



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE RESISTENCIA DE BACTERIAS A LOS METALES
PESADOS, EN LA MICROCUCIENCA DEL RIO CHIBUNGA.

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: CRISTIAN MARCELO SALGADO ERAZO

DIRECTOR: DR. GERARDO MEDINA

Riobamba-Ecuador

2018

©2018, Salgado Erazo Cristian Marcelo

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: **EVALUACIÓN DE RESISTENCIA DE BACTERIAS A LOS METALES PESADOS, EN LA MICROCUENCA DEL RIO CHIBUNGA**, de responsabilidad del señor Cristian Marcelo Salgado Erazo, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr.: Gerardo Medina

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACION

Ing: Paola Chiluzza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Cristian Marcelo Salgado Erazo declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes del documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

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

Cristian Marcelo Salgado Erazo.

060419416-7

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mi hijo Fernando que es mi fuente de superación diaria, a mi esposa Macarena por ser mi soporte y apoyo constante, a mis padres Marcelo y Liliana por siempre motivarme a superarme y guiarme en el camino del bien, a mi familia quienes siempre me ha brindado su apoyo incondicional en todo momento, en especial a mis abuelos y mis queridas hermanas Nicole y Andrea, y a todas las personas que han formado parte de este camino que ahora culmina con éxito.

CRISTIAN

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios por todas las bendiciones recibidas durante este camino, por permitirme salir adelante y ser cada día una mejor persona.

Al Dr. Gerardo Medina tutor de mi trabajo de titulación y la Ing. Paola Chiluiza por su apoyo, paciencia, consideración y estima mostrada durante la realización de esta investigación.

A la Ing. Maritza Yáñez por brindarme su apoyo, experiencia y amistad durante el desarrollo de mi investigación en el laboratorio de Microbiología.

A mi hermana Andrea Salgado por su apoyo incondicional y desinteresado durante la realización de este trabajo.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias, y la Escuela de Ciencias Químicas por la formación recibida y brindarme innumerables experiencias y anécdotas, que siempre quedarán grabadas en mi corazón.

CRISTIAN

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Agua	5
1.2. Importancia del agua	5
1.3. Tipos de Agua	6
1.4. Recursos Hídricos.....	7
1.4.1. Cuenca Hidrográfica.....	7
1.4.2. Cuenca Hidrográfico del Río Pastaza y Subcuenca del Río Chambo	7
1.4.3. Microcuenca del Río Chibunga	9
1.5. Aguas Residuales	11
1.5.1. Aguas Residuales Domésticas	11
1.5.2. Aguas Residuales Industriales	11
1.6. Metales Pesados	11
1.6.1. Características y toxicidad de los metales pesados.....	12
1.6.2. Plomo (Pb).....	12
1.6.3. Cromo	13
1.6.4. Cadmio.....	13
1.6.5. Mercurio	14
1.6.6. Fuentes de generación de metales pesados	14
1.6.7. Importancia de los metales pesados	14
1.6.8. Contaminación por metales pesados	15
1.6.9. Tratamientos de remediación para metales pesados	15
1.6.10. Métodos de tratamiento para metales pesados en medios líquidos	16

1.6.11.	<i>Tratamientos Biológicos de remediación para metales pesados</i>	16
1.6.12.	<i>Procesos de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados.</i>	17
1.7.	Microorganismos	17
1.7.1.	<i>Microorganismos y sus ambientes naturales</i>	18
1.7.2.	<i>Microorganismos del agua</i>	18
1.7.3.	<i>Microorganismos presentes en aguas residuales</i>	18
1.8.	Crecimiento Bacteriano	20
1.8.1.	<i>Crecimiento bacteriano en Medios de Cultivo</i>	20
1.9.	Medios de Cultivo	21
1.9.1.	<i>Tipos de Medios de Cultivo</i>	21
1.10.	Aislamiento de Bacterias	22
1.11.	Métodos de Identificación bacteriana	23
1.12.	Tinción de Gram	24
1.12.1.	<i>Bacterias Gram Positivas y Bacterias Gram Negativas</i>	24
1.13.	Resistencia Bacteriana	25
1.13.1.	<i>Tipos de resistencia:</i>	25
1.14.	Importancia de las bacterias resistentes	26
1.15.	Bacterias resistentes a metales pesados	26
1.16.	Mecanismos de Resistencia a metales pesados	27
1.16.1.	<i>Exclusión de metales por barrera de permeabilidad</i>	27
1.16.2.	<i>Eflujo de metales por transporte activo</i>	27
1.16.3.	<i>Secuestro intracelular</i>	27
1.16.4.	<i>Secuestro extracelular</i>	28
1.16.5.	<i>Transformación enzimática de metales a una forma menos tóxica</i>	28
1.16.6.	<i>Reducción de la sensibilidad de blancos celulares a metales</i>	28
1.17.	Determinantes de resistencia a metales pesados y su localización genética	28
CAPÍTULO II		29
2.	MARCO METODOLÓGICO	29
2.1.	Diseño Experimental	29

2.1.1.	<i>Tipo y Diseño de Investigación</i>	29
2.1.2.	<i>Unidad de Análisis</i>	29
2.1.3.	<i>Población de Estudio</i>	29
2.1.4.	<i>Tamaño de Muestra</i>	29
2.1.5.	<i>Selección de Muestra</i>	30
2.2.	Lugar de Estudio	30
2.3.	Fases de la Investigación	30
2.3.1.	<i>Fase I: Elección de los puntos de muestreo</i>	31
2.3.2.	<i>Fase II: Siembra y conteo de bacterias resistentes</i>	32
2.3.2.1.	<i>Preparación de Medios de Cultivo</i>	32
2.3.2.2.	<i>Preparación Solución Patrón</i>	33
2.3.3.	<i>Fase III: Aislamiento y Caracterización de clones resistentes a metales pesados</i> .	35
2.3.3.1.	<i>Criterios de Selección</i>	35
2.3.3.2.	<i>Aislamiento de clones bacterianos</i>	36
2.3.3.3.	<i>Estabilización de las colonias</i>	36
2.3.3.4.	<i>Tinción Gram de los aislados bacterianos</i>	37
2.3.4.	<i>Fase IV: Evaluación de resistencia a altas concentraciones</i>	38
2.3.5.	<i>Fase V: Fase de Identificación de los aislados bacterianos resistentes</i>	39
CAPITULO III		41
3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS	41
3.1.	Fase I: Caracterización físico-química	41
3.2.	Fase II: Aislamiento	42
3.2.1	<i>Conteo microbiológico inicial</i>	43
3.3.	Fase III: Selección de aislados bacterianos	50
3.4.	Fase IV: Estabilización de aislados bacterianos	50
3.5.	Fase V: Tinción Gram de los aislados bacterianos	52
3.6.	Fase VI: Evaluación de resistencia bacteriana a metales pesados (Pb, Cr, Cd, Hg)	
	53	
a.	Primera Evaluación	54
b.	Segunda Evaluación	54

c.	Tercera Evaluación	55
d.	Cuarta evaluación.....	55
e.	Quinta evaluación.....	56
f.	Sexta evaluación	57
g.	Séptima evaluación.....	58
h.	Octava evaluación.....	58
i.	Novena evaluación.....	59
3.6.1.	<i>Resistencia al Plomo</i>	61
3.6.2.	<i>Resistencia al Cromo</i>	62
3.6.3.	<i>Resistencia al Cadmio</i>	63
3.6.4.	<i>Resistencia al Mercurio</i>	64
3.7.	Fase VII: Identificación de las cepas bacterianas aisladas más resistentes a metales pesados.....	66
3.7.1.	<i>Tinción Gram de los aislados bacterianos más resistentes a concentraciones de metales pesados</i>	66
3.8.	Fase VIII: Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de los clones bacterianos aislados.	67
	CONCLUSIONES.....	69
	RECOMENDACIONES	70
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Criterios y ejemplos Metodológicos Aplicados a la Identificación Bacteriana.....	23
Tabla 1-2. Sales de metales pesados utilizadas para la preparación de medios de cultivo.	33
Tabla 2-2. Distribución de los aislados bacterianos y muestras.	38
Tabla 3-2. Concentraciones de sal de metal pesado utilizado en las pruebas de resistencia	39
Tabla 1-3. Resultados de análisis de parámetros físico-químicos	41
Tabla 2-3. Resultados de concentración de metales pesados en las muestras de agua del río. ...	41
Tabla 3-3. Conteo microbiológico inicial para M1.....	43
Tabla 4-3. Conteo microbiológico inicial para M2.....	43
Tabla 5-3. Conteo microbiológico inicial para M3.....	44
Tabla 6-3. Conteo microbiológico inicial para M4.....	44
Tabla 7-3. Conteo microbiológico inicial para M5.....	44
Tabla 8-3. Conteo microbiológico inicial para M6.....	45
Tabla 9-3. Conteo microbiológico inicial para M7.....	45
Tabla 10-3. Numero de aislados seleccionados.	50
Tabla 11-3. Identificación de los clones aislados y estabilizados con 50 µg/ml de metal.	51
Tabla 12-3. Resultados de Evaluación Microscópica y Tinción Gram de clones estabilizados. ...	52
Tabla 13-3. Resultado de crecimiento de los clones en presencia de Pb, Cr, Cd y Hg a una concentración de 50 µg/ml y 100 µg/ml.	55
Tabla 14-3. Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb, Cr, Cd y Hg a una concentración de 200 µg/ml y 400 µg/ml.	56
Tabla 15-3. Resultados de crecimiento de clones a una concentración para el Cr de 600 µg/ml y 750 µg/ml.	57
Tabla 16-3. Resultados de crecimiento de clones en presencia de Pb, Cd y Hg a una concentración de 750 µg/ml y 1000 µg/ml	58
Tabla 17-3. Resultados de crecimiento de clones en presencia de Pb, Cd y Hg a una concentración de 2000 µg/ml y en presencia de Pb a una concentración de 3000 µg/ml.....	59
Tabla 18-3. Concentración máxima de resistencia a metales pesados de los clones evaluados .	60
Tabla 19-3. Porcentaje de resistencia de los clones aislados según los medios suplementados .	61
Tabla 20-3. Clones más resistentes escogidos para su identificación.	66
Tabla 21-3. Identificación mediante pruebas bioquímicas para bacilos gramnegativos.....	67
Tabla 22-3. Identificación mediante pruebas bioquímicas para bacilos grampositivos	67

ÍNDICE GRÁFICOS

Gráfico 1-3 Estimación de crecimiento en medio PCA	46
Gráfico 2-3 Estimación de crecimiento en medio PCA expresado en escala logarítmica	46
Gráfico 3-3 Estimación de crecimiento en medios suplementados con metal pesado.....	47
Gráfico 4-3 Estimación de crecimiento en medios suplementados en escala logarítmica.....	47
Gráfico 5-3. Estimación de crecimiento de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, M6.....	48
Gráfico 6-3 Estimación de crecimiento bacteriano en la muestra M7	49
Gráfico 7-3. Crecimiento de bacilos y cocos en la tinción gram.....	53
Gráfico 8-3. Resistencia al Plomo	62
Gráfico 9-3. Resistencia al cromo	63
Gráfico 10-3. Resistencia al cadmio.....	64
Gráfico 11-3 Resistencia al mercurio	65
Gráfico 12-3 Resultados de géneros obtenidos de las cepas aisladas	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Demarcación Hidrográfica de la Cuenca del Río Pastaza	8
Figura 2-1 Demarcación hidroGráfico de la subcuenca del río Chambo	9
Figura 3-1. Microcuencas de la Provincia de Chimborazo	10
Figura 4-1. Bacterias Gram Positivas y Bacterias Gram Negativas	24
Figura 1-2 Ubicación de la Microcuenca del Río Chibunga.....	30
Figura 2-2 Localización de los puntos de muestreo Rio Chimborazo-San Luis	31
Figura 3-2 Muestreo en el Punto M1-Río Chimborazo	34
Figura 4-2 Recuento de heterótrofos	36
Figura 5-2 Tinción Gram de las muestras.	37

RESUMEN

El objetivo de la presente trabajo de titulación fue evaluar la resistencia a los metales pesados Plomo (Pb²⁺), Cromo (Cr⁶⁺), Cadmio (Cd²⁺) y Mercurio (Hg²⁺) de aislados bacterianos para obtener clones resistentes y caracterizarlos. Estos fueron obtenidos a partir de muestras de agua de la Microcuenca del Río Chibunga. Para esto se aislaron clones bacterianos de siete muestras de agua provenientes de distintos puntos a lo largo de la microcuenca, utilizando medio de cultivo PCA suplementado con metales pesados para estimar el crecimiento bacteriano con el fin de aislar las bacterias resistentes. Se obtuvieron 32 clones los cuales se estabilizaron y se caracterizaron por medio de tinción gram, siendo las bacterias gram negativas las que predominaron. Estos clones fueron sometidos a concentraciones crecientes de metal pesado para evaluar su resistencia, de los cuales el 75% fue resistente a plomo hasta una concentración de 2000 ug/ml, un 56% fue resistente a cromo hasta una concentración de 600 ug/ml, un 25% fue resistente a mercurio hasta la concentración de 1000 ug/ml y el 19% fue resistente a cadmio hasta 1000 ug/ml. Además ocho clones presentaron multiresistencia para todos los metales pesados en diferentes concentraciones, todos provenientes de la muestra cinco. Se caracterizaron por medio de pruebas bioquímicas nueve clones obteniéndose como resultado que estas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter* y *Sthaphylococcus*. Los resultados muestran que existen bacterias que resisten a varias concentraciones de metal pesado además indican que existe multiresistencia, por lo cual pueden ser utilizadas en procesos de biorremediación de agua contaminada con metales pesados por tal motivo se recomienda investigar la eficiencia de estas bacterias en la remediación de ambientes contaminados con metales.

Palabras clave: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <RESISTENCIA A METALES PESADOS>, <BACTERIAS>, <MICROORGANISMOS>, <PLOMO (Pb)>, <CROMO (Cr⁶⁺)>, <CADMIO (Cd)>, <MERCURIO (Hg)>, <MICROBIOLOGÍA>

SUMMARY

The objective of this degree research was to evaluate the resistance to heavy metals Lead (Pb²⁺), Chromium (Cr⁶⁺), Cadmium (Cd²⁺), and Mercury (Hg²⁺) of bacterial isolates to obtain resistant clones and characterize. These were obtained from water samples from the Chibunga River Micro-Watershed. For this, bacterial clones were isolated from seven water samples from different points along the Micro-Watershed, using PCA (Plate Count Agar) culture medium supplemented with heavy metals to estimate bacterial growth in order to isolate the resistant bacteria. 32 clones were obtained which were stabilized and characterized by means of gram staining, being the gram bacteria negative which predominated. These clones were subjected to increasing concentrations of heavy metal to evaluate their resistance, of which 75% was resistant to lead up to a concentration of 2000 ug / ml, a 56% was resistant to chromium up to a concentration of 600 ug / ml, 25% was resistant to mercury up to the concentration of 1000 ug / ml, and 19% was resistant to cadmium up to 1000 ug / ml. In addition, 8 clones presented multi-resistance for all heavy metals in different concentrations, all of them from sample five. They were characterized by means of the biochemical tests nine clones, obtaining as a result that these belong to the genera *Pseudomonas*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter* and *Staphylococcus*. The results show that there are bacteria which resist several concentrations of heavy metal, also indicate that there is multi-resistance, so they can be used in processes of bioremediation of water contaminated with heavy metals. For this reason, it is recommended to research the efficiency of these bacteria in the remediation of environments contaminated with metals.

Key words: <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <RESISTANCE TO HEAVY METALS>, <BACTERIA>, <MICROORGANISMS>, <LEAD (Pb)>, <CHROMIUM (Cr⁶⁺)>, <CADMIUM (Cd)>, <MERCURY (Hg)>, <MICROBIOLOGY>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

Los metales pesados son constituyentes naturales de la corteza terrestre que se usan en varias actividades antropogénicas, estos pueden llegar a ser contaminantes del agua debido a descargas líquidas sin tratamiento en distintos cuerpos de agua como los recursos hídricos que son un pilar fundamental en el desarrollo de diferentes actividades como urbanas, industriales, agrícolas, etc., esto se debe a que los elementos químicos presentes en ciertos contaminantes no son degradables y tienen efectos tóxicos o mutagénicos sobre los organismos que están expuestos a ellos. Lo ha generado una importante contaminación.

En la región centro del país existe contaminación del agua debido a que no se cuenta con un control y supervisión adecuada por parte de las entidades competentes de vertidos industriales, agrícolas, domésticos, entre otros, alterando el ecosistema donde son descargados.

El Río Chibunga es un recurso hídrico del cual se beneficia la población que habita su curso. Estudios realizados en sus aguas durante los últimos años indican que posee un alto nivel de contaminación debido a descargas industriales, aguas residuales urbanas, aguas contaminadas con pesticidas entre otras. Según el Proyecto de Gestión Integral de la Cuenca del Río Chambo (de la que es parte el Río Chibunga) del CESA, Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas, se determinó que el 80% de los 4.500 litros por segundo que corren por este afluente está contaminado con coliformes fecales y metales pesados (CESA, 2010). Además estudios realizados sobre la calidad de agua del Río Chibunga por el CEAS, Centro de Estudios y Acción Social, indican que existe la presencia de metales pesados en este río. (Bustos & Bustos, 2010, pp. 7-10). Por tal motivo se puede afectar directamente a la población que está en contacto con su cauce, generando un problema de salud pública.

Los microorganismos en contacto con metales pesados pueden llegar a tolerar ciertas cantidades de los mismos porque generan ciertos mecanismos de resistencia. Existen pocos estudios relacionados a los beneficios que pudieran tener estos microorganismos que pueden llegar a ser utilizados en tratamientos de biorremediación para degradar a contaminantes que sean peligrosos o transformarlos en formas menos tóxicas.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los vertidos residuales sin tratamiento derivados de las actividades humanas liberan una gran cantidad de elementos contaminantes, dentro los cuales se encuentran los metales pesados que han constituido un gran problema ambiental ya que no pueden ser degradados ni destruidos y se acumulan en la cadena trófica, pudiendo llegar a afectar a la salud de las personas, esto lo convierte en un problema de salud pública que debe ser solucionado.

Los métodos de tratamiento biológico para metales pesados donde se utilizan microorganismos se han convertido en una alternativa viable por su bajo costo y su especificidad. El vertido de aguas residuales genera una relación entre contaminantes y microorganismos que puede originar una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de tolerancia. La presencia de metales pesados ejerce una presión selectiva sobre los microorganismos expuestos a ellos, motivando a que se adapten a estas condiciones ambientales, solo los microorganismos que contrarresten los efectos tóxicos de estos metales son capaces de sobrevivir.

Es por ello que esta investigación evalúa la cantidad de bacterias resistentes para aislar y caracterizar cepas bacterianas capaces de sobrevivir en ambientes con metales pesados tales como Mercurio, Cromo, Cadmio, y Plomo, con el fin de evaluar la tolerancia de bacterias a metales pesados y que posteriormente puedan ser utilizadas como potenciales herramientas biotecnológicas para remediar ambientes contaminados con metales.

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Existen pocas investigaciones realizadas sobre bacterias resistentes a metales pesados en el contexto de nuestra región, aun así las investigaciones realizadas han comprobado que existe un gran porcentaje de bacterias que resiste a concentraciones elevadas de metales pesados como la realizada por Moraga, Merino & Mondaca en el año 2003 quienes realizaron un estudio de la microbiota de la bahía de Iquique (Chile), utilizando CuSO_4 como presión selectiva a una concentración de 800 $\mu\text{g/ml}$, en el cual se obtuvo bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes* resistentes a Pb, As, Ni, Cu, Hg, Zn, Cr y Cd; Además se evidenció de una relación entre la resistencia a los metales pesados y la resistencia a antibióticos. (Moraga, et al., 2003, pp. 91-93)

Las investigaciones realizadas han encontrado una relación entre la resistencia a antibióticos y metales pesados encontrado así multirresistencia como la realizada por Martínez y col. en el año 2010 en el río Almendares (Cuba) donde se presentaba contaminación con metales pesados y desechos domésticos por lo que se realizó una búsqueda de bacterias resistentes a antibióticos e iones metálicos, en muestras de agua y sedimento de este ecosistema acuático. A todos los aislados bacterianos se les determinó la resistencia a los antibióticos Eritromicina (ERI), Penicilina (PEN), Cefalexina (CEF), Cloranfenicol (CLOR), Ceftriaxona (CRO), Cefotaxima (CTX), Cefalexina (CEF), Kanamicina (KAM), Cloranfenicol (CLOR), Amikacina (AMIK), Norfloxacin (NOR), Ceftriaxona (CRO), Cefotaxima (CTX) por el método de Kirby-Bauer, así como la resistencia a plomo, cromo y cadmio. Se identificaron 23 aislados entre los cuales se obtuvieron bacterias de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*. El 88.9% de los clones fueron resistentes a eritromicina, 83.3% de los clones a cloranfenicol y para el resto de antibióticos todos los clones fueron 100% resistentes. Para los metales pesados el 100% de los clones fueron resistentes hasta 1,5 mM de plomo y cromo, en el caso del cadmio el 66,6% de los clones resistieron hasta 1,5 mM. (Martínez, et al., 2010, pp. 1-6).

