriana	65
4.1.2.	Identificación bacteriana.....	67
4.2.	Determinación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, resistentes <i>in vitro</i> al plomo (Pb) y al mercurio (Hg), a concentraciones de: 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml.	72
V.	CONCLUSIONES.....	84
VI.	RECOMENDACIONES	85
VII.	REFERENCIAS	86
	ANEXOS.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Calidad de agua superficial en la Cuenca Ramis, mercurio (Hg) mg/l.....	23
Figura 2. Calidad de agua superficial en la Cuenca Ramis, plomo (Pb) mg/l.....	23
Figura 3. Especiación del plomo en disolución en función del pH.	27
Figura 4. Ciclo biogeoquímico del mercurio.....	33
Figura 5. Mecanismo de reducción del Hg ²⁺ a Hg ⁰ en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (a) El operón <i>mer</i> . MerR actúan como represor (en ausencia de Hg ²⁺) o como activador de la transcripción (en presencia de Hg ²⁺). (b) Transporte y reducción del Hg ²⁺ . El Hg ²⁺ se une a los restos de cisteína tanto en MerR como en MerT.	40
Figura 6. Zona de recolección de muestras de agua del Río Ramis, durante los meses de diciembre del 2016 a enero del 2017.....	49
Figura 7. Procedimiento del recuento en placa por el método de vertido en placa	52
Figura 8. Aislamiento de bacterias por estría cruzada en placa.	54
Figura 9. Estandarización y comparación del inóculo, en el Laboratorio de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.....	63
Figura 10. Comparación del recuento bacteriano de las muestras de agua del río Ramis, durante el mes de abril, 2017.	66
Figura 11. Aislamiento de cultivos puros: <i>Serratia</i> (a), <i>Klebsiella</i> (b), <i>Staphylococcus</i> (c), <i>Escherichia</i> (d), <i>Streptococcus</i> (e), y <i>Enterobacter</i> (f); Laboratorio de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.	71
Figura 12. Desarrollo de las bacterias resistentes al plomo y al mercurio, en el Laboratorio de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.....	77
Figura 13. Tratamiento con plomo y mercurio, a diferentes concentraciones y con diferentes géneros bacterianos, en el Laboratorio de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.	77
Figura 14. Comparación de los recuentos bacterianos en los tratamientos realizados, durante el mes de abril, 2017.....	78
Figura 15. Comparación de los recuentos bacterianos en las concentraciones realizadas, durante el mes de abril, 2017.	79
Figura 16. Comparación de los recuentos bacterianos en los géneros bacterianos inoculados, durante el mes de abril, 2017.....	80
Figura 17. Medición geográfica del lugar de la toma de muestra en el río Ramis, durante los meses de diciembre a enero, 2017.	96
Figura 18. Medición de pH y Temperatura de las aguas del río Ramis, durante los meses de diciembre a enero, 2017.	96
Figura 19. Toma de muestra de agua proveniente del río Ramis, durante los meses de diciembre a enero, 2017.	96
Figura 20. Diluciones de las muestras de aguas para la cuantificación bacteriana del Ramis, Lab. de Microbiología, durante el mes de enero, 2017.	96
Figura 21. Medición y elevación del pH a 8 del medio de cultivo preparado con Agar Müeller Hinton, Lab. de Microbiología, durante los meses de enero a febrero, 2017.	96

Figura 22. Incubación de los cultivos a 25°C por 4 días, Lab. de Microbiología, durante los meses de enero a febrero, 2017.	96
Figura 23. Cuantificación bacteriana de las aguas del río Ramis, Lab. de Microbiología, durante el mes de enero, 2017.	97
Figura 24. Recuento de los cultivos bacterianos realizados a través de las diluciones, Lab. de Microbiología, durante el mes de enero, 2017.	97
Figura 25. Colonias bacterianas seleccionadas para la identificación de bacterias, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.	97
Figura 26. Observación microscópica de la tinción Gram realizada, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.	97
Figura 27. Observación de la prueba de la catalasa realizada a las bacterias grampositivas (B3: <i>Staphylococcus</i> , B5: <i>Streptococcus</i>); Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.	97
Figura 28. Cultivo de las bacterias en pruebas bioquímicas, medios selectivos y diferenciales, para la identificación de las bacterias; Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.	97
Figura 29. Incubación de los cultivos bacterianos en pruebas bioquímicas, medios selectivos y diferenciales, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.	98
Figura 30. Reacción de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias gramnegativas, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017. ..	98
Figura 31. Crecimiento del género <i>Staphylococcus</i> en Agar Base Salado Manitol, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.	98
Figura 32. Crecimiento del género <i>Escherichia</i> en Agar M-Endo LES, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.	98
Figura 33. Medio Agar Müeller Hinton con diferentes concentraciones de Pb y Hg, Lab. de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.	98
Figura 34. Sembrado por la técnica de vertido en placa, Lab. de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.	98
Figura 35. Recuento bacteriano de los cultivos realizados en contador de colonias, Lab. de Microbiología, durante el mes de marzo a abril, 2017.	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacciones Bioquímicas de las Enterobacterias.....	58
Tabla 2. Cuantificación bacteriana de las muestras de agua del río Ramis.....	65
Tabla 3. Identificación del género bacteriano, Lab. de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.....	70
Tabla 4. Cuantificación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis resistentes al plomo, en el Laboratorio de Microbiología, durante los meses de marzo a abril, 2017.	74
Tabla 5. Cuantificación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis resistentes al mercurio, en el Laboratorio de Microbiología, durante los meses de marzo a abril, 2017.	75
Tabla 6. Cuantificación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis resistentes al plomo y al mercurio, en el Laboratorio de Microbiología, durante los meses de marzo a abril, 2017.....	76
Tabla 7. Análisis de varianza y prueba de Tukey del recuento bacteriano de las muestras de agua, durante el mes de abril, 2017.	99
Tabla 8. Análisis con estructura factorial de tratamientos para los recuentos bacterianos resistentes al plomo y al mercurio, durante el mes de abril, 2017.....	100
Tabla 9. Prueba de interacción entre los factores metales, concentración, y bacterias; durante el mes de abril, 2017.	100

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

UFC	Unidades Formadoras de Colonia
ppm	Partes por millón
pH	Potencial de hidrógeno
°C	Grados centígrados
ml	Mililitro
l	Litro
µg	Microgramo
mm	Milímetro
cm	Centímetro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
Pb	Plomo
Hg	Mercurio
UNEP	Programa del Medio Ambiente de las Naciones Unidas
EPA	Agencia de Protección Ambiental Americana
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
INS	Instituto Nacional de Salud
TSI	Agar Lisina y Hierro
LIA	Agar Triple Azúcar y Hierro
CIT	Agar Citrato de Simmons
SIM	Medio Sulfuro de Hidrógeno Indol Movilidad

RESUMEN

La contaminación de los ecosistemas acuáticos en especial el río Ramis, por la presencia de metales pesados como plomo y mercurio, es un problema ambiental que se viene acrecentando cada vez más, evidencia de ello es la pérdida del ecosistema acuático y la biodiversidad, acompañado de la escasez de agua para la población; el vertimiento de estos compuestos tóxicos por diversas causas hacia las fuentes de agua, viene generando grandes problemas para la sociedad y la biodiversidad. La presente investigación se planteó como objetivo: cuantificar mediante las unidades formadoras de colonias 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 (Pb) y al mercurio (Hg), a concentraciones de: 200, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. Se realizó tres muestreos de agua, a partir de ellas se aislaron las bacterias en medio de cultivo Agar Müeller Hinton; posteriormente la identificación de la comunidad 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 el medio de cultivo con Pb y Hg a diferentes concentraciones, 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, las cuales son significativamente diferentes ($p < 0,0001$). Se identificaron seis géneros bacterianos: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*. Estas bacterias son resistentes al plomo y al mercurio en todas las concentraciones, y los recuentos bacterianos fueron distintos en los tratamientos, los cuales presentaron diferencia estadística significativa ($p < 0,0001$) entre todos los factores.

Palabras clave: Resistencia, *in vitro*, comunidad bacteriana, mercurio, plomo.

ABSTRACT

Pollution of aquatic ecosystems, especially the Ramis River, due to the presence of heavy metals such as lead and mercury, is an increasing environmental problem. Evidence of this is the loss of the aquatic ecosystem and biodiversity, accompanied by the Water scarcity for the population; The dumping of these toxic compounds due to various causes towards water sources has created major problems for society and biodiversity. The objective of the present investigation was to quantify by means of the colony forming units and qualitatively to identify the bacterial community of the Ramis river waters and to determine the bacterial community of the Ramis river waters, resistant *in vitro* to lead (Pb) and mercury (Hg), at concentrations of: 200, 500, 1000 and 2000 $\mu\text{g/ml}$. Three water samplings were performed, from which the bacteria were isolated in Müller Hinton agar medium; The identification of the bacterial community was carried out 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 the culture medium with Pb and Hg at different concentrations, 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 of water depth in the latter zone, which are significantly different ($p < 0.0001$). Six bacterial genders were identified: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* and *Enterobacter*. These bacteria are resistant to lead and mercury in all concentrations, and bacterial counts were different in treatments, which presented a statistically significant difference ($p < 0.0001$) among all factors.

Key words: Resistance, *in vitro*, bacterial community, mercury, lead.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente a nivel mundial el problema de la contaminación ambiental viene generando grandes impactos en la salud pública, en la economía y en la sociedad en general; por tanto, la conservación del medio ambiente es necesaria en estos tiempos. Tanto el desarrollo industrial y la creciente urbanización han causado grandes problemas ambientales debido al vertimiento de efluentes industriales y domésticos en diferentes ecosistemas de la naturaleza. El vertimiento de compuestos tóxicos y microorganismos patógenos, en especial las bacterias resistentes a varios químicos que habitan en aguas residuales, vienen a constituir la causa de la contaminación de los ecosistemas acuáticos, de manera especial los ríos.

La contaminación del ambiente con metales tóxicos y radionúcleos aparece como consecuencia de actividades humanas, principalmente industriales; sin embargo, fuentes como la agricultura y la eliminación de residuos también contribuyen. Estos contaminantes son liberados en la atmósfera y en los ambientes acuáticos y terrestres, principalmente como partículas o solutos pudiendo alcanzar concentraciones elevadas, especialmente cerca del sitio de descarga. Los efectos de los metales varían considerablemente sobre el funcionamiento de los ecosistemas y son de importancia económica y de salud pública (Ara *et al.*, 2007).

Las consecuencias de la contaminación 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. Esta problemática tiene consecuencias negativas en la salud pública, en la economía y en la sociedad en general (Martínez *et al.*, 2010).

Diversos estudios para determinar el efecto de los contaminantes sobre la comunidad bacteriana se han realizado en ecosistemas impactados por estos contaminantes, donde se observa que la resistencia bacteriana a metales suele estar también asociada con la resistencia a antibióticos, como es el caso de la resistencia al mercurio (Moraga *et al.*, 2003).

En el Perú, varios afluentes presentan contaminación con metales pesados. En Tacna, todos los afluentes presentan este problema. De ahí la necesidad de generar mecanismos que permitan su descontaminación y, por ende, la utilización de esta agua para el consumo de la población (Ara *et al.*, 2007).

La región de Puno no está libre del problema de la contaminación de sus afluentes y debido a ello surge la necesidad de generar métodos que permitan su descontaminación, para así obtener grandes beneficios para la sociedad, en ese sentido, para la región esto es vital y primordial, porque cada vez acrecienta la escasez de agua por la contaminación de los ríos y del Lago Titicaca. El río Ramis presenta una mayor contaminación por metales pesados, lugar donde también existe una variable comunidad bacteriana, que es resistente o que probablemente utiliza el plomo o mercurio como fuente de energía; estas bacterias que habitan en este río en un futuro podrían emplearse en procesos de biorremediación de sus aguas y sólidos o sedimentos.

Por lo mencionado, en la investigación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar la resistencia *in vitro* al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis - Puno, Perú.

Objetivos específicos

- Cuantificar mediante las unidades formadoras de colonias (UFC) e identificar cualitativamente la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis.
- Determinar 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.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Pellizzari *et al.* (2014), en su investigación sobre “degradación de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua (estudio preliminar)”. El estudio tuvo como objetivo investigar la resistencia al arsénico en cultivos puros de *Pseudomonas aeruginosa*, aislada de aguas subterráneas de la ciudad Presidencia Roque Sáenz Peña, provincia de Chaco y evaluar su posible uso para la remoción de este contaminante presente en las aguas subterráneas. Las cepas se inmovilizaron en piedra natural y se cultivaron en caldo de sales y 1 mgAs/l. Donde se observó la resistencia al arsénico y la formación de biofilm, el cual logró la interacción entre las células, roca y arsénico. Finalmente la remoción de arsénico se evaluó durante 3 meses y el porcentaje de eliminación de arsénico al final del experimento fue de 60%.

Martínez *et al.* (2010), en su investigación sobre “resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares”. El problema de la contaminación originada por los metales pesados y desechos domésticos en este río conllevó a investigar la existencia de bacterias resistentes a antibióticos e iones metálicos, a partir de las muestras de agua y de sedimento del ecosistema acuático. La resistencia a los antibióticos para todos los géneros bacterianos fue determinada por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), de igual forma la resistencia al plomo, cromo y cadmio. Los 23 aislamientos fueron clasificados en los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*; resultando el género *Bacillus* el más frecuente. De las cepas, el 96% resultaron ser multirresistentes a los compuestos químicos, al mostrar resistencia a cuatro o más antibióticos y a los tres metales. Solo 7 cepas del total mostraron co-resistencia, que fue dada por la resistencia coexistente: en las bacterias grampositivas a ERI, PEN, CEF, CLOR, CRO, CTX, y en las bacterias gramnegativas a CEF, KAM, CLOR, AMIK, NOR, CRO, CTX, y a los tres metales. Esto manifiesta la posible propagación en el río de cepas multirresistentes, que pueden transferirse y diseminarse los determinantes de resistencia.

Ara *et al.* (2007), en su investigación sobre “resistencia y degradación de arsénico por la comunidad bacteriana de las aguas del río Maure - Tacna, Perú”. Teniendo como

objetivo determinar la población bacteriana autóctona del río Maure que tolera o que utiliza el arsénico (As) y que en el futuro se podría emplear en procesos de biorremediación, para ello se realizaron seis muestreos entre los meses de agosto y octubre de 2007, lográndose 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 + NaAsO₂ (600µg/ml) a diferentes velocidades (MA₃, MA₆, MA₉ y MA₁₀), lo cual significa que se trataría de diferentes especies. Para el Perú este sería un primer reporte de bacterias acuáticas autóctonas que utilizan arsénico como fuente de energía.

Guzmán *et al.* (2007), en su investigación sobre “resistencia a antimicrobianos y a metales pesados en cepas de *Escherichia coli* aisladas del río Alseseca”. Teniendo como objetivo aislar cepas de *E. coli* e identificar su capacidad de resistencia a los antimicrobianos y a los metales pesados. Para aislar las cepas de *E. coli* a partir de las muestras de agua del río Alseseca, se realizaron diluciones seriadas y se cultivaron en McConkey y EMB incubando por 24h y luego se identificaron a través de pruebas de laboratorio rutinarias de agar CROM y APIS. Las cepas tipificadas como *E. coli* se sometieron en el método de Kirby-Bauer con el fin determinar su sensibilidad a 12 antimicrobianos, identificándose su resistencia a 1 mg/l, 2 mg/l, 2000ppm y 3000ppm de los metales NiCl₂, NaVO₃, CoSO₄, CuCl₂, Na₂MoO₄·2H₂O, Pb (C₂H₃O₃). Resultando 33 cepas como *E. coli*, donde más del 70% fueron resistentes a SXT, AM, CB y CF. La totalidad de las cepas fueron resistentes a 1 mg/l, 2 mg/l de los metales, a 2000 y 3000ppm también fueron resistentes a excepción en CoSO₄ y CuCl₂.

Cervantes *et al.* (2006), en su investigación sobre “interacciones microbianas con metales pesados”, donde indican que los organismos vivos se encuentran expuestos en la naturaleza a los metales pesados, por lo común presentes en sus formas ionizadas. Estos iones ejercen diferentes efectos tóxicos sobre los microorganismos. Al mismo tiempo la exposición a los metales, selecciona y retiene variantes microbianas que son capaces de tolerar sus efectos nocivos. Se han identificado variados y eficaces mecanismos de resistencia en distintas especies de bacterias, protistas y hongos. El estudio de las interacciones de microorganismos con los metales podría ser útil para entender las relaciones de los metales tóxicos con los organismos superiores como

mamíferos y plantas. Algunos sistemas microbianos de tolerancia a metales poseen el potencial para utilizarlos en procesos biotecnológicos de biorremediación de la contaminación ambiental por metales tóxicos o de la recuperación de metales valiosos.

Álvarez *et al.* (2004), en su investigación sobre “resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela”. Donde se planteó evaluar la resistencia bacteriana en tilapias silvestres y cultivadas, y determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) para los antimicrobianos seleccionados. La sensibilidad se evaluó utilizando dos métodos: semi-cuantitativo de difusión a partir del disco en agar Müeller Hinton y cuantitativo determinando la concentración inhibitoria mínima. Por más que la resistencia a los antimicrobianos en las muestras evaluadas del Lago de Valencia fue elevada (6 a 12 compuestos), se registraron variaciones en las distintas especies, detectando multiresistencia en todas las bacterias, con una superior resistencia en ambiente de cultivo (8 a 12 compuestos) que en ambiente natural. Un compuesto que se usa ampliamente en la acuicultura y que carece de importancia en salud pública es el ácido oxolínico, este parece ser el más útil en inhibir el desarrollo de estas bacterias logrando una CIM en el rango de 0,5-10 $\mu\text{g/ml}$. La elevada resistencia y los amplios valores de CIM resultantes, destaca y recomienda que el uso de antimicrobianos se deba realizar en forma responsable con un estudio previo de resistencia *in vitro*, así evitar la selección de cepas bacterianas resistentes.

Moraga *et al.* (2003), en su investigación sobre “resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la Bahía de Iquique”. Con el fin de estudiar la resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique, en las coordenadas (20°10’S-70°08’W). Se seleccionaron 43 cepas y se cultivaron en agar PCA suplementado con CuSO_4 (800 $\mu\text{g/ml}^{-1}$). Donde se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas de los metales pesados: Pb, As, Ni, Cu, Hg, Zn, Cr y Cd en las cepas donde hubo crecimiento en este medio. También se determinaron los patrones de resistencia a estos metales así como la susceptibilidad a distintos antibióticos. La totalidad de cepas analizadas fueron bacterias gramnegativas no fermentadoras, principalmente del género: *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. Se hallaron niveles variables de resistencia a los metales pesados. Obteniéndose la evidencia de una relación entre la resistencia a los metales pesados y la resistencia a los antibióticos ensayados.

Paniagua *et al.* (2003), en su investigación sobre “resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*”. Teniendo como objetivo determinar la resistencia a antibióticos y metales pesados de 150 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, que fueron aisladas de pacientes infectados del área de Tlalnepantla, Estado de México. Se determinó por el método de Kirby-Bauer la susceptibilidad a 12 antibióticos. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del plomo, cromato, mercurio, cadmio y arsenato fueron determinadas por el método de dilución en placa. La resistencia a antibióticos fueron: 94% de ampicilina y penicilina, 92% de ceftazidima, 73% de eritromicina, 57% de pefloxacina, 40% de cefotaxima y tetraciclina, 36% de dicloxacilina, 32% de trimetoprim con sulfametoxazol, 24% de gentamicina, 10% de cefuroxima y 7% de cefalotina. La CMI del plomo tuvo una distribución bimodal con 2.6% de cepas de mediana sensibilidad (CMI=200 $\mu\text{g/ml}$) y 97.4% de cepas resistentes (CMI=800-3200 $\mu\text{g/ml}$). Todas las cepas fueron sensibles al cromato (CMI=375 $\mu\text{g/ml}$) y resistentes al mercurio (CMI>20 $\mu\text{g/ml}$) y al cadmio (CMI>50 $\mu\text{g/ml}$). De las cepas un 26% fue sensible al arsenato (CMI=200-400 $\mu\text{g/ml}$) y un 74% fue resistente (CMI=800-1600 $\mu\text{g/ml}$). Los patrones de resistencia a antibióticos y metales pesados en su mayoría incluyeron a la penicilina, ampicilina y ceftriaxona, así como al plomo, mercurio, arsenato y cadmio. Los resultados obtenidos manifiestan la elevada resistencia de las cepas de *Staphylococcus aureus* a los principales antibióticos de elección y demuestran que la contaminación ambiental causada por los metales pesados, o también el mal uso de los antibióticos, actúan como factor de selección para ambos fenotipos de resistencia.

Cañizares (2000), en su investigación sobre “biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana”. Donde indica que la utilización de microorganismos como biosorbentes de metales pesados ofrece una alternativa potencial a los métodos que existen para la destoxificación y recuperación de metales tóxicos o valiosos que están presentes en aguas residuales industriales. Varias levaduras, hongos, algas, bacterias e incluso cierta flora acuática poseen la capacidad de concentrar metales y de acumularlas dentro de la estructura microbiana. En la actualidad los procesos biotecnológicos más eficaces utilizan la biosorción y la bioprecipitación, pero cabe resaltar que procesos tales como la unión a macromoléculas específicas podrían tener un potencial en el futuro. Las tecnologías que utilizan estos procesos son por lo común usadas para el control de la contaminación de diversas fuentes.