Paniagua y col. en el año 2003 realizaron una investigación en la comunidad de Reyes Iztacala, Tlalnepantla en el Estado de México analizando cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* determinando su resistencia a antibióticos y metales pesados, para esto utilizaron 150 cepas clínicas provenientes de pacientes contagiados. Los metales pesados analizados fueron plomo, cromo en forma de cromato, cadmio y arsénico en forma de arsenato. Obteniendo como resultado que 97,4% de las cepas fueron resistentes a plomo con una concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 800 y 3200 ug/ml, el 100% de las cepas fueron resistentes a cromato con CMI de 375 ug/ml y mercurio con CMI de 20 ug/ml y el 26% de las cepas presentaron resistencia a arsenato con CMI entre 800-1600 ug/ml. En el caso de los antibióticos fueron resistentes el 94% de las cepas a ampicilina y penicilina, 92% a ceftazidima, 73% a eritromicina, 57% a pefloxacina, 40% a cefotaxima y tetraciclina, 36% a dicloxacilina, 32% a trimetoprim con sulfametoxazol, 24% a gentamicina, 10% a cefuroxima y 7% a cefalotina. (Paniagua C., et al., 2003, pp. 13-21)

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

- Evaluar a la población microbiana resistente a los metales pesados Hg, Cr, Cd, Pb en la microcuenca del Río Chibunga.

Objetivos específicos

- Caracterizar físico-química y microbiológicamente muestras de agua provenientes de la microcuenca del río Chibunga
- Aislar a partir de muestras de agua bacterias resistentes a metales pesados (Hg, Cr, Cd, Pb).
- Evaluar la resistencia de aislados bacterianos a metales pesados
- Identificar a algunos de microorganismos que son resistentes a metales pesados (Hg, Cr, Cd, Pb).

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Agua

Constituye la sustancia más abundante del planeta Tierra siendo la única que se puede encontrar tanto en estado líquido, sólido y gaseoso. (FAO, 2016).

1.2. Importancia del agua

De la cantidad total del agua del planeta el 97% es salada y el 3% es dulce, de este tres por ciento su gran mayoría está congelada en los glaciares, otro tanto se encuentra en el agua subterránea, atmósfera, humedad del suelo y los lagos, una menor parte es la que encontramos en los ríos y una pequeña porción es la que llamamos “agua de consumo” que es el agua que utilizamos a diario.

El agua es fundamental para el equilibrio del ecosistema porque es indispensable para el desarrollo de todos los procesos biológicos. En los seres vivos la composición porcentual promedio es 70% a pesar que no todos tienen esta misma cantidad, esta continúa siendo el constituyente principal.

El agua ayuda a regular el clima a través de su ciclo hidrológico, permaneciendo relativamente constante a través del tiempo, la disponibilidad de este recurso se ve afectada por los diversos cambios climáticos del planeta y el nivel de contaminación que va en aumento. Cabe recalcar que es el principal recurso para el funcionamiento de la vida y es el punto de estabilización del cualquier medio ambiente.

Las aguas que podemos utilizar para nuestro beneficio las llamamos recursos hídricos. Además para las actividades antropogénicas el agua es muy importante para las actividades industriales, agrícolas, domésticas, recreativas, entre otras, siendo utilizado y desperdiciado a diario. (AAG Center for Global Geography Education, 2011).

1.3. Tipos de Agua

Algunos de los principales tipos de agua son los siguientes:

- Agua dulce es el agua natural que tiene una concentración baja en sales la cual es utilizada para el consumo humano.
- Agua salada posee con una concentración alta en sales con más diez mil miligramos por mililitro.
- Agua del suelo es el agua que se encuentra en la parte superior del suelo o en la zona aireación para que pueda ser evotranspirada a la atmósfera.
- Agua estancada es un tipo de agua inmóvil que se encuentra en determinadas zonas de ríos, lagos, lagunas, estanques, acuíferos, etc.
- Agua freática es el agua subterránea que se mantiene en la zona de saturación
- Agua subterránea es el agua que se encuentra en la zona de saturación del suelo y que tiene una movilización lenta desde distintas zonas de elevación
- Agua superficial es el agua natural que se encuentra en la tropósfera como la que se encuentra en los ríos, lagunas, lagos, océanos, mares, humedales, reservorios, etc.
- Agua dura es un tipo de agua que tiene una cantidad significativa de iones positivos, la dureza para este tipo de agua se determina por la cantidad de átomos de calcio y magnesio presentes en el agua.
- Agua blanda es aquella que posee pocos minerales disueltos.
- Aguas negras son un tipo de agua que provienen del agua de abastecimiento de una población que ha sido usada y es contaminada por diversos factores, pueden estar compuestas por grasas, aceites, desechos industriales y domésticos, entre otros.
- Aguas grises son un tipo de aguas doméstica residuales compuestas por el agua residual de actividades como desechos de cocina, baños, lavadoras, fregaderos, etc.
- Aguas residuales son los fluidos residuales de un sistema de alcantarillas que provienen del agua utilizada por una ciudad, comunidad, cultivos, granjas, industrias y contienen ciertas cantidades de materia orgánica suspendida.
- Agua bruta es el agua que no tiene tratamiento alguno o el agua que entra a una planta para su posterior tratamiento.
- Aguas muertas son un tipo de agua que tienen un déficit alto de oxígeno y que tienen una nula o escasa circulación. (JAPAC, 2013)

1.4. Recursos Hídricos

Los recursos hídricos conforman a las aguas interiores que son renovadas a través del ciclo del agua, estas son la fuente principal de agua de consumo. Una pequeña parte de este recurso es verdaderamente usada y aprovechada.

Se refiere también como “Recurso Hídrico” al término usado en las estadísticas totales de caudales de aguas superficiales y subterráneas. Siendo importante acotar que estos caudales no están totalmente disponibles o son realmente aprovechables para el consumo humano. (FAO, 2016).

Los recursos hídricos pueden verse contaminados generalmente por actividades antropogénicas, debido a esto pierden su estado natural siendo peligrosos para el consumo humano, para la agricultura, pesca, etc. Las formas de vida que habitan su agua se ven afectadas debido a la disminución del oxígeno disponible siendo peligrosa para la supervivencia de las formas de vida multicelular. (Agudelo, 2005, pp. 91-100).

1.4.1. Cuenca Hidrográfica.

Una cuenca hidrográfica es todo el conjunto de superficies de terreno circundantes a un río donde sus aguas tienen al río como su punto de drenaje común. Las cuencas hidrográficas se dividen en subcuencas y microcuencas. (SENAGUA, 2009, pp. 1-5).

Una cuenca hidrográfica se conforma de los siguientes componentes: afluentes de tercer orden, afluentes de segundo orden, afluentes de primer orden los cuales desembocaran sus aguas en sus afluentes principales respectivamente y un río principal con un curso de agua que desembocará en el mar.

1.4.2. Cuenca Hidrográfico del Río Pastaza y Subcuenca del Río Chambo

Con un área de 32182,34 km² la cuenca hidrográfica del río Pastaza es la tercera más importante del país con un gran área de drenaje, alcanza una altitud de hasta 5000 m.s.n.m. en la cordillera de los Andes y un caudal de 2051 m³ por segundo (SENAGUA, 2017, pp. 7-10)

Las principales afluentes que alimentan al río Pastaza provienen de los nevados y volcanes Cotopaxi, Altar, Chimborazo, Sangay, entre otros, abarcando un área desde el oriente de la cordillera Real hasta la cordillera Occidental. Las aguas del río Pastaza tienen un aspecto turbio debido la cantidad de sólidos disueltos que transporta, además tiene un color grisáceo debido a los escombros de las laderas que caen durante su cauce. La microbiota es diversa debido a la gran cantidad de drenajes de sus afluentes que provienen de distintos sectores y pisos climáticos. (Palacios, 2013, pp. 8-10).

La cuenca hidrográfica del río Pastaza además se divide en subcuencas, una de ellas es la subcuenca del río Chambo con una superficie aproximada de 3580 km², como se observa en la figura 3-1., se encuentra ubicada en la provincia de Chimborazo y cubre aproximadamente el 50% de la superficie total de la misma, abarcando a siete de los diez cantones de la provincia. Dentro de la provincia de Chimborazo se encuentra el 98% del área total de la subcuenca, donde su cauce comprende en su mayoría a humedales y páramos. La subcuenca también abarca áreas urbanas y rurales, áreas extensas de cultivos, reservas y zonas protegidas como el Parque Nacional Sangay y la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo. (Cómite Subcuenca del Río Chambo, 2015).

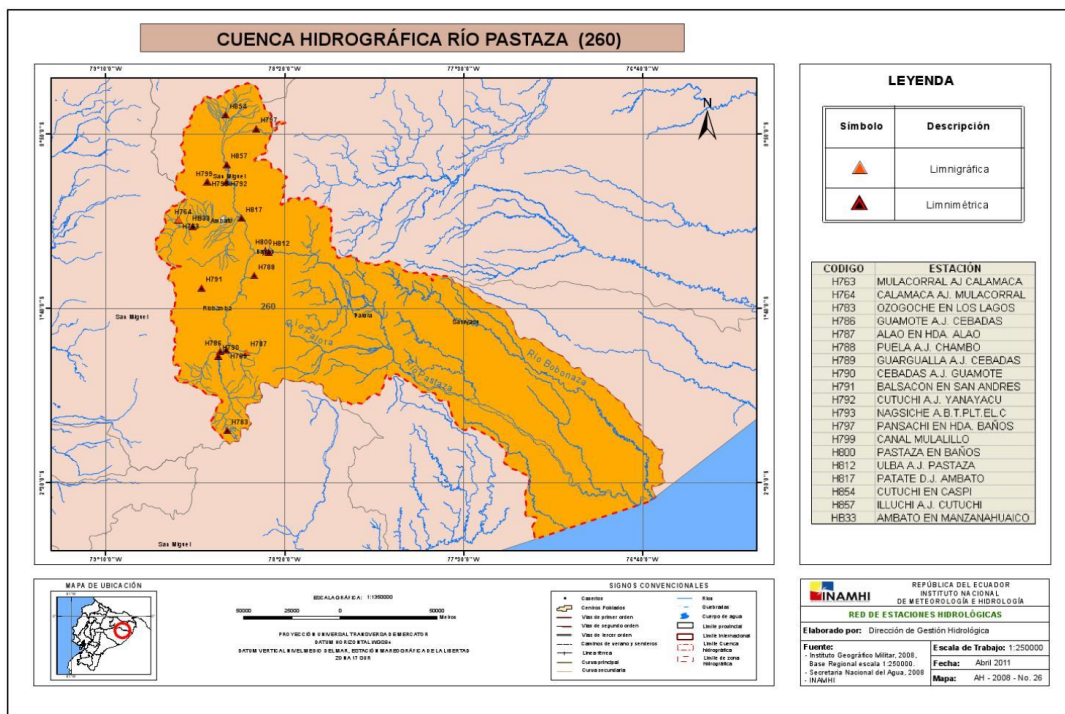


Figura 1-1. Demarcación Hidrográfica de la Cuenca del Río Pastaza

Fuente: Inamhi, 2011.

cultivos que generan descargas residuales agrícolas en el río e incorporan cantidades de materia orgánica. (Jaque & Potocí, 2015, pp. 54-57)

Las actividades antropogénicas han deteriorado la calidad del agua de la microcuenca, convirtiendo al río Chibunga en uno de los ríos más contaminados del país. Cuando el río atraviesa zonas agrícolas se descargan a su cauce gran cantidad de residuos de fertilizantes, pesticidas, abonos químicos, entre otros productos.

El paso a través de zonas pobladas incorporan al río una gran variedad de elementos contaminantes, como materia orgánica, metales pesados, hidrocarburos, aceites y grasas alcanzando niveles que están por encima del límite permisible por la norma nacional debido. (El Telégrafo, 2013)

Son incorporados además las aguas residuales de la ciudad de Riobamba que no cuentan con un debido tratamiento deteriorando aún más la calidad del agua. Según estudios realizados por la Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas (CESA) sus aguas llegan a tener niveles de entre 2000 y 10000 de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), además de gran cantidad de materia orgánica motivo por el cual existe gran cantidad de coliformes fecales, este factor se encuentra elevado hasta cincuenta veces más del límite permisible para que mantenga vida natural. (CESA, 2010)



Figura 3-1. Microcuencas de la Provincia de Chimborazo

Fuente: Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de Chimborazo, 2011

1.5. Aguas Residuales

Son aguas que provienen de un sistema de abastecimiento de una población que han sido alteradas por actividades antropogénicas como las domésticas, industriales, agrícolas, etc, La composición de las aguas residuales está marcada por la incorporación de materia orgánica, coliformes fecales, sólidos suspendidos y sedimentables, además de aceites, grasas y metales pesados. (Ramalho, 2003, pp. 10-12).

1.5.1. Aguas Residuales Domésticas

Las aguas residuales domesticas son aguas que han sido utilizadas en distintas actividades de un hogar ya sean en los baños, cocina, fregaderos, lavado, jardines, entre otras y contienen sólidos, desechos orgánicos, sales, grasas, detergentes que al incorporarse a los sistemas de alcantarillado produce un nivel de contaminación. (Ramalho, 2003, pp. 10-15)

1.5.2. Aguas Residuales Industriales

Son un tipo de agua residual que proviene de las distintas actividades y procesos industriales, la composición de este tipo de aguas depende de la actividad industrial de la que provienen y del tipo de proceso en la que esté involucrada (Ramalho, 2003, pp. 10-15).

1.6. Metales Pesados

Son elementos químicos constituyentes naturales de la corteza terrestre con distintas propiedades metálicas con pesos moleculares muy altos. Dentro de los cuales se incluyen a metales de transición, lantánidos y actínidos. La industria minera explota estos metales con el fin de aprovecharlos en distintas actividades industriales y tecnológicas por este motivo se ven asociadas con la contaminación debido al alto grado de toxicidad hacia los seres vivos. (Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes España, 2016).

1.6.1. Características y toxicidad de los metales pesados

Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos algunas de las características de los metales pesados son las siguientes: Son elementos metálicos que tienen altos pesos moleculares como por ejemplo el mercurio, cromo, cadmio, arsénico, plomo, etc. Otra característica es que son altamente tóxicos para los seres vivos, pequeñas concentraciones pueden afectar gravemente a su salud. Generalmente se acumulan en la cadena alimenticia de los seres vivos. (EPA, 2016).

En los seres vivos pueden llegar a bloquear las actividades biológicas a través de la inactivación enzimática esto se debe a la formación de enlaces entre los metales y los grupos sulfhídricos de las proteínas, ocasionando daños muy graves e irreversibles al ser vivo. (Vullo, 2003, p. 94)

1.6.2. Plomo (Pb)

Según la Organización Mundial de la Salud el plomo es un metal tóxico presente de forma natural en pequeñas cantidades en la corteza terrestre, al combinarse con otros elementos forma diversas sales, óxidos y compuestos organometálicos.

En la industria, el plomo se utiliza en su mayoría en forma de aleaciones con otros metales, como el estaño, arsénico, cobre, cadmio, antimonio, sodio, entre otros. También se encuentra asociado a otras sustancias químicas en productos comerciales como las baterías, la pintura, recubrimientos de cables y cerámicas, en explosivos y municiones, así como también se encuentra en productos agrícolas como los insecticidas y herbicidas.

Los compuestos derivados del plomo son tóxicos, un mal manejo o una exposición prolongada genera altos riesgos a la salud humana. Puede ingresar al cuerpo humano por medio del agua, aire o en alimentos contaminados. (Lenntech BV , 2016)

Las principales fuentes de contaminación de plomo en el ambiente son: La explotación minera, la industria metalúrgica, uso de pinturas y gasolina con plomo pero en su mayoría en la fabricación de baterías de plomo-ácido para automóviles. El plomo también se usa en otros productos como los pigmentos, materiales de soldado, vidrieras, vajillas, esmaltes, joyería, juguetes, municiones, en algunos cosméticos y medicamentos. Se puede encontrar plomo en el agua potable entubada con tuberías de plomo o que poseen soldaduras en base de plomo. En la actualidad, buena parte del plomo comercializado en los mercados mundiales se obtiene por medio del reciclaje. (OMS, 2017)

1.6.3. Cromo

Elemento químico con propiedades metálicas que se distribuye de manera amplia en la naturaleza en forma de mineral como la crocoita, es muy resistente frente a la corrosión. Dentro de los 29 elementos biológicamente más importantes de la corteza terrestre el cromo ocupa el cuarto lugar. Se encuentra en varios estados de oxidación, siendo los más comunes el cromo (III) y el cromo (VI). El cromo (III) biológicamente es un oligoelemento y es necesario para distintos procesos bioquímicos y fisiológicos de los procesos metabólicos de la vida, específicamente su acción se ve reflejada en el metabolismo de la glucosa, del colesterol y de los ácidos grasos, además tiene un papel importante en distintas reacciones enzimáticas sin embargo el cromo (VI) es muy tóxico cuando se pone en contacto con el ser humano siendo clasificado por la IARC (International Agency for Research on Cancer) en el grupo I de cancerígenos comprobados en humanos debido a que en exposición ocupacional pudiera provocar cáncer en el sistema respiratorio. (Téllez, 2004)

1.6.4. Cadmio

El cadmio en la naturaleza se encuentra en mayor cantidad en forma de óxidos, sulfuros, carbonatos. Las características más importantes son su resistencia a la corrosión y sus propiedades electroquímicas por eso es usado para diversas aplicaciones como en la galvanización, en la fabricación de tintes, pinturas, baterías, plásticos, cigarrillos. Además está presente en algunos alimentos enlatados y congelados que han bioacumulado cantidades de cadmio. Algunos de los principales efectos tóxicos que produce el cadmio en la salud de las personas se manifiestan en los huesos y riñones, cabe recalcar que las personas que tengan niveles bajos de hierro en su organismo son vulnerables a los efectos del cadmio. (Pérez, 2012)

Según la Organización mundial de la Salud (OMS) la actividad antropogénica ha incrementado los niveles naturales del cadmio ya que este metal se encuentra presente en rangos bajos en la naturaleza, siendo clasificado como cancerígeno comprobado para los seres humanos. Según la fuente de emisión y por las corrientes de aire el cadmio puede recorrer distancias considerables en el ambiente. Por lo general el cadmio tiende a acumularse con rapidez en ciertos organismos como moluscos y crustáceos y se encuentra en menor cantidad en vegetales, tubérculos, cereales. (OMS, 2017).

1.6.5. Mercurio

En la naturaleza el mercurio está presente de forma elemental o metálica, en forma inorgánica como el cloruro de mercurio y en forma orgánica como en el etilmercurio o metilmercurio, todas estas formas causan efectos negativos a la salud. Además el mercurio presente de forma natural en la corteza terrestre proviene de actividad volcánica y erosión de diversas rocas pero por lo general la principal causa de emisiones de mercurio al ambiente proviene de actividades humanas principalmente como la extracción minera, combustión de carbón, sistemas de calefacción e incineración. El metilmercurio es una transformación natural del mercurio elemental este generalmente tiende a bioacumularse en crustáceos y peces.

La exposición de los seres humanos al mercurio se produce principalmente a través de la inhalación de los vapores de mercurio elemental durante los procesos industriales y mediante el consumo de pescado y mariscos contaminados. (OMS, 2017)

1.6.6. Fuentes de generación de metales pesados

Los metales pesados se encuentran de forma natural en la corteza terrestre, donde están almacenados por millones de años estos provienen de actividad volcánica, sísmica, de impactos de asteroides, entre otros. La industria genera y dispersa una gran cantidad de metales pesados que son utilizados en sus procesos como por ejemplo el zinc, plomo, cromo, cadmio, níquel, mercurio, cobalto, plata, oro o radionucleidos como el torio que pueden contaminar ambientes naturales y afectar a la salud de las personas. (Vullo, 2003).

1.6.7. Importancia de los metales pesados

Los metales pesados son de los recursos más explotados por la humanidad, de los cuales se han extraído de depósitos subterráneos cantidades grandes para su aprovechamiento industrial, comercial, tecnológico. Una de las grandes industrias que se ha beneficiado es la minera que a las rocas ricas en estos materiales las lleva a procesos de fundición y refinado para poder extraerlas, durante este proceso se genera una liberación de pequeñas y grandes cantidades al ambiente. (Suárez & Reyes, 2002)

La gran mayoría de metales pesados se encuentran dentro de los organismos como micronutrientes en mínimas concentraciones, estos se vuelven tóxicos cuando esta concentración aumenta. (Sherameti, et al., 2011)

1.6.8. Contaminación por metales pesados

Cuando los metales pesados actúan como contaminantes tienen efectos nocivos para los ambientes con los que tienen contacto, generalmente llegan a ellos por vertidos industriales, domésticos, agrícolas que no han tenido un tratamiento previo. En el suelo suelen afectar a su fertilidad y deterioran sus características de uso, en el caso del agua cuando existe una contaminación con metales pesados ya sea en lagos, ríos, acuíferos, entre otros, afecta a gran escala a todo su ecosistema ya que para todos los organismos multicelulares los metales pesados en cantidades excesivas son tóxicos y pueden generar la muerte. (García *et al*, 2005)

Los metales pesados cuando actúan como contaminantes ambientales son muy difíciles de remover ya que son muy estables y resistentes porque no pueden ser biodegradados ni destruidos, generalmente esta es la razón por lo cual son considerados como un problema ambiental. (Sherameti, et al., 2011). Pueden transformarse a diferentes estados de oxidación o formar complejos menos tóxicos por medio de métodos de tratamientos químicos pero estos procesos tienen costos excesivos, una alternativa menos costosa es utilizar tratamientos biológicos con bacterias que incorporen metales pesados a su metabolismo. (Martínez, et al., 2010, pp. 1-6)

1.6.9. Tratamientos de remediación para metales pesados

La aplicación de métodos para el tratamiento de metales pesados dependerá del ambiente, de la geología e hidrología del lugar, de factores químicos como la solubilidad y la forma química que se encuentre presente, además otros factores como los procesos de inmovilización y mitigación, y de la medida de dispersión del metal tanto vertical como horizontal.

Los métodos de remoción de metales pesados con químicos son procesos de gran especificidad y que requieren de costos excesivos, además estos procesos no se pueden realizar in situ porque es muy difícil tratar un determinado metal pesado en presencia de otros por la competencia existente. En cambio los métodos biológicos ofrecen la alternativa menos costosa de biorremediación de un ambiente contaminado además hay una mayor especificidad para remover un metal en particular, las operaciones son más flexibles y se pueden realizar tanto in situ como ex situ. (Vullo, 2003).

1.6.10. Métodos de tratamiento para metales pesados en medios líquidos

Los métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con metales incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación, estos resultan costosos e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja. El uso de sistemas biológicos para la eliminación de metales pesados a partir de soluciones con concentraciones bajas tienen una buena eficiencia y bajo costo.

Dentro de la biotecnología existen principalmente tres procesos para tratar aguas residuales contaminadas con metales pesados. La precipitación extracelular, la biosorción y la captación estos procesos se realizan a través de biopolímeros y moléculas especializadas que provienen de células de microorganismos, involucrando fenómenos físicos, químicos y biológicos. Estos procesos se utilizan en la actualidad para controlar la contaminación de diversas actividades industriales como en la minería, producción metálica, fundiciones, extracción del petróleo. (Cañizares Villanueva, 2000, pp. 133-134)

1.6.11. Tratamientos Biológicos de remediación para metales pesados

Las estrategias de remediación basadas en procesos microbianos pueden minimizar la toxicidad y la biodisponibilidad de los metales pesados. Dentro de estas técnicas se encuentran la bioestimulación en donde se activa a la población microbiana nativa; la bioaumentación que involucra la introducción artificial de poblaciones bacterianas para aumentar y mejorar la capacidad de degradación, la bioacumulación que utiliza células vivas para acumular sustancias químicas en su organismo y la biosorción que capta iones metálicos mediante biomasa microbiana. Estas técnicas se caracterizan por ser tecnologías de remediación promisorias desde el punto de vista económico y de efectividad (Rajendran et al, 2003). De otro lado, la fitoremediación es el uso de plantas para remover contaminantes del ambiente. Existen plantas denominadas hiperacumuladoras que pueden absorber grandes cantidades de metales en sus tejidos aéreos (tallos y hojas), lo cual permite el postratamiento de los metales pesados. (Beltrán-Pineda, 2016, pp. 173-178).

1.6.12. Procesos de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados.

Las técnicas de biorremediación utilizan organismos vivos y en particular microorganismos para reducir, eliminar o inmovilizar contaminantes, transformando o degradando los contaminantes a especies químicas no peligrosas o con menor peligro, denominándose los procesos “biotransformación” y “biodegradación” respectivamente. La biotransformación es cualquier alteración de la estructura atómica o molecular de una especie química, por parte de microorganismos. La biodegradación consiste en la disgregación de sustancias orgánicas en moléculas menores o en componentes inorgánicos, denominándose “mineralización” a la degradación completa de un contaminante orgánico en constituyentes inorgánicos.

Estos procesos de transformación y degradación son el resultado del uso por parte de los microorganismos de los contaminantes orgánicos como fuente de alimentación y energía. Generalmente en condiciones aerobias los productos finales son CO₂, agua y materia celular y en condiciones anaerobias el producto final de la biodegradación puede ser CH₄, CO₂ y H₂, entre otros.

Para un funcionamiento efectivo de los procesos de biorremediación se deben conjuntar varios factores óptimos de carácter faunístico, nutricional y fisico-químico. Así, los microorganismos nativos deben ser capaces de metabolizar las sustancias contaminantes existentes con los nutrientes y los aceptores de electrones (éstos últimos para proporcionar la energía necesaria a los microorganismos) disponibles en el medio. El principal problema de los metales pesados es que no pueden ser biodegradados, sin embargo los microorganismos pueden interactuar con ellos transformándolos, las principales transformaciones se deben a cambios en el estado de oxidación. Esto influye de forma drástica en la movilidad del contaminante, ya que en algunos casos aumenta la solubilidad de los productos de alteración, favoreciendo así su eliminación del medio, mientras que en otros casos disminuye, produciéndose una inmovilización del contaminante. (López Gutiérrez, 2001, pp. 233-240).

1.7. Microorganismos

Grupo amplio y diverso de organismos microscópicos que existen como células aisladas o asociadas; también incluye el estudio de los virus. (Madigan & Martinko, 2005)

1.7.1. *Microorganismos y sus ambientes naturales*

Cada hábitat tiene diferentes características que favorecen a determinados organismos y que perjudican a otros, motivo por el cual las comunidades microbianas que viven en estos tienen sus características definidas por el hábitat. Un ecosistema microbiano relaciona tanto a las comunidades microbianas y a todos los componentes físicos y químicos del medio. Debido a esto existen importantes comunidades microbianas en el suelo, en el agua, tanto en ríos, lagos, océanos, vertientes, etc. También asociados con organismos superiores como plantas y animales. (Madigan, et al., 2003)

1.7.2. *Microorganismos del agua*

La variabilidad microbiológica de las aguas naturales abarca numerosos organismos e incluye células eucariotas (algas, protozoarios y hongos), células procariotas (bacterias) y virus.

1.7.3. *Microorganismos presentes en aguas residuales*

De acuerdo a tipo y concentración de sustancias en las aguas residuales, varía la cantidad de microorganismos presentes en ellas. Influyen también factores físicos y químicos como la temperatura, ph, sólidos disueltos, etc., debido a que cada organismo tiene diferentes requerimientos de estos parámetros para poder desarrollarse. A medida que la cantidad de un nutriente va en aumento, lo hace también la cantidad de microorganismos, mientras que el número de especies disminuye. (Vazquez, 2017)

Los principales grupos de microorganismos presentes en aguas superficiales y en aguas residuales son bacterias, hongos, algas, protozoos y virus. (Tchobanoglous & Crites, 2000) (Vargas, 1996)

1.7.3.1. *Hongos*

Mohos, setas, levaduras y otros organismos que no tiene clorofila y normalmente son inmóviles, filamentosos y multicelulares. Algunos crecen en el suelo, mientras otros se sujetan a árboles y

otras plantas de donde obtienen nutrientes. Algunos son patógenos, mientras que otros estabilizan aguas residuales y digieren desperdicios (EPA, 2016).

1.7.3.2. Algas

Plantas simples sin raíces que crecen en proporción a la cantidad de nutrientes disponibles en aguas donde llega luz solar. Las algas pueden afectar negativamente la calidad del agua al reducir el nivel de oxígeno disuelto en ella. Sirven de alimento para los peces y pequeños animales acuáticos (EPA, 2016). Estos microorganismos contienen necesariamente clorofila para la actividad fotosintética, sin embargo el color verde puede estar enmascarado por la presencia de otros pigmentos carotenoides. Son aerobias, y en ambientes con poco oxígeno, mueren, flotan y se descomponen produciendo mal olor (Apella, 2005, pp. 2-6)

1.7.3.3. Protozoos

Animales unicelulares microscópicos más grandes y más complejos que las bacterias. Pueden causar enfermedades (EPA, 2016). Los protozoos son células eucariotas simples (organismos cuyas células tienen membrana nuclear) con características del reino animal, ya que son móviles y heterótrofos. El nombre proviene del griego proto: primero y zoo: animal, debido a que existe la hipótesis de que son los seres vivos más antiguos. Debido a su tamaño pequeño y a la producción de quistes que les permiten resistir a las condiciones medioambientales adversas. (Alvarez, 2006).

1.7.3.4. Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procariontes de pequeño tamaño y diversidad en su forma: esferas, barras, hélices, entre otras. (Madigan & Martinko, 2005). Organismos microscópicos vivientes que pueden ayudar en el control de la contaminación al metabolizar la materia orgánica en aguas residuales, derrames petroleros y otros contaminantes. Sin embargo, las bacterias presentes en el suelo, agua o aire puede también causar problemas de salud en humanos, animales y plantas. (EPA, 2016).

La evolución de las bacterias se debe en gran parte a su metabolismo, es decir según la fuente de carbono que utilicen como los autotótrofos cuya fuente principal de carbono es el CO₂, los heterótrofos utilizan como principal fuente de carbono a la materia orgánica, existen otros organismos que utilizan a la luz como fuente de energía estos son los fotoautotrofos y los quimiótrofos que oxidan a compuestos químicos para utilizarlos como fuente de energía. (Scragg, 1996)

1.8. Crecimiento Bacteriano

Crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de las estructuras y los constituyentes celulares de un organismo. Se considera crecimiento microbiano al incremento del número de células microbianas es decir a la proliferación de una población. (Benintende, 2008, pp. 1-6).

Se requiere un alto nivel de adaptación en los microorganismos para acoplarse a los cambios químicos y físicos de un medio, por ejemplo un microorganismo facultativo a través del metabolismo oxidativo producirá enzimas necesarias para adaptarse a un medio anaerobio. Los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a las características físicas, químicas y biológicas del medio, sin embargo cambios repentinos afectan significativamente a las poblaciones que en algunos casos solo una pequeña porción sobrevive, siendo estos los más resistentes. (Scragg, 1996, pp. 191-192)

Para determinar que existe crecimiento se toma como referencia el aumento en el número de los microorganismos los cuales se dividen por medio de gemación y fisión binaria. Las células microbianas que no obtienen crecimiento son definidas como no viables ya que una vez que fueron incubadas por un período de tiempo fueron incapaces de multiplicarse, esto debido a que el medio donde se desarrolla no tienen los nutrientes suficientes para su desarrollo o contiene materiales tóxicos que impiden el crecimiento, otros factores que pueden afectarlos son los cambios en la cantidad de oxígeno, alteración en los valores de pH y temperatura. (Scragg, 1996).

1.8.1. Crecimiento bacteriano en Medios de Cultivo

El crecimiento bacteriano se da con mayor especificidad en distintos medios de cultivo que son definidos como soluciones con nutrientes que se usan para cultivar microorganismos en el laboratorio. Dentro de la microbiología se utilizan dos tipos los químicamente definidos y los

complejos o definidos. Los medios definidos están formados por cantidades exactas de compuestos ya sean orgánicos o inorgánicos disueltos en agua destilada, es decir su composición química es exacta. (Madigan & Martinko, 2005)

Los medios complejos en muchos casos suelen ser los más adecuados ya que contienen hidrolizados de componentes orgánicos como la carne, levaduras soja y algunas proteínas o sustancias nutritivas que no son químicamente definidas. Estos complejos hidrolizados están disponibles en el mercado en forma de polvo y se utilizan disueltos en agua destilada. (Madigan, et al., 2003).

1.9. Medios de Cultivo

Un medio cultivo es una solución que posee características nutritivas y que en concentraciones adecuadas se utiliza para cultivar microorganismos, donde se multiplicaran y formaran colonias.

1.9.1. Tipos de Medios de Cultivo

Según a la finalidad a la que vayan a estar destinados los medios de cultivo se dividen en:

1.9.1.1. Medios Selectivos

Son los utilizados para inhibir el crecimiento de distintas bacterias y poder aislar y seleccionar a las requeridas que esten presentes en una muestra. Esta selectividad se obtiene añadiendo distintas sustancias selectivas, por ejemplo sales biliares que inhiben a bacterias grampositivas del género cocos u otras sustancias complejas como los antibióticos. (Alvarez , et al., 1990)

Este proceso requiere suplementar y añadir nutrientes o componentes inorgánicos para reproducir las condiciones de crecimiento de ciertos microorganismos con el objetivo de aislarlos y separar a los microorganismos no deseados. Para que el proceso tenga éxito se necesita primero de un inóculo que contenga al microorganismo en cuestión, por lo que se inicia seleccionando el medio apropiado para sembrar el inóculo y que se desarrolle en un ambiente selectivo. (Madigan, et al., 2003).

1.9.1.2. Medios de diferenciación

Son medios utilizados para diferenciar a las bacterias presentes en una muestra que presentan una respuesta positiva a una reacción bioquímica de otras que no muestran ninguna reacción. Los medios que se utilizan para las enterobacterias son de diferenciación ya que contienen lactosa. (Alvarez , et al., 1990).

1.9.1.3. Medios de Identificación

Son los medios que se utilizan para estudiar el comportamiento de bacterias sobre un sustrato determinado. Se utilizan para la identificación de bacterias por ejemplo en pruebas bioquímicas. (Alvarez , et al., 1990)

1.9.1.4. Medios de Multiplicación

Son aquellos que a través de sus componentes, crean un ambiente óptimo para el crecimiento de un grupo de bacterias y que conllevara a un máximo crecimiento celular bacteriano en un menor tiempo. Se utilizan por ejemplo en la industria para preparar vacunas o antibióticos. (Alvarez , et al., 1990)

1.10. Aislamiento de Bacterias

Es un proceso que consiste en seleccionar los organismos de interés y separarlos de una comunidad microbiana, esto es importante debido a que los cultivos obtenidos sirven para realizar estudios más detallados en condiciones controladas. (Madigan, et al., 2003)

1.11. Métodos de Identificación bacteriana

Las bacterias se clasifican según sus características taxonómicas en categorías según sus características, agrupándolas según la familia, género, especie, tipo y cepa bacteriana. (Romero, 2010, pp. 247-251).

Algunos de los criterios utilizados para la identificación de las bacterias son: la de observación macroscópica y microscópica, su metabolismo y otras propiedades como la resistencia a algún agente como se puede evidenciar en la Tabla 1-1. (Zaragoza Crespo & Gimeno Cardona, 2008).

Tabla 1-1. Criterios y ejemplos Metodológicos Aplicados a la Identificación Bacteriana

CRITERIO	METODOLOGÍA EN EJEMPLO
OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA	Observación e inspección de colonias: disposición, tamaños, textura, forma, pigmentos, etc.
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	Tinciones: formas, agrupación, esporas, cápsula, flagelos, etc.
METABOLISMO	Bacterias Bioquímicas: uso de sustratos (oxidación/fermentación), producción de metabolitos secundarios, etc.
OTRAS PROPIEDADES	Resistencia a antibióticos: antibiograma y antibiotipos, ribotipos, fagotipos, estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias, estudio de sinergias o antagonismos, etc.

Realizado por: Cristian Salgado, 2018

Fuente: (Zaragoza Crespo & Gimeno Cardona, 2008)

La identificación bacteriana hasta el nivel de género y especie se ha realizado convencionalmente mediante el uso de medios de cultivo, pruebas bioquímicas y tinciones. Con el avance de la tecnología se han perfeccionado las técnicas de identificación, siendo las técnicas moleculares las más precisas. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica automatizada que ayuda a la identificación de diversas bacterias por sus características genéticas, esta técnica es altamente sensible y de gran especificidad ya que amplifica un fragmento de ADN para obtener muchas copias de una región particular de ADN, obteniendo así suficiente material genético para poder identificar una bacteria con mayor precisión. (Romero, 2010, pp. 247-251)

1.12. Tinción de Gram

La tinción gram es una técnica desarrollada por Hans Christian Joachim Gram en 1884, la cual sirve de evaluación diferencial de un gran número de bacterias. Utiliza colorantes para diferenciar dos grandes grupos microbianos los gram positivos de color violeta y los gram negativos que tienen una coloración rosa. Se puede evaluar aparte del grupo de color otras características como la forma que define a cocos, bacilos, micrococos, cocobacilos, etc.; si presentan cápsula, si poseen endosporas y que forma tienen estas, ya sea ovalada, esférica, terminal etc.; sus bordes si cóncavos, abultados, irregulares, paralelos y su disposición si tienen forma de racimos, cadenas, tétradas, dispersas, etc. (Fernández, et al., 2010, pp. 6-8).

1.12.1. Bacterias Gram Positivas y Bacterias Gram Negativas

El fundamento de diferenciación entre gram positivas y gram negativas es la pared celular (Figura 4-1). La pared celular de las bacterias gram negativas es una pared celular que posee una delgada capa de peptidoglicanos y su membrana externa formada por lipopolisacáridos estas características hacen que sean solubles en solventes orgánicos, motivo por el cual no retienen el colorante cristal violeta y es decolorada por el alcohol pero si retienen a la safranina tornándose de color rosa, en cambio las bacterias gram positivas tienen una pared celular con una capa más gruesa de peptidoglicanos que es más resistente a los solventes orgánicos lo que le permite mantener el color violeta del cristal violeta. (Madigan & Martinko, 2005)

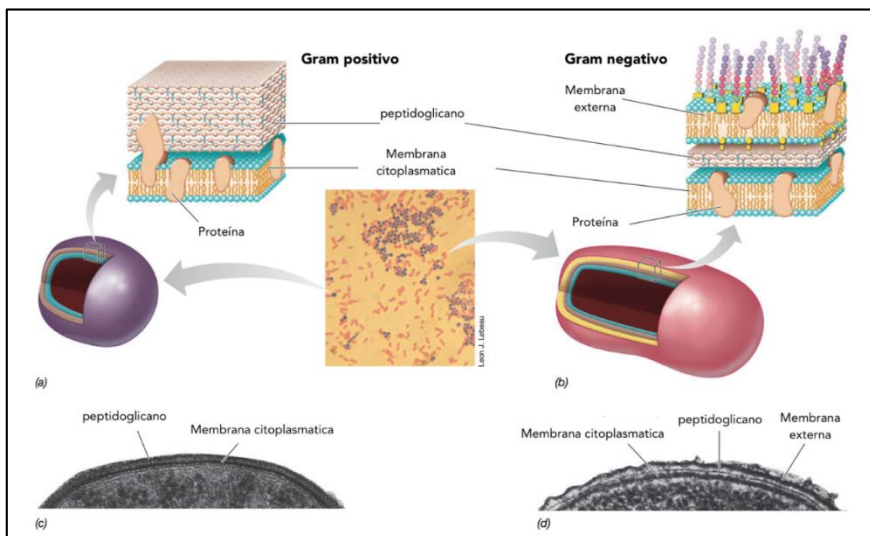


Figura 4-1. Bacterias Gram Positivas y Bacterias Gram Negativas
Fuente: (Ojeda Rios, 2018)

1.13. Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana se define como la capacidad que tienen las bacterias a tolerar y sobrevivir a efectos nocivos de sustancias antimicrobianas. Esta resistencia se produce por ejemplo cuando las bacterias tienen contacto con los antimicrobianos y sufren alteraciones genéticas para sobrevivir al efecto nocivo de estos. (Fernandez & López, 2002, pp. 1-5)

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública ya que al evolucionar y generar más mecanismos de resistencia a antibióticos nos hace incapaces de tratar cierto tipo de infecciones y hace que esta resistencia aumente con el tiempo. Esto generará en un futuro próximo aumento de diferentes tipos de enfermedades que no se puedan tratar a tiempo y lleven a una muerte prematura. (Garbayo, 2017)

1.13.1. Tipos de resistencia:

1.13.1.1. Resistencia Natural

Desde el punto de vista natural es una característica propia y específica de cada familia, género o especie bacteriana sobrevivir en ambientes que son nocivos para la mayoría de bacterias, esta característica le otorga ventajas competitivas respecto a otras especies. Por ejemplo las bacterias gram negativas tienen una resistencia intrínseca a la vancomicina y no se puede variar esta característica. (Departamento de Bacteriología y Virología., 2006)

1.13.1.2. Resistencia Adquirida

Es la resistencia que ha sido adquirida por estar en contacto con el antimicrobiano y que produce mutaciones en los nucleótidos de los cromosomas para sobrevivir a estos, también puede proceder de la transmisión de material genético externo de otras bacterias. Desde el punto de vista clínico es la capacidad de las bacterias sobrevivir a una concentración inhibitoria mínima. (Fernandez & López, 2002, pp. 1-5)

1.14. Importancia de las bacterias resistentes

La resistencia bacteriana es un problema de salud ya que las bacterias van adaptándose a los antimicrobianos generando mutaciones que derivan en enfermedades que son más difíciles de tratar generando así el fracaso de un tratamiento antimicrobiano, además el uso excesivo de antimicrobianos como los antibióticos puede producir perturbaciones en las personas que se ven expuestas a altas concentraciones de estos. (OMS, 2017).