Zelibor *et al.* (1987), en su investigación sobre “ensayos de resistencia bacteriana a arsénico en el pozo de monitoreo de agua por el método de recuento viable directa”. Donde indican que para los patrones de resistencia de metales pesados se utilizó aislamientos de pantalla para la resistencia a una variedad de sales de metales pesados. Con discos de concentración 0,7 cm en blanco. Se impregnaron con 0.2 ml de una solución de sal, se secaron, y se colocaron en placas de agar Müeller Hinton previamente extendido con una suspensión de las cepas a ensayar. Las placas se incubaron durante 48 horas a 25 °C. La zona de inhibición producida por la sal se midió y se anotó como muy resistente (<2,0 mm), moderadamente resistente (2,0 a 10,0 mm), o sensible (> 10,0 mm). Las soluciones de sales de metales pesados se prepararon y se filtraron a (0,2 μm tamaño de poro) antes de su uso. Las sales incluyen $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 M), CdCl_2 (0,001 M), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,16 M), HgCl_2 (0,001 M), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,0 M), y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (0,1 M) en EDTA equimolar.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Metales pesados

La persistencia en el ambiente de los metales genera una problemática especial. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden degradarse ni biológicamente ni químicamente en la naturaleza, son elementos químicos que el hombre no crea ni destruye (Sánchez, 2011), los metales pesados son conocidos como potencialmente contaminantes y devastadores, ya que son estos los que contaminan el aire, el agua y la tierra que son utilizados principalmente por las plantas y todos los demás eslabones de las cadenas tróficas (Toro, 2013).

Desde el inicio de la era industrial, los metales han penetrado de manera lenta en el ambiente, ocasionando que se acumulen progresivamente en suelos, sedimentos y aguas superficiales. Constituyen el 75% de los elementos conocidos, están caracterizados por ser buenos conductores del calor y la electricidad, tienen alta densidad, y son sólidos en temperaturas normales (excepto el mercurio). Además pueden formar aleaciones entre sí y son ampliamente utilizados, por ejemplo, en la fabricación de automóviles, computadoras, la construcción de autopistas, puentes, etc., así como en la producción de electrodomésticos, y material de laboratorio. Se encuentran en forma de elementos

nativos (mineral, geológico) o también son producto de actividades antropogénicas (fungicidas, minería y fundición, industrias plásticas, y deshechos) (Griet, 2006).

La designación de metal pesado no está muy bien definida, pudiéndose encontrar diversos criterios para clasificar este tipo de contaminantes, empleando el criterio de densidad se puede considerar como metal pesado aquellos metales con una densidad superior a $4,5 \text{ g/cm}^3$, mientras que si tenemos en cuenta el peso atómico se denomina metal pesado a aquellos elementos químicos que poseen un peso atómico comprendido aproximadamente entre, el del cromo (51,99) y el del plomo (207,19) (Sánchez, 2011).

De acuerdo a su interrelación con los seres vivos, se distinguen dos grupos dentro de los metales pesados. Un grupo de oligoelementos o micronutrientes las cuales se requieren en pequeñas cantidades para el funcionamiento de sistemas enzimáticos, dentro de los que se encuentran el Cobre, Hierro, Selenio y Zinc, entre otros, que a su vez pueden ser tóxicos si se incrementa la concentración a la cual se exponen los organismos. El otro grupo son los metales pesados sin función biológica conocida, los cuales pueden originar efectos tóxicos a partir de determinadas concentraciones; este grupo tiene la propiedad de ser persistentes en el ambiente y bioacumularse, haciendo que su concentración en un organismo vivo, tienda con el tiempo, a sobrepasar la concentración del elemento en el ambiente; en este grupo se encuentran el Arsénico, Cadmio, Cromo, Plomo, Mercurio y Talio. El potencial de toxicidad de estos últimos depende de su capacidad de combinarse con diferentes tipos de moléculas, sobre todo las que cuentan con grupos sulfhidrilos en su estructura. Es importante aclarar que aunque los términos metales pesados y metales tóxicos se utilicen como sinónimos, solo algunos de los metales pesados son tóxicos (Goyer, 1997).

La toxicidad que presentan estos metales no esenciales radica, generalmente, en que presentan actividad cancerígena y mutagénica, envenenamiento, así como en la reducción de la actividad de alguno de los órganos vitales. Los metales pesados presentan una cualidad especial debido a que no son biodegradables, esta es su capacidad de bioacumulación en los organismos vivos. La importancia de este fenómeno es debida a que en muchos casos lo que hace tóxicos a los metales pesados no son, en general, sus características esenciales, sino las concentraciones en las que pueden presentarse (Sánchez, 2011).

2.2.1.1. Metales pesados presentes en aguas y sedimentos

Los metales en el transcurso de su vida útil están sujetos a corrosión y desgaste, lo que produce las pérdidas al ambiente. La mayoría de los contaminantes metálicos llegan a alcanzar a las aguas superficiales y subálveas. Los residuos de muchas operaciones industriales que contienen metales se encuentran en forma líquida y alcanzan rápidamente las aguas naturales. Además, se liberan al aire cantidades significativas de muchos metales que son nuevamente transportados por la lluvia a la superficie terrestre. La escorrentía agrícola, el alcantarillado doméstico y los residuos mineros también contribuyen a las concentraciones de metales que se encuentran en las aguas naturales. Los metales pesados se encuentran presentes en los sistemas acuáticos a muy escasa concentración, por lo que son denominados elementos traza, pero a pesar de esta baja concentración, y debido a su poder de bioacumulación, es muy importante poder conocer y controlar de forma rigurosa los niveles en los que se encuentran estos contaminantes en los medios acuáticos, principalmente en las aguas de consumo (Sánchez, 2011).

Existen muchas definiciones del término de “metales pesados”, y todos los elementos metálicos de interés económico, por lo tanto, también los de interés minero entran prácticamente en esta categoría (Oyarzun e Higuera, 2009); la mayoría de los metales pesados son los de interés industrial y económico, lo cual hace que las principales fuentes antropogénicas sean las actividades de minería, fundición y refinado, que implican extraer los metales de sus menas en los depósitos subterráneos y, posteriormente, fundirlos y refinarlos hasta la obtención y conversión en bienes de consumo que después de usados se desechan (Sánchez, 2011). Una de las actividades industriales más peligrosas desde el punto de vista de la contaminación es la minería, debido a la inmensa cantidad de residuos que se generan y a los elementos que los conforman, estando principalmente compuestos de ácidos y metales muy tóxicos para los organismos vivos. Además, pese a que su origen suele estar localizado como una fuente puntual, el efecto de la contaminación asociada a este tipo de actividad puede extenderse lejos de dicha fuente (Mendiguchía, 2005).

En los sistemas acuáticos continentales como ríos, lagos, embalses, etc., los metales pesados están presentes como producto de la acción de procesos naturales y

antropogénicos. Así, se diferencia entre un origen natural de metales pesados y otro antropogénico; si bien en la práctica la distinción entre una contaminación de origen industrial, doméstico o natural y la que es producida por actividades mineras resulta muy difícil de distinguir (Rosas, 2005).

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).

En los estudios sobre contaminación por metales pesados en sistemas acuáticos, los sedimentos constituyen un material primordial para conocer el nivel de contaminación de una determinada zona (Chen *et al.*, 1996). Estos actúan como sumideros de contaminantes y cuando cambian las condiciones ambientales se transforman en una importante fuente de metales que pueden ser incorporados por la biota (Ahumada y Contreras, 2002). El efecto puede mostrarse aún más significativo para los organismos bentónicos debido a que viven en asociación con los sedimentos superficiales contaminados. No obstante, en muchos casos los metales también se acumulan en los niveles más altos de la cadena trófica, incluyendo a los peces y el hombre (Romero *et al.*, 2000).

Por si mismos los sedimentos se constituyen un reservorio natural de metales pesados (González *et al.*, 2004), son considerados excelentes absorbentes de contaminantes, actúan como portadores y posibles fuentes de contaminación, debido a que los metales pesados no se quedan de manera permanente y pueden ser liberados a la columna del agua por cambios en las condiciones ambientales tales como pH, potencial redox, oxígeno disuelto o la existencia de quelatos orgánicos (Almeida *et al.*, 2010). Las actividades humanas originan vertidos de diferentes tipos, que en los sedimentos fluviales aumentan la concentración de metales pesados. De acuerdo a su forma de asociación, los metales son susceptibles o no de poder solubilizarse durante las modificaciones fisicoquímicas estacionales como estiaje, crecida, etc., (Rosas, 2005).

En los sedimentos, la concentración de metales pesados no sólo depende de fuentes antropogénicas y litogénicas, sino también del contenido de la materia orgánica, de las características textuales, de la composición mineralógica y del ambiente deposicional sedimentario. Por ello, los contenidos de metales en muestras de sedimentos tomadas en puntos muy próximos, pueden presentar mucha diferencia, siendo responsable principal de tales discrepancias la textura del sedimento (Usero *et al.*, 1997).

En los cuerpos de agua en la cuenca del río Ramis, el mercurio es un elemento que se hace presente con valores por debajo de los Estándares de Calidad Ambiental para agua; ECA-Categoría 3, correspondiente para riego de vegetales y bebida de animales (0,001 mg/l) y con valores normales de los ECA-Categoría 4, correspondiente para la conservación del ambiente acuático (0,0001 mg/l), (Figura 1). El plomo es otro elemento que también se hace presente con valores elevados por encima de los ECA-Categoría 3 (0,05 mg/l) y Categoría 4 (0,0025 mg/l), (Figura 2).

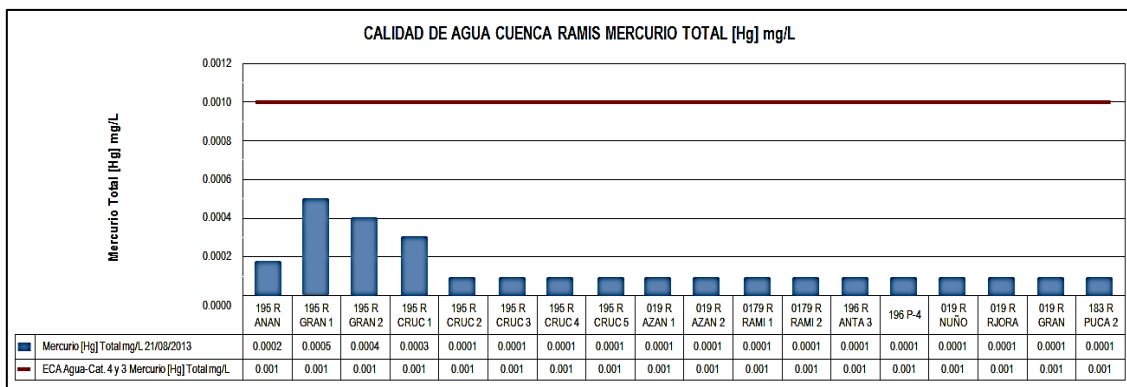


Figura 1. Calidad de agua superficial en la Cuenca Ramis, mercurio (Hg) mg/l.

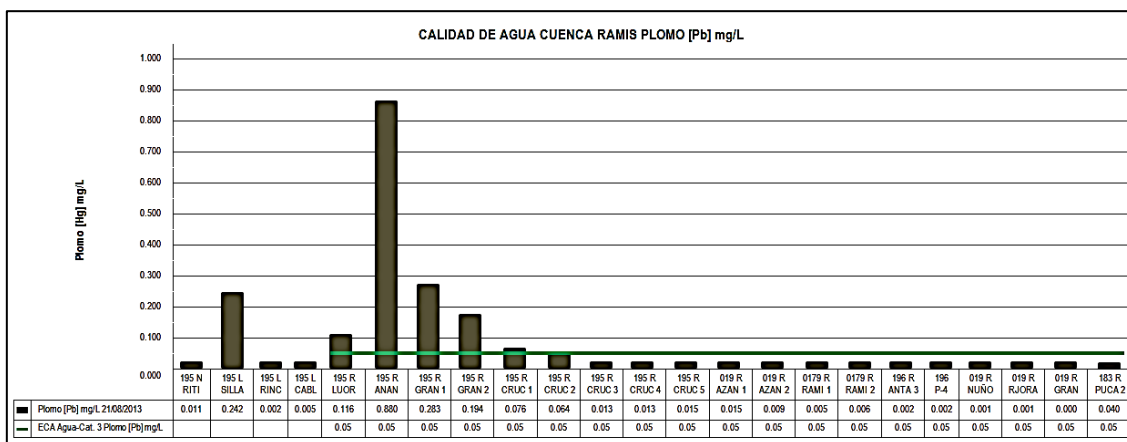


Figura 2. Calidad de agua superficial en la Cuenca Ramis, plomo (Pb) mg/l.

Fuente: Comisión Multisectorial para la Prevención y Recuperación Ambiental del Lago Titicaca y sus Afluentes, 2014.

2.2.2. El Plomo

El plomo es un elemento químico de número atómico 82 y su peso atómico es de 207,19. Se encuentra clasificado dentro de los llamados metales pesados con una densidad relativa de 11,4 g/ml. Posee la capacidad de combinarse con los átomos de otros elementos, esto es determinado por los estados de oxidación 2 y 4 Pb(II) y Pb(IV), de los cuales el estado de oxidación dos, es el más estable, y por lo tanto; el que se presenta en gran porcentaje en la naturaleza. Su punto de ebullición y punto de fusión se observa a 1.725°C y 328°C respectivamente. Es un metal blando, dúctil, maleable, muy resistente a la corrosión y pobre conductor de electricidad (Sánchez, 2011).

De los principales elementos metálicos que ocasionan daño a la salud es el plomo. Este metal produce riqueza económica tanto en la actividad minera como industrial (Lacasaña *et al.*, 1996). El plomo en la naturaleza no se presenta habitualmente en su estado elemental, sino forma parte de minerales como: la galena (PbS), la cerusita (PbCO₃) y la anglesita (PbSO₄), entre otros. Asimismo existen numerosos compuestos inorgánicos en cuyas estructuras está presente el plomo, ejemplo de estos compuestos son los acetatos, bromatos y oxalatos (Sánchez, 2011). Es el elemento pesado más común, registrando 13 mg/kg de la corteza terrestre, en la naturaleza existen distintos isótopos estables incluyendo en orden de abundancia, ²⁰⁸Pb, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, y ²⁰⁴Pb (Lead Environmental Aspects, 1989).

Es poco resistente el plomo metálico al ataque de los ácidos sulfúrico y clorhídrico, y se disuelve en ácido nítrico con lentitud. En condiciones habituales el plomo metálico es pobremente soluble en agua (Bradl, 2005).

En los últimos años, los países de Australia, Estados Unidos, China, Canadá, Kazajistán, Perú, México, Suecia, República de Sudáfrica, Corea del Norte y Rusia, en orden decreciente son los principales productores de plomo en el mundo. El 11,4% de la producción mundial de plomo contribuye América Latina y el Caribe, teniendo en cuenta que el Perú y México son los productores más importantes. Este metal ha sido asociado con la civilización desde que se comenzó la práctica de la metalurgia (Mielke y Reagan, 1998).

2.2.2.1. Origen de la contaminación por Plomo

En la corteza terrestre la distribución del plomo es muy abundante debido a que se encuentra formando parte de abundantes estructuras. Sin embargo, una consecuencia directa de los múltiples usos industriales del elemento es su aumento y acumulación en el medio ambiente, debido a que el hombre ha usado este metal desde hace unos 6000 años, lo que ha dado lugar al origen de un ciclo no natural del plomo. Debido a ello, el plomo se distribuye por suelo, agua y atmósfera; en ocasiones lo hace en concentraciones superiores a las que son recomendadas (Sánchez, 2011). Actualmente el mundo atraviesa por un proceso de rápido desarrollo en los distintos campos de las actividades humanas, entre ellas las agrícolas e industriales, los gobiernos de todo el mundo también están conscientes del potencial de contaminación ambiental asociado a dicho desarrollo (Mora, 2002).

En forma de carbonatos y sulfuros se suele encontrar al plomo en la corteza terrestre. Este metal es muy utilizado por el hombre como aditivo de combustibles (gasolinas), si bien su uso está en continuo declive debido a su incremento en el ambiente (al plegarse englobado en los humos del quemado de estos combustibles) y a su poder toxicológico. Se utiliza también en la fabricación de baterías, fabricación de pinturas, como aislante de radiaciones ionizantes y en formulaciones de pesticidas (Marín, 2003).

En la actualidad, aproximadamente el 35% del plomo se emplea para fabricar baterías de automóviles; y, debido a su importancia cuantitativa, el segundo uso del plomo es su incorporación al cristal de los monitores de ordenador y las pantallas de televisión, con la función de poder absorber radiaciones perjudiciales. El amplio espectro de usos del plomo en la industria incluye además la fabricación de pinturas, barnices para cerámicas, diversos cosméticos, tetraetilplomo para elementos de la construcción, la fabricación de tuberías de plomo y como componente de combustibles, entre otros muchos usos más. Estas dos últimas aplicaciones mencionadas son las causas más comunes de contaminación de aguas por plomo, así como las baterías gastadas de los automóviles (Moreno, 2003).

Otra de las fuentes que es comúnmente olvidada es la actividad de caza y pesca, en España se estima que la caza y el tiro son responsables de difundir anualmente cerca de

6000 toneladas en el ambiente relativamente baja a comparación de las 60 000 toneladas anuales que difunde Estados Unidos. La pesca deja en las zonas acuáticas unas 100 toneladas más cada año en España. Si consideramos en cuenta estos valores a nivel global y los comparamos con los 300 millones de toneladas que se estima que los humanos a lo largo de la historia hemos extraído, podemos observar como una cantidad significativa de este plomo se encuentra como contaminante en el medio ambiente (Guitart y Thomas, 2005).

2.2.2.2. El Plomo en disolución

El plomo metálico en condiciones normales no reacciona con el agua. Sin embargo, la reactividad con el agua aumenta cuando se pone en contacto con aire húmedo. En la superficie del metal se forma una diminuta capa de óxido de plomo (PbO), en presencia de oxígeno y agua, el plomo metálico se convierte en hidróxido de plomo (Pb(OH)₂), lo que origina que este pueda entrar en el agua potable a través del deterioro de las tuberías de plomo, muy utilizadas a nivel doméstico hasta el año 1980; siendo su ecuación química de equilibrio: $2\text{Pb}(s) + \text{O}_2(g) + 2\text{H}_2\text{O}(l) \rightarrow 2 \text{Pb}(\text{OH})_2(s)$ (Sánchez, 2011).

Desde la óptica fisicoquímica, el Pb²⁺ forma complejos de cierta estabilidad con los nitratos, cloruros y cianuros; y, menos estables con ácidos como el acético, los orgánicos hidroxilados y el tiosulfúrico. Además de ello, este catión moderadamente forma sales solubles con cloruro, bromuro, yoduro, fluoruro, sulfato y carbonato. Por otro lado, el Pb⁴⁺ puede ser acomplejado en medio clorhídrico por el cloruro presente, así como por sulfato en medio sulfúrico relativamente concentrado mientras que el óxido correspondiente (PbO₂) presenta una baja solubilidad en agua (Marín, 2003).

En sistemas acuáticos contaminados el plomo que está presente tiende a sedimentar y acumularse en el fondo en forma de sulfuro, carbonato y fosfato, esto casi en su totalidad. Sin embargo, en ocasiones una parte menor del elemento persiste disuelta en el agua, esto viene señalado por el pH del medio (Sánchez, 2011).

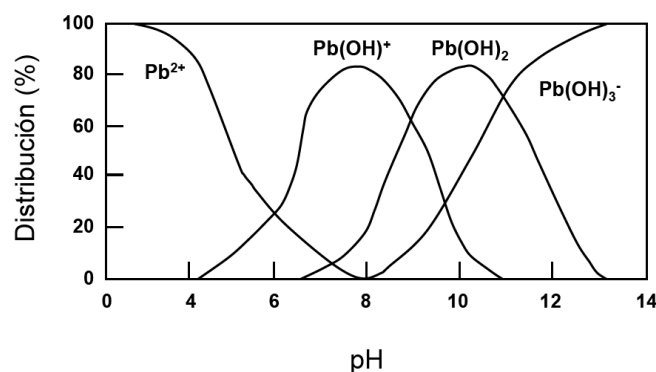


Figura 3. Especiación del plomo en disolución en función del pH.

Fuente: Sánchez (2011).

Expuesto al aire el plomo metálico sufre en primer lugar un proceso de oxidación inducido por el oxígeno atmosférico, que lo transforma en hidróxido, siendo después atacado por el CO₂ para dar lugar a una fina película de carbonato que lo protege al metal de posteriores corrosiones. En los ambientes salinos, o aguas saladas o salobres, el metal reacciona con los aniones que están presentes transformándose en sales estables como los haluros y los sulfatos correspondientes. No obstante, estas sales pueden ser atacadas posteriormente por aguas ácidas o con reducido contenido salino (aguas blandas) lo que podría conducir a nuevos fenómenos de corrosión en el metal. En aguas naturales que no se encuentran contaminadas, el contenido de plomo total tanto disuelto, coloidal y asociado a partículas, oscila entre 50 µg/l y 10 mg/l, mientras que la fracción de plomo disuelto no suele sobrepasar los 10 µg/l. Lógicamente, si se detectan concentraciones más superiores de plomo será indicativo de que el cauce natural se encuentra contaminado por aguas residuales ricas en el metal. Además, en la actualidad, téngase en cuenta que otra fuente de aporte de plomo de principal magnitud a un agua natural es el agua de lluvia contaminada por los gases de escape de los automóviles. Sin embargo, la concentración normal de plomo en un agua de bebida no suele sobrepasar los 10 µg/l (Marín, 2003).

2.2.2.3. Toxicidad del Plomo

El plomo y los compuestos de plomo son normalmente contaminantes tóxicos. Las sales de plomo II y también los compuestos orgánicos del plomo desde un punto de vista toxicológico son considerados dañinos. La Agencia de Control Ambiental Americana (EPA), ha catalogado al plomo como probable carcinógeno en el hombre (grupo B2),

(Naseri *et al.*, 2007), y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer lo cataloga como posible carcinógeno en el hombre (grupo 2B), (P.A.R.A.N., 1998).