En áreas naturales como en los ríos se ven expresiones de resistencia a ciertos antibióticos y contaminantes como los metales pesados ya que a través de descargas sin tratamiento en los cuerpos de agua se incorporan agentes que no son naturales y cambian el ecosistema del agua, generando por ejemplo que las bacterias sufran alteraciones genéticas para adaptarse a nuevas condiciones, se ha observado en ecosistemas que han sufrido este tipo de alteraciones que la resistencia bacteriana a metales pesados por lo general suele estar asociada a la resistencia a antibióticos. (Moraga, et al., 2003, pp. 91-94)

1.15. Bacterias resistentes a metales pesados

Gran cantidad de células contienen dos tipos de sistemas de captura de cationes de metales pesados, el primero es rápido e inespecífico, expresado constitutivamente y utilizado por una infinidad de sustratos además dependen del gradiente quimiosmótico presente en la membrana citoplasmática bacteriana. El segundo tipo de sistema tiene gran especificidad de sustrato, es lento y habitualmente utiliza hidrólisis de ATP como fuente de energía en complemento al gradiente quimiosmótico. Este sistema que consume energía solo se incita en la célula cuando esta lo requiera, en condiciones nutricionales perniciosas o en algún escenario metabólico especial.

Mientras una célula se enfrenta a grandes concentraciones de metal pesado que se almacena por el sistema inespecífico, el catión del metal pesado es trasladado al citoplasma, a pesar de su gran concentración, porque estos transportadores inespecíficos son expresados constantemente. Por esta razón la entrada no puede cerrarse. Esta “puerta abierta” es la razón principal para que los iones metálicos pesados sean tóxicos. Una vez que el gen que codifica el sistema transportador rápido e inespecífico ha mutado se obtienen mutantes tolerantes a metales pesados.

Dentro de la variedad microbiana existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los microorganismos resistentes tienen la característica de poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia de un metal,

en tanto que los tolerantes muestran indiferencia a la presencia o ausencia del mismo. Por tal motivo los microorganismos resistentes y los tolerantes son de gran interés como captadores de metales en sitios que han sido contaminados, puesto que los dos pueden obtener la capacidad de eliminar los contaminantes. (Marrero-Coto, et al., 2010, pp. 67-78)

1.16. Mecanismos de Resistencia a metales pesados

El rol que cada metal juega en el metabolismo normal, y la presencia de genes localizados en plásmidos, cromosomas o transposones determinan la resistencia a metales pesados en microorganismos que controlan la resistencia a metales. (Sueiro, 2012, pp. 12-15).

Existen varios mecanismos mediante los cuales la célula puede desarrollar resistencia a metales pesados tales como: limitando el acceso de los metales ya sea por barrera de permeabilidad o bombas de eflujo; transformándolos en moléculas menos tóxicas; alterando componentes celulares para disminuir su sensibilidad a los mismos; o mediante el secuestro intra o extracelular (Cervantes, et al., 2006, pp. 203-210). A continuación se detallan algunos de los mecanismos de resistencia:

1.16.1. Exclusión de metales por barrera de permeabilidad

Algunas alteraciones en la composición de la pared celular, membrana, o envoltura de un microorganismo son ejemplos de mecanismos que interfieren la entrada de metales por barrera de permeabilidad.

1.16.2. Eflujo de metales por transporte activo

Los microorganismos utilizan este mecanismo para exportar los metales tóxicos desde su citoplasma al espacio extracelular

1.16.3. Secuestro intracelular

Es la acumulación de metales en el citoplasma mediante la unión a proteínas de tal manera de prevenir la exposición de componentes celulares esenciales a los mismos.

1.16.4. Secuestro extracelular

Se utiliza este mecanismo con el fin de secuestrar el metal para resguardar a la bacteria por ejemplo en *Stenotrophomonas sp.* JD1 se observa la producción de un exopolisacárido el cual tiene la capacidad de secuestrar a Cr(VI) y de esta forma proteger a la bacteria.

1.16.5. Transformación enzimática de metales a una forma menos tóxica

Es la capacidad de ciertos microorganismos de transformar a metales a una forma menos toxica por ejemplo la reducción enzimática de Cr (VI) a Cr (III) a través de reductasas de cromato, se considera como un mecanismo de resistencia en varios microorganismos.

1.16.6. Reducción de la sensibilidad de blancos celulares a metales

La protección de los blancos celulares puede provenir de mutaciones que disminuyen la sensibilidad de los componentes celulares como las enzimas a los metales pesados, sin alterar su función básica, o por un aumento en la producción del componente celular evitando la inactivación total por el metal. (Sherameti, et al., 2011, pp. 6-10).

1.17. Determinantes de resistencia a metales pesados y su localización genética

Los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados dentro del cromosoma bacteriano, en elementos móviles como plasmidos o transposones o en ambos. Los determinantes plasmídicos que confieren resistencia a metales generalmente poseen una gran especificidad comparable con la que presentan los productos codificados por otros genes que intervienen en el metabolismo celular, y constituyen sistemas inducibles en la mayoría de los casos. (Marrero-Coto, et al., 2010, pp. 68-70)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Diseño Experimental

2.1.1. Tipo y Diseño de Investigación

La investigación se clasifica como experimental y correlacional puesto que se afecta a las variables físicas y químicas del agua del río Chibunga y tiene como propósito medir el grado de resistencia a metales pesados que poseen distintas muestras de bacterias que son capaces de sobrevivir en medios suplementados con concentraciones de estos metales pesados

2.1.2. Unidad de Análisis

Los microorganismos presentes en aguas del río Chibunga.

2.1.3. Población de Estudio

Las siete muestras tomadas de la microcuenca del río Chibunga

2.1.4. Tamaño de Muestra

La cantidad de 250 ml de agua tomada en cada punto de muestreo.

2.1.5. Selección de Muestra

Las muestras serán tomadas en el transcurso de un día los siete puntos de muestreo.

2.2. Lugar de Estudio

La evaluación de resistencia de bacterias a metales pesados se realizó en la Microcuenca del Río Chibunga localizada en la Provincia de Chimborazo, en el cantón Riobamba, la cual tiene una longitud aproximada de 14 km. La Figura 1-2 muestra la ubicación de la microcuenca.

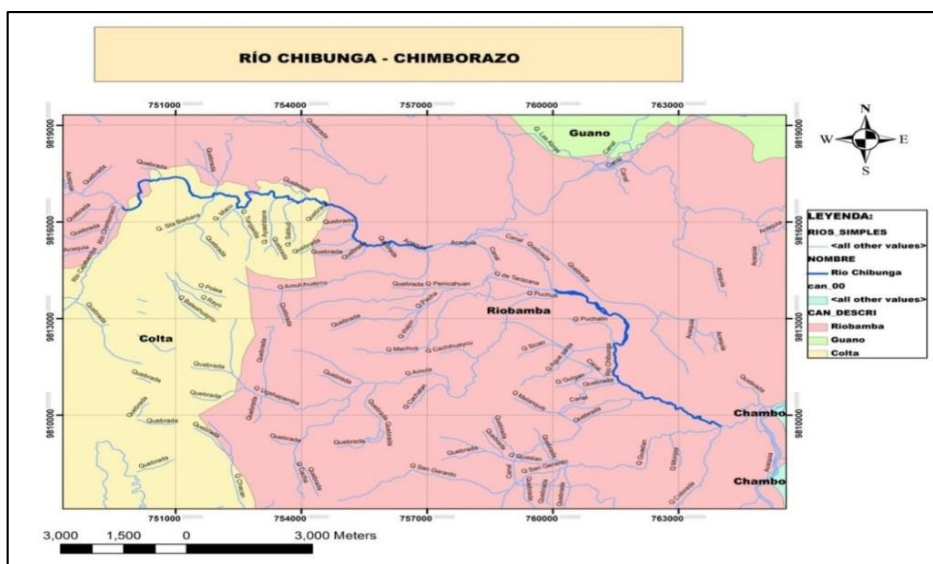


Figura 1-2 Ubicación de la Microcuenca del Río Chibunga

Fuente: (Jaque & Potocí, 2015. Mapa de localización de la Microcuenca del Río Chibunga Chimborazo, Riobamba. ESPOCH. Escala 1:125,000. Pag 52).

2.3. Fases de la Investigación

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

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

2.3.1. Fase I: Elección de los puntos de muestreo

Se eligieron siete puntos de muestreo dentro del curso del río en la microcuenca tomando como referencia a estudios realizados sobre el Índice de Calidad de Agua del Río Chibunga (Jaque & Potocí, 2015, pp. 57-68), para comprender el comportamiento de las bacterias a través del río desde una zona con bajo nivel de contaminación hasta una zona donde existe una alta contaminación. Esto nos ayudará a comparar y evaluar microbiológicamente los distintos comportamientos de las bacterias a diferentes niveles de contaminación. Los puntos de muestreo son los siguientes:

- M1= Río Chimborazo
- M2= Comunidad de San Juan
- M3= Sector de la Cemento Chimborazo
- M4= Parque Ricpamba
- M5= Parque Ecológico
- M6= Sector de San Luis
- M7= Descarga del río Chibunga al río Chambo

La Figura 2-2 muestra la localización de los puntos de muestreo en la microcuenca del Río Chibunga.

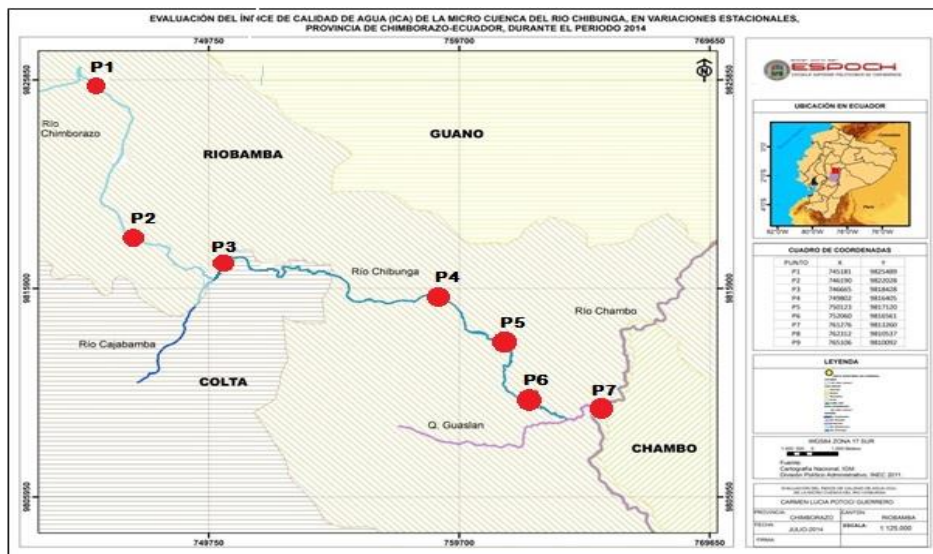


Figura 2-2 Localización de los puntos de muestreo Río Chimborazo-San Luis

Fuente: (Jaque & Potocí, 2015. Mapa De Los Límites De La Microcuenca Del Río Chibunga. Chimborazo, Riobamba. ESPOCH. Escala 1:125,000. Pag 53

2.3.2. Fase II: Siembra y conteo de bacterias resistentes

a. Materiales

- Pipetas de vidrio
- Micro pipeta
- Vasos de precipitación
- Puntas plásticas para micropipeta
- Pera de succión
- Cajas petri
- Frascos de vidrio
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de Ensayo
- Tapas de plástico para tubos de ensayo
- Gradilla
- Frascos de vidrio
- Rotulador
- Petrifilm

b. Procedimiento

2.3.2.1. Preparación de Medios de Cultivo

Se prepararán cinco medios diferentes. Un medio control y cuatro medios con presión selectiva cada uno con un metal pesado (Hg^{2+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} y Cd^{2+}), en forma de sales según la Tabla 1-2. Para todos los medios de cultivo se utilizará PCA (Plate Count Agar) Difco™ como base.

Según los resultados obtenidos de una investigación previa realizada para la Feria Expositiva Asociada de Tecnologías, Proyectos y Experiencias Ambientales en el marco de la II Jornada Iberoamericana en Saludo al día Mundial del Medio Ambiente – Ecuador 2016, se obtuvo con una concentración inicial de 10 ug/ml cantidades incontables de colonias bacterianas por tal motivo se aumentó la concentración en este ensayo a 50 ug/ml. (Medina, et al., 2016, pp. 1-6). Además se utilizaron como referencia estudios realizados donde se utilizaron concentraciones de metales desde 50 hasta 1600 ug/mL (Moraga, et al., 2003, pp. 91-94) y desde 50 hasta 800 ug/ml (Paniagua C., et al., 2003, pp. 13-18), por tal motivo se estimó así un valor base de concentración inicial de 50 ug/ml de cada metal pesado como se observa en la tabla 1-2

Tabla 1-2. Sales de metales pesados utilizadas para la preparación de medios de cultivo.

Nombre	Compuesto	Cantidad	Marca
Nitrato de Cadmio (II) tetrahidratado	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 mg/L	MERCK
Hidroxiacetato de Plomo (II)	$\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$	50 mg/L	MERCK
Nitrato de Cromo (III) nonahidratado	$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50 mg/L	MERCK
Acetato de Mercurio (II)	$\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_3$	50 mg/L	MERCK

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

2.3.2.2. *Preparación Solución Patrón*

Se preparó una solución para cada concentración de sal de metal pesado según la Tabla 2 pesando 50 mg de cada sal de metal pesado y se diluyó en un vaso de precipitación con 10mL de agua destilada esterilizada para preparar una solución patrón de concentración de 50 mg/ml.

2.3.2.3. *Conteo Microbiológico inicial para la estimación de bacterias resistentes a Metales Pesados*

a. Muestreo

Se realizó el muestreo en los siete puntos seleccionados de la microcuenca del río Chibunga, abarcando una longitud aproximada de catorce kilómetros, desde una altitud aproximada de 4000 msnm hasta 2600 msnm, todas las muestras fueron tomadas el mismo día. Se utilizó el método de muestreo simple en cada una de los puntos, reflejando las condiciones del agua en el momento de toma de muestra.

Procedimiento

- Para realizar este muestreo se utilizó un envase estéril.
- Primero se retira la tapa del envase, luego se sumerge en el agua con la boca en dirección hacia abajo y se realiza dos enjuagues.
- Una vez realizado los enjuagues se coloca el envase en dirección horizontal en contracorriente con el fin de evitar la contaminación del operador se deja llenar el envase.

- Una vez llenado se retira del agua, se coloca la tapa y se cierra completamente verificando que no exista ningún derrame.
- Por último se transporta en un enfriador térmico con el fin de preservar las condiciones de la muestra hasta su análisis en el laboratorio.



Figura 3-2 Muestreo en el Punto M1-Río Chimborazo

Realizado por: Cristian Salgado

b. Diluciones Seriadas

- De cada muestra se realizarán cinco diluciones seriadas en base diez hasta 10^{-5} . Esto se realizará para cada muestra, y se replicará dos veces para obtener un menor margen de error en los resultados.
- Para realizar las diluciones seriadas se requirieron de tubos de ensayo estériles con sus respectivos tapones, rotulados con el nombre de la disolución. Primero se preparó una solución madre, tomando 10 ml de muestra de agua y 90 ml de agua destilada estéril en un matraz hasta llegar a los 100ml (dilución 1/10). Posteriormente se añadieron 9ml de agua destilada estéril a cada tubo de ensayo.
- Una vez completados todos los tubos de ensayo se procedió a realizar las disoluciones con las muestras de agua hasta la disolución de 10^{-5} . Primero se extrajo 1ml de la muestra de agua del río y se transfirió al primer tubo de ensayo de dilución 1:10 que cada 9ml de disolución y se mezclaron homogéneamente, por lo tanto se obtuvo una solución que ha sido diluida por factor de diez. Para la segunda dilución en serie, se tomó 1ml de la disolución del tubo 1:10 y se añadió sobre los 9 ml del tubo 1:100, se mezcló homogéneamente, el proceso se repitió hasta obtener una disolución de 1:100000, es decir, 10^{-5} .

c. **Siembra de las muestras en medios de cultivo**

Cada una de las disoluciones seriadas se sembraron en los medios de cultivo suplementados con la presión selectiva de cada metal pesado, así como en un medio que carece de esta presión. De acuerdo al siguiente protocolo:

- Se colocó un mechero bunsen cerca del lugar de siembra para evitar contaminación. De cada dilución se tomó 100 ul con una pipeta automática y se vertió sobre el medio de cultivo. Se necesitó un asa de vidrio para la siembra esparciendo la muestra líquida por toda la superficie del medio de cultivo sólido con un movimiento en espiral. Este procedimiento se realizará para cada una de las disoluciones seriadas con su respectiva replica.
- Se realizó el conteo de las UFC a las 72 horas de la siembra.

d. **Ecuación para el cálculo de UFC/ml**

Para el cálculo de las unidades formadoras en unidades de volumen se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{No. de colonias por placa * factor de dilución}{volumen inicial sembrado}$$

2.3.3. Fase III: Aislamiento y Caracterización de clones resistentes a metales pesados

2.3.3.1. Criterios de Selección

De cada una de las placas sembradas se escogerá un número de clones según los siguientes criterios:

- Los que presentaron mayor tamaño
- Las que crecieron con formas definidas
- Las que crecieron en menor tiempo

De cada muestra donde exista crecimiento se eligieron dos aislados que cumplan con los criterios de selección.

2.3.3.2. *Aislamiento de clones bacterianos*

a. **Procedimiento**

Por medio de los criterios de selección se escogieron 32 aislados bacterianos que mostraron crecimiento en los medios de PCA + presión selectiva de las sales de Nitrato de Cadmio (II) tetrahidratado, Hidroxiacetato de Plomo (II), Nitrato de Cromo (III) nonahidratado y Acetato de Mercurio (II) con una concentración de 50 ug/ml.

Los aislados bacterianos que fueron seleccionadas se repicaron con un palillo de madera estéril en las placas preparadas y se incubo por 72 horas a 35°C



Figura 4-2 Recuento de heterótrofos
Fuente: Salgado, Cristian. 2018

2.3.3.3. *Estabilización de las colonias*

Con el fin de obtener aislados bacterianos que se encuentren bien adaptados al medio de cultivo fue necesario estabilizarlos con al menos 3 repiques. Se estabilizó sobre los medios en los cuales habían venido creciendo manteniendo la misma presión selectiva para garantizar su supervivencia y verificar que no sobreviven por reserva de nutrientes

a. Procedimiento

- Se prepararon cajas Petri con medios PCA suplementados con 50 µg/mL de los metales Pb, Cr, Cd y Hg
- Dentro de la cámara de flujo se repicó por medio de un palillo de madera estéril a cada aislado y se sembraron, este procedimiento se repitió tres veces
- Se incubó a 35°C por 72 horas cada placa

2.3.3.4. Tinción Gram de los aislados bacterianos

Se realizó la tinción gram para los aislados bacterianos seleccionados de cada medio de cultivo suplementado con metal pesado. La tinción se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

- Se añadió una gota de agua destilada en un portaobjetos y luego se añade una cantidad pequeña de una colonia bacteriana y se frota o extiende con un asa, posterior se deja secar para que el extendido se fije
- Se añade por un minuto cristal violeta y se enjuaga con agua destilada
- Se añade suficiente lugol para que cubra al frotis por un minuto, luego se enjuaga con agua destilada
- Se añade alcohol acetona para decolorar, posterior se lava con agua destilada
- Se añade suficiente colorante safranina para que cubra el frotis por un minuto, posterior se enjuaga y se deja secar.

Una vez que la preparación se encuentre seca se añade una gota de aceite de inmersión y se observa al microscopio para identificar si es Gram positivo o Gram negativo, describir que forma tiene, y como se encuentra distribuido

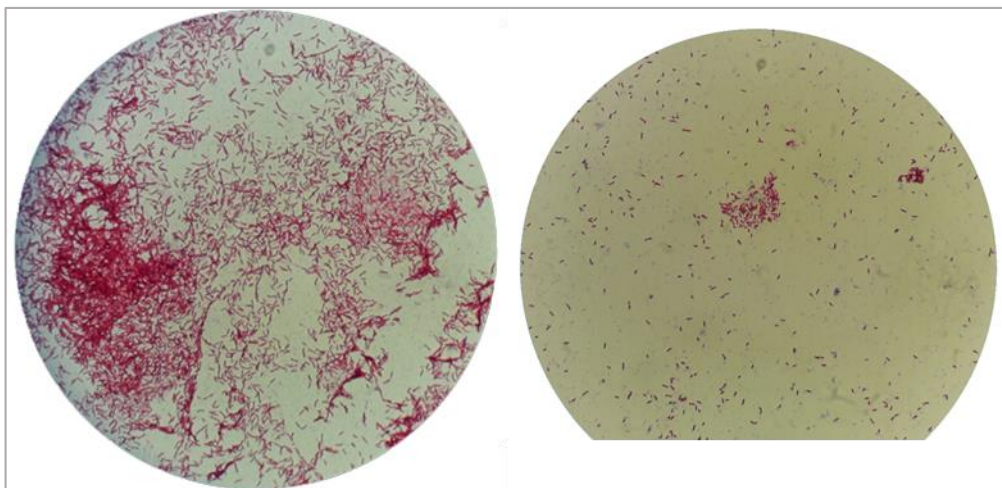


Figura 5-2 Tinción Gram de las muestras.

Fuente: Salgado, Cristian. 2018

2.3.4. Fase IV: Evaluación de resistencia a altas concentraciones

Los aislados bacterianos estabilizados se sometieron a concentraciones crecientes de metales pesados en un rango que va desde 50ug/ml hasta 4000ug/ml para evaluar la resistencia a cada metal pesado.

En la tabla 3-2., se especifica los aislados bacterianos que se someterán a la evaluación de resistencia, a que muestra pertenece y en que medio suplementado creció.

Tabla 2-2. Distribución de los aislados bacterianos y muestras.

MUESTRAS	PCA+Pb	PCA+Cr	PCA+Cd	PCA+Hg
M1	2	2		
M2	2	2		
M3	2	2		
M4	2			
M5	2	2	2	2
M6	2		2	
M7	2	2	2	
TOTAL	14	10	6	2

Realizado por: Cristian Salgado, 2018

a. Materiales

- Agua destilada
- Medio de cultivo PCA+ solución de Pb
- Medio de cultivo PCA+ solución de Cr
- Medio de cultivo PCA+ solución de Cd
- Medio de cultivo PCA+ solución de Hg
- Micro pipeta
- Puntas plásticas para micropipeta
- Rotulador
- Petrifilm

b. Procedimiento

- Se preparó 250 mL de medio PCA
- Se añadió las sales de cada metal pesado para con la concentración requerida.
- Se colocó los medios suplementados en cajas Petri de cada metal pesado y replica debidamente dividida por cuadrícula y rotulada
- Dentro de la cámara de flujo a través de un palillo de madera estéril se tomó una colonia purificada de cada aislado bacteriano y se sembró en cada medio suplementado específico en las cajas Petri cuadrículadas, en concentraciones crecientes.
- Se incubó las placas sembradas a 35°C por 72 horas
- Se reportó los resultados obtenidos pasadas las 72 horas.
- Se realizó el mismo procedimiento con las concentraciones evaluadas, las cuales se encuentran detalladas en la tabla 4-2.

Tabla 3-2. Concentraciones de sal de metal pesado utilizado en las pruebas de resistencia

Metal Pesado	Concentración (µg/mL) en PCA									
Pb	50	100	200	400	750	1000	2000	3000	4000	
Cr	50	100	200	400	600	750				
Cd	50	100	200	400	600	750	1000			
Hg	50	100	200	400	600	750	1000	2000		

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

2.3.5. Fase V: Fase de Identificación de los aislados bacterianos resistentes

Para la caracterización de los aislados bacterianos más resistentes a los metales pesados se utilizó las siguientes pruebas:

- Tinción Gram: Se realizó una tinción Gram de los aislados bacterianos más resistentes con el fin de verificar si mantienen la misma forma obtenida en la primera tinción
- Prueba de Oxidasa: Se utilizó una muestra de colonia recogida con un palillo estéril y se impregnó en un papel que contenía reactivo Kovac, se esperó treinta segundos para la reacción, la cual es positiva si cambia de color y negativa si no lo hace.
- Prueba de Catalasa: Se tomó una pequeña muestra de colonia y se impregnó en un porta objetos, luego se añadió una gota de agua oxigenada y se observó si produce desprendimiento de burbujas o no.

- De acuerdo a la coloración Gram obtenidas de las bacterias evaluadas se realizó las siguientes pruebas bioquímicas:

Si es Gram negativo:

- Citrato
- SIM, que incluye a:
 - Producción de ácido sulfhídrico
 - Indol
 - Movilidad
- Agar TSI
- Manitol
- Ureasa

Si es Gram Positivo:

- Oxidasa
- Catalasa
- Manitol
- Ureasa

Los resultados se comparan con las tablas del Manual de Técnicas en Microbiología Clínica de *Alvarez et. al.*, donde se analiza según la reacción positiva o negativa de las pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos su género y especie bacteriana.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

3.1. Fase I: Caracterización físico-química

Se realizó la caracterización física química de las muestras, primero in situ y luego se analizó en el laboratorio, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 1-3. Resultados de análisis de parámetros físico-químicos

Muestra	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (us/cm)	Solidos Totales Disueltos (mg/L)	Salinidad	Potencial Redox (mV)
M1	9,8	7,85	0,199	0,83	0,1	0,85
M2	8,8	7,78	0,176	0,74	0,1	0,86
M3	11,9	6,88	0,347	0,98	0,2	0,43
M4	6,9	7,89	0,318	0,164	0,2	0,87
M5	6,7	8,20	0,350	0,185	0,2	0,96
M6	7,6	8,22	0,384	0,203	0,2	0,98
M7	8,3	7,74	0,432	0,228	0,2	0,75

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Tabla 2-3 Resultados de concentración de metales pesados en las muestras de agua del río.

METAL PESADO	MUESTRAS	UNIDAD	CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS	VALOR LIMITE PERMISIBLE	MÉTODO DE APLICACIÓN
Plomo	M1	mg/L	<0,3	0,2	PEE/ CESTTA/29 Standard Methods Ed. 21.2005/3030B, 3111B
	M2	mg/L	<0,2	0,2	
	M3	mg/L	<0,2	0,2	
	M4	mg/L	<0,2	0,2	
	M5	mg/L	<0,3	0,2	
	M6	mg/L	<0,2	0,2	
	M7	mg/L	<0,3	0,2	
METAL PESADO	MUESTRAS	UNIDAD	CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS	VALOR LIMITE PERMISIBLE	MÉTODO DE APLICACIÓN

Cadmio	M1	mg/L	<0,04	0,02	PEE/ CESTTA/33 Standard Methods Ed. 21.2005 3500- CdB/3030-E 3111-B
	M2	mg/L	<0,03	0,02	
	M3	mg/L	<0,03	0,02	
	M4	mg/L	<0,03	0,02	
	M5	mg/L	<0,04	0,02	
	M6	mg/L	<0,04	0,02	
	M7	mg/L	<0,04	0,02	
Mercurio	M1	mg/L	<0,001	0,005	PEE/ CESTTA/34 EPA 3015A/EPA 245.1/EPA 7470A
	M2	mg/L	<0,001	0,005	
	M3	mg/L	<0,001	0,005	
	M4	mg/L	<0,001	0,005	
	M5	mg/L	<0,001	0,005	
	M6	mg/L	<0,001	0,005	
	M7	mg/L	<0,001	0,005	
Cromo hexavalente	M1	mg/L	<0,02	0,5	PEE/CESTTA 32 Standard Methods No 3500-CrB
	M2	mg/L	<0,02	0,5	
	M3	mg/L	<0,02	0,5	
	M4	mg/L	<0,02	0,5	
	M5	mg/L	<0,02	0,5	
	M6	mg/L	<0,02	0,5	
	M7	mg/L	<0,02	0,5	

Fuente: Laboratorio CESTTA, 2017

3.2. Fase II: Aislamiento

Se prepararon cinco medios diferentes para la evaluación inicial. Un medio sin presión selectiva como control y cuatro medios con presión selectiva de cada metal pesado utilizando como base medio PCA (Plate Count Agar) para Hg²⁺, Cr⁶⁺, Pb²⁺ y Cd²⁺.

Se utilizaron para la preparación de medios con presión selectiva sales que contienen a estos metales pesados como fuente de metales.

Para la concentración inicial se tomó referencia a estudios realizados sobre resistencia a metales pesados donde se utilizaron concentraciones de metales pesados desde 50 hasta 1600 ug/mL en el caso de Moraga & Mondaca en el año 2003 en la bahía de Iquique, concentraciones desde 50 hasta 800 ug/ml utilizado por Paniagua et al., en el 2003 en la ciudad de México y por valoraciones preliminares realizadas a una concentración de 25 ug/ml donde se obtuvo cantidades incontables se consideró como presión selectiva inicial una concentración de 50 ug/ml para cada metal pesado.

3.2.1 Conteo microbiológico inicial

Para realizar la valoración inicial de la cantidad de bacterias que se encuentran en las muestras se realizó una siembra sin diluir en placas con medio PCA, obteniendo como resultado en todas las placas un número incontable de colonias bacterianas. Por tal motivo para evaluar la cantidad inicial de bacterias presentes en las muestras se realizaron cinco diluciones seriadas para cada muestra desde 10^{-1} hasta 10^{-5} y se replicó una vez para obtener un menor margen de error en los resultados, esto se realizó para cada medio suplementado con metal pesado. Transcurridas las 72h de incubación, se procedió a realizar el conteo de las colonias de cada medio obteniéndose los resultados que se muestran en las Tablas 3-3 a la 7-2.

Tabla 3-3. Conteo microbiológico inicial para M1.

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				Prom. UFC/ml
			10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
M1	PCA	A	136500	720000	2700000	10000000	3,39E+06
		B					
	PCA+Pb	A	15500	85000	500000	4000000	1,15E+06
		B					
	PCA+Hg	A	0	0	0	0	0,00E+00
		B					
	PCA+Cd	A	5000	5000	0	0	5,00E+03
		B					
	PCA+Cr	A	31000	145000	700000	2000000	7,19E+05
		B					

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Tabla 4-3. Conteo microbiológico inicial para M2.

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				Prom. UFC/ml
			10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
M2	PCA	A	120500	1000000	4850000	20000000	$6,49 \times 10^6$
		B					
	PCA+Pb	A	99000	205000	400000	2500000	$8,01 \times 10^5$
		B					
	PCA+Hg	A	0	0	0	0	0
		B					
	PCA+Cd	A	0	0	0	0	0
		B					
	PCA+Cr	A	18500	120000	300000	2000000	$6,10 \times 10^5$
		B					

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Tabla 5-3 Conteo microbiológico inicial para M3.

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				Prom. UFC/ml
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
M3	PCA	A	41000	155000	1050000	1500000	6,87x10 ⁵
		B					
	PCA+Pb	A	43500	185000	700000	1000000	4,82x10 ⁵
		B					
	PCA+Hg	A	0	0	0	0	0
		B					
	PCA+Cd	A	0	0	0	0	0
		B					
	PCA+Cr	A	18500	120000	300000	2000000	6,10x10 ⁵
		B					

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Tabla 6-3 Conteo microbiológico inicial para M4.

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				Prom. UFC/ml
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
M4	PCA	A	104000	260000	1000000	7000000	2,09x10 ⁶
		B					
	PCA+Pb	A	3000	0	0	1000000	2,51x10 ⁵
		B					
	PCA+Hg	A	0	0	0	0	0
		B					
	PCA+Cd	A	0	0	0	0	0
		B					
	PCA+Cr	A	0	0	0	0	0
		B					

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Tabla 7-3. Conteo microbiológico inicial para M5.

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				Prom. UFC/ml
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
M5	PCA	A	160500	675000	3200000	8000000	3,01E+06
		B					
	PCA+Pb	A	22000	60000	200000	1000000	3,21E+05
		B					
	PCA+Hg	A	17000	15000	100000	1000000	2,83E+05
		B					
	PCA+Cd	A	8000	25000	100000	1000000	2,83E+05
		B					
	PCA+Cr	A	10500	55000	200000	1000000	3,16E+05
		B					

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Tabla 8-3. Conteo microbiológico inicial para M6.

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				Prom. UFC/ml
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
M6	PCA	A	210000	1175000	6750000	22500000	7,66E+06
		B					
	PCA+Pb	A	10500	50000	150000	1000000	3,03E+05
		B					
	PCA+Hg	A	0	0	0	0	0,00E+00
		B					
	PCA+Cd	A	13500	85000	700000	500000	3,25E+05
		B					
	PCA+Cr	A	0	0	0	0	0,00E+00
		B					

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Tabla 9-3. Conteo microbiológico inicial para M7.

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				Prom. UFC/ml
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
M6	PCA	A	294000	2505000	20900000	161500000	4,63E+07
		B					
	PCA+Pb	A	300000	2045000	14100000	125000000	3,54E+07
		B					
	PCA+Hg	A	0	0	0	0	0,00E+00
		B					
	PCA+Cd	A	56000	525000	4950000	44000000	1,24E+07
		B					
	PCA+Cr	A	117000	635000	6400000	59000000	1,65E+07
		B					

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Los resultados que se muestran en las Tablas 3-3 a la 9-3, indican la presencia de una alta carga bacteriana en todos los sitios evaluados, en las cuales siempre la cantidad de bacterias obtenida sin la presión selectiva fue mayor a la obtenida cuando los medios se suplementaron con los metales pesados, lo que demuestra que podría existir un importante nivel de contaminación en el río y que los metales pesados evaluados ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento bacteriano.

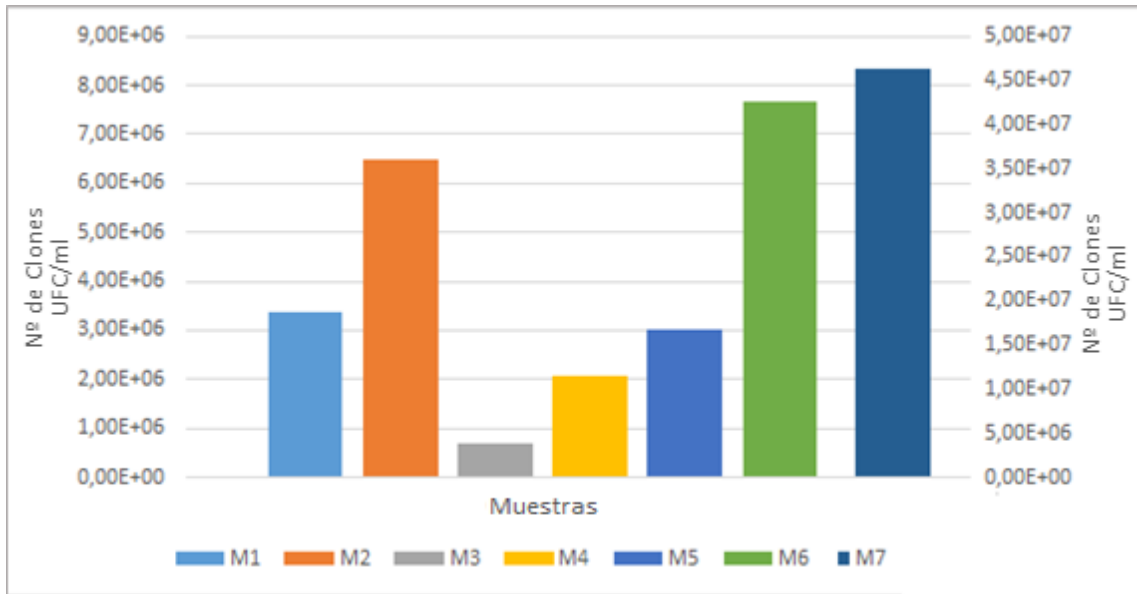


Gráfico 1-3 Estimación de crecimiento en medio PCA

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

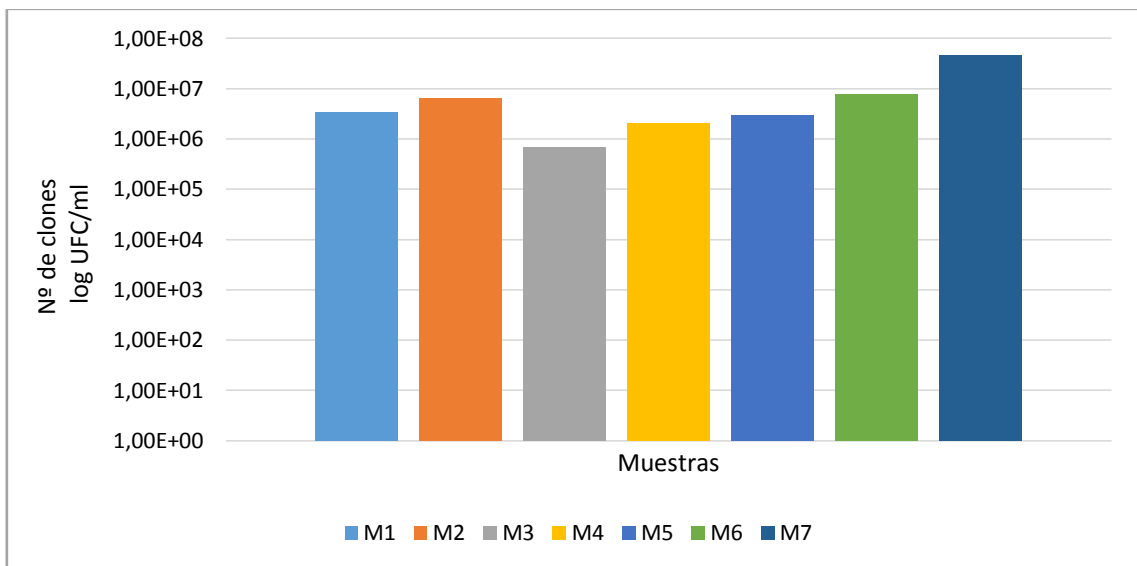


Gráfico 2-3 Estimación de crecimiento en medio PCA expresado en escala logarítmica

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

En el gráfico 1-3 y 2-3, se puede apreciar que las muestras con mayor crecimiento bacteriano fue la muestra M7 con un rango mucho mayor que las otras muestras esto esta expresado en el gráfico en el eje secundario alcanzando una cantidad aproximada de $4,6 \times 10^7$ UFC/ml, a diferencia de las otras muestras que tuvieron valores en el rango de 10^6 , esto se puede evidenciar de mejor manera en el gráfico 2-3., donde se expresa en función logarítmica para una mejor comprensión. Dentro de las otras muestras M6 obtuvo más crecimiento que las muestras M1, M2, M4, M5 y la que menor crecimiento bacteriano obtuvo fue la M3, convirtiéndose en la de menor población bacteriana.