Es un elemento no esencial desde la óptica fisiológica, que posee carácter tóxico. Es más perjudicial esta toxicidad frente a los organismos autóctonos de las aguas naturales a medida que el agua presenta una menor dureza. En el ser humano, el plomo causa la conocida enfermedad del saturnismo, que se caracteriza por la acumulación del metal en los huesos, y especialmente en los nervios, sistema renal e hígado. El saturnismo provoca anemia, parálisis, dolores de cabeza y alteraciones enzimáticas y en los tejidos adiposos es en donde preferencialmente se aloja. A esto hay que sumar su carácter de carcinogénico, tanto del metal como también de sus sales inorgánicas, los cuales todos son incluidos por la IARC en el grupo 2B (posiblemente carcinógenos por ingestión), (Marín, 2003); la enfermedad a la que conduce la acumulación de plomo en nuestro organismo es conocida como saturnismo. Su eliminación es compleja, lenta y sólo es dable cuando los niveles de absorción son bajos (Toro, 2013).

El plomo que se encuentra disuelto en los medios acuáticos, cuando es asimilado por un organismo, se acumula en determinados órganos o tejidos. Esto se conoce, desde hace tiempo, como el peligro de bioacumulación del plomo, procedente de la dificultad de excreción del mismo (Sánchez, 2011); la eliminación del plomo es lenta y se da primordialmente por el riñón a través de la orina (filtración glomerular y secreción tubular), otras vías de eliminación son por las heces, sudor, saliva, bilis y exfoliación dérmica (Bataller, 2004).

El plomo también es considerado como metal neurotóxico que puede ser absorbido sin esfuerzo por el cuerpo humano, en primer lugar a través del estómago y los pulmones. Los efectos tóxicos del plomo en seres humanos, en especial los niños han sido bien documentados, los estudios indican que los daños neurológicos en niños pueden ocurrir a niveles de plomo en sangre tan bajos como 10 µg/dl (Yang *et al.*, 2005).

En las plantas, el plomo limita la síntesis clorofílica. No obstante a ello, las plantas son capaces de absorber del suelo elevados niveles de plomo, hasta 500 ppm. Cabe resaltar que el plomo también puede ser introducido en la cadena alimenticia mediante la absorción por parte de las plantas. Consecuentemente, el uso de pesticidas de plomo

está prohibido en la mayor parte de los países. El plomo presente en el agua residual, proviene principalmente de las calles, tubería y suelos, debido a la utilización en fontanería y que todavía está presente en construcciones antiguas (Sánchez, 2011).

Para la biota, también incluido el ser humano, el plomo es considerado un elemento no esencial y potencialmente dañino. La disminución de la fotosíntesis vegetal y el desarrollo de anemia en mamíferos son provocados cuando este metal alcanza niveles tóxicos. En las plantas además del efecto ya mencionado también se le atribuye la reducción en el crecimiento, en la biomasa y la transpiración; adicionalmente las lesiones cromosómicas, inhibición de la división celular e interferencia con enzimas ligadas al metabolismo del nitrógeno (Cebrián, 2007).

La vía de intoxicación a través de la cadena trófica es inducida por la persistencia y bioacumulación del plomo en los organismos. La máxima concentración se da en los huesos, que actúan como lugares de almacenamiento de este metal, los órganos en los que se presenta en mayor medida son en el hígado, en los riñones y en el sistema nervioso central. Esta intoxicación produce diversos efectos, como náuseas, vómitos, dolores abdominales, dolor y debilidad muscular, fatiga, parestesia, espasmos, cambios enzimáticos en la sangre, anemia, hiperactividad y desórdenes neurológicos; los efectos que ocasiona en los niños son más graves que en los adultos, siendo los más característicos síntomas el letargo, vómitos, mareos, irritabilidad y pérdida del apetito, que sigue adelante hasta desembocar en ataxia y reducción de la consciencia, y pueden ocasionar finalmente coma y la muerte. Cabe mencionar que la intoxicación por plomo también afecta al desarrollo del feto (Moreno, 2003).

El plomo, al igual que el mercurio, se almacena en el cuerpo siendo lentamente excretado. Por ello, puede atravesar la barrera placentaria desde la madre hacia el feto; si esto ocurre, el elemento al reaccionar con los aminoácidos sulfurados puede conllevar a dificultades en el intercambio celular de oxígeno. En este sentido, se han podido demostrar correlaciones a través de casos de retraso mental en niños y niveles elevados de plomo en su sangre. De acuerdo a lo anterior, es deducible lógico que el empleo de plomo en la actividad humana vaya en continuo decrecimiento a partir de los años 70 del siglo pasado (Marín, 2003).

2.2.3. El Mercurio

El mercurio es considerado un elemento natural cuyo símbolo químico es Hg. Esta abreviatura proviene de la palabra griega hydrargyrum, que significa plata líquida. El mercurio en su forma pura, es un metal blanco plateado y líquido a temperatura y presión estándar. En diferentes contextos, al mercurio se le conoce con frecuencia como azogue, mercurio líquido o mercurio metálico. Por otro lado, el mercurio puro se le denomina como mercurio elemental (Weinberg, 2007); es considerado también el único metal que posee la propiedad de permanecer en estado líquido a temperatura ambiente, es poco habitual que lo encontremos en la litosfera, donde constituye tan sólo el 10-4%; a simple vista tiene color blanco plateado y muy brillante, pero en capas delgadas es casi transparente y de color azul violáceo (Jiménez, 2005).

El mercurio es un elemento químico de número atómico 80 y su peso atómico es de 200,59. Se encuentra clasificado dentro de los llamados metales pesados con una densidad relativa de 13,55 g/ml. Es considerado el único metal líquido a temperatura ambiente, debido a que presenta una temperatura de fusión de $-38,8^{\circ}\text{C}$, siendo además un elemento demasiado volátil, con una presión de vapor a 20°C de $1,22 \cdot 10^{-3}$ mm. Posee la capacidad de combinarse con los átomos de otros elementos, esto es determinado por los estados de oxidación 1 y 2 (Hg(I) y Hg(II)), y a pesar de que se trata de un metal noble, se encuentra de manera estable en la naturaleza, presente en cualquiera de sus tres estados de oxidación. Fácilmente se puede alejar con otros metales como el oro y la plata formando amalgamas. Además de las diferentes formas inorgánicas, normalmente unido a oxígeno, cloro y azufre, el mercurio también se presenta formando parte de compuestos orgánicos entre los que destaca el metilmercurio por su toxicidad. Es un metal pobre conductor del calor, sin embargo es muy buen conductor de la electricidad (Bradl, 2005).

Junto con el cadmio y zinc, el mercurio se ubica en el grupo IIb de la tabla periódica. Las características fisicoquímicas del mercurio son: estado líquido a temperatura ambiente y el único conocido en estado líquido a 0°C ., densidad elevada, calor específico poco elevado, líquido muy poco compresible, tensión superficial muy alta, capacidad calorífica muy débil y capacidad de amalgamación con otros metales. Debido a estas características, el mercurio posee el don de la ubicuidad. En consecuencia

cualquier producto que se analice, ya sea natural o artificial, al menos contendrá trazas de mercurio (Español, 2001).

El cinabrio (HgS) es el mineral más importante del mercurio, sus mayores reservas mineras se encuentra en Almadén, Ciudad Real, de donde se han extraído aproximadamente unas 200 000 toneladas de mercurio desde hace 2500 años. El mercurio se extrae sencillamente de la mena, que al ser calentada en el aire a temperaturas superiores a los 540°C desprende vapor de mercurio que luego se condensa para obtener el metal líquido (Cotton *et al.*, 1999). En la naturaleza el mercurio se encuentra en forma de mineral cinabrio, que viene a ser un sulfuro de mercurio, o también se le puede encontrar principalmente en grandes bolsas de mercurio metal. El sulfuro de mercurio es prácticamente inatacable por los agentes atmosféricos como el CO_2 , O_2 y H_2O ; y no ingresa en el ciclo del agua, debido a ello la incorporación del mercurio a las cadenas tróficas por esta vía es insignificante (Doadrio, 2004).

2.2.3.1. Origen de la contaminación por Mercurio

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. En el año 1997, la producción secundaria de mercurio en el mundo constituía aproximadamente un 40% de la producción primaria (Gaona, 2004).

En la corteza terrestre la distribución del mercurio es abundante, se encuentra tanto en estado elemental como combinación en forma de sales inorgánicas como en compuestos organometálicos. Este metal se emplea desde la antigüedad más remota, la evidencia de mercurio líquido más antigua se halló en una tumba egipcia en Kurna y data del año 1600 a.C. Sin embargo, una consecuencia directa de los múltiples usos industriales del elemento es su aumento y acumulación en el medio ambiente, debido a ello, el mercurio se distribuye por suelo, agua y atmósfera e ingresa en la cadena trófica a través de los organismos acuáticos principalmente (Sánchez, 2011).

El mercurio se encuentra en la litosfera principalmente como sulfuro y en algunas minas bajo su forma elemental de líquido. Este metal entra al medio hídrico a través de las

emisiones volcánicas, y sobre todo, ligado a los efluentes residuales procedentes de la producción de cementos, fabricación de baterías, combustión de fuel, así como también de la producción de hidróxido sódico y cloro. Además de ello, varios pesticidas contienen mercurio en sus formulaciones (Marín, 2003).

En la actualidad, los usos más principales del mercurio se encuentran en la industria cloro-alcalina, la fabricación de pilas, de lámparas fluorescentes y de material para empastes dentales que ya ha sido sustituido en los países desarrollados. 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, y también han sido la razón de innumerables intoxicaciones con fatales consecuencias. Cabe resaltar que esta no es la única aplicación del mercurio responsable de víctimas mortales, ya que la aplicación como fungicida también ha causado desgracias. Otras aplicaciones de importancia a destacar del mercurio son su empleo en los termómetros, para la elaboración de espejos, en los motores de turbinas, como detonante e incluso en la medicina como antiséptico (Sánchez, 2011).

Pese a su 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, se calcula que estos procesos liberan a la atmósfera aproximadamente entre 25 000 y 150 000 toneladas anuales de mercurio, el cual posteriormente se introduce al agua y al suelo (Moreno, 2003).

Los haluros, cromatos y sulfuros son sales moderadamente solubles formados por el Hg^+ . Por otro lado, los yoduros, tiocianatos y sulfuros del Hg^{2+} también son relativamente solubles. Además de ello, el Hg^{2+} puede ser capaz de generar una amplia variedad de complejos de relativa estabilidad como los aminados, clorurados, cianurados, bromurados, sulfurados, tiocianurados, yodurados y tiosulfurados (Marín, 2003).

2.2.3.2. El Mercurio en disolución

El mercurio en el aire eventualmente se asienta en el agua y en el suelo donde puede fluir al agua. Una vez que ha sido depositado, quienes pueden transformarlo a mercurio metílico son los microorganismos, el mercurio metílico es una forma altamente tóxica que se acumula en los peces y los mariscos, y también se acumula en los animales que se alimentan de los peces (Toro, 2013).

El mercurio sigue un ciclo complejo en el medio ambiente que engloba sus tres estados de oxidación, siendo el más escaso de ellos el Hg(I), y se logra extender por aire, agua y suelo, con la intervención de procesos químicos y biológicos en dicho ciclo (Moreno, 2003).

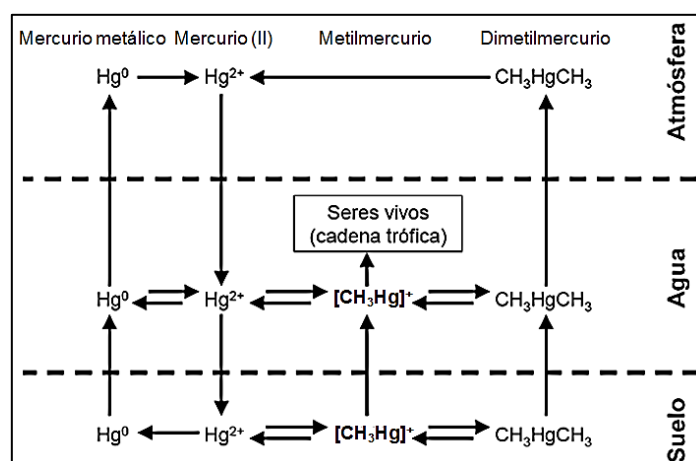


Figura 4. Ciclo biogeoquímico del mercurio.

Fuente: Moreno (2003).

Existen una serie de vías a partir de las cuales el mercurio puede entrar en el dominio de las aguas terrestres. El mercurio (II) y metilmercurio pueden depositarse directamente desde la atmósfera por vía húmeda o seca sobre cuerpos de agua terrestre; $Hg(II)$ y metilmercurio también pueden ser incorporados a las aguas terrestres por acción de la lluvia; por otro lado, este lavado y arrastre de mercurio desde el suelo a las aguas terrestres puede realizarse a partir de corrientes de agua subterránea (Gaona, 2004).

En el medio acuoso coexisten diversos compuestos, desde el mercurio elemental, las sales inorgánicas de mercurio que presentan cierta solubilidad, hasta el metilmercurio

formado por los procesos metabólicos de diferentes bacterias o por los procesos puramente químicos. Las formas orgánicas del mercurio, de manera principal el metilmercurio son muy asimilables por los organismos vivos, por lo que cuando ya ha sido producido ingresa en la cadena trófica sufriendo un proceso de biomagnificación a lo largo de ella (Sánchez, 2011).

El Hg^0 también puede ser producido en aguas terrestres a partir de la reducción de Hg(II) a causa de los ácidos húmicos que están presentes en suelos o sedimentos. Asimismo, la demetilación del metilmercurio puede ser llevada a cabo en presencia de luz solar. Una parte pequeña de este Hg^0 permanecerá disuelto mientras que la gran parte pasara a la atmósfera por volatilización (Gaona, 2004).

Por otra parte, los niveles de mercurio en aguas no contaminadas no suelen superar el $\mu\text{g/l}$. Sin embargo, en aguas contaminadas pueden incrementarse notablemente estos niveles, como es el caso de algunas aguas superficiales de Alemania donde se han podido medir hasta 0,40 mg/l del metal (Marín, 2003).

El mercurio es un elemento sujeto a fenómenos de biotransformación una vez que ingresa al medio ambiente, lo que logra incrementar enormemente su potencial tóxico. En este sentido, el contenido de mercurio en un agua se divide entre formas inorgánicas de Hg^+ , tales como cloruro e hidróxido de manera especial, y compuestos orgánicos de Hg^{2+} de mucho más elevado poder toxicológico, tales como los derivados metilados, dimetilados y fenólicos. De este modo, el Hg^+ que ingresa a un agua bien oxigenada, y sobre todo, a aguas con pH ácido (menor a 5,0) es inmediatamente oxidado a Hg^{2+} , el cual a su vez puede reaccionar de acuerdo a dos procesos (Marín, 2003):

- Puede ser reducido completamente a mercurio elemental por algunos microorganismos (por ejemplo varias especies de *Pseudomonas*) con lo cual se evapora a la atmósfera, en donde se logra oxidar a Hg^+ , pasando después desde este lugar a las aguas y suelos asociado a las lluvias.
- Puede formar complejos organomercuriados altamente tóxicos, en especial los denominados metilmercurio y el dimetilmercurio. Para esto, el Hg^{2+} de un agua que suele estar asociado a partículas orgánicas o a los microorganismos, o

inclusive englobado en los sedimentos del fondo de un cauce hídrico, logra experimentar un fenómeno de metilación, el cual puede discurrir tanto en aguas con buen oxígeno como en medio anóxico. En los medios oxigenados, el proceso produce primero metionina mercúrica cuya ruptura produce finalmente los derivados mono y dimetilados. Además, la formación de metilmercurio estaría favorecida frente a la del compuesto dimetilado si el pH del agua fuese ácido.

2.2.3.3. Toxicidad del Mercurio

El mercurio es considerado uno de los mejores ejemplos de la multiplicidad de efectos tóxicos de los metales, dependiendo de la forma química en el que se encuentre. El estado elemental y los compuestos organomercuriales son las principales formas en las que presenta una importante toxicidad, de los que cabe destacar es el metilmercurio (Sánchez, 2011). En general, el mercurio de la misma manera que el plomo, es un metal pesado y se acumula en el organismo. Durante el embarazo, el mercurio puede llegar hasta el bebé y causar trastornos en su desarrollo (Toro, 2013).

Tanto el mercurio como sus derivados tienen un elevado potencial tóxico, pues suelen ser rápidamente absorbidos por cualquier ser vivo. Por otro lado, debido a su muy lenta cinética de eliminación desde el organismo, este metal manifiesta el ya referido fenómeno de la bioacumulación. Esto supone que a medida que se escale en la cadena trófica, la cantidad de mercurio acumulada en los organismos de eslabones superiores es más alta (Marín, 2003).

La ruta más importante de penetración del mercurio elemental en el cuerpo humano es la inhalación de vapor de mercurio. Aproximadamente el 80% del mercurio vapor que se inhala es retenido por el organismo. Una vez que es absorbido, el mercurio elemental se distribuye con facilidad por todo el cuerpo; es capaz de traspasar las barreras sangre-placenta y sangre-cerebro. Posteriormente el mercurio elemental es oxidado a mercurio inorgánico divalente por la vía hidrógeno peroxidasa-catalasa, presente en la mayoría de los tejidos. El mercurio divalente posee una movilidad mucho más reducida, debido a ello, la distribución del mercurio elemental absorbido se encuentra limitada principalmente por esta oxidación (Gaona, 2004).

La inhalación de sus vapores es la principal vía de exposición al mercurio elemental, causando desórdenes neurológicos y de comportamiento como labilidad emocional, pérdida de la memoria, insomnio, temblores, modificaciones en el sistema neuromuscular y dolores de cabeza. Se han observado también efectos en el riñón y la tiroides, ocasionando mortalidad en altas exposiciones. Alrededor del 80% del vapor de mercurio que se inhala es absorbido por los tejidos pulmonares, luego se disuelve en la sangre, y se transporta al cerebro, en donde ocasiona daños irreversibles al sistema nervioso central, también se oxida por los glóbulos rojos de la sangre almacenándose en sus formas oxidadas en los riñones. Por otra parte, la absorción intestinal de mercurio elemental es baja y puede ser oxidada en los tejidos corporales a la forma divalente inorgánica (U.N.E.P., 2002).

Los efectos tóxicos que pueden ocurrir por la inhalación de vapor de mercurio dañan especialmente al sistema nervioso. Las exposiciones leves se caracterizan por la pérdida de memoria, inestabilidad emocional como angustia e irritabilidad, insomnio, temblores e inapetencia. A exposiciones moderadas se observan de manera más importante los desórdenes mentales y las perturbaciones motoras, así como las afecciones renales. Las exposiciones breves, a elevados niveles de vapor de mercurio pueden ocasionar daños pulmonares y la muerte. Sin embargo, el empleo de cosméticos y medicamentos que contienen mercurio también es una fuente adicional de exposición (Cebrián, 2007).

La absorción de mercurio metálico por ingestión es escaso (Gaona, 2004), y en lo que respecta al metilmercurio, este se absorbe de forma muy eficiente tras su ingestión, debido a su carácter lipofílico se origina la absorción de más del 90% del metilmercurio ingerido, además presenta una fuerte predisposición a la bioconcentración en la cadena trófica. Este compuesto se almacena en el cerebro, en especial en la corteza cerebral. Los importantes efectos tóxicos en adultos son neurológicos, en cambio la exposición a este compuesto en el embarazo ocasiona la aparición de lesiones congénitas del sistema nervioso que causa la disrupción de la arquitectura del cerebro. La manifestación de temblores y pérdida de sensibilidad en los dedos de las extremidades superiores e inferiores, ataxia, pérdida de visión y audición, neurastenia, espasmos, finalmente coma y muerte, es debido a la neurotoxicidad del metilmercurio (Moreno, 2003).

El mercurio inorgánico resulta ser poco asimilable por ingestión, alrededor del 15% se consigue asimilar concentrándose principalmente en los riñones. Su forma más habitual es el cloruro de mercurio y sus efectos que produce son la ulceración corrosiva del sistema digestivo, que causa hemorragias y necrosis en el tubo digestivo, también se incluye la insuficiencia renal generalizada, pudiendo ser estos efectos fatales en dosis elevadas (Moreno, 2003); sin embargo, el metilmercurio que es ingerido en la dieta se absorbe prácticamente en su totalidad (mayor al 90%) y se vierte al torrente sanguíneo. El transporte y la penetración del metilmercurio en los distintos tejidos se encuentran facilitados por la formación de un complejo de metilmercurio y cisteína. Este complejo es estructuralmente semejante a la metionina, por lo que su transporte hacia el interior de la célula es posible mediante las proteínas transportadoras de aminoácidos neutros (Gaona, 2004).

Desde el enfoque fisiológico, la absorción de mercurio orgánico por el cuerpo es superior al 90% del que se ingiere, por el contrario sólo el 10% del mercurio inorgánico ingerido es absorbido por el organismo. La acumulación del mercurio se da en tejidos grasos, músculos, riñones, huesos, cerebro y sistema nervioso, lo que provoca alteraciones y parálisis muscular, también problemas visuales y daños cerebrales. Además, puede ocasionar alteraciones en las enzimas que están involucradas en el sistema circulatorio. Por último, la teratogénesis es el resultado final, debido a que el proceso de división cromosómica puede ser alterado gravemente por este metal. Pese a lo anterior, no está catalogado como carcinógeno por la IARC (Marín, 2003).

En comparación a los adultos los más susceptibles al mercurio son los niños, en ellos puede provocar daños en el sistema nervioso y digestivo, y además lesiones en el riñón. En el embarazo puede pasar de la madre hacia el feto, lugar en donde puede acumularse y provocar daño cerebral, retardo mental, incapacidad para hablar, ceguera, etc., también puede ser transmitido al niño a través de la leche materna (A.T.S.D.R., 1999); la reducción del campo visual irreversible, dificultad auditiva, igualmente irreversible, ataxia, parálisis y muerte son producidos por los derivados orgánicos. Los efectos dependen de la dosis, los dos primeros se producen a bajas concentraciones y los últimos a elevadas concentraciones del tóxico; además son teratógenos y afectan al feto causando retardo mental y deficiencias neuromusculares (Doadrio, 2004).

La Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) han establecido que el cloruro de mercurio y el metilmercurio son posibles carcinógenos para los seres humanos (grupo 2B), de igual modo concluyen que el mercurio metálico y los compuestos orgánicos de mercurio no son clasificados en lo que respecta a carcinogenicidad para los seres humanos (grupo 3) (Sánchez, 2011).

2.2.4. Resistencia e interacciones bacterianas a metales pesados

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes 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 (Vullo, 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. A veces estos mecanismos pueden ser en beneficio y otros en perjuicio del organismo, ya que la naturaleza de la interacción microorganismo-metal 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).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005), entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular. Actualmente, existe una gran cantidad de información sobre los genes que codifican transportadores de metales pesados, caracterizados a niveles bioquímico y estructural, esto es 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. Algunos de estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula frente a metales potencialmente dañinos, así como frente a las especies que estos producen al interactuar con los componentes celulares (Brown *et al.*, 2006); otros están muy especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas, confiriéndoles la capacidad de resistencia a metales pesados (Nies, 2003).

Se ha observado que los plásmidos aislados de diferentes bacterias grampositivas y gramnegativas codifican la resistencia a los metales pesados. Ciertos plásmidos que confieren resistencia a antibióticos también contienen genes para la resistencia al mercurio y al arsénico. 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).

Con relación al mercurio, a concentraciones suficientemente altas, el Hg^{2+} y el CH_3Hg^+ son tóxicos no sólo para los organismos superiores, sino también para los microorganismos. A pesar de todo, algunas bacterias pueden llevar a cabo la biotransformación del mercurio tóxico en formas no tóxicas. En las bacterias gramnegativas resistentes al mercurio, la enzima mercúrico-reductasa ligada a NADPH reduce el Hg^{2+} a Hg^0 , que es volátil pero no resulta tóxico para los humanos ni los microorganismos. La conversión bacteriana del Hg^{2+} en Hg^0 permite convertir más CH_3Hg^+ en Hg^{2+} (Madigan *et al.*, 2009).

En las bacterias gramnegativas *Pseudomonas aeruginosa*, los genes de resistencia al mercurio residen en un plásmido. Estos genes, denominados genes *mer*, están organizados en un operón bajo el control de la proteína reguladora MerR (Figura 5). MerR funciona como represor y como activador de la transcripción. En ausencia del Hg^{2+} , MerR funciona como un represor y se une a la región operadora del operón *mer*, lo que impide la transcripción de *merTPCAD*. Sin embargo, cuando hay Hg^{2+} , éste forma un complejo con MerR que activa la transcripción del operón *mer*. La proteína MerP es una proteína de unión a Hg^{2+} periplásmica. MerP se une al Hg^{2+} y lo transfiere

a la proteína de membrana MerT, que transporta el Hg^{2+} al interior de la célula para que lo reduzca la mercurio-reductasa. El resultado final es la reducción del Hg^{2+} a Hg^0 (que, como ya se ha expuesto, es volátil y no es tóxico) y la liberación del Hg^0 desde la célula (Figura 5b), (Madigan *et al.*, 2009).

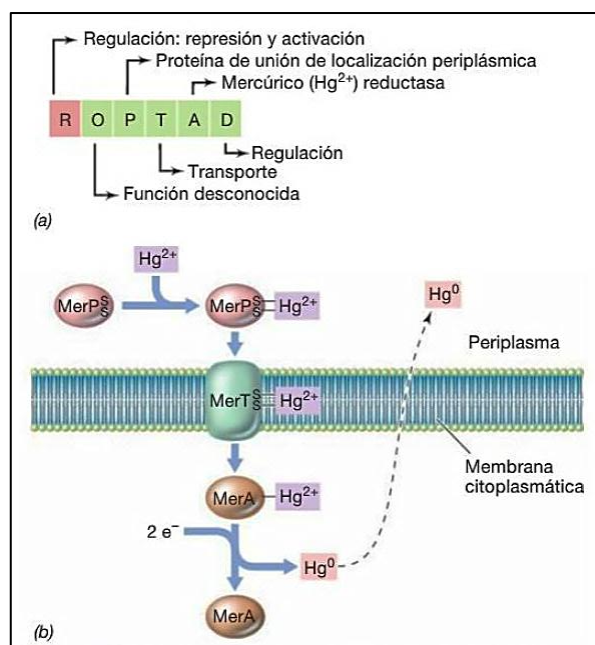


Figura 5. Mecanismo de reducción del Hg^{2+} a Hg^0 en *Pseudomonas aeruginosa*. (a) El operón *mer*. MerR actúan como represor (en ausencia de Hg^{2+}) o como activador de la transcripción (en presencia de Hg^{2+}). (b) Transporte y reducción del Hg^{2+} . El Hg^{2+} se une a los restos de cisteína tanto en MerR como en MerT.

Fuente: Madigan *et al.* (2009).

2.2.5. Microorganismos del medio acuático

La microbiología de las aguas se ocupa del estudio de las relaciones que mantienen los microorganismos con su medio ambiente, dicho de otro modo con el agua; y con los demás organismos que se encuentran ahí presentes. Los microorganismos más abundantes que albergan las diferentes masas de aguas que existen en nuestro planeta son: bacterias, cianofíceas, hongos, protozoos, algas y virus. Las bacterias y cianofíceas de acuerdo a su estructuración morfológica son células procariotas mientras que el resto, a excepción de los virus, son células eucariotas (Marín, 2003). La presencia de gran cantidad de microorganismos en un cuerpo de agua indica un alto nivel de nutrientes. El agua contaminada por sistemas de aguas cloacales o residuos orgánicos biodegradables contiene una cantidad relativamente elevada de bacterias (Tortora *et al.*, 2007).

2.2.4.1. Características generales de las bacterias

Las bacterias están incluidas en el reino Monera, modernamente su clasificación se realiza bajo criterios de composición de su ADN, o bien por aspectos morfológicos y es susceptible de periódica modificación. Son microorganismos procariotas, en general de menor tamaño que los organismos eucariotas pero mayores que los virus. En función de la naturaleza y tipo de la pared celular se agrupan en tres grandes divisiones: *micoplasmas*, que no sintetizan una pared celular y sólo tienen membrana celular; *bacterias grampositivas*, que sintetizan una pared celular de una capa; *bacterias gramnegativas* que poseen una pared celular con al menos dos capas estructuralmente distintas. Para clasificar las bacterias como grampositivas o negativas se usa un tipo de tinción especial, la tinción de Gram, que sirve para poner de manifiesto la estructura de la pared celular del individuo (Marín, 2003).

2.2.6. Bacterias presentes en el medio acuático

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. Cuando estos microorganismos se introducen en el agua, las condiciones ambientales son muy diferentes y por lo tanto su capacidad de reproducirse y de sobrevivir son limitadas. Debido a que su detección y recuento a nivel de laboratorio son lentos y laboriosos, se ha usado el grupo de las bacterias coliformes como indicadores, ya que su detección es más rápida y sencilla (Craun *et al.*, 1997).

La flora bacteriana de cualquier agua la conforman dos grupos típicos: (a) *bacterias autóctonas*, con hábitat en el agua y que sólo pueden desarrollarse óptimamente aquí, y (b) *bacterias procedentes de otros biótopos*, especialmente bacterias procedentes de la tierra. Además, sobre las aguas superficiales cae constantemente una lluvia de bacterias procedentes del aire. Todas estas bacterias ocasionales únicamente permanecen vivas en el agua un tiempo limitado, que si se dilata las convierte en organismos facultativos de las aguas (Marín, 2003).

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana debido a que estos son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal

tanto del hombre como de los animales de sangre caliente, están presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades, permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas y se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección (Arcos *et al.*, 2005).

Los microorganismos que conforman el grupo de los coliformes totales; *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, viven como saprófitos independientes o como bacterias intestinales; los coliformes fecales (*Escherichia*) son de origen intestinal (Canosa, 1995). Todos pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no esporulantes, fermentadores de lactosa con producción de gas; constituyen aproximadamente el 10% de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales (Prescott *et al.*, 1996).

Las bacterias del tracto intestinal no suelen sobrevivir en el medio acuático, 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 presencia de coliformes en el agua indica la contaminación bacteriana reciente y constituye un indicador de degradación de los cuerpos de agua (Fernández *et al.*, 2001).

El contenido bacteriano es muy variable dependiendo del tipo de agua, concentración de sales inorgánicas y sustancias orgánicas, enturbiamiento, iluminación y temperatura. En este sentido, las bacterias marinas son diferentes de las de las aguas dulces, y a su vez, las de los ríos suelen ser distintas a las habituales de los medios lacustres (Marín, 2003).

2.2.5.1. Género: *Staphylococcus*

Concepto y características del Género *Staphylococcus*

De acuerdo con la última edición del Manual de Bergey's, en la Sección XIV van a encontrarse cocos grampositivos aerobios y anaerobios facultativos que se clasifica dentro de tres familias: la Familia *Micrococaceae*, la Familia *Streptococaceae* y Familia

Peptococaceae. La primera incluye los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus*, y *Planococcus*, siendo *Staphylococcus* fundamentalmente el que presenta mayor interés clínico (Granados y Villaverde, 2003).

El nombre del género *Staphylococcus* se refiere a que estos cocos grampositivos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas (Murray *et al.*, 2014), los estafilococos son células esféricas grampositivas por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas. Se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso (Brooks *et al.*, 2011).

Aunque los estafilococos tienen una marcada tendencia a formar racimos (del griego *staphyle*, racimo de uvas), también se pueden observar células solas, en pares o en cadenas cortas. Los estafilococos tienen una estructura grampositiva típica en cuanto a su pared celular. Al igual que todos los cocos medicamente importantes, son no flagelados, no móviles y no forman esporas. Los estafilococos se desarrollan mejor en condiciones aeróbicas, pero son anaerobios facultativos (Ryan *et al.*, 2011); incluye a bacterias grampositivas, anaerobias facultativas y que fermentan azúcares con formación de ácido láctico, como uno de los productos principales. Se diferencian de las bacterias del ácido láctico en que pueden realizar metabolismo respiratorio y en que sus requerimientos nutricionales son menos exigentes (Marín, 2003).

Los miembros del género *Staphylococcus* (estafilococos) son cocos grampositivos que tienden a disponerse en racimos similares a uvas (Ryan *et al.*, 2011), los cocos grampositivos son un grupo heterogéneo de bacterias. Las características que tienen en común son su forma esférica, su reacción a la tinción de Gram y la ausencia de endosporas (Murray *et al.*, 2014), el género *Staphylococcus* corresponde a cocos grampositivos inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas y de tamaño entre 0.5 y 2 micrómetros. Se agrupan en forma de racimos, producen catalasa en su metabolismo y degradan por fermentación los azúcares (Granados y Villaverde, 2003), en contraste con los estreptococos, los estafilococos producen catalasa (Ryan *et al.*, 2011), las catalasas son enzimas que convierten peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso (Murray *et al.*, 2014).

Se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso (Brooks *et al.*, 2011), crecen bien en medios generales y son bastante resistentes a muchos agentes externos; de ahí su amplia distribución en la naturaleza (Granados y Villaverde, 2003), crecen rápidamente en casi todos los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerofílicas. Se desarrollan con más rapidez a una temperatura de 37°C pero forman pigmento mejor a una temperatura ambiente (20 a 25°C) (Brooks *et al.*, 2011).

2.2.5.2. Género: *Streptococcus*

Concepto y características del Género *Streptococcus*

De acuerdo con la última edición del Manual de Bergey's, se considera al género *Streptococcus* englobado dentro de la Sección XIV y con carácter propio (Granados y Villaverde, 2003).

El género *Streptococcus* es un grupo formado por diversos cocos grampositivos que normalmente se disponen en parejas o en cadenas (a diferencia de los racimos formados por *Staphylococcus*). La mayoría de las especies son anaerobios facultativos, y algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (crecimiento capnofílico) (Murray *et al.*, 2014), los estreptococos son bacterias esféricas grampositivas que de manera característica forman pares o cadenas durante su multiplicación, tienen una amplia distribución en la naturaleza (Brooks *et al.*, 2011), los estreptococos van a corresponder a cocos grampositivos de tamaño relativamente pequeño (entre 1 y 1,5 micrómetros de diámetro), anaerobios facultativos y que se disponen en pares y sobretodo en cadenas (Granados y Villaverde, 2003).

Los estreptococos se tiñen con las tinciones comunes y demuestran células coccas que en general son más pequeñas y con una apariencia más ovalada que los estafilococos. En general están dispuestas en cadenas con células ovales que se tocan una a otra, debido a que se dividen en un plano y tienden a permanecer unidas. La longitud puede variar desde un solo par hasta cadenas continuas de más de 30 células, dependiendo de la especie y de las condiciones de desarrollo (Ryan *et al.*, 2011), es uno de los géneros

representativos de las bacterias del ácido láctico, ya que se trata de anaerobios facultativos incapaces de realizar un metabolismo respiratorio, que crecen fácilmente sobre la superficie de medios sólidos expuestos al aire, pero que requieren para su ciclo vital de complejos factores de crecimiento integrados por varias vitaminas y aminoácidos (Marín, 2003).

Sus exigencias nutricionales son complejas, y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero. Son capaces de fermentar carbohidratos, proceso que produce ácido láctico, y son catalasa-negativos, a diferencia de las especies del género *Staphylococcus* (Murray *et al.*, 2014), son catalasa y oxidasa negativa y fermentan la glucosa con la producción consiguiente de ácidos (Granados y Villaverde, 2003), los estreptococos elaboran diversas sustancias y enzimas extracelulares (Brooks *et al.*, 2011), crecen mejor en medios enriquecidos en condiciones aerobias y anaerobias facultativas. Se prefiere el agar sangre debido a que satisface las necesidades de crecimiento y también sirve como un indicador de los patrones de hemólisis (Ryan *et al.*, 2011).

Los estreptococos fecales, incluyen un número de especies que se encuentran en las heces de los humanos y animales de sangre caliente. Esto es muy importante, ya que la contaminación fecal causada por animales puede involucrar riesgos sanitarios, por lo que hay que tener en cuenta los microorganismos más abundantes y frecuentes en las heces de los animales. En todos ellos se encuentran coliformes y Estreptococos fecales, aunque son más abundantes los estreptococos fecales (Fernández *et al.*, 2001); estos no se multiplican en el medio ambiente, o si esto ocurre es solamente en raras ocasiones, son más persistentes en ambientes acuáticos y en suelos contaminados que *E. coli*. Son importantes en situaciones donde se sabe que hay contaminación fecal y no se detectan coliformes, como ocurre cuando las descargas son intermitentes o más antiguas, de modo que mueren los coliformes fecales y *E. coli*, y permanecen los estreptococos (Environment Agency, 2002).

Los estreptococos son un grupo extenso y heterogéneo de bacterias y ningún sistema es suficiente para clasificarlos. No obstante, es imprescindible comprender la clasificación para entender su importancia médica (Brooks *et al.*, 2011).

2.2.5.3. Género: *Serratia*

Concepto y características del Género *Serratia*

Granados y Villaverde (2003), menciona que el género *Serratia* corresponde a un grupo de microorganismos que pertenecen a la Familia Enterobacteriaceae, capaces de fermentar lentamente la lactosa y la glucosa, capaces de producir acetoina a partir de la degradación de glucosa, son móviles, utilizan el citrato como fuente de energía, producen ADNasa y orintín-descarboxilasa.

Las cepas de *Serratia* fermentan lactosa con lentitud (3 a 4 días), si acaso lo hacen. Algunas producen colonias características de color rojo ladrillo. Aunque menos común, este género produce la misma variedad de infecciones oportunistas que se observan con el resto de las enterobacterias (Ryan *et al.*, 2011).

Se comportan como saprófitas del hombre, aunque se pueden encontrar en el medio ambiente, como por ejemplo en el agua o en otros líquidos. Son resistente a los antibióticos e incluso a los desinfectantes (Granados y Villaverde, 2003), las cepas de *Serratia* muestran resistencia consistente a la ampicilina y cefalotina, con la adición frecuente de resistencia a diversos antimicrobianos, lo que incluye aminoglucósidos (Ryan *et al.*, 2011); una bacteria típica de este género que frecuentemente es hallado en suelos y aguas es *Serratia marcescens* que posee como característica propia la de apenas fermentar lactosa, y la de producir muy poca o ninguna cantidad de gas en la fermentación de glucosa. Además, muchas cepas de *Serratia* son capaces de producir un pigmento celular rojo, la prodigiosina, siendo un derivado pirrólico (Marín, 2003).

2.2.5.4. Género: *Klebsiella*

Concepto y características del Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* se consideran por ser enterobacterias inmóviles, fermentadoras rápidas de lactosa, productora de acetoina a consecuencia de la utilización de la glucosa, crece en medios de citrato utilizándolo como fuente de carbono y en su mayoría son capaces de alcalinizar los medios ricos en urea (actividad ureasa positiva) (Granados y Villaverde, 2003).

Las características bacteriológicas más distintivas del género *Klebsiella* son la ausencia de motilidad y la presencia de una cápsula de polisacáridos. Esto da a las colonias su aspecto mucoso, brillante y forma la base para el sistema de serotipificación. De todas las enterobacterias, *Klebsiella* se encuentra entre las más resistentes a los antimicrobianos, a menudo es resistente a múltiples fármacos (Ryan *et al.*, 2011).

2.2.5.5. Género: *Enterobacter*

Concepto y características del Género *Enterobacter*

Estas bacterias fermentan lactosa, también pueden contener cápsulas que producen colonias mucoides y son móviles (Brooks *et al.*, 2011), al género *Enterobacter* se le considera como enterobacteria capaz de fermentar rápidamente la lactosa con producción de ácido y gas, así como de degradar la glucosa con producción de acetoina; utiliza el citrato como fuente de energía, lo que la diferencia claramente de *Escherichia*. Es una cepa móvil que no sintetiza ADNasa, pero es capaz de producir ornitín-descarboxilasa (Granados y Villaverde, 2003).

Las bacterias del género *Enterobacter* por lo común fermentan lactosa con rapidez y producen colonias similares a las de *Klebsiella*, aunque no tienen el aspecto mucoso. Una característica diferencial es su motilidad por flagelos peritricos, que por lo común están presentes en bacterias del género *Enterobacter*, pero que se encuentran ausentes de manera uniforme en bacterias del género *Klebsiella*. El género *Enterobacter*, por lo común es menos virulento que *Klebsiella* (Ryan *et al.*, 2011), y la bacteria prototipo del grupo es *Enterobacter aerogenes*, común en suelo y aguas, y en alguna ocasión localizada en el tracto intestinal. Como característica típica, algunas cepas de este género están capacitadas para efectuar la fijación de nitrógeno en condiciones anaeróbicas, propiedad que las distingue de las demás cepas entéricas (Marín, 2003).

Además de la ampicilina, son resistentes a cefalosporinas de primera generación, pero pueden ser susceptibles a generaciones más avanzadas de cefalosporinas; no obstante, con frecuencia relativa ocurre la producción de mutantes que elaboran betalactamasas y confieren resistencia a muchas cefalosporinas (Ryan *et al.*, 2011), la mayor parte de las cepas poseen una lactamasa β cromosómica denominada *ampC* que las vuelven

intrínsecamente resistentes a la ampicilina y a las cefalosporinas de primera y segunda generaciones. Las mutantes suelen producir en exceso lactamasa β que confiere resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (Brooks *et al.*, 2011).

2.2.5.6. Género: *Escherichia*

Concepto y características del Género *Escherichia*

Son bacterias gramnegativas aerobias y anaerobias facultativas, fermentadoras rápidas de lactosa y glucosa con producción de ácido y gas; no producen SH_2 (hidrógeno sulfurado), no utilizan el citrato y, salvo excepciones, producen indol a partir del agua peptonada, prueba muy característica de *Escherichia* (Granados y Villaverde, 2003).

La mayor parte de las cepas de *E. coli* fermentan lactosa con rapidez y producen indol. Estas y otras acciones bioquímicas son suficientes para separarlas de otras especies (Ryan *et al.*, 2011), es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Esta bacteria se asocia a múltiples enfermedades, que incluyen la gastroenteritis e infecciones extraintestinales, como las ITU, meningitis y sepsis. Multitud de cepas son capaces de producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia, posee una amplia variedad de factores de virulencia. Además de los factores generales que comparten todos los miembros de la Familia Enterobacteriaceae, las cepas de *Escherichia* poseen unos factores de virulencia especializados que se pueden clasificar en dos categorías generales: adhesinas y exotoxinas (Murray *et al.*, 2014). Suele producir pruebas con positividad para indol, lisina descarboxilasa y fermentación de manitol y produce gas a partir de glucosa (Brooks *et al.*, 2011).

En el tubo digestivo existen grandes cantidades de *E. coli* aunque estos microorganismos pueden comportarse como patógenos oportunistas cuando los intestinos se perforan y las bacterias acceden a la cavidad peritoneal, la mayor parte de *E. coli* que causan enfermedad digestiva y extraintestinal lo hacen porque han adquirido factores de virulencia específicos codificados en plásmidos o en ADN de bacteriófagos (Murray *et al.*, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

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 provenientes del río Ramis (Figura 6). Las muestras se colectaron en botellas de vidrio con tapa rosca de 1 litro de capacidad, previamente lavadas y enjuagadas con agua destilada y debidamente esterilizadas por autoclavado a vapor. En el muestreo se tomaron tres muestras contracorriente: 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. Dichas muestras fueron colocadas a 4°C en una caja conservadora con bolsas de hielo seco, de acuerdo a lo mencionado por Ara *et al.* (2007), hasta su transporte al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, donde fueron procesadas.