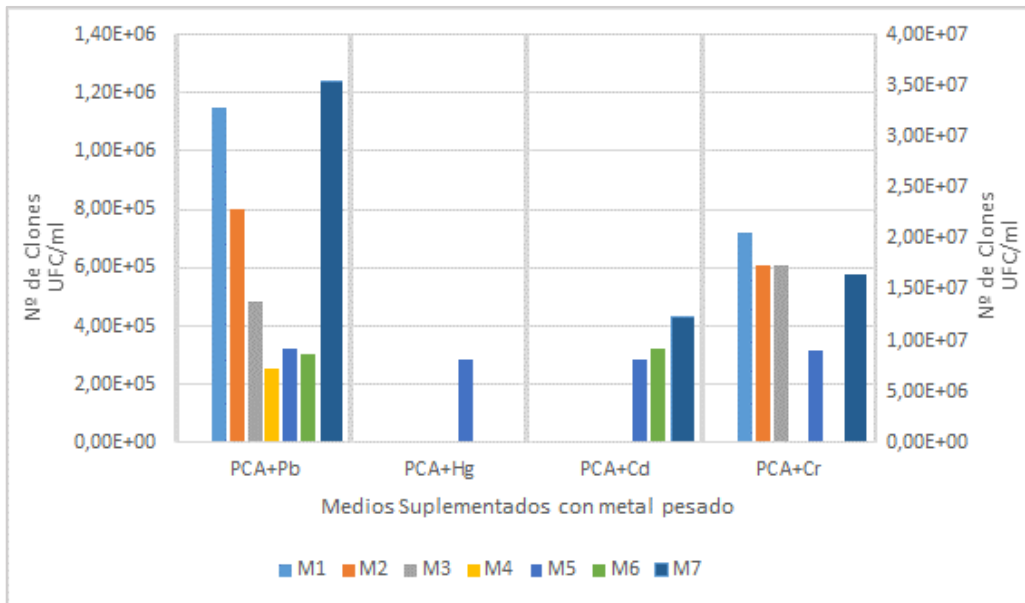


Gráfico 3-3 Estimación de crecimiento en medios suplementados con metal pesado.

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Por la diferencia de magnitud que la muestra siete tiene con las demás se graficó en escala logarítmica para una mejor comprensión como se representa en el gráfico 4-3.

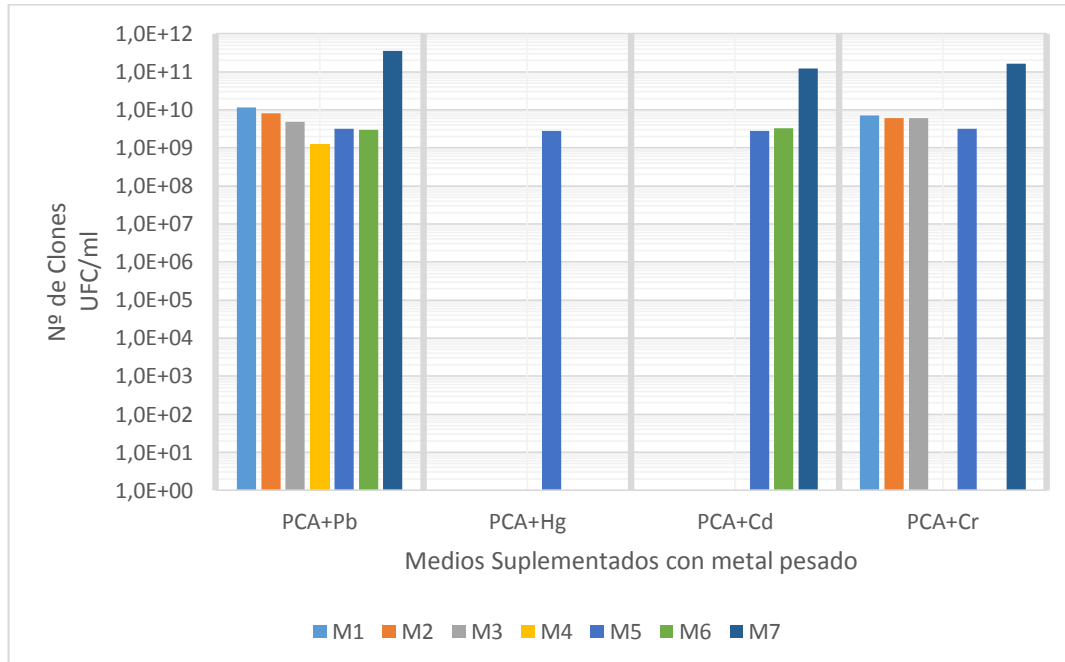


Gráfico 4-3 Estimación de crecimiento en medios suplementados en escala logarítmica.

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

La evaluación del crecimiento de la microbiota existente en las muestras de agua del río Chibunga según las gráficas 3-3 y 4-3 y las tablas 3-3 a la 9-3, muestran que el Pb fue el metal ante el cual las bacterias mostraron mayor tolerancia, obteniéndose en ese caso crecimiento en todas las muestras. Mientras que el hecho de que en presencia de Hg solo se obtuvo crecimiento en una muestra (M5) indica que el Mercurio es el metal que mostró la mayor toxicidad y que además el punto M5 puede ser el de mayor contaminación. Con respecto a los otros metales podemos notar que el Cr⁶⁺ es menos tóxico que el Cd ya que obtuvo crecimiento en cinco de las siete muestras, en cambio el cadmio solo en cuatro.

Los resultados obtenidos en esta investigación con respecto a la resistencia a Pb son similares a los obtenidos por Moraga et al. (2003), puesto que en todas las muestras se reportó crecimiento en los medios suplementados con Pb. En el caso del Cr se obtuvo resultados similares a los reportados por Martínez et al. (2010), ya que en más de la mitad de las muestras evaluadas se obtuvo crecimiento en medio suplementado con cromo, para el Hg los resultados tienen coincidencia con los reportados por Paniagua et al. (2006), debido a que el mercurio es el metal más tóxico para las bacterias evaluadas.

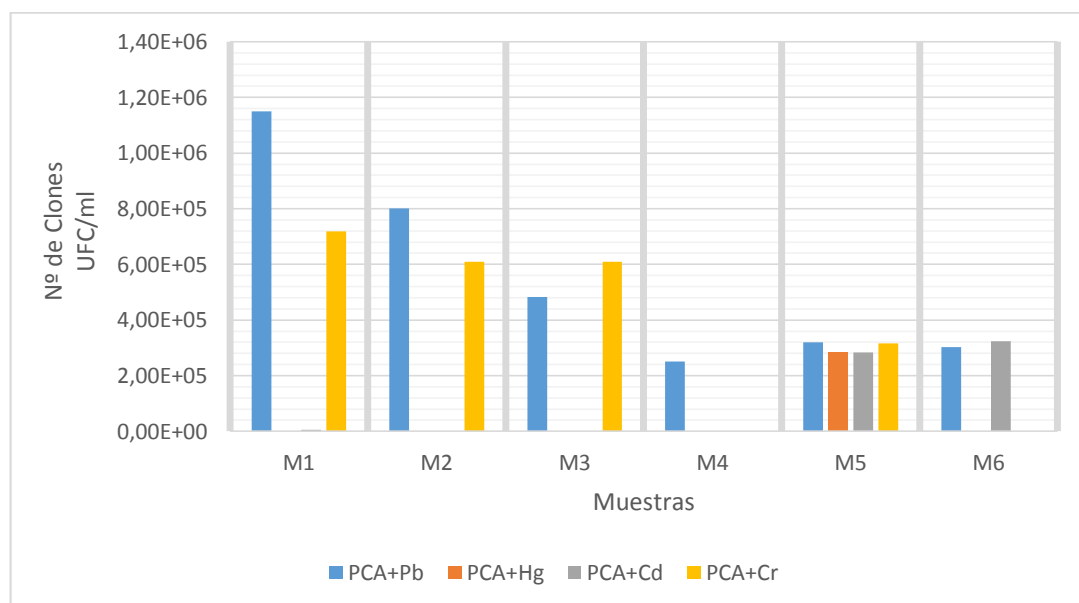


Gráfico 5-3. Estimación de crecimiento de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, M6

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

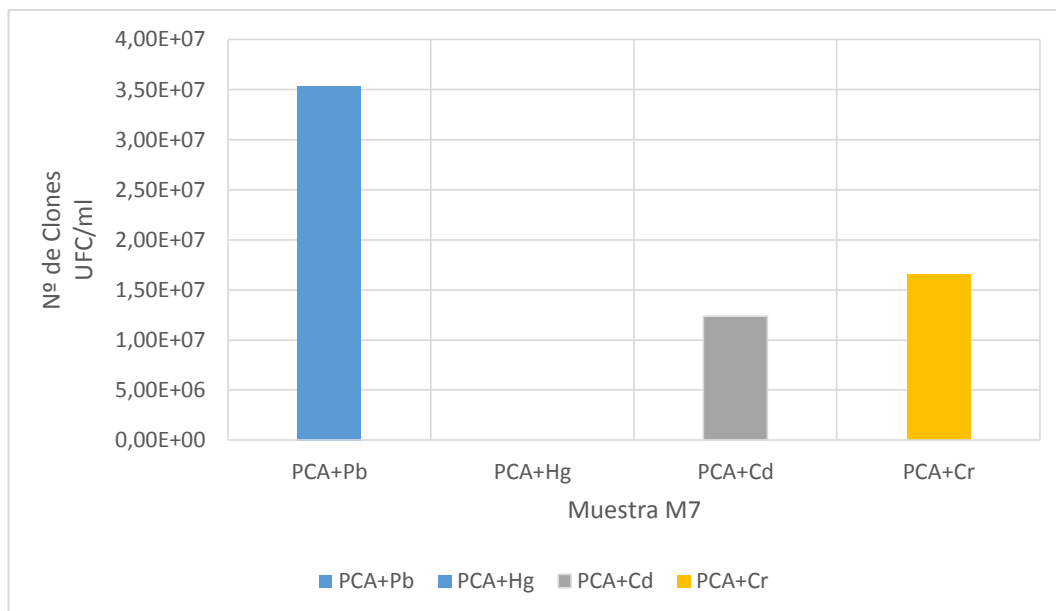


Gráfico 6-3 Estimación de crecimiento bacteriano en la muestra M7

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

En el Gráfico 5-3 se muestra el crecimiento bacteriano en las muestras M1, M2, M3, M4, M5, M6 de cada metal pesado, la muestra M4 fue la única que no presentó crecimiento en los medios enriquecidos para Cr, Cd, y Hg, solamente en los medios suplementados con Pb mostraron crecimiento, evidenciándose que la presión selectiva de los medios con metales pesados fue mayor generando un efecto negativo al crecimiento bacteriano.

La muestra M7 tiene una magnitud superior de crecimiento por lo que se representó en el gráfico 6-3, donde se evidencia un mayor crecimiento en los medios enriquecidos con plomo y nulo crecimiento con mercurio.

En las muestras M1, M5, M6 y M7 se encontró crecimiento de las bacterias resistentes al cadmio, siendo en esta última donde mayor cantidad de bacterias se encontraron.

La muestra M5 presentó crecimiento bacteriano en todos los medios suplementados con metales pesados, siendo la única donde se evidenció crecimiento en los medios enriquecidos con Hg, además tuvieron un buen índice de crecimiento por lo que podemos demostrar que en esta muestra existen muchas bacterias resistentes a metales pesados esta observación podría indicar que es la parte de la microcuenca donde presenta altos índices de contaminación.

3.3. Fase III: Selección de aislados bacterianos

De los aislados bacterianos encontrados se realizó una selección al azar a partir de su crecimiento en cada uno de los medios utilizados (PCA + Pb²⁺, PCA + Cd²⁺, PCA + Cr⁺⁶ y PCA + Hg²⁺) utilizando los criterios de selección indicados en el apartado 2.3.3.1 del Capítulo II. Se realizó una selección de al menos dos clones de cada una de las muestras obteniéndose un total de 32 clones seleccionados para realizar las pruebas de tolerancia a metales pesados como se muestra en la tabla 10-3.

Tabla 10-3 Numero de aislados seleccionados.

Muestra	Medios				Numero de Clones
	PCA+Pb	PCA+Cr	PCA+Cd	PCA+Hg	
M1	2	2			4
M2	2	2			4
M3	2	2			4
M4	2				2
M5	2	2	2	2	8
M6	2		2		4
M7	2	2	2		6
Total	14	10	6	2	32

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

3.4. Fase IV: Estabilización de aislados bacterianos

La estabilización se realizó sobre los 32 clones seleccionados, realizando 3 repiques consecutivos en los medios suplementados con metal pesado manteniendo la presión selectiva de 50 µg/ml, tanto para los clones que crecieron en presencia de plomo, mercurio, cadmio y cromo.

Se obtuvieron un total de 32 aislados bacterianos estabilizados. Todos los clones mantuvieron su nivel de crecimiento en el proceso de estabilización demostrando así que todas las colonias bacterianas están adaptadas a sus medios.

Tabla 11-3 Identificación de los clones aislados y estabilizados con 50 µg/ml de metal.

Nº Clones	PCA+Pb (50µg/ml)	Nº Clones	PCA+Cr (50µg/ml)	Nº Clones	PCA+Cd (50µg/ml)	Nº Clones	PCA+Hg (50µg/ml)
C1	+	C15	+	C25	+	C31	+
C2	+	C16	+	C26	+	C32	+
C3	+	C17	+	C27	+		
C4	+	C18	+	C28	+		
C5	+	C19	+	C29	+		
C6	+	C20	+	C30	+		
C7	+	C21	+				
C8	+	C22	+				
C9	+	C23	+				
C10	+	C24	+				
C11	+						
C12	+						
C13	+						
C14	+						

Indicadores de crecimiento: con crecimiento (+), sin crecimiento (-).

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

3.5. Fase V: Tinción Gram de los aislados bacterianos

Se tomó una fracción de cada clon y se analizó por muestra la tinción Gram de los 32 aislados bacterianos, obteniendo los resultados de la tabla 12-3.

Tabla 12-3. Resultados de Evaluación Microscópica y Tinción Gram de clones estabilizados.

Medio Suplmentado con Pb2+			Medio Suplmentado con Cr6+			Medio Suplmentado con Cd2+			Medio Suplmentado con Hg2+		
Nº Clones	Tinción Gram	Muestra	Nº Clones	Tinción Gram	Muestra	Nº Clones	Tinción Gram	Muestra	Nº Clones	Tinción Gram	Muestra
1	Bacilos Gram (-)	M1	15	Bacilos Gram (-)	M1	25	Bacilos Gram (-)	M5	31	Bacilos Gram (-)	M5
2	Bacilos Gram (-)		16	Bacilos Gram (-)		26	Bacilos Gram (-)		32	Bacilos Gram (-)	
3	Bacilos Gram (-)	M2	17	Bacilos Gram (-)	M2	27	Cocos Gram (+)	M6			
4	Bacilos Gram (-)		18	Bacilos Gram (-)		28	Cocos Gram (+)				
5	Bacilos Gram (-)	M3	19	Bacilos Gram (-)	M3	29	Bacilos Gram (-)	M7			
6	Bacilos Gram (-)		20	Bacilos Gram (-)		30	Bacilos Gram (-)				
7	Cocos Gram (+)	M4	21	Bacilos Gram (-)	M5						
8	Cocos Gram (+)		22	Bacilos Gram (-)							
9	Cocos Gram (+)	M5	23	Bacilos Gram (-)	M7						
10	Cocos Gram (+)		24	Bacilos Gram (-)							
11	Micrococos Gram (+)	M6									
12	Cocos Gram (+)										
13	Bacilos Gram (-)	M7									
14	Bacilos Gram (-)										

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

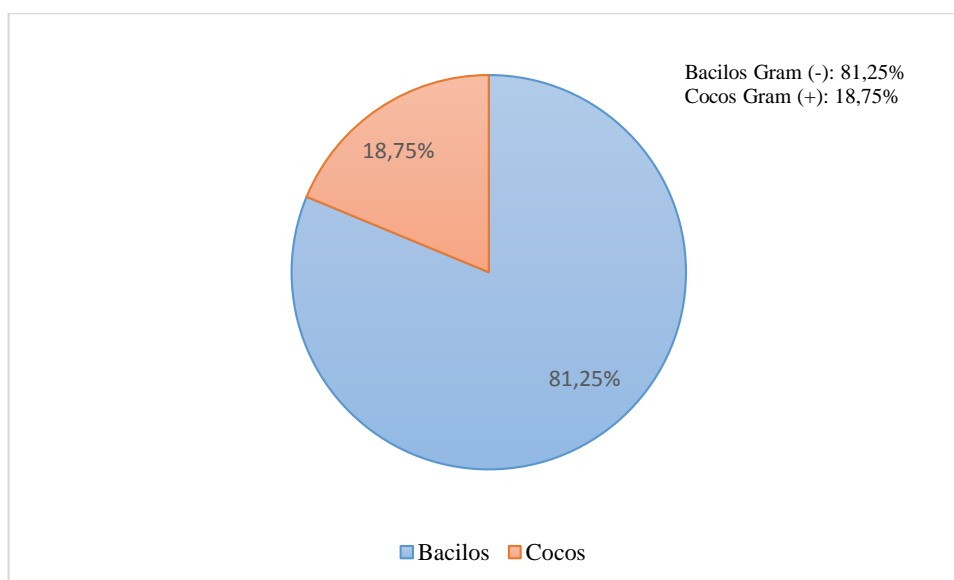


Gráfico 7-3. Crecimiento de bacilos y cocos en la tinción gram

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

La evaluación microbiológica por el método Gram de los aislados bacterianos muestra que el porcentaje de bacilos es mayor que el porcentaje de cocos como se indica en el gráfico 7-3. Los bacilos Gram negativos se adaptaron de mejor manera a los medios, mientras que los cocos Gram positivos fueron los que se obtuvieron en menor cantidad. Tanto en los bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos se puede encontrar bacterias patógenas causantes de enfermedades en las personas. (Ojeda Rios, 2018, pp. 3-7)

Un estudio realizado por Jaque y Potocí (2015) del Índice de Calidad de Agua (ICA) en el río Chibunga muestran que el río tiene niveles fuera del límite permisible por la legislación de coliformes fecales, oxígeno disuelto, grasas y aceites, por tal motivo se puede considerar que el agua posee una alta carga orgánica, una de las características de las aguas con gran cantidad de carga orgánica es que contienen bacterias que pueden ser patógenas y estas en su mayoría son gram negativas. (Jaque & Potocí, 2015, pp. 75-78)

3.6. Fase VI: Evaluación de resistencia bacteriana a metales pesados (Pb, Cr, Cd, Hg)

Para esta evaluación en todos los casos se utilizaron los aislados estabilizados, estos se sembraron en concentraciones crecientes de metal pesado iniciando con 50 µg/ml para todos los metales y se incubaron por 72 horas a 35°C.

Mientras se incrementa la concentración de metal pesado ciertos clones dejaron de crecer por lo que dejan de ser considerados para el siguiente incremento de concentración

La tabla de resultados de todos los clones y sus incrementos respecto a la concentración de metales pesados se muestran en el Anexo B.

a. Primera Evaluación

Para la primera evaluación de tolerancia se sembraron todos los aislados bacterianos en medios suplementados con una concentración de 50 µg/ml tanto para Pb, Cr, Cd, y Hg, los resultados se muestran en la tabla 13-3.

En la primera evaluación a una concentración 50 µg/ml todos los clones crecieron en presencia de Plomo, en el caso del Cromo solamente seis clones no mostraron crecimiento (C13, C14, C23, C24, C25, C26), el Cadmio muestra mayor toxicidad que Cromo y Plomo encontrándose una inhibición en 14 de los 32 clones evaluados. El metal que muestra mayor toxicidad es el Mercurio puesto que solamente crecieron 8 clones (C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22) todos de la muestra M5.

b. Segunda Evaluación

Para la segunda evaluación se utilizó una concentración de 100 µg/ml para todos los metales, la evaluación se llevó a cabo para los clones que presentaron crecimiento en la primera evaluación. Los resultados se muestran en la tabla 13-3.

Tabla 13-3 Resultado de crecimiento de los clones en presencia de Pb, Cr, Cd y Hg a una concentración de 50 µg/ml y 100 µg/ml.

Metal Pesado Concentracion 50 ug/ml					Metal Pesado Concentracion 100 ug/ml												
Muestra/ Clones	Pb	Cr	Cd	Hg	Muestra/ Clones	Pb	Cr	Cd	Hg	Muestra/ Clones	Pb	Cr	Cd	Hg			
M1	C1	+	+	-	-	M1	C1	+	+	---	---	M5	C17	+	+	+	+
	C2	+	+	-	-		C2	+	+	---	---		C18	+	+	+	+
	C3	+	+	-	-		C3	+	+	---	---		C19	+	+	+	+
	C4	+	+	-	-		C4	+	+	---	---		C20	+	+	+	+
M2	C5	+	+	-	-	M2	C5	+	+	---	---	M5	C21	+	+	+	+
	C6	+	+	-	-		C6	+	+	---	---		C22	+	+	+	+
	C7	+	+	-	-		C7	+	+	---	---		C23	+	---	+	---
	C8	+	+	-	-		C8	+	+	---	---		C24	+	---	+	---
M3	C9	+	+	-	-	M3	C9	+	+	---	---	M6	C25	+	---	+	---
	C10	+	+	-	-		C10	+	+	---	---		C26	+	---	+	---
	C11	+	+	-	-		C11	+	+	---	---		C27	+	+	+	---
	C12	+	+	-	-		C12	+	+	---	---		C28	+	+	+	---
M4	C13	+	-	-	-	M4	C13	+	---	---	---	M5	C29	+	+	+	---
	C14	+	-	-	-		C14	+	---	---	---		C30	+	+	+	---
M5	C15	+	+	+	+	M5	C15	+	+	+	+	M7	C31	+	+	+	---
	C16	+	+	+	+		C16	+	+	+	+		C32	+	+	+	---

(+) Con crecimiento, (-) sin crecimiento, (---) no se sembró.

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Es importante hacer notar que en la segunda evaluación la tasa de mortalidad es nula ya que todos los clones que crecieron a 50 µg/ml sobrevivieron al incrementarse a 100 µg/ml, indicándonos que mantienen la tolerancia a todos los metales pesados.

c. Tercera Evaluación

La tercera evaluación se llevó a cabo a una concentración de 200 µg/ml para todos los clones que presentaron crecimiento. Los resultados se muestran en la tabla 14-3

Los resultados muestran una tolerancia similar a la segunda evaluación, ya que la mortalidad de clones es nula, lo que nos indica una buena adaptación a los medios con metales pesados. La concentración de metales todavía no es tóxica para sus metabolismos.

d. Cuarta evaluación

En esta evaluación debido a la tolerancia presentada en los clones se llevó a cabo al doble de concentración de la anterior, es decir a 400 µg/ml para todos los clones que presentaron crecimiento. Los resultados pueden observarse en la tabla 14-3.

Tabla 14-3 Resultados del crecimiento de los clones en presencia de Pb, Cr, Cd y Hg a una concentración de 200 µg/ml y 400 µg/ml.

Metal Pesado Concentracion 200 ug/ml					Metal Pesado Concentracion 400 ug/ml												
Muestra/ Clones	Pb	Cr	Cd	Hg	Muestra/ Clones	Pb	Cr	Cd	Hg	Muestra/ Clones	Pb	Cr	Cd	Hg			
M1	C1	+	+	---	---	M1	C1	+	+	---	---	M5	C17	+	+	-	+
	C2	+	+	---	---		C2	+	+	---	---		C18	+	+	-	+
	C3	+	+	---	---		C3	+	+	---	---		C19	+	+	-	+
	C4	+	+	---	---		C4	+	+	---	---		C20	+	+	-	+
M2	C5	+	+	---	---	M2	C5	+	+	---	---	M5	C21	+	+	-	+
	C6	+	+	---	---		C6	+	+	---	---		C22	+	+	-	+
	C7	+	+	---	---		C7	+	+	---	---		C23	+	---	+	---
	C8	+	+	---	---		C8	+	+	---	---		C24	+	---	+	---
M3	C9	+	+	---	---	M3	C9	+	+	---	---	M6	C25	+	---	+	---
	C10	+	+	---	---		C10	+	+	---	---		C26	+	---	+	---
	C11	+	+	---	---		C11	+	+	---	---		C27	+	+	+	---
	C12	+	+	---	---		C12	+	+	---	---		C28	+	+	+	---
M4	C13	+	---	---	---	M4	C13	+	---	---	---	M5	C29	+	+	+	---
	C14	+	---	---	---		C14	+	---	---	---		C30	+	+	+	---
M5	C15	+	+	+	+	M5	C15	+	+	-	+	M7	C31	+	+	+	---
	C16	+	+	+	+		C16	+	+	-	+		C32	+	+	+	---

(+) Con crecimiento, (-) sin crecimiento, (---) no se sembró.

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

En esta evaluación la tolerancia para los metales Pb, Cr y Hg se mantuvo similar a la anterior ya que no hubo mortalidad para ninguno de los clones evaluados, en el caso del Cd se observó la inhibición del crecimiento de 8 de los 18 clones que toleraron la concentración de 200 ug/ ml.

e. Quinta evaluación

En esta etapa se realizó la evaluación de resistencia solo para el metal pesado Cr primero se evaluó a una concentración de 600 µg/ml y posteriormente se evaluó a una concentración de 750 µg/ml. Los resultados se muestran en la tabla 15-3.

Tabla 15-3 Resultados de crecimiento de clones a una concentración para el Cr de 600 µg/ml y 750 µg/ml.

Metal Pesado Concentracion 600 ug/ml				Metal Pesado Concentracion 750 ug/ml					
Muestra/Clones	Cr	Muestra/Clones	Cr	Muestra/Clones	Cr	Muestra/Clones	Cr		
M1	C1	-		C17	+				
	C2	-		C18	+	M1	C17	-	
	C3	-		C19	+		C18	-	
	C4	-		C20	+		C19	-	
M2	C5	-		C21	+		C20	-	
	C6	-	M5	C22	+	M2	C21	-	
	C7	-		C23	---		M5	C22	-
	C8	-		C24	---			C23	---
M3	C9	-		C25	---		C24	---	
	C10	-	M6	C26	---	M3	C25	---	
	C11	-		C27	-		M6	C26	---
	C12	-		C28	-			C27	---
M4	C13	---		C29	-	M4	C28	---	
	C14	---		C30	-			C29	---
M5	C15	+		C31	-	M5	C30	---	
	C16	+	M7	C32	-		M7	C31	---
								C32	---

(+) Con crecimiento, (-) sin crecimiento, (---) no se sembró.

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Para el Cr la concentración de 600 µg/ml fue altamente tóxica evidenciose un drástico descenso en el crecimiento de los clones, 18 de los 32 clones fueron inhibidos, sobrevivieron solamente 8 clones todos pertenecientes a la muestra M5. Los resultados obtenidos para la concentración de 750 µg/ml como se muestra en la tabla 15-3, observándose la inhibición de los clones evaluados llegando a su límite de tolerancia.

f. Sexta evaluación

En esta etapa se realizó la evaluación de tolerancia para el Pb, Cd y Hg a una concentración de 750 µg/ml, el resultado de esta evaluación se muestra en la tabla 16-3.

Analizados los datos obtenidos podemos afirmar que los clones sembrados en presencia de los metales Pb, Cd y Hg mantienen su tolerancia ya que la tasa de mortalidad es nula, es decir todos los clones crecieron.

g. Séptima evaluación

En esta evaluación se incrementó a 1000 µg/ml la concentración de metal pesado para el Pb, Cd, y Hg. Los resultados se muestran en la tabla 16-3.

Tabla 16-3 Resultados de crecimiento de clones en presencia de Pb, Cd y Hg a una concentración de 750 µg/ml y 1000 µg/ml

Metal Pesado Concentracion 750 ug/ml				Metal Pesado Concentracion 1000 ug/ml										
Muestra /Clones	Pb	Cd	Hg	Muestra /Clones	Pb	Cd	Hg	Muestra /Clones	Pb	Cd	Hg			
M1	C1	+	---	---	M1	C17	+	---	+	M1	C17	+	---	+
	C2	+	---	---		C18	+	---	+		C18	+	---	+
	C3	+	---	---		C19	+	---	+		C19	+	---	+
	C4	+	---	---		C20	+	---	+		C20	+	---	+
M2	C5	+	---	---	M2	C21	+	---	+	M2	C21	+	---	+
	C6	+	---	---		C22	+	---	+		C22	+	---	+
	C7	+	---	---		C23	+	+	---		C23	+	-	---
	C8	+	---	---		C24	+	+	---		C24	+	-	---
M3	C9	+	---	---	M3	C25	+	+	---	M3	C25	+	-	---
	C10	+	---	---		C26	+	+	---		C26	+	-	---
	C11	+	---	---		C27	+	+	---		C27	+	+	---
	C12	+	---	---		C28	+	+	---		C28	+	+	---
M4	C13	+	---	---	M4	C29	+	+	---	M4	C29	+	+	---
	C14	+	---	---		C30	+	+	---		C30	+	+	---
M5	C15	+	---	+	M5	C31	+	+	---	M5	C31	+	+	---
	C16	+	---	+		C32	+	+	---		C32	+	+	---

(+) Con crecimiento, (-) sin crecimiento, (---) no se sembró.

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Los resultados de esta evaluación indican el mismo nivel de tolerancia para el Pb ya que todos sus clones sobrevivieron a esta concentración. En el caso del mercurio se mantiene el crecimiento de los mismos clones que venían sobreviviendo a los incrementos de concentración, en el caso del Cd la población de clones se redujo a 6 clones ya que 4 de los 10 clones evaluados no crecieron.

h. Octava evaluación

En esta etapa no se utilizó Cr ya que se alcanzó el límite de crecimiento siendo la concentración de 1000 µg/ml inhibitoria para todos los clones. Para las placas que contienen Pb, Cd y Hg se utilizó una concentración de 2000 µg/ml. Los resultados se observan en la tabla 17-3.

La evaluación muestra que todos los clones sembrados en presencia de Cd y Hg se presentan crecimiento, es decir esta concentración inhibe completamente el crecimiento, alcanzando el

límite de tolerancia. En el caso del Pb 24 clones crecieron y 8 de los 32 clones presentaron mortalidad.

i. Novena evaluación

En esta evaluación solamente se utilizó como presión selectiva el Pb con una concentración de 3000 µg/ml, ya que los otros metales pesados mostraron inhibición de crecimiento sobre todos los clones a concentración de 2000 µg/ml. Los resultados se observan en la tabla 17-3.

Tabla 17-3 Resultados de crecimiento de clones en presencia de Pb, Cd y Hg a una concentración de 2000 µg/ml y en presencia de Pb a una concentración de 3000 µg/ml

Metal Pesado Concentracion 2000 ug/ml				Metal Pesado Concentracion 3000 ug/ml											
Muestra /Clones	Pb	Cd	Hg	Muestra /Clones	Pb	Cd	Hg	Muestra/Clones	Pb	Muestra/Clones	Pb				
M1	C1	+	---	---	M5	C17	-	---	-	M1	C1	-	M5	C17	-
	C2	+	---	---		C18	-	---	-		C18	-			
	C3	+	---	---		C19	-	---	-		C19	-			
	C4	+	---	---		C20	-	---	-		C20	-			
M2	C5	+	---	---	M6	C21	-	---	-	M2	C5	-	M6	C21	-
	C6	+	---	---		C22	-	---	-		C22	-			
	C7	+	---	---		C23	+	---	---		C23	-			
	C8	+	---	---		C24	+	---	---		C24	-			
M3	C9	+	---	---	M7	C25	+	---	---	M3	C7	-	M7	C25	-
	C10	+	---	---		C26	+	---	---		C8	-			
	C11	+	---	---		C27	+	-	---		C9	-			
	C12	+	---	---		C28	+	-	---		C10	-			
M4	C13	+	---	---	M4	C29	+	-	---	M4	C11	-	M6	C26	-
	C14	+	---	---		C30	+	-	---		C12	-			
M5	C15	-	---	-	M5	C31	+	-	---	M5	C13	-	M7	C27	-
	C16	-	---	-		C32	+	-	---		C14	-			

(+) Con crecimiento, (-) sin crecimiento, (---) no se sembró.

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Los resultados indican que la concentración de 3000 ug/ml de Pb es inhibitoria para la población de clones, por lo tanto alcanzaron su límite de crecimiento.

Luego de realizadas todas las evaluaciones podemos afirmar que el metal pesado frente al cual los clones alcanzaron mayor tolerancia fue el Pb. Esta afirmación se evidencia al observar los resultados de la tabla 17-3, donde se muestra que de los 32 clones evaluados, 24 clones son capaces de tolerar la concentración de Pb hasta 2000 µg/ml.

Tabla 18-3 Concentración máxima de resistencia a metales pesados de los clones evaluados

Muestra	N° Clones	METAL PESADO			
		Pb Concentración µg/ml	Cr Concentración µg/ml	Cd Concentración µg/ml	Hg Concentración µg/ml
M1	C1	2000	400	-	-
	C2	2000	400	-	-
	C3	2000	400	-	-
	C4	2000	400	-	-
M2	C5	2000	400	-	-
	C6	2000	400	-	-
	C7	2000	400	-	-
	C8	2000	400	-	-
M3	C9	2000	400	-	-
	C10	2000	400	-	-
	C11	2000	400	-	-
M4	C12	2000	400	-	-
	C13	2000	-	-	-
M5	C14	2000	-	-	-
	C15	1000	600	200	1000
	C16	1000	600	200	1000
	C17	1000	600	200	1000
	C18	1000	600	200	1000
	C19	1000	600	200	1000
	C20	1000	600	200	1000
	C21	1000	600	200	1000
M6	C22	1000	600	200	1000
	C23	2000	-	750	-
	C24	2000	-	750	-
	C25	2000	-	750	-
M7	C26	2000	-	750	-
	C27	2000	400	1000	-
	C28	2000	400	1000	-
	C29	2000	400	1000	-
	C30	2000	400	1000	-
	C31	2000	400	1000	-
	C32	2000	400	1000	-

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

De color rojo está marcada la máxima resistencia, (-) No presentaron resistencia a ninguna concentración

El plomo es el único donde todos los clones toleran concentraciones de metal, ocho clones toleran hasta una concentración 1000 µg/ml y 24 clones toleran hasta la concentración de 2000 µg/ml. El cromo fue el que mostró un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento ya que los clones crecieron hasta una concentración máxima de 600 µg/ml siendo esta la menor concentración de metal donde se obtuvo crecimiento (C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22).

Los únicos clones que mostraron tolerancia tanto para plomo y cromo en concentraciones de 2000 µg/ml y 400 µg/ml respectivamente fueron C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, todos estos provenientes de las muestras M1, M2, M3, como se indica en la tabla 18-3.

Siguiendo en el orden de mayor tolerancia (Tabla 18-3), los clones que mostraron tolerancia para plomo hasta una concentración de 2000 µg/ml, cadmio hasta 1000 µg/ml y cromo hasta 400 µg/ml fueron los siguientes: C27, C28, C29, C30, C31, C32, los cuales son de la muestra M7.

En cambio los clones C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22 mostraron tolerancia para Pb y Hg hasta una concentración de 1000 µg/ml, para Cr obtuvieron tolerancia hasta 600 µg/ml y en Cd 200 µg/ml, siendo estos clones provenientes de la muestra M5 los únicos que presentaron tolerancia a todos metales pesados.

Es importante hacer notar que los clones que mayor tolerancia obtuvieron presentaban resistencia a al menos tres metales y provienen de las muestras M5 y M7, posiblemente siendo estos dos lugares los que tienen mayor nivel de contaminación. La muestra M5 se encuentra dentro de la ciudad de Riobamba donde son descargadas una cantidad importante de aguas residuales de todo tipo y M7 tiene a sus alrededores gran presencia agrícola además que es el punto donde el río Chibunga se une al Chambo por lo tanto viene arrastrando gran cantidad de contaminantes en su cauce.

En la tabla 19-3 se muestra un cuadro comparativo entre los porcentajes de tolerancia de los clones aislados con cada metal pesado, con el fin de tener una mejor comprensión de la tolerancia de los clones evaluados a cada metal pesado. Para realizar el porcentaje se tomó en cuenta a los clones que sobrevivieron a cada incremento de concentración en relación con el número total de clones seleccionados.

Tabla 19-3 Porcentaje de resistencia de los clones aislados según los medios suplementados

Medio	Concentración de Metal Pesado en µg/ml								
	50	100	200	400	600	750	1000	2000	3000
PCA+Pb	100%	100%	100%	100%	-	100%	100%	75%	0%
PCA+Cr	81%	81%	81%	81%	25%	0%	-	-	-
PCA+Cd	56%	56%	56%	31%	-	31%	19%	0%	-
PCA-Hg	25%	25%	25%	25%	-	25%	25%	0%	-

(-): no se sembró

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

3.6.1. Resistencia al Plomo

Las pruebas de resistencia al Pb mostraron que los clones mantenían un nivel alto de adaptación al medio suplementado, manteniendo un 100% de crecimiento en todos los clones hasta la concentración de 1000 µg/ml, cuando se llegó a una concentración de 2000 µg/ml los clones alcanzaron 75% de crecimiento como se indica en la Gráfico 8-3 y la Tabla 19-3., siendo la concentración más alta entre todos los metales analizados, cuando la concentración se incrementó a 3000 µg/ml se evidenció una inhibición total en el crecimiento.

Los clones analizados alcanzan tolerancia al metal Pb hasta 2000 $\mu\text{g/ml}$, por lo que podemos afirmar que este es el metal menos tóxico para la población de clones evaluados.

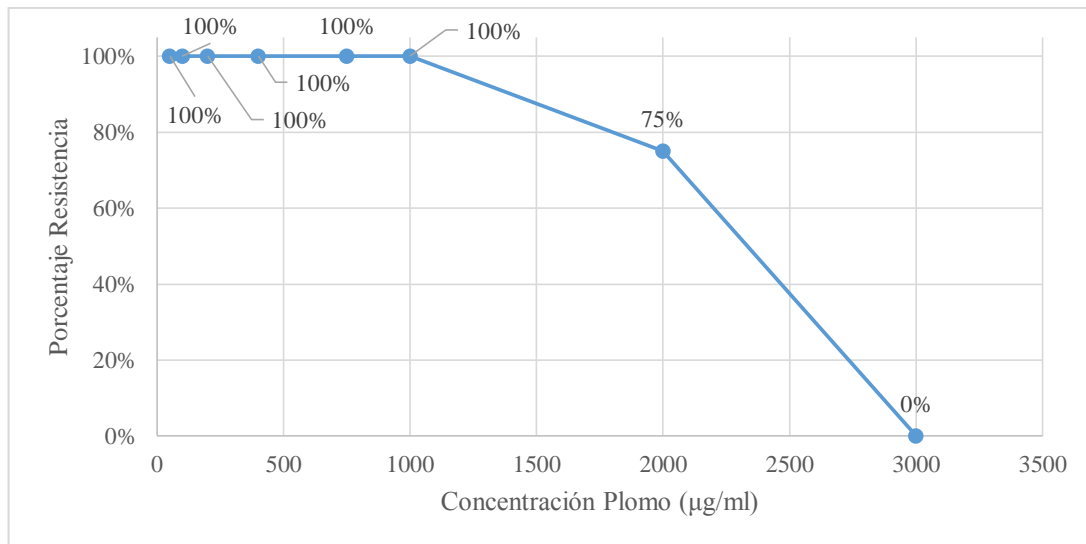


Gráfico 8-3. Resistencia al Plomo

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Los resultados obtenidos muestran un comportamiento similar de los clones reportados por Paniagua et al. (2003), quienes aislaron clones capaces de resistir concentraciones de plomo en un rango de 800 a 3200 $\mu\text{g/mL}$.

En las pruebas de tolerancia se pudo llegar hasta una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ en los aislados de la muestra M5 y 2000 $\mu\text{g/mL}$ en los aislados bacterianos de las muestras M1, M2, M3, M4, M6, M7.

3.6.2. Resistencia al Cromo

Los resultados obtenidos para la evaluación del crecimiento de los aislados bacterianos en presencia de Cr mostraron una inhibición de crecimiento en la mitad de la población estudiada a una concentración de 600 $\mu\text{g/ml}$ como se puede apreciar en la gráfica 9-3., la mortalidad fue drástica cuando se elevó a 750 $\mu\text{g/ml}$ ya que no se obtuvo crecimiento alguno de los clones inhibiendo por completo el crecimiento de aislados bacterianos, los clones se adaptaron de mejor manera a concentraciones de 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ mostrando porcentajes de tolerancia de 81% en cada uno.