Figura 6. Zona de recolección de muestras de agua del Río Ramis, durante los meses de diciembre del 2016 a enero del 2017.

Fuente: Google Maps.

3.2. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación fue experimental y analítico, debido a que se realizó la cuantificación bacteriana de las aguas del río Ramis mediante las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y también se determinó la resistencia de la comunidad bacteriana en tratamientos con plomo, mercurio y la combinación de estos metales pesados.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

Población:

Para la investigación comprendió la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis - San Antón.

Muestra:

El número total de muestras evaluadas fueron tres, en cada punto se hizo el muestreo correspondiente y se realizó tres repeticiones para cada muestra.

3.4. METODOLOGÍA

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

3.4.1.1. Aislamiento y cuantificación bacteriana

El aislamiento y la cuantificación bacteriana se realizaron de la siguiente manera:

Método de aislamiento por vertido en placa: también llamado método de dilución o vaciado en placa proporciona por lo general placas con un número apropiado de colonias y se basa en una dilución aproximadamente cuantitativa de la muestra original en un medio sólido (Bailón *et al.*, 2003).

Para aislar la comunidad bacteriana a partir de las muestras de agua provenientes del río Ramis, se aplicó la metodología propuesta por Camacho *et al.* (2009), la cual fue de la siguiente manera:

Primero, se distribuyó las placas Petri en la mesa de trabajo de manera que la inoculación y la adición de medio de cultivo se puedan realizar cómoda y libremente. Marcando las bases de las placas con los datos pertinentes. Después, 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 de cultivo preparado con agar Müeller Hinton (elevándose el pH del medio a 8 con Hidróxido de sodio midiéndolas a través de tiras reactivas de pH). Para mezclar, se homogenizó mediante movimientos de derecha a izquierda en el sentido de las manecillas del reloj, en sentido contrario y de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidando que el medio no moje la cubierta de las placas. Posteriormente se dejó solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las placas, no debe exceder de 20 minutos. Finalmente, se incubó las placas en posición invertida durante 4 días a temperatura de 25°C.

Método de recuento en placa o recuento de microorganismos viables: la técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho *et al.*, 2009).

Con este método se puede distinguir entre células viables y no viables; esto se logra sembrando diluciones de las muestras que contienen los microorganismos en medios de cultivos sólidos dispensados en placas Petri, incubando y posteriormente realizando el conteo de las colonias visibles (la metodología puede ser aplicada en la superficie del agar o dentro del agar). Estas colonias a su vez, son multiplicadas por el factor inverso de la dilución (o diluciones). Con esta metodología y con el objetivo de reducir el error estadístico, se recomienda realizar suficientes réplicas de las mismas diluciones, así como, de las diferentes diluciones a utilizar. Adicionalmente, el conteo y cálculo de la

población de viables, se debe realizar en placas que contengan entre 30 y 300 colonias (algunos autores reportan el rango de 50 a 300) (Rojas, 2011).

Para la cuantificación bacteriana, se aplicó la metodología propuesta según Ara *et al.* (2007), para el recuento del número total de bacterias mesófilas viables, primero se realizó el método de vertido en placa, usando como medio de crecimiento Agar Müeller Hinton. Cada muestra se trabajó por triplicado, y la incubación fue a 25°C por 4 días. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento en las diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; tal como se observa en la Figura 7.

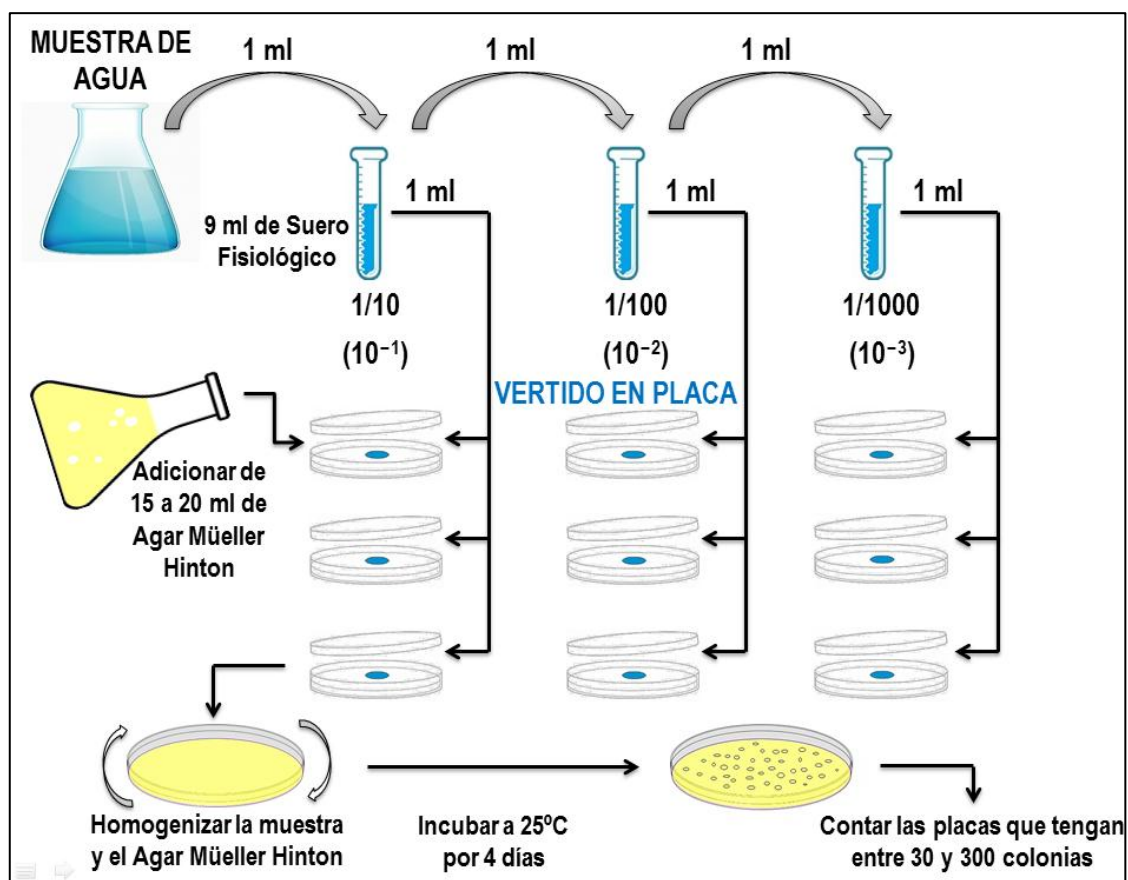


Figura 7. Procedimiento del recuento en placa por el método de vertido en placa

Fuente: (elaboración propia).

3.4.1.2. Aislamiento a cultivo puro e identificación bacteriana

El aislamiento a cultivo puro o axénico y la identificación bacteriana se realizó de la siguiente manera:

Método de aislamiento de cultivo puro por técnica de estría cruzada en placa: los cultivos puros están formados por un solo tipo de microorganismo; y son indispensables para conocer las características morfológicas, propiedades de tinción, actividad bioquímica, patogenicidad, sensibilidad a antibióticos e identificación de las especies microbianas (Aquiahuatl y Pérez, 2004).

Para hacer el aislamiento a cultivo puro o axénico, 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 las siguientes pruebas bioquímicas: TSI, LIA, Citrato de Simmons, Urea, SIM.

La técnica de cultivo que se utilizó fue la de estría cruzada en placa, donde se aplicó la metodología según Aquiahuatl y Pérez (2004), la cual fue de la siguiente manera:

Primero, en la parte posterior y exterior de la placa con agar Müeller Hinton, se dividió en cuatro cuadrantes. Se tomó una colonia bacteriana con el asa de Kolle de punta circular previamente flameada y fría, en el momento de inocular la colonia se hizo 4-5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la placa, cerrando la placa para evitar contaminación. Después, se flameó el asa de inoculación en el mechero y luego se giró la placa Petri un cuarto de vuelta. Al abrir nuevamente la placa, se enfrió el asa de siembra tocando la superficie del medio lejos de la zona de estrías recién hechas. Seguidamente, se rozó con el asa una vez la superficie del conjunto original de estrías y se hizo un segundo grupo de estrías en el segundo cuadrante como en el caso anterior. Finalmente, se repitió el procedimiento en el tercer cuadrante y al efectuar la siembra en el último cuadrante, no se flameó el asa de siembra solo se hizo una estría más abierta (Figura 8).

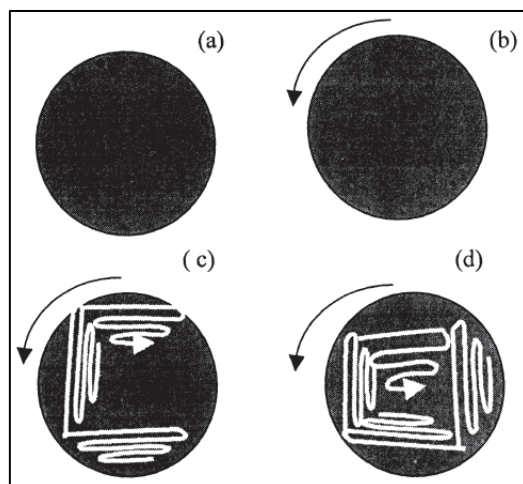


Figura 8. Aislamiento de bacterias por estría cruzada en placa.

Fuente: Aquiahuatl y Pérez (2004).

Método de Tinción Gram: esta tinción separa las bacterias en dos grandes grupos, las grampositivas que retienen el primer colorante usado (cristal violeta) y las gramnegativas que se tiñen con el segundo colorante (safranina). Estas diferencias están basadas en la estructura y composición química de la pared celular. Las grampositivas tienen una pared gruesa de péptidoglicano y además, muchas de estas especies presentan ácidos teicoicos en la pared. Las gramnegativas contienen menos péptidoglicano y su capa es mucho más delgada, pero está rodeada de una bicapa más externa de lípidos, llamada membrana externa (Olivas, 2012).

Para realizar la tinción Gram, primeramente se tomó un pequeño inóculo del cultivo puro con la ayuda de un asa de siembra para extenderlo en una lámina portaobjeto y se fijó con la flama de un mechero. Después, se vertió sobre el frotis cristal violeta dejándolo actuar por 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se lavó con abundante agua destilada, teniendo mucho cuidado. Luego, se cubrió el frotis con lugol, y se dejó actuar por 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se lavó con abundante agua destilada, teniendo mucho cuidado. Seguidamente, se cubrió con solución decolorante (alcohol-acetona), por 30 segundos. Transcurrido el tiempo, se lavó con abundante agua destilada, teniendo mucho cuidado. Por último, se cubrió con colorante de contraste (safranina), y se dejó actuar por 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se lavó con agua de la llave y teniendo mucho cuidado se escurrió con un papel secante por la parte inferior de la lámina portaobjeto. La preparación teñida se secó al aire, dejando la lámina en posición inclinada.

Finalmente, las preparaciones teñidas se llevaron a observar al microscopio óptico compuesto de marca Zeiss con el objetivo de 100X, añadiendo una pequeña gota de aceite de inmersión.

Prueba de la catalasa: la catalasa es una enzima que está relacionada con microorganismos aeróbicos (excluyendo a los *Streptococcus*) y anaeróbicos facultativos y ausente en los anaeróbicos estrictos. Esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno se forma como de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de carbohidratos. Si se deja acumular, el peróxido de hidrógeno es letal para la célula bacteriana. La prueba de catalasa llevada a cabo en portaobjetos es útil para diferenciar estreptococos (catalasa negativa) de estafilococos (catalasa positiva), (Sanabria y Mercedes, 2001).

Para realizar esta prueba, se transfirió un inóculo de las bacterias a ensayar en una lámina portaobjetos y sobre ellas se agregó peróxido de hidrógeno (agua oxigenada). La interpretación de resultados se realizó de la siguiente manera: la aparición rápida y sostenida de burbujas de gas o efervescencia se consideró como reacción positiva, cuando no hubo aparición de burbujas se consideró como reacción negativa, y la aparición leve y diminuta de burbujas de gas al cabo de 20 a 30 segundos luego de adicionado el agua oxigenada, se consideró como una reacción negativa.

Cultivo en medios específicos y diferenciales:

Los *medios selectivos* son medios complejos que contienen sustancias que sólo permiten que crezcan determinados microorganismos, o sustancias que estimulan el crecimiento de algunos microorganismos (González, 2010).

Los *medios diferenciales* son medios que contienen sustancias o indicadores que permiten la diferenciación de un microorganismo a otro. Por ejemplo, el agar MacConkey permite distinguir los microorganismos fermentadores de la lactosa de los no fermentadores por la coloración que toman (Sanabria y Mercedes, 2001).

Para el cultivo en medios diferenciales, se utilizaron el Agar MacConkey y Agar M-Endo LES; y para el cultivo en medios selectivos se utilizaron el Agar Base Salado

Manitol, Agar SS y Agar *Pseudomonas*. Todo ello, con el fin de poder diferenciar e identificar las colonias aisladas en cultivo puro. Las placas preparadas y contenidas con medio de cultivo diferencial y selectivo fueron divididas en partes iguales conforme a la cantidad de colonias que se iba a identificar, para ello; con un lapicero indeleble fueron divididas en partes iguales en la base de la placa. La siembra en cada medio de cultivo mencionado se hizo con la ayuda de un asa de Kolle de punta circular previamente flameada y fría, después las placas se llevaron a incubación a temperatura de 25°C por 4 días. Terminado el tiempo de incubación, se procedió a la lectura e identificación de acuerdo al medio de cultivo y al crecimiento dado en placa.

Pruebas Bioquímicas para Enterobacterias: TSI, LIA, Citrato de Simmons, Urea, SIM.

Es posible conocer las características metabólicas de los microorganismos por su inoculación en medios de cultivo con diversos sustratos que puedan ser utilizados como fuentes de energía, carbono, donadores de electrones, así como de otros nutrientes esenciales necesarios para su crecimiento. Existen numerosas pruebas bioquímicas con medios de cultivo adicionados de indicadores de pH para detectar la producción de ácido o álcali, con inhibidores selectivos como bilis, cianuro o con colorantes, sulfuros, etc., que facilitan la determinación de diferentes actividades metabólicas. Las actividades que se evalúan con mayor frecuencia son: capacidad para fermentar carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa), para catabolizar aminoácidos y urea, la producción de enzimas hidrolíticas específicas de tipo endo o exo como oxidasas, reductasas, amilasas, lipasas, etc., (Aquiahuatl *et al.*, 2012).

Para las pruebas bioquímicas se utilizaron los siguientes medios de cultivo diferenciales: Agar Triple Azúcar y Hierro, Agar Lisina y Hierro, Agar Citrato de Simmons, Agar Base Urea, y Medio SIM.

En tubos de ensayo con tapa rosca, se preparó los medios diferenciales tal como indica la marca y el envase siguiendo su protocolo de preparación. La forma de sembrado e incubación en los medios mencionados es distinta, asimismo en la lectura e interpretación de resultados. En tal sentido, para cada medio se realizó de la siguiente forma:

- a. **Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI):** la siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró por picadura en la columna vertical y estría en la superficie inclinada. Llevándolo a incubación a 25°C de 18 a 24 horas. La lectura de resultados se hizo de acuerdo a la tabla de reacciones bioquímicas de las Enterobacterias (Tabla 1).

- b. **Agar Lisina y Hierro (LIA):** la siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró por picadura en la columna vertical y estría en la superficie inclinada. Llevándolo a incubación a 25°C de 18 a 24 horas. La lectura de resultados se hizo de acuerdo a la tabla de reacciones bioquímicas de las Enterobacterias (Tabla 1).

- c. **Agar Citrato de Simmons:** la siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró en forma de estría única en la superficie inclinada. Llevándolo a incubación a 25°C de 18 a 24 horas. En la lectura de resultados, se consideró como prueba positiva si el medio vira a un color azul oscuro, y se consideró negativa cuando el medio conserva su color verde original.

- d. **Agar Base Urea:** la siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró en forma de estría única en la superficie inclinada. Llevándolo a incubación a 25°C de 18 a 24 horas. En la lectura de resultados, se consideró como prueba positiva si el medio vira a un color rosado oscuro, y se consideró negativa cuando el medio conserva su color amarillo original.

- e. **Medio SIM:** la siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró por picadura en forma vertical. Llevándolo a incubación a 25°C de 18 a 24 horas. En la lectura de resultados, el microorganismo es móvil cuando se observó turbidez en todo el medio, mientras que si es inmóvil sólo hay crecimiento en la línea de siembra. Si se forma un precipitado negro pone de manifiesto la formación de Hidrogeno de Sulfuro (H₂S) positivo. La presencia de Indol da lugar a una coloración rojo-púrpura al añadir el reactivo de Kovacs.

Tabla 1. Reacciones Bioquímicas de las Enterobacterias.

GRUPO I HIDRÓGENO SULFURADO (H ₂ S) POSITIVO								
ANAEROGÉNICOS (GAS NEGATIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	-	- o +	K/K	-	-	-	+	<i>Salmonella typhi</i>
AEROGÉNICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	2+	4+	K/K	-	+	-	+	<i>Salmonella</i>
K/A o A/A	2+	4+	K/K	-	+	-	+	<i>Arizona</i>
K/A o A/A	2+	4+	K/A	-	+	-	+	<i>Citrobacter</i>
K/A o A/A	2+	4+	R/A	- o +	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	2+	4+	K/K	+	-	-	+	<i>Edwarsiella</i>
GRUPO II HIDRÓGENO SULFURADO (H ₂ S) NEGATIVO								
ANAEROGÉNICOS (GAS NEGATIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	-	-	K/A	- o +	-	-	-	<i>Shigella</i>
K/A o A/A	-	-	K/K o K/N	+	-	-	V	<i>Escherichia</i>
K/A o A/A	-	-	K/A	- o +	+	D	+ o V	<i>Enterobacter</i>
A/A	-	-	K/K	-	+	-	+ o V	<i>Serratia</i>
K/A	-	-	R/A	+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	-	-	R/A	+	+	-	- o +	<i>Providencia</i>
A/A	-	-	A/A o K/A	- o +	-	V	V	<i>Yersinia</i>
AEROGÉNICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
A/A o K/A	2+	-	K/K o K/A	+	-	-	V	<i>Escherichia</i>
A/A	4+	-	K/K	- o +	+	+	-	<i>Klebsiella</i>
A/A o K/A	3+	-	K/K o K/A	-	+	D	+ o V	<i>Enterobacter</i>
K/A o A/A	2+	-	K/K	-	+	-	+ o V	<i>Serratia</i>
K/A	+	-	K/A o R/A	+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	+	-	K/A o A/A	-	+	-	V	<i>Paratyphi A.</i>
NO FERMENTADORES								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/K o K/N	-	-	K/A	-	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>

K: Alcalino R: Rojo D: Diferentes reacciones
 A: Ácido N: Neutro V: Variable

Fuente: Según el Instituto Nacional de Salud (2001).

3.4.1.3. Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorio, los tratamientos correspondieron a la lugar de donde procedió las muestras de agua (tres muestras de agua, las tres de un solo punto de muestreo), todas estas formaron un total de tres unidades experimentales.

Los recuentos bacterianos de las muestras de agua del río Ramis, fueron sujetos a pruebas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación); seguidamente se realizó el análisis de varianza y prueba de medias Tukey ($P \leq 0.05$) con el fin de comparar entre las muestras, 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 (Balzarini *et al.*, 2008).

La Media: la media aritmética, o simplemente media o promedio, es una medida descriptiva de tendencia central cuyo único número resume una serie de valores a partir de los cuales se calcula. Es obtenida sumando todos los valores de la población y dividiendo el total entre el número de valores que se sumaron (Celis y Labrada, 2014).

$$\text{Media} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} = \mu$$

Donde $\sum_{i=1}^N x_i$ indica que hay que sumar todas las equis (x) disponibles, desde x_1 hasta x_N . La secuencia de valores que deben sumarse se especifica mediante los símbolos N e $i = 1$ que aparecen arriba y abajo de la letra griega \sum (sigma). El resultado tiene la misma unidad de medida que las lecturas individuales. La media se representa simbólicamente mediante la letra griega μ (mu) cuando se obtiene de datos poblacionales, y mediante \bar{x} cuando se estima a partir de una muestra aleatoria simple. La media es el resultado matemático que sintetiza los datos en una sola cifra, y no debemos olvidar que únicamente describe al grupo como tal y no a cada uno de sus elementos (Celis y Labrada, 2014).

Desviación Estándar: la desviación típica o desviación estándar es una medida de dispersión expresada en las unidades originales, que es igual a la raíz cuadrada de la varianza (Celis y Labrada, 2014). Se escribe de la siguiente manera:

$$s = \sqrt{s^2}$$

Donde, S es la desviación estándar y S^2 es la varianza.

Coefficiente de Variación: el coeficiente de variación (CV) es una medida útil porque mide la dispersión en forma relativa, y permite una interpretación más objetiva de la variabilidad (Rustom, 2012). La fórmula es la siguiente:

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} * 100\%$$

Dónde:

CV = coeficiente de variación.

S = desviación estándar de la muestra.

\bar{x} = media aritmética de la muestra.

Análisis de varianza: permite probar hipótesis referidas a los parámetros de posición (esperanza) de dos o más distribuciones. La hipótesis que se somete a prueba generalmente se establece con respecto a las medias de las poblaciones en estudio o de cada uno de los tratamientos evaluados en un experimento (Balzarini *et al.*, 2008).

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = observación del tratamiento.

μ = promedio general.

t_i = efecto del tratamiento i .

ϵ_{ij} = término de error aleatorio asociado a la observación Y_{ij} .

En tal sentido, en las pruebas estadísticas evaluadas:

Si el resultado es $p < 0,05$ indica que las pruebas son significativas.

Si el resultado es $p > 0,05$ indica que las pruebas no son significativas.

Prueba de Tukey: es un procedimiento el cual calcula como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una cantidad (DMS) basada en el cuantil correspondiente de la distribución de rangos estudentizados (Balzarini *et al.*, 2008).

$$W_{ij} = q \times CMER$$

Dónde:

W_{ij} = comparador para el par de tratamientos ij .

q = valor de la tabla de Tukey, con grados de libertad de tratamientos y grados de libertad del error.

CME = cuadrado medio del error, y r = son las repeticiones de los tratamientos.

3.4.2. 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 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.2.1. Preparación de las soluciones de metales pesados

Para la preparación se trabajó con Nitrato de plomo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$] y con Cloruro de mercurio [HgCl_2], 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; lo cual se detalla a continuación:

Sabiendo que el peso molecular del Nitrato de plomo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$], 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 diluciones a través de la ecuación: $C_1V_1 = C_2V_2$.

i) Para la obtención de la solución de 200 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de Pb, se reemplazó:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000\ 000\ \mu\text{g/l}) (V_1) = (200\ \mu\text{g/l}) (240\ \text{ml})$$

$$V_1 = \frac{(200\ \mu\text{g/l}) (240\ \text{ml})}{1000\ 000\ \mu\text{g/l}}$$

$V_1 = 0.048$ ml de la solución stock y aforar a 240 ml de agua destilada.

ii) Para la obtención de la solución de 500 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de Pb, se reemplazó:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000\ 000\ \mu\text{g/l}) (V_1) = (500\ \mu\text{g/l}) (240\ \text{ml})$$

$$V_1 = \frac{(500\ \mu\text{g/l}) (240\ \text{ml})}{1000\ 000\ \mu\text{g/l}}$$

$V_1 = 0.12$ ml de la solución stock y aforar a 240 ml de agua destilada.

iii) Para la obtención de la solución de 1000 µg/ml de concentración de Pb, se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$(1000\ 000\ \mu\text{g/l}) (V_1) = (1000\ \mu\text{g/l}) (240\ \text{ml})$$

$$V_1 = \frac{(1000\ \mu\text{g/l}) (240\ \text{ml})}{1000\ 000\ \mu\text{g/l}}$$

$V_1 = 0.24$ ml de la solución stock y aforar a 240 ml de agua destilada.

iv) Para la obtención de la solución de 2000 µg/ml de concentración de Pb, se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$(1000\ 000\ \mu\text{g/l}) (V_1) = (2000\ \mu\text{g/l}) (240\ \text{ml})$$

$$V_1 = \frac{(2000\ \mu\text{g/l}) (240\ \text{ml})}{1000\ 000\ \mu\text{g/l}}$$

$V_1 = 0.48$ ml de la solución stock y aforar a 240 ml de agua destilada.

3.4.2.2. Experimentación de la resistencia bacteriana al plomo y al mercurio

Método de la escala o patrón de McFarland: es una técnica basada en turbidimetría, la escala se basa en la capacidad de precipitación del Cloruro de Bario en presencia de Ácido Sulfúrico y su utilidad, es la de poder elaborar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón y valorando su concentración (Rojas, 2011).

Para la determinación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis que son resistentes *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 1.5×10^8 UFC/ml. Para ello, se trabajó con el Estándar McFarland de Turbidez de Equivalencia 0.5, de marca Remel, empleándolo de la siguiente forma:

Primero, se invirtió suavemente el Estándar McFarland de Turbidez de Equivalencia 0.5 para suspender completamente las micropartículas que contiene. En un tubo de ensayo de diámetro similar al Estándar McFarland de Turbidez de Equivalencia 0.5 (marca Remel), se preparó una suspensión bacteriana en suero fisiológico a partir de un cultivo puro y se comparó visualmente a la turbidez del Estándar McFarland (Figura 9).

La comparación visual, se realizó con una luz adecuada y se leyó los tubos contra la tarjeta blanca con líneas negras con el fin de contrastar ambos. Cuando hubo obliteración o distorsión igual de líneas negras indicó una coincidencia de turbidez. Una vez dado coincidencia, a través del método de vertido en placa se vertió 1 ml del tubo con suspensión bacteriana preparada con la ayuda de una jeringa estéril a la placa, para luego echar de 15 a 20 ml de medio de cultivo preparado consistente en agar Müeller Hinton a diferentes concentraciones, por cada metal y la combinación de estos mismos. Finalmente, se incubó las placas en posición invertida durante 4 días a temperatura de 25°C, finalizado este tiempo se realizó el recuento bacteriano que desarrollo, lo cual indica la resistencia a los metales.



Figura 9. Estandarización y comparación del inóculo, en el Laboratorio de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.

3.4.2.3. Análisis estadístico

Los tratamientos correspondieron a las bacterias inoculadas en cada concentración y en cada metal por separado y en combinación, más un control positivo sin metal, por tanto sin concentración. Los recuentos bacterianos obtenidos, fueron sujetos a pruebas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación); seguidamente se realizó el análisis con estructura factorial de tratamientos (3x4x6) y su

interacción, prueba de medias Tukey ($P \leq 0.05$) con el fin de comparar 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 (Balzarini *et al.*, 2008).

Análisis con estructura factorial de tratamientos (3x4x6): estos diseños se utilizan para estudiar los efectos producidos por dos o más factores tratamiento y generalmente sus interacciones. Cuando los tratamientos se definen mediante la combinación de los niveles de dos o más factores de interés, se dice que el diseño experimental involucra una estructura factorial de tratamientos (Balzarini *et al.*, 2008).

Según, Morales *et al.* (2009), los análisis de experimentos factoriales presentan muchas ventajas pero a su vez puede haber algunos inconvenientes:

- a. **Ventajas:** se logra una gran eficiencia en el uso de los recursos experimentales disponibles, además se obtiene información respecto a las diversas interacciones. Los resultados experimentales son aplicables a un rango de condiciones más amplio debido a las combinaciones de los diversos factores en un solo experimento y los resultados son de naturaleza más comprensiva. No obstante a ello, los experimentos factoriales son más eficientes que los experimentos simples.
- b. **Inconvenientes:** el resultado del experimento y el análisis estadístico resultante es más complejo. Con un gran número de combinaciones de tratamientos, la relación de unidades experimentales homogéneas es más difícil. Convencidos de que algunas de las combinaciones de tratamientos pueden ser de muy poco o ningún interés, algunos de los recursos experimentales pueden ser malgastados. Además, el número de tratamientos o combinaciones aumentan rápidamente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

4.1.1. Cuantificación bacteriana

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 correspondiente a 40 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde 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.

Tabla 2. Cuantificación bacteriana de las muestras de agua del río Ramis.

MUESTRA	Recuento bacteriano (UFC/ml) promedio de tres repeticiones			\bar{X} (UFC/ml)	D.S.	C.V. (%)
	Repetición I	Repetición II	Repetición III			
Muestra 1	$1,23 \times 10^3$	$1,11 \times 10^3$	$0,92 \times 10^3$	$1,09 \times 10^3$	0,16	14,38
Muestra 2	$1,67 \times 10^3$	$1,61 \times 10^3$	$1,46 \times 10^3$	$1,58 \times 10^3$	0,11	6,85
Muestra 3	$2,69 \times 10^5$	$2,51 \times 10^5$	$2,44 \times 10^5$	$2,55 \times 10^5$	0,13	5,06

\bar{X} = Promedio; D.S. = Desviación estándar; C.V. = Coeficiente de variación.

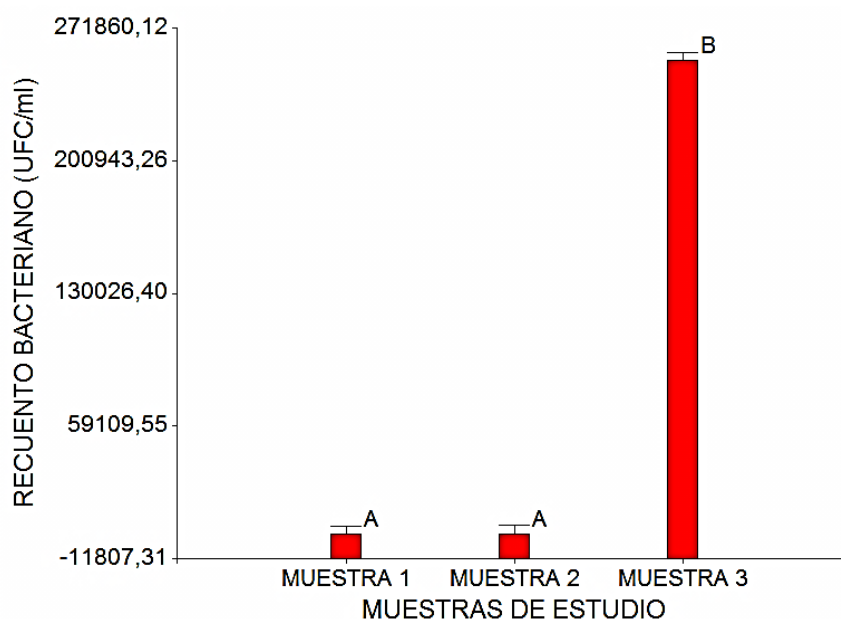
Muestra 1: del borde del afluente.

Muestra 2: a 10 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde del río.

Muestra 3: a 40 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde del río.

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 ($F_c = 1157,27$; $g_l = 2$; $p\text{-valor} = <0,0001$), en donde la muestra 3 correspondiente a 40 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde del río presentó diferencia estadística significativa respecto a las muestras 1 y 2 correspondiente al borde del afluente y a 10 cm de profundidad del agua que discurre a 2 metros del borde del río respectivamente.

Las muestras 1 y 2 mencionadas anteriormente no presentaron diferencia estadística significativa. Estos resultados se ilustran gráficamente en la Figura 10 y Tabla 7, 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 de las aguas del río Ramis, 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.



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

Figura 10. Comparación del recuento bacteriano de las muestras de agua del río Ramis, durante el mes de abril, 2017.

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 9×10^3 , 7×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 8×10^3 y 4×10^3 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 biótopos, especialmente bacterias procedentes de la tierra. Además, sobre las aguas superficiales cae constantemente una lluvia de bacterias procedentes del aire.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los recuentos bacterianos realizados, en las aguas del río Ramis, zona distrito de San Antón, la comunidad bacteriana posee una cuantificación en el orden de 10^3 y 10^5 UFC/ml de agua; validando completamente la hipótesis planteada.

4.1.2. Identificación bacteriana

Se identificó seis géneros bacterianos, los cuales corresponden a *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*, tal como se observa en la Tabla 3 y Figura 11. El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Serratia* fue de 4 mm de tamaño, superficie lisa, consistencia blanda, aspecto brillante, color beige, forma irregular, borde ondulado y elevación convexa; resultando una bacteria gramnegativa de acuerdo a la tinción Gram realizada. En las pruebas bioquímicas realizadas reaccionó a TSI (K/A), LIA (K/K), Citrato de Simmons (positivo), SIM (sulfuro de hidrógeno negativo, producción de indol positivo y movilidad positiva), Urea (negativo, con la producción de gas en cantidad de 2+).

El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Klebsiella* fue de 3 mm de tamaño, superficie rugosa, consistencia blanda, aspecto traslúcido o mate, color beige, forma irregular, borde ondulado y elevación elevada; resultando una bacteria gramnegativa de acuerdo a la tinción Gram realizada. En las pruebas bioquímicas realizadas reaccionó a TSI (A/A), LIA (K/K), Citrato de Simmons (positivo), SIM (sulfuro de hidrógeno negativo, producción de indol positivo y movilidad negativa), Urea (negativo, con la producción de gas en cantidad de 1+).

El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Staphylococcus* fue de 3,5 mm de tamaño, superficie lisa, consistencia mucoide, aspecto brillante, color amarillo, forma irregular, borde ondulado y elevación elevada; resultando una bacteria grampositiva de acuerdo a la tinción Gram realizada, y catalasa positivo de acuerdo a la prueba de la catalasa. En el medio selectivo agar Base Salado Manitol se obtuvo un crecimiento de colonias de coloración anaranjada.

El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Escherichia* fue de 3 mm de tamaño, superficie lisa, consistencia blanda, aspecto brillante, color beige, forma irregular, borde ondulado y elevación convexa; resultando una bacteria gramnegativa de acuerdo a la tinción Gram realizada. En las pruebas bioquímicas realizadas reaccionó a TSI (A/A), LIA (K/K), Citrato de Simmons (negativo), SIM (sulfuro de hidrógeno negativo, producción de indol positivo y movilidad positiva), Urea (negativo, con la producción de gas en cantidad de 2+). En el medio diferencial agar M-Endo LES se obtuvo un crecimiento de colonias de coloración verde brillante/dorado metálico.

El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Streptococcus* fue de 3,2 mm de tamaño, superficie lisa, consistencia mucoide, aspecto brillante, color amarillo, forma circular, borde entero y elevación elevada; resultando una bacteria grampositiva de acuerdo a la tinción Gram realizada, y catalasa negativo de acuerdo a la prueba de la catalasa.

El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Enterobacter* fue de 4 mm de tamaño, superficie lisa, consistencia blanda, aspecto brillante, color beige, forma circular, borde entero y elevación convexa; resultando una bacteria gramnegativa de acuerdo a la tinción Gram realizada. En las pruebas bioquímicas realizadas reaccionó a TSI (A/A), LIA (K/K), Citrato de Simmons (positivo), SIM (sulfuro de hidrógeno negativo, producción de indol negativo y movilidad positiva), Urea (positivo, con la producción de gas en cantidad de 1+).

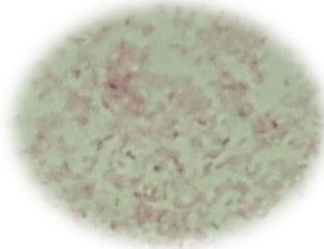
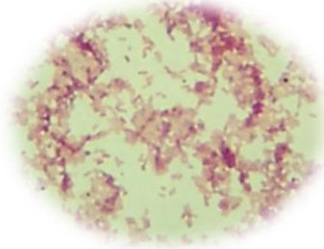

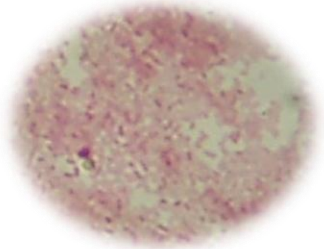
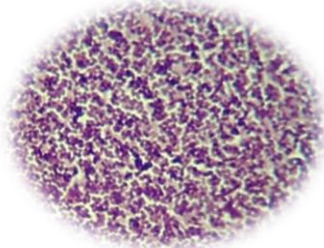
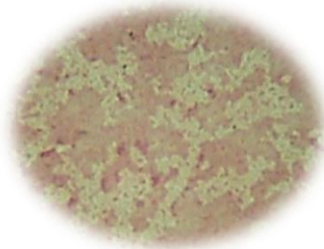
A partir de las muestras de agua provenientes del río Ramis se obtuvo a los géneros bacterianos *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*, comparado con lo reportado por Martínez *et al.* (2010), donde obtuvieron 23 aislados a partir de muestras de agua 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 e identificaron 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. Esto se apoya con lo que 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 anteriormente 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. Esto se apoya con lo que 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. En este sentido, las bacterias marinas son diferentes de las aguas dulces, y a su vez, las de los ríos suelen ser distintas a las habituales de los medios lacustres.

Tabla 3. Identificación del género bacteriano, Lab. de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.

Cód.	Género	Características culturales - Colonia	Tinción Gram	Pruebas Bioquímicas
B1	<i>Serratia</i>	Tamaño: 4 mm. Superficie: lisa Consistencia: blanda Aspecto: brillante Color: beige Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa		TSI: K/A LIA: K/K CITRATO: (+) SIM: (- / + / +) UREA: (-) GAS: 2+
B2	<i>Klebsiella</i>	Tamaño: 3 mm. Superficie: rugosa Consistencia: blanda Aspecto: traslúcido/mate Color: beige Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: elevada		TSI: A/A LIA: K/K CITRATO: (+) SIM: (- / + / -) UREA: (-) GAS: 1+
B3	<i>Staphylococcus</i>	Tamaño: 3,5 mm. Superficie: lisa Consistencia: mucoide Aspecto: brillante Color: amarillo Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: elevada		CATALASA: positivo (+) OTROS: desarrollo en agar Base Salado Manitol.
B4	<i>Escherichia</i>	Tamaño: 3 mm. Superficie: lisa Consistencia: blanda Aspecto: brillante Color: beige Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa		TSI: A/A LIA: K/K CITRATO: (-) SIM: (- / + / +) UREA: (-) GAS: 2+ OTROS: colonia con brillo metálico en agar M-Endo LES.
B5	<i>Streptococcus</i>	Tamaño: 3,2 mm. Superficie: lisa Consistencia: mucoide Aspecto: brillante Color: amarillo Forma: circular Borde: entero Elevación: elevada		CATALASA: negativo (-)
B6	<i>Enterobacter</i>	Tamaño: 4 mm. Superficie: lisa Consistencia: blanda Aspecto: brillante Color: beige Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa		TSI: A/A LIA: K/K CITRATO: (+) SIM: (- / - / +) UREA: (+) GAS: 1+

SIM: Sulfuro de Hidrógeno/Indol/Movilidad; (+): Positivo; (-): Negativo.

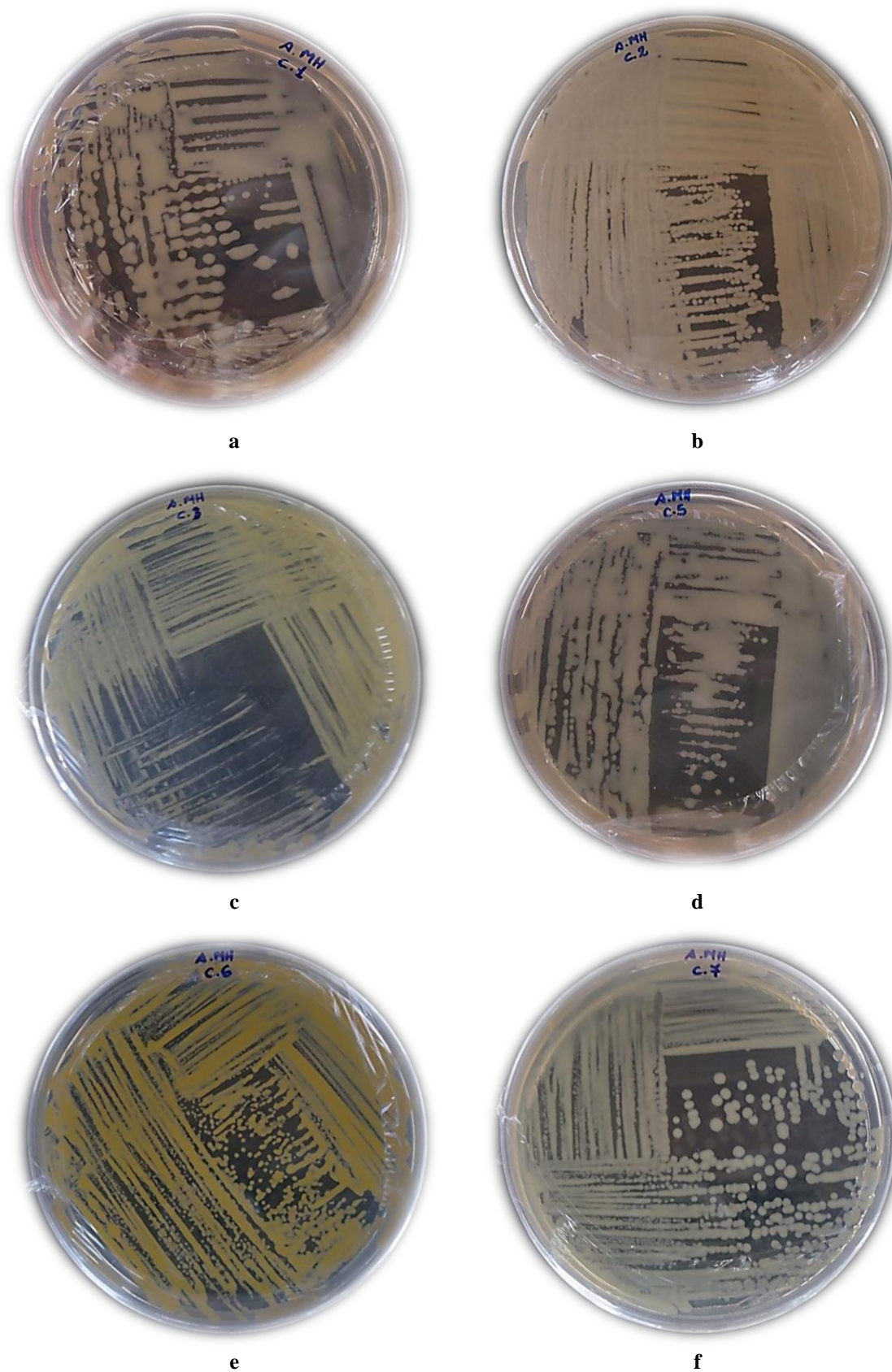


Figura 11. Aislamiento de cultivos puros: *Serratia* (a), *Klebsiella* (b), *Staphylococcus* (c), *Escherichia* (d), *Streptococcus* (e), y *Enterobacter* (f); Laboratorio de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.

4.2. 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.

A las bacterias aisladas e identificadas (*Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*), se les inoculó *in vitro* para experimentar la resistencia bacteriana al plomo y al mercurio, en sus formas de Nitrato de plomo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$] y Cloruro de mercurio [HgCl_2] respectivamente; 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, tal como se observa en la Figura 12 y 13. Los recuentos bacterianos en el tratamiento control oscila entre los promedios con valores de: 151×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 147×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 166×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 162×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 163×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 144×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*.