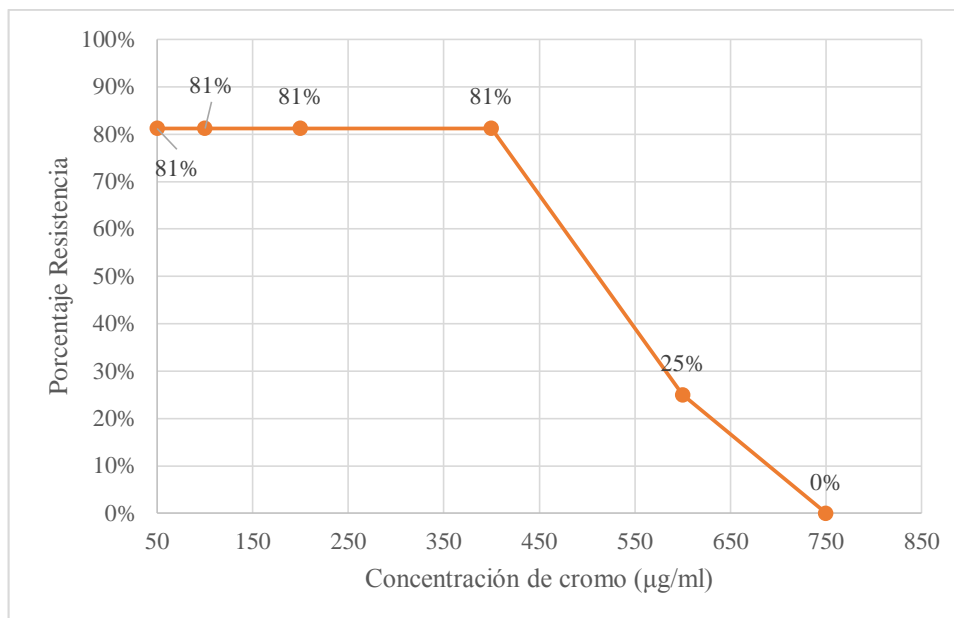


Gráfico 9-3. Resistencia al cromo

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Al comparar los resultados de tolerancia a Cr obtenidos en este estudio con los reportados por Paniagua *et al.*, y Moraga *et al.*, en el año 2003, se observa que nuestros clones se comportan de manera similar a los clones evaluados por Paniagua *et al.*, con un nivel de tolerancia de hasta 750 µg/ml. Mientras que en el caso de Moraga *et al.* pp. 91-93, los niveles de tolerancia son mayores, en su estudio alcanzó una concentración de 1600 µg/ml, suponemos que esto se debe a las condiciones de ambiente donde habitan los clones (Temperatura, pH, concentración del metal, etc.) las cuales diferencian las características de la microbiota presente.

3.6.3. Resistencia al Cadmio

Las pruebas de resistencia a cadmio muestran que los clones alcanzan una resistencia hasta la concentración de 1000 µg/ml. En las concentraciones de 100 y 200 µg/ml alcanza una resistencia del 56% como en relación con el crecimiento bacteriano, cuando se incrementa a 400 µg/ml hay un descenso significativo en el porcentaje de crecimiento que reduce hasta el 31% y se mantiene el mismo porcentaje con una concentración de 750 µg/ml, en la concentración de 1000 µg/ml se reduce el porcentaje de crecimiento hasta el 19% como se puede observar en la Gráfico 10-3, cuando se incrementa la concentración hasta 2000 µg/ml no se obtiene ningún crecimiento, inhibiendo así el crecimiento de los aislados bacterianos.

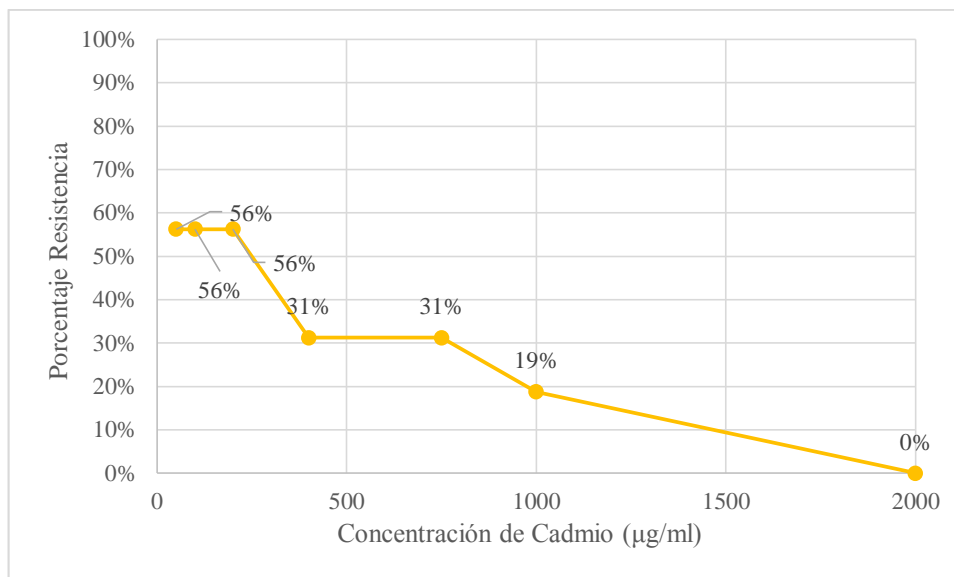


Gráfico 10-3. Resistencia al cadmio

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Los resultados muestran en este caso un mayor rango de tolerancia (6 de 32 clones fueron capaces de tolerar hasta 1000 µg/ml de Cd) al reportado por Moraga *et al.* (2003) en clones aislados de las aguas de la Bahía de Iquique quienes mostraron un valor de tolerancia máxima de 400 µg/ml para Cd. En nuestro caso los valores de tolerancia obtenidos para Cd corresponden a más del doble de los reportados por Moraga *et al* (2003) pp. 91-93.

3.6.4. Resistencia al Mercurio

Las pruebas realizadas muestran que los aislados bacterianos evaluados alcanzaron una tolerancia de hasta 1000 µg/ml de mercurio, a esta concentración se obtuvo un crecimiento de 8 de los 32 clones evaluados (25%) como se muestra en la tabla 18-3., siendo este junto el cadmio el segundo metal que después del plomo presentó un nivel de tolerancia mayor (1000 µg/ml). Cuando se incrementó la concentración a 100, 200, 400, 750 y 1000 µg/ml alcanzó una resistencia del 25% en todos los casos manteniendo la misma cantidad de clones resistentes, lo que nos indica que estos clones fueron los que mejor se adaptaron al medio. Cuando se incrementó la concentración a 2000 µg/ml ningún clon fue capaz de crecer, como se muestra en la gráfica 11-3., cabe recalcar que todos estos clones provienen de la muestra M5 lo cual podría indicar que en este caso existe una condición ambiental que favorece la resistencia a este metal.

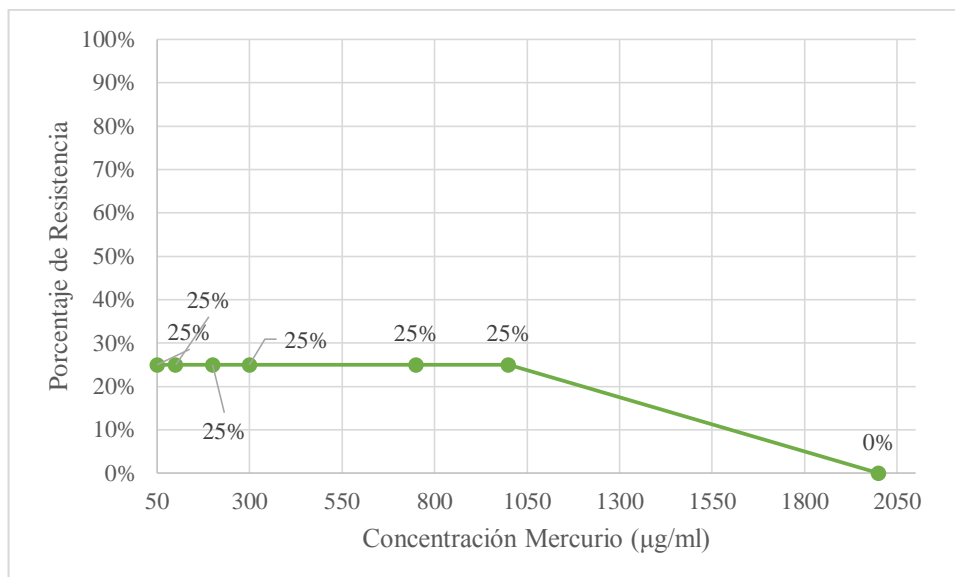


Gráfico 11-3 Resistencia al mercurio

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Los resultados reportados en esta investigación difieren a los obtenidos por Moraga *et al.* (2003) y Paniagua *et al.* (2003), cuyos clones solo lograron tolerar concentraciones máximas de 40 y 50 µg/ml respectivamente, los clones evaluados en esta investigación obtuvieron una mayor tolerancia al medio suplementado con mercurio lo que indica una mejor adaptación al mercurio.

Al hacer una evaluación de los resultados de la tolerancia mostradas por los clones ante todos los metales evaluados Pb, Cr, Cd y Hg (Tabla 18-3), se puede observar que los clones de M5 (C15 al C22) mostraron tolerancia a los 4 metales, en el caso de Cr y Hg obtuvieron los mayores niveles de tolerancia (600 µg/ml en el Cr y 1000 µg/ml en el Hg), para Pb y Cd mostraron niveles de tolerancia a 1000 y 2000 µg/ml respectivamente. Estos resultados parecieran indicar que en este punto existe un factor ambiental que favorece la aparición de bacterias tolerantes a varios metales.

Un resultado similar se observó para M7 (tabla 18-3) donde los clones presentaron tolerancia a tres metales (Pb, Cd, Cr) para Pb y Cd alcanzaron el nivel máximo de tolerancia 2000 µg/ml y 1000 µg/ml respectivamente, en el caso del Cr alcanzó un nivel de tolerancia de 400 µg/ml.

Finalmente los resultados encontrados indican que existe un efecto derivado de los desechos generados por la ciudad de Riobamba sobre la tolerancia a los cuatro metales puesto los aislados bacterianos obtenidos de M5 donde se encuentra un lugar importante de incorporación de aguas residuales de la ciudad al río Chibunga son los que presentaron tolerancia a los cuatro metales evaluados.

3.7. Fase VII: Identificación de las cepas bacterianas aisladas más resistentes a metales pesados

Para la identificación bacteriana se utilizaron los clones más resistentes ante cada metal pesado como se indica en la tabla 18-3., a concentraciones de 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml y 600 µg/ml respectivamente.

Los clones más resistentes se los agrupó por muestras y se escogió un clon que cumpla con los parámetros de selección descritos en el apartado 2.3.3.1., del Capítulo II, es decir la de mayor tamaño y que tenga una forma bien definida. Esta selección se realizó por motivo de optimizar los recursos disponibles para la identificación con pruebas bioquímicas. Los clones escogidos se muestran en la tabla 20-3.

Tabla 20-3 Clones más resistentes escogidos para su identificación.

Metal	Concentración (µg/ml)	Muestra	Clones
Pb	2000	M1	C3
	2000	M2	C7
	2000	M3	C10
	2000	M4	C14
	2000	M6	C24
	2000	M7	C31
Cr	600	M5	C19
Cd	750	M7	C29
Hg	1000	M5	C15

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

3.7.1. Tinción Gram de los aislados bacterianos más resistentes a concentraciones de metales pesados

Se realizó una tinción gram de los clones más resistentes con el fin de comprobar si mantienen las mismas características que mostraron en la tinción Gram de los aislados bacterianos como está indicado en la tabla 12-3.

La evaluación de la tinción gram de los aislados bacterianos según la tabla 19-3., coincide con los resultados obtenidos en la tinción gram de los aislados bacterianos más resistentes, lo cual nos indica que las bacterias que fueron aisladas, estabilizadas y sometidas a pruebas de resistencia a concentración de metal pesado mantienen la misma forma identificada con anterioridad.

3.8. Fase VIII: Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de los clones bacterianos aislados.

Tabla 21-3 Identificación mediante pruebas bioquímicas para bacilos gramnegativos

METAL	MUESTRA	CLONES	Concentración (ug)	Oxidasa	Catalasa	Citrato	SIM			TSI	Manitol	Ureasa	Resultados
							H ₂ S	Indol	Movilidad				
Pb	M1	C3	2000	+	+	-	-	-	+	K/K	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	M2	C7	2000	+	+	-	-	-	-	K/A	-	-	<i>Shigella</i>
	M3	C10	2000	+	+	-	-	-	-	K/K	-	-	<i>Shigella</i>
	M7	C31	2000	-	+	+	-	-	+	A/A	-	+	<i>Proteus</i>
Cr	M5	C19	600	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	<i>Enterobacter</i>
Cd	M7	C29	750	+	+	-	-	-	-	K/K	-	-	<i>Shigella</i>
Hg	M5	C15	1000	-	+	+	-	-	+	K/K	-	+	<i>Proteus</i>

SIM: Sulfuro, Indol y Movilidad, TSI: agar hierro triple azúcar, A/A: reacción ácido sobre ácido, K/A: reacción alcalina sobre ácido, K/K: reacción alcalina y fermentación de glucosa.

Realizado por: Cristian Salgado. 2018.

Tabla 22-3 Identificación mediante pruebas bioquímicas para bacilos grampositivos

METAL	MUESTRA	CLONES	Concentración (ug)	Oxidasa	Catalasa	Manitol	Ureasa	Resultados
Pb	M4	C14	2000	+	+	-	-	<i>Staphylococcus</i>
	M6	C24	2000	-	+	+	-	<i>Staphylococcus</i>

Realizado por: Cristian Salgado. 2018

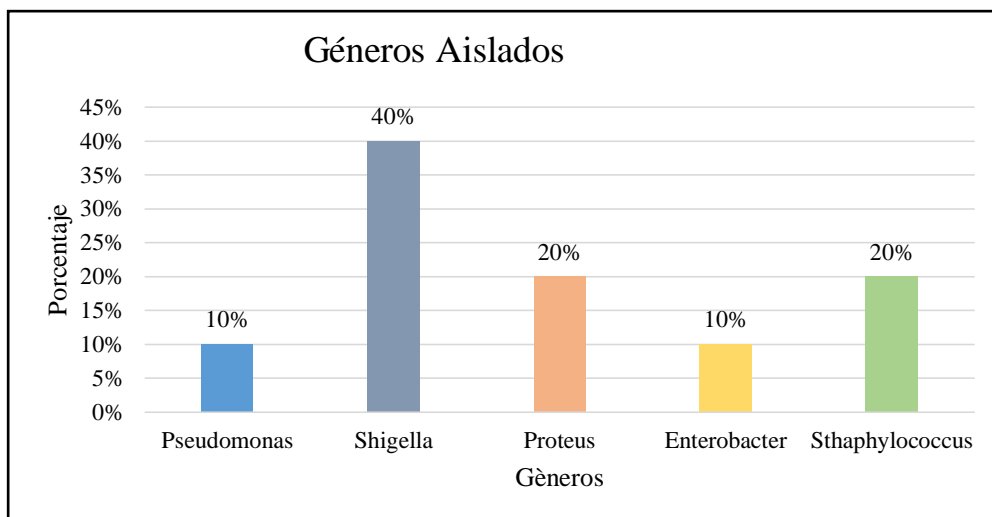


Gráfico 12-3 Resultados de géneros obtenidos de las cepas aisladas
Realizado por: Cristian Salgado. 2018

Para determinar el género de cada cepa se compararon los resultados de las pruebas bioquímicas con el Manual de Técnicas en Microbiología Clínica de Alvarez et al. (1990), donde se encuentran tablas de características diferenciales de cada género y especie que muestran las diferencias entre gram negativos y gram positivos.

Utilizando distintas pruebas bioquímicas se realizó una identificación preliminar de los géneros correspondientes a los clones aislados, los resultados se muestran en el gráfico 12-3., determinándose la presencia de los géneros *Pseudomonas*, *Shigella*, *Proteus* y *Enterobacter* para bacilos gramnegativos, los géneros que se repiten son *Shigella* y *Proteus*. En cambio para cocos grampositivos se obtuvo la presencia de los géneros *Sthaphylococcus*. Estos resultados son similares a los reportados por Paniagua G. (2003), pp. 92-94, donde el género de *Sthaphylococcus* fue el más resistente a metales pesados.

Los géneros de bacterias que fueron obtenidos en la investigación son similares a los obtenidos por Martínez et al. (2010) y Duque A. (2016), considerando que en estas investigaciones se utilizó también muestras ambientales, coinciden los géneros sugeridos de *Shigella* y *Proteus* que forman parte de los grupos de coliformes, que habitualmente se encuentran en muestras de agua con alta carga orgánica. Este grupo es causante de infecciones digestivas, urinarias y respiratorias. Mientras tanto el género *Pseudomonas* es un microorganismo común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, el agua y las aguas residuales. Es importante indicar que estos resultados no son concluyentes y para identificar a nivel de especie cada uno de los géneros sugeridos es necesario realizar una evaluación bioquímica de mayor profundidad o identificar los aislados utilizando pruebas de biología molecular.

Los altos niveles de resistencia a metales pesados mostrados por los géneros encontrados los hacen candidatos para ser utilizarlos en procesos de biorremediación de metales pesados.

CONCLUSIONES

- Se realizó una caracterización físico-química de las muestras de agua de la microcuenca del Río Chibunga encontrándose niveles muy bajos de presencia de metales pesados que pocas veces superan el límite permisible por la norma por lo que no se puede decir que exista una contaminación con metales significativo, sin embargo se lograron aislar bacterias con altos niveles de tolerancia ante los metales estudiados (Pb, Cd, Cr y Hg).
- Se aislaron 32 clones bacterianos utilizando medios suplementados con metales pesados, estos se ajustaron a criterios de selección para evaluar la resistencia en concentraciones crecientes de metal pesado.
- La evaluación de la resistencia a los metales pesados de los aislados bacterianos evidenció que el metal menos tóxico fue el Pb en el cual se obtuvo crecimiento de un 75% de los clones hasta 2000 µg/ml. Mientras que el metal que mostró menor tolerancia fue el Cr con un valor de resistencia máximo a 600 µg/ml, en el cual solo crecieron 8 clones (25%) de los 32 evaluados.
- Se caracterizaron nueve clones bacterianos que representan a todas las muestras resistentes a concentraciones de plomo de 2000 µg/ml, de cromo de 600 µg/ml, de cadmio de 1000 µg/ml y mercurio de 1000 µg/ml y se llegó a determinar que estos aislados bacterianos pertenecen a los géneros *Shigella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus* y *Enterobacter*.
- Los niveles de tolerancia encontrados en los aislados bacterianos ante los metales pesados utilizados como presión selectiva muestran que en el río Chibunga existe una gran variedad de bacterias capaces de tolerar altos niveles de metales pesados.
- Las bacterias aisladas en este estudio mostraron niveles de tolerancia variable a los metales empleados, se debe hacer notar que los aislados provenientes del sitio de muestreo M5 mostraron tolerancia a los cuatro metales utilizados, lo cual podría indicar que existen distintos factores ambientales en este lugar que influyen en la resistencia a estos metales, uno de ellos podría ser un alto nivel de contaminación.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con la investigación para determinar la eficiencia de los clones en procesos de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados.
- Realizar una identificación más precisa de las bacterias que resisten a concentraciones elevadas de metales pesados, una de las opciones podría ser a través de técnicas de biología molecular.
- Se recomienda evaluar la resistencia de las bacterias de la microcuenca del río Chibunga a antibióticos, esta investigación será muy importante para determinar los efectos de la multirresistencia bacteriana, además ayudará a identificar cepas que pueden ser un problema de salud pública.
- Caracterizar otros cuerpos de agua como aguas residuales de industrias, aguas residuales domésticas, aguas negras, lagunas, etc., a través del método utilizado en la investigación para buscar bacterias que sean resistentes a los metales pesados utilizados en la investigación y a otros metales como por ejemplo el cobre, hierro, arsénico, zinc o níquel.

BIBLIOGRAFÍA

AAG CENTER FOR GLOBAL GEOGRAPHY EDUCATION. *Water Resources*. [en línea]. 2011. Washington-USA. [Consulta: 27 Enero 2018]. Disponible en: <http://cgge.aag.org/WaterResources1e/index.html>.

AGUDELO, R. M. *El agua, recurso estratégico del siglo XXI*. Medellín-Colombia: Rev. Fac. Nac. Salud Pública vol.23 no.1, 2005, pp. 91-100.

ALVAREZ , M. V., et al. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. Madrid-España: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas, 1990, pp. 28-29.

ALVAREZ, A. *Los protozoos. Características generales y su rol como agentes patógenos*. Santa Rosa-Argentina: Cátedra de Patología General y Anatomía Patológica Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam., 2006, p. 62.

ANDRADE , M., at al. *Depuración de Aguas Residuales por Medio de Humedales Artificiales*. Barcelona-España: N. Antequera Durán, ed. Cochabamba: s.n., 2010, pp. 53-83.

APELLA, M. *Microbiología de agua. conceptos básicos*. Buenos Aires-Argentina: Centro de Referencia para Lactobacilos y Universidad Nacional de Tucumán, 2005, pp. 2-6.

BELTRÁN-PINEDA, M