Los resultados del tratamiento con Pb a diferentes concentraciones, que se observan en la Tabla 4, demuestran que los recuentos bacterianos presentan resistencia a este metal, obteniéndose a la concentración de 200 µg/ml recuentos bacterianos que oscilan entre los promedios con valores de: 148×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 87×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 162×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 90×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 92×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 84×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; a la concentración de 500 µg/ml: 130×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 83×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 91×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 64×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 84×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 56×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; a la concentración de 1000 µg/ml: 130×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 79×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 86×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 61×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 71×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 53×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; y a la concentración de 2000 µg/ml: 65×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 60×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 66×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 58×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 63×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 47×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*.

Los resultados del tratamiento con Hg a diferentes concentraciones, que se observan en la Tabla 5, demuestran que los recuentos bacterianos presentan resistencia a este metal, obteniéndose a la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ recuentos bacterianos que oscilaron entre los promedios con valores de: 135×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 128×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 93×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 127×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 128×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 116×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; a la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$: 133×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 123×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 88×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 125×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 127×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 83×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; a la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$: 129×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 92×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 84×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 122×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 124×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 73×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; y a la concentración de 2000 $\mu\text{g/ml}$: 123×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 63×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 68×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 116×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 121×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 34×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*.

Los resultados del tratamiento con Pb y Hg a diferentes concentraciones, que se observan en la Tabla 6, demuestran que los recuentos bacterianos presentan resistencia a ambos metales en combinación, obteniéndose a la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ recuentos bacterianos que oscilaron entre los promedios con valores de: 150×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 145×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 163×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 161×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 95×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 101×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; a la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$: 146×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 142×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 92×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 154×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 92×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 98×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; a la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$: 91×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 90×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 62×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 145×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 68×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 36×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*; y a la concentración de 2000 $\mu\text{g/ml}$: 87×10^6 UFC/ml para *Serratia*, 82×10^6 UFC/ml para *Klebsiella*, 58×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus*, 141×10^6 UFC/ml para *Escherichia*, 63×10^6 UFC/ml para *Streptococcus*, y 33×10^6 UFC/ml para *Enterobacter*.

Tabla 4. Cuantificación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis resistentes al plomo, en el Laboratorio de Microbiología, durante los meses de marzo a abril, 2017.

PLOMO						
CONCENTRACIÓN 0 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	155	158	173	168	172	151
Repetición II	152	145	167	161	163	144
Repetición III	146	139	159	156	155	138
\bar{X}	151	147	166	162	163	144
D.S.	4,6	9,7	7	6	8,5	6,5
C.V. (%)	3	6,6	4,2	3,7	5,2	4,5
CONCENTRACIÓN 200 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	152	96	171	96	98	94
Repetición II	148	88	163	90	93	82
Repetición III	145	77	152	85	86	76
\bar{X}	148	87	162	90	92	84
D.S.	3,5	9,5	9,5	5,5	6	9,2
C.V. (%)	2,4	11	5,9	6,1	6,5	10,9
CONCENTRACIÓN 500 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	138	92	97	72	90	61
Repetición II	131	81	91	63	84	56
Repetición III	122	75	84	57	79	51
\bar{X}	130	83	91	64	84	56
D.S.	8	8,6	6,5	7,5	5,5	5
C.V. (%)	6,2	10,4	7,2	11,8	6,5	8,9
CONCENTRACIÓN 1000 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	136	83	92	69	77	58
Repetición II	129	79	86	62	72	53
Repetición III	125	74	79	53	65	47
\bar{X}	130	79	86	61	71	53
D.S.	5,6	4,5	6,5	8	6	5,5
C.V. (%)	4,3	5,7	7,6	13,1	8,5	10,5
CONCENTRACIÓN 2000 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	71	66	73	64	71	52
Repetición II	66	61	65	58	63	49
Repetición III	59	52	59	51	54	40
\bar{X}	65	60	66	58	63	47
D.S.	6	7,1	7	6,5	8,5	6,2
C.V. (%)	9,2	11,9	10,7	11,3	13,6	13,3

\bar{X} = Promedio; D.S. = Desviación estándar; C.V. = Coeficiente de variación.

Tabla 5. Cuantificación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis resistentes al mercurio, en el Laboratorio de Microbiología, durante los meses de marzo a abril, 2017.

MERCURIO						
CONCENTRACIÓN 0 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repeticón I	155	158	173	168	172	151
Repeticón II	152	145	167	161	163	144
Repeticón III	146	139	159	156	155	138
\bar{X}	151	147	166	162	163	144
D.S.	4,6	9,7	7	6	8,5	6,5
C.V. (%)	3	6,6	4,2	3,7	5,2	4,5
CONCENTRACIÓN 200 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repeticón I	141	138	99	133	136	123
Repeticón II	136	127	94	128	126	115
Repeticón III	129	118	86	121	122	109
\bar{X}	135	128	93	127	128	116
D.S.	6	10	6,6	6	7,2	7
C.V. (%)	4,5	7,8	7,1	4,7	5,6	6,1
CONCENTRACIÓN 500 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repeticón I	139	131	93	132	134	91
Repeticón II	135	123	90	125	126	82
Repeticón III	126	115	82	119	120	77
\bar{X}	133	123	88	125	127	83
D.S.	6,7	8	5,7	6,5	7	7,1
C.V. (%)	5	6,5	6,4	5,2	5,5	8,5
CONCENTRACIÓN 1000 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repeticón I	133	98	89	129	131	81
Repeticón II	129	92	85	122	124	73
Repeticón III	125	86	78	115	117	66
\bar{X}	129	92	84	122	124	73
D.S.	4	6	6	7	7	8
C.V. (%)	3,1	6,5	6,6	5,7	5,6	10,2
CONCENTRACIÓN 2000 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repeticón I	130	69	75	121	125	43
Repeticón II	122	65	68	117	123	36
Repeticón III	117	54	60	111	114	24
\bar{X}	123	63	68	116	121	34
D.S.	6,6	7,8	7,5	5	5,9	9,6
C.V. (%)	5,3	12,4	11,1	4,3	4,9	28

\bar{X} = Promedio; D.S. = Desviación estándar; C.V. = Coeficiente de variación.

Tabla 6. Cuantificación de la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis resistentes al plomo y al mercurio, en el Laboratorio de Microbiología, durante los meses de marzo a abril, 2017.

PLOMO Y MERCURIO						
CONCENTRACIÓN 0 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	155	158	173	168	172	151
Repetición II	152	145	167	161	163	144
Repetición III	146	139	159	156	155	138
\bar{X}	151	147	166	162	163	144
D.S.	4,6	9,7	7	6	8,5	6,5
C.V. (%)	3	6,6	4,2	3,7	5,2	4,5
CONCENTRACIÓN 200 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	156	152	171	166	104	106
Repetición II	150	147	164	160	93	102
Repetición III	144	135	155	158	88	94
\bar{X}	150	145	163	161	95	101
D.S.	6	8,7	8	4,2	8,2	6,1
C.V. (%)	4	6	4,9	2,6	8,6	6,1
CONCENTRACIÓN 500 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	151	148	96	159	101	103
Repetición II	148	143	92	153	92	99
Repetición III	139	134	87	149	84	91
\bar{X}	146	142	92	154	92	98
D.S.	6,2	7,1	4,5	5	8,5	6,1
C.V. (%)	4,3	5	4,9	3,3	9,2	6,3
CONCENTRACIÓN 1000 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	96	93	68	149	75	45
Repetición II	91	91	63	144	66	38
Repetición III	87	87	54	141	62	24
\bar{X}	91	90	62	145	68	36
D.S.	4,5	3,1	7,1	4	6,7	10,7
C.V. (%)	4,9	3,4	11,5	2,8	9,8	30
CONCENTRACIÓN 2000 µg/ml						
BACTERIA	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
Repetición I	92	89	65	146	71	42
Repetición II	89	82	59	142	64	35
Repetición III	79	76	51	135	53	22
\bar{X}	87	82	58	141	63	33
D.S.	6,8	6,5	7	5,6	9,1	10,1
C.V. (%)	7,9	7,9	12	3,9	14,5	30,8

\bar{X} = Promedio; D.S. = Desviación estándar; C.V. = Coeficiente de variación.

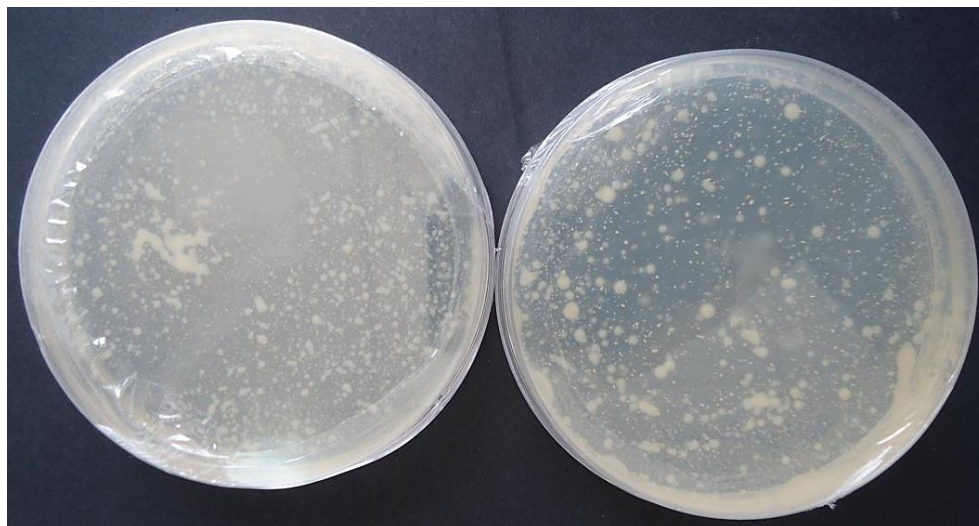
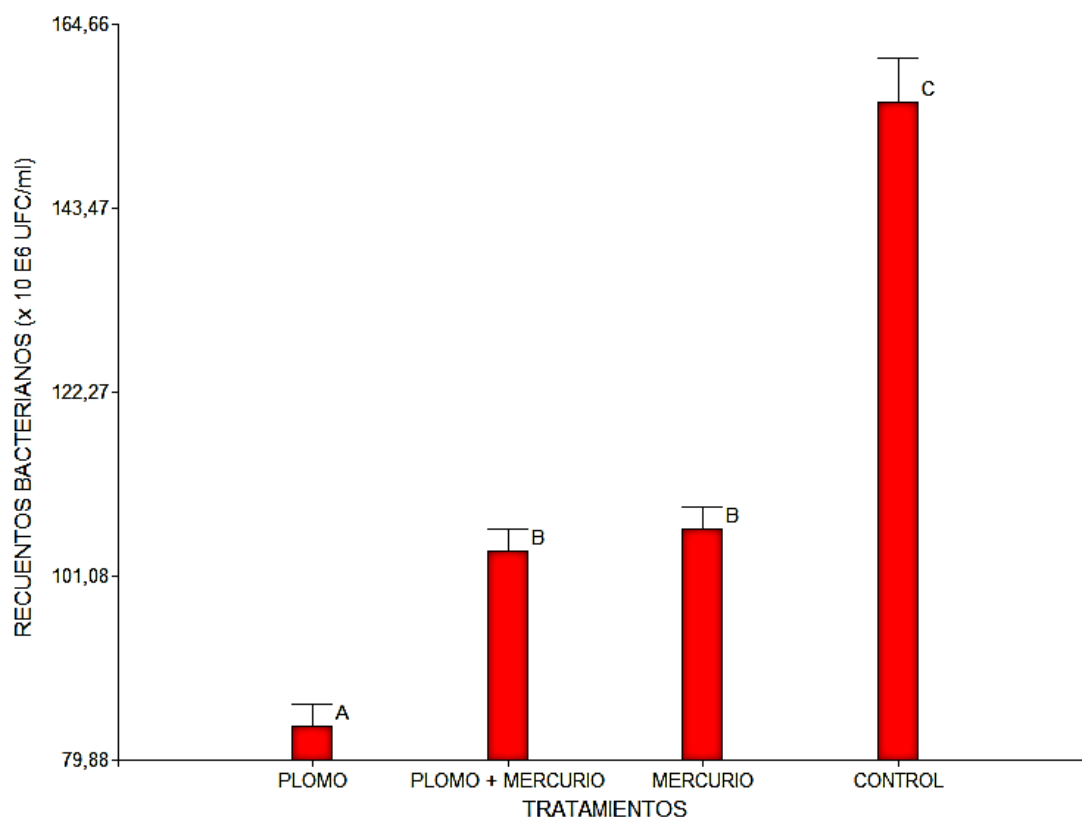


Figura 12. Desarrollo de las bacterias resistentes al plomo y al mercurio, en el Laboratorio de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.



Figura 13. Tratamiento con plomo y mercurio, a diferentes concentraciones y con diferentes géneros bacterianos, en el Laboratorio de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.

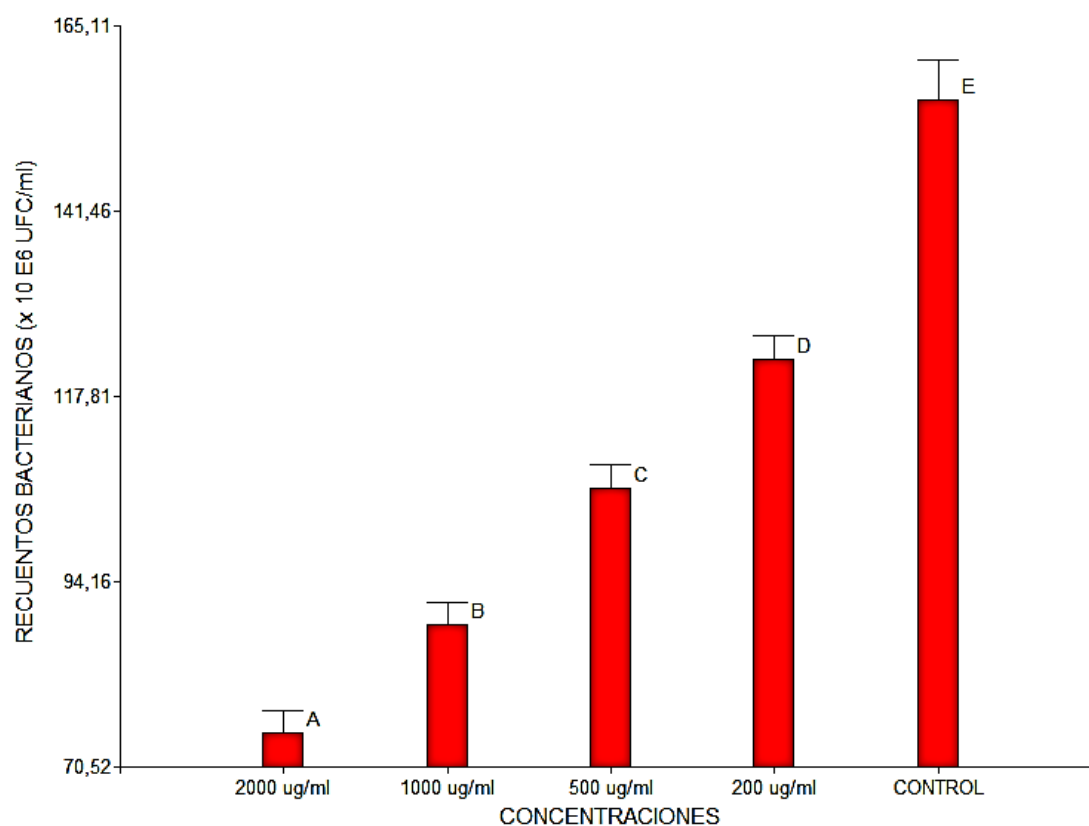
Realizado el análisis con estructura factorial de tratamientos de 3x4x6 y la prueba de Tukey a los recuentos bacterianos, se demostró que en el tratamiento con mercurio y el tratamiento en combinación de plomo y mercurio presentan promedios casi similares, demostrando que estos tratamientos no presentan diferencia estadística significativa; pero estos tratamientos si presentan diferencia estadística significativa respecto al tratamiento con plomo 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 ($F_c = 54,53$; $g_l = 3$; $p\text{-valor} = <0,0001$), (Tabla 8), todos estos resultados también se representan gráficamente en la Figura 14.



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

Figura 14. Comparación de los recuentos bacterianos en los tratamientos realizados, durante el mes de abril, 2017.

De acuerdo al análisis realizado, los recuentos bacterianos demuestran que las cuatro concentraciones de plomo y mercurio, siendo estas de 200, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ presentan diferencia estadística significativa entre ellas; el recuento bacteriano en la última concentración de 2000 $\mu\text{g/ml}$ 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 ($F_c = 49,19$; $gl = 2$; $p\text{-valor} = <0,0001$), (Tabla 8), estos resultados se representan gráficamente en la Figura 15.

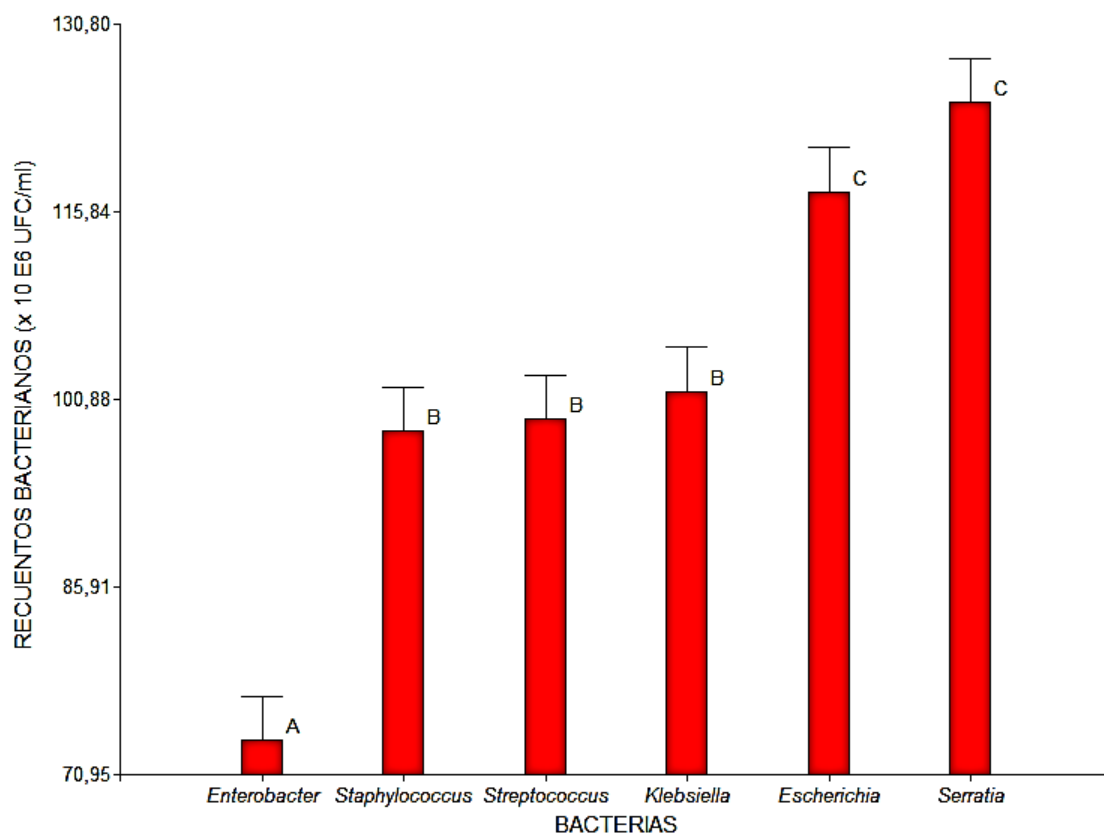


Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 15. Comparación de los recuentos bacterianos en las concentraciones realizadas, durante el mes de abril, 2017.

Conforme al análisis realizado, 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 ($F_c = 25,86$; $g_l = 5$; $p\text{-valor} = <0,0001$), (Tabla 8). 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*; estos resultados también se representan gráficamente en la Figura 16.

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 ($F_c = 82,33$; $g_l = 77$; $p\text{-valor} = <0,0001$), (Tabla 9).



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

Figura 16. Comparación de los recuentos bacterianos en los géneros bacterianos inoculados, durante el mes de abril, 2017.

De acuerdo a lo resultados obtenidos, la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis en su totalidad es resistente al plomo y al mercurio en concentraciones de una mínima de 200 $\mu\text{g/ml}$ y una concentración máxima de 2000 $\mu\text{g/ml}$, las bacterias aisladas y plenamente identificadas 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 arsénico, de los cuales el 100% fueron bacilos grampositivos con crecimiento en medio Müeller Hinton con Arsénico bajo la forma de arsenito de sodio en concentraciones menores o iguales a 200 $\mu\text{g/ml}$, pero que a concentraciones mayores su comportamiento fue diferente; nueve de ellos que representa el 50%, se desarrollaron en la concentración más alta de 600 $\mu\text{g/ml}$ y solo un 22% crecieron en medio M9 sólido suplementado con arsénico como única fuente de energía.

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 plomo y arsénico, el 77,7% al cobre y el 36,4% al níquel. Similarmente, en una 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 plomo, cromo y cadmio de las cepas que fueron estudiadas, en su totalidad presentaron resistencia a estos metales.

Las que presentan mayor resistencia a los metales pesados 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 cadmio 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 el 27% de cepas en estudio crecieron en un medio suplementado con cobre y la mayor parte de estas cepas correspondieron a bacterias no fermentadoras, gramnegativas pertenecientes al género *Pseudomonas*, principalmente *P. maltophilia*, y algunas correspondientes al género *Alcaligenes*.

Una de las bacterias más resistentes al plomo y al mercurio aislada del río Ramis es del género *Serratia*, tal como se demuestra en la investigación, la resistencia que presenta probablemente se deba a diversos mecanismos moleculares y genéticos propios que posee la bacteria, en comparación con las demás bacterias encontradas que no poseen dichos mecanismos; tal como lo afirma Granados y Villaverde (2003), donde menciona que *Serratia* presenta resistencia a los antibióticos e incluso a los desinfectantes.

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 plomo y mercurio 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;

esto es respaldado por Moreno (2003), donde afirma que 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 plomo y mercurio que presenta la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, de acuerdo a los resultados obtenidos, donde la particularidad de los géneros bacterianos resistentes a estos metales pesados es que 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 mercurio, diversos estudios demuestran que algunas bacterias son capaces de transformar el mercurio en otras formas menos tóxicas, y es probable que dicho proceso también lo realicen las bacterias aisladas del río Ramis; tal como lo afirma Madigan *et al.* (2009), donde menciona que a concentraciones suficientemente altas, el Hg^{2+} y el CH_3Hg^+ 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 mercurio, la enzima mercúrico-reductasa ligada a NADPH reduce el Hg^{2+} a Hg^0 , 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, es preciso mencionar que la resistencia que presentan las bacterias, es probable que también se deba a los diversos mecanismos genéticos que posee la bacteria; esto es respaldado por 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 captores 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 o en ambos.

Por último, también es probable que dicha resistencia al plomo y mercurio que presentan las bacterias, 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.

V. 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; presentando diferencia estadística significativa ($F_c = 1157,27$; $g_l = 2$; $p\text{-valor} = <0,0001$), además se identificó 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 $\mu\text{g/ml}$; en el cual se obtuvo recuentos bacterianos promedios que oscilan entre $65\text{-}150 \times 10^6$ UFC/ml en *Serratia*, $60\text{-}145 \times 10^6$ UFC/ml en *Klebsiella*, $62\text{-}163 \times 10^6$ UFC/ml en *Staphylococcus*, $58\text{-}161 \times 10^6$ UFC/ml en *Escherichia*, $63\text{-}128 \times 10^6$ UFC/ml en *Streptococcus*, y $33\text{-}116 \times 10^6$ UFC/ml en *Enterobacter*; presentando diferencia estadística significativa entre todos los factores a ($F_c = 40,04$; $g_l = 11$; $p\text{-valor} = <0,0001$).

VI. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones de degradación del plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, variando los valores de pH para su mejor degradación.

Realizar estudios a nivel de planta piloto en sistemas de biodiscos con la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, que presenta resistencia y degradación al plomo y al mercurio.

Realizar la identificación y caracterización molecular de las especies bacterianas de las aguas del río Ramis, que presenta resistencia y degradación al plomo y al mercurio.

VII. REFERENCIAS

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (A.T.S.D.R). (1999).
Reseña Toxicológica del Mercurio. Servicio de Salud Pública. Departamento de
Salud y Servicios Humanos. Atlanta G.A.
- Ahumada, R. y Contreras, S. (2002). Contenido de metales (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb,
Sr, V y Zn) en los sedimentos marinos de la región patagónica, Chile. *Ciencia y
Tecnología del Mar*. 25(2), 77-86.
- Almeida, M., De Armas, Y. y Rojas, L. (2010). Caracterización química de los
sedimentos sumergidos, elemento clave dentro de un programa de monitoreo
ambiental integral en las playas de la Bahía de Matanzas. *Oficina de Manejo
Costero - Playa de Varadero, Cuba*. 10.
- Álvarez, J., Agurto, C., Álvarez, A. y Obregón, J. (2004). Resistencia antimicrobiana en
bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. *Revista Científica*.
14(6), 1-16.
- Aquihuatl, M. y Pérez, M. (2004). Manual de Prácticas del Laboratorio de
Microbiología General. CBS Iztapalapa. Departamento de Biotecnología.
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D.F. 118.
- Aquihuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramírez, F. y Salazar, M. (2012).
Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología General. Casa abierta al
tiempo. Departamento de Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la
Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D.F.
78.
- 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.
- Arcos, M., Ávila, S., Estupiñán, S. y Gómez, A. (2005). Indicadores microbiológicos de
contaminación de las fuentes de agua. *NOVA - Publicación Científica*. 3(4), 69-
79.

- Bailón, L., González, R. y Cervantes, A. (2003). Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 175.
- Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. y Robledo, C. (2008). Manual del Usuario InfoStat. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. 336.
- Bataller, R. (2004). Toxicología Clínica. Editorial Romeo. Valencia. 171-177.
- 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.
- Bradl, H. (2005). Heavy metals in the environment: origin, interaction and remedation. Interface Science and Technology Vol. 6. Elsevier academic press. Reino Unido.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S. y Mietzner, T. (2011). Jawets, Melnick Y Adelberg Microbiología Médica. 25a Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. México, D. F. 833.
- 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., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2a Edición. Facultad de Química, UNAM. México. 10.
- Canosa, A. (1995). Indicadores bacteriológicos de eutrofización en los embalses de Chuza, Neusa y Tominé, y en la laguna de Chingaza. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Centro de Investigaciones Científicas. Santa fe de Bogotá, Colombia. 196.
- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42(1), 131-143.

- Cebrián, A. (2007). Elaboración de contenidos para materiales de difusión con información sobre sustancias tóxicas y riesgos ecotoxicológicos. Informe final de la asesoría. Instituto Nacional de Ecología. México. 114.
- Celis, A. y Labrada, V. (2014). Bioestadística. 3a Edición. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. 337.
- 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.
- Chen, W., Tan, S. y Tay, J. (1996). Distribution, fractional composition and release of sediment-bound heavy metals in tropical reservoirs. *Water, Air, and Soil Pollution*. 92, 273-287.
- Combariza, D. (2009). Contaminación por metales pesados en el embalse del muña y su relación con los niveles en sangre de plomo, mercurio y cadmio y alteraciones de salud en los habitantes del Municipio de Sibaté (Cundinamarca) 2007. Tesis de Maestría. Departamento de Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 115.
- 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.
- Cotton, F., Wilkinson, G., Murillo, C. y Bochman, M. (1999). *Advanced Inorganic Chemistry*. 6a Edición. Ed. John Wiley & Sons. New York.
- Craun, G., Berger, P. y Calderón, R. (1997). Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *J. Am. Water Works Ass.* 89: 96-104.
- Doadrio, A. (2004). Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. *Real Academia Nacional de Farmacia. Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 70, 933-959.

- Environment Agency. (2002). Standing Committee of Analysts, The Microbiology of Drinking Water. Part 1. Water Quality and Public Health, Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. United States: Environment Agency.
- Español, S. (2001). Toxicología del Mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Jornada Internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal de Iberoamérica. Lima, Perú.
- Fernández, M., Álvarez, A. y Espigares, M. (2001). Transmisión fecohídrica 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.
- González, A., Marañón, N., Espinosa M. y Argota, H. (2004). Granulometría, sedimentación, composición y contenido total de metales pesados en los sedimentos del río Cobre, de Santiago de Cuba. Editorial Universitaria. Facultad de Ciencias Naturales. Departamento de Química. Universidad de Oriente. Empresa Geólogo - Minera de Oriente.
- González, J. (2010). Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico. 3ra Edición. Elsevier Masson España, S.L. Barcelona, España. 548.
- Goyer, R. (1997). Toxic and essential metal interactions. Annu. Rev. Nutr. 17, 37-50.
- Granados, R. y Villaverde, C. (2003). Microbiología. Tomo I. Editorial Paraninfo. Madrid, España. 330.
- Griet, S. (2006). Mercure: une solution qui nous empoisonne. Laboratorio Europeo de Radiación del Sincrotrón en Grenoble, Francia.
<http://www.scienceinschool.org/2007/issue7/mercury/spanish>
- Guitart, R. y Thomas, V. (2005). ¿Es el plomo empleado en deportes (caza, tiro y pesca deportiva) un problema de salud pública infravalorado?. Rev. Esp. Salud Pública. 79, 621-632.

- Guzmán, G., Avelino, F., Rivera, J., Castañeda, R. y Chávez, B. (2007). Resistencia a antimicrobianos y a metales pesados en cepas de *Escherichia coli* aisladas del río Alseseca. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2), 203-210.
- Instituto Nacional de Salud. (2001). Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Serie de Primera. Edición Normas Técnicas N° 28.
- Jiménez, A. (2005). Interacción del mercurio con los componentes de las aguas residuales. Tesis de Pregrado. Departamento de Ingeniería Química. Facultad De Ingeniería y Arquitectura. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia. 97.
- 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.
- Lead environmental aspects. (1989). Geneva, World Health Organization, (Environmental Health Criteria, No. 85).
- 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). Fisicoquímica 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. (2002). Plomo en suelo y su asociación con los niveles sanguíneos en niños y mujeres embarazadas. Tesis de Maestría en Ciencias. Área: Biotecnología. Universidad de Colima, México. 71.

- 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.
- Mendiguchía, C. (2005). Utilización de ultratrazas de metales pesados como trazadores de los efectos antropogénicos producidos en ecosistemas acuáticos. Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica. Universidad de Cádiz. España. 373.
- Mielke, H. y Reagan, P. (1998). Soil Is an Important Pathway of Human Lead Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 106(1), 217-229.
- Mora, H. (2002). Migración de plomo a través de facies hidroquímicas del agua subterránea. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Civil: Hidráulica y Energética. Universidad Politécnica de Madrid, España. 286.
- 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.
- Morales, J., Quemé, J. y Melgar, M. (2009). *InfoStat. Manual de uso: Ejemplos de los principales métodos estadísticos utilizados en la industria cañera*. 1a Edición. Cengicaña. Guatemala. 45.
- Moreno, M. (2003). *Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. McGraw Hill, Madrid, España.
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2014). *Microbiología Médica*. 7a Edición. Elsevier España, S.L. Barcelona, España. 966.
- Naseri, M., Hosseini, M., Assadi, Y. y Kiani, A. (2007). Rapid determination of lead in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* 75, 56-62.
- Nies, D. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 27, 313-39.

- Olivas, E. (2012). Manual de Prácticas: Laboratorio de Microbiología. Academia de Microbiología y Parasitología. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. México. 75.
- Oriundo, C. y Robles, J. (2009). Determinación de plomo en suelos debido a la contaminación por fábricas aledañas al Asentamiento Humano cultura y progreso del distrito de Ñaña - Chaclacayo. Tesis de Pregrado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 44.
- Oyarzun, R. e Higuera, P. (2009). Minerales, Metales, Compuestos Químicos, y Seres Vivos: Una Difícil Pero Inevitable Convivencia. Departamento de Cristalografía y Mineralogía, Facultad de Ciencias Geológicas, Universidad. http://www.ucm.es/info/crismine/Geologia_Mineralogia/Mineria_toxicidad.htm
- Paniagua, C., Monroy, P., Vaca, P. y González, A. (2003). Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Revista Médica del Hospital General de México. 66(1), 13-21.
- Pellizzari, E., Marinich, L., Flores, S. y Giménez, C. (2014). Degradación de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua. Estudio Preliminar. Avances en Ciencias e Ingeniería. 6(1), 1-5.
- Plan de Acción Regional de América del Norte (P.A.R.A.N.). (1998). Expediente de nominación sobre el plomo. Presentado por Estados Unidos al Grupo de Trabajo sobre el Manejo Adecuado de las Sustancias Químicas.
- Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (1996). Microbiología. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España.
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (U.N.E.P.). (2002). Evaluación mundial sobre el mercurio. Programa interorganismos para la gestión racional de las sustancias químicas. Suiza.
- Rojas, A. (2011). Manual de Microbiología: Conceptos y Práctica de Microbiología General. Taller de Publicaciones. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Colombia. 161.

- Rojas, C. (2011). Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de una hidroeléctrica (P.H. Las Cruces) en Nayarit, México. Tesis de Pregrado. División de Ciencias Biológicas y Ambientales. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México. 168.
- Romero, A., Vandecasteele, C. y Cooreman, H. (2000). Metales (Cr, Pb y Zn) en sedimentos y quironómidos del Río Rocha. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental*. 8, 37-47.
- Rosas, H. (2005). Contaminación de sedimentos del río Anioia por Metales Pesados (Barcelona - España). *Investigación y Desarrollo. Universidad Privada Boliviana*. 5: 75-89.
- Rustom, A. (2012). Estadística descriptiva, probabilidad e inferencia. Una visión conceptual y aplicada. Departamento de Economía Agraria. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 196.
- Ryan, K., George Ray, C., Ahmad, N., Lawrence Drew, W. y Plorde, J. (2011). *Sherris Microbiología Médica*. 5a Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. México, D. F. 793.
- Sanabria, J. y Mercedes, D. (2001). *Manual de Laboratorio Microbiología*. Curso de Microbiología Ambiental. Área de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Escuela de Ingeniería Recursos Naturales y del Ambiente. Facultad de Ingeniería. Universidad del Valle. Colombia. 95.
- 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.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). Introducción a la Microbiología. 9a Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. Buenos Aires, Argentina. 959.
- Usero, J., Morillo, J. y Gracia, I. (1997). Contaminación por metales en sedimentos acuáticos. Tecnología del agua. 166, 44-50.
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. Revista Química Viva. 3(2), 93-104.
- Weinberg, J. (2007). Introducción a la contaminación por mercurio para las ONG. Red Internacional de Eliminación de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (IPEN). 166.
- Yang, C., Kumar, A. y Zen, J. (2005). Precise blood lead analysis using a combined internal standard and standard addition approach with disposable screen-printed electrodes. Anal. Biochem. 338, 278–283.
- Zelibor, J., Doughten, M., Grimes, D. y Colwell, R. (1987). Testing for Bacterial Resistance to Arsenic in Monitoring Well Water by the Direct Viable Counting Method. Applied and Environmental Microbiology. 53(12), 2929-2934.

ANEXOS



Figura 17. Medición geográfica del lugar de la toma de muestra en el río Ramis, durante los meses de diciembre a enero, 2017.



Figura 18. Medición de pH y Temperatura de las aguas del río Ramis, durante los meses de diciembre a enero, 2017.



Figura 19. Toma de muestra de agua proveniente del río Ramis, durante los meses de diciembre a enero, 2017.

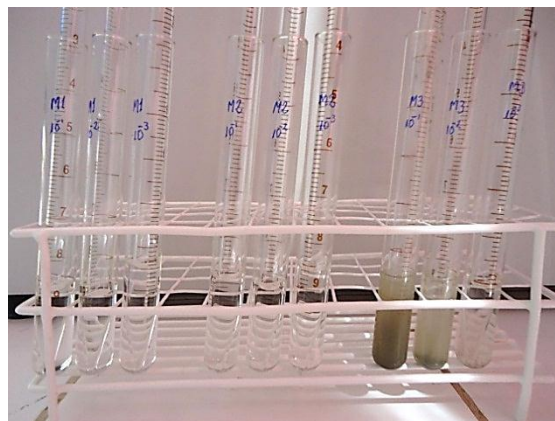


Figura 20. Diluciones de las muestras de aguas para la cuantificación bacteriana del Ramis, Lab. de Microbiología, durante el mes de enero, 2017.



Figura 21. Medición y elevación del pH a 8 del medio de cultivo preparado con Agar Müller Hinton, Lab. de Microbiología, durante los meses de enero a febrero, 2017.



Figura 22. Incubación de los cultivos a 25°C por 4 días, Lab. de Microbiología, durante los meses de enero a febrero, 2017.



Figura 23. Cuantificación bacteriana de las aguas del río Ramis, Lab. de Microbiología, durante el mes de enero, 2017.

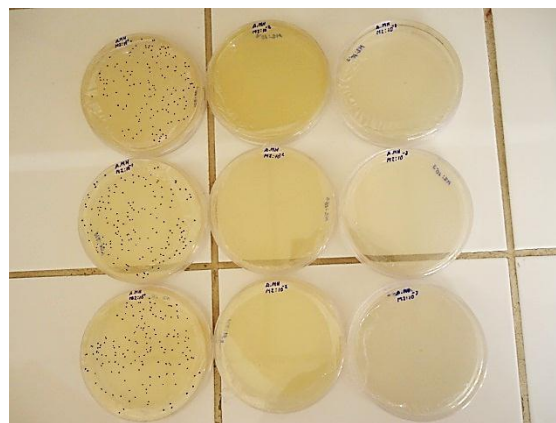


Figura 24. Recuento de los cultivos bacterianos realizados a través de las diluciones, Lab. de Microbiología, durante el mes de enero, 2017.



Figura 25. Colonias bacterianas seleccionadas para la identificación de bacterias, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.



Figura 26. Observación microscópica de la tinción Gram realizada, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.

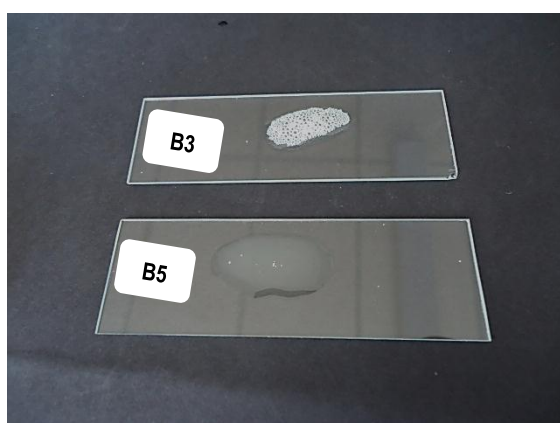


Figura 27. Observación de la prueba de la catalasa realizada a las bacterias grampositivas (B3: *Staphylococcus*, B5: *Streptococcus*); Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.



Figura 28. Cultivo de las bacterias en pruebas bioquímicas, medios selectivos y diferenciales, para la identificación de las bacterias; Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.



Figura 29. Incubación de los cultivos bacterianos en pruebas bioquímicas, medios selectivos y diferenciales, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.



Figura 30. Reacción de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias gramnegativas, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.

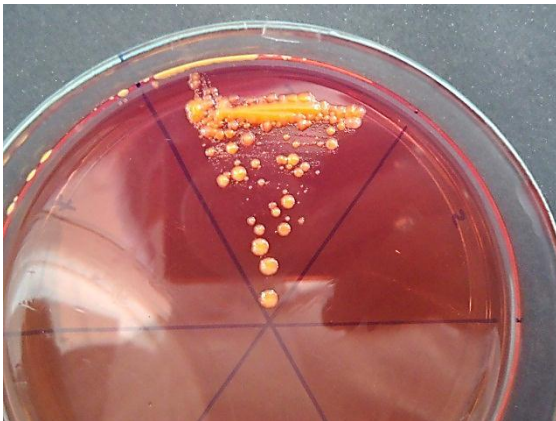


Figura 31. Crecimiento del género *Staphylococcus* en Agar Base Salado Manitol, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.



Figura 32. Crecimiento del género *Escherichia* en Agar M-Endo LES, Lab. de Microbiología, durante el mes de febrero, 2017.



Figura 33. Medio Agar Müeller Hinton con diferentes concentraciones de Pb y Hg, Lab. de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.



Figura 34. Sembrado por la técnica de vertido en placa, Lab. de Microbiología, durante el mes de marzo, 2017.



Figura 35. Recuento bacteriano de los cultivos realizados en contador de colonias, Lab. de Microbiología, durante el mes de marzo a abril, 2017.

Tabla 7. Análisis de varianza y prueba de Tukey del recuento bacteriano de las muestras de agua, durante el mes de abril, 2017.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUESTO BACTERIANO	9	1,00	1,00	8,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	128355920622,22	2	64177960311,11	1157,27	<0,0001
MUESTRAS DE ESTUDIO	128355920622,22	2	64177960311,11	1157,27	<0,0001
Error	332738933,33	6	55456488,89		
Total	128688659555,56	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=18656,26733

Error: 55456488,8889 gl: 6

MUESTRAS DE ESTUDIO	Medias	n	E.E.
M1	1086,67	3	4299,48 A
M2	1580,00	3	4299,48 A
M3	254666,67	3	4299,48 B

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

Tabla 8. Análisis con estructura factorial de tratamientos para los recuentos bacterianos resistentes al plomo y al mercurio, durante el mes de abril, 2017.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECuentos Bacterianos	234	0,66	0,65	21,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	208718,24	11	18974,39	40,04	<0,0001
TRATAMIENTOS	77521,25	3	25840,42	54,53	<0,0001
CONCENTRACIONES	69931,05	3	23310,35	49,19	<0,0001
BACTERIAS	61265,94	5	12253,19	25,86	<0,0001
Error	105196,11	222	473,86		
Total	313914,35	233			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=12,35068

Error: 473,8564 gl: 222

TRATAMIENTOS Medias n E.E.

METAL 1	83,74	72	2,57	A
COMBINACIÓN	103,89	72	2,57	B
METAL 2	106,50	72	2,57	B
CONTROL	155,67	18	5,14	C

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=13,54587

Error: 473,8564 gl: 222

CONCENTRACIONES Medias n E.E.

C4	74,81	54	2,97	A
C3	88,63	54	2,97	B
C2	106,17	54	2,97	C
C1	122,56	54	2,97	D
C0	155,67	18	5,14	E

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=14,07506

Error: 473,8564 gl: 222

BACTERIAS Medias n E.E.

B6	73,67	39	3,49	A
B3	98,33	39	3,49	B
B5	99,31	39	3,49	B
B2	101,51	39	3,49	B
B4	117,44	39	3,49	C
B1	124,59	39	3,49	C

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

Tabla 9. Prueba de interacción entre los factores metales, concentración, y bacterias; durante el mes de abril, 2017.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Recuento bacteriano	234	0,98	0,96	6,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	306375,01	77	3978,90	82,33	<0,0001
Metales	77521,25	3	25840,42	534,68	<0,0001
Concentración	69931,05	3	23310,35	482,33	<0,0001
Metales*Concentración	9922,44	6	1653,74	34,22	<0,0001
Bacterias	61265,94	5	12253,19	253,54	<0,0001
Metales*Bacterias	54799,08	15	3653,27	75,59	<0,0001
Concentración*Bacterias	16348,42	15	1089,89	22,55	<0,0001
Metales*Concentración*Bact..	16586,84	30	552,89	11,44	<0,0001
Error	7539,33	156	48,33		
Total	313914,35	233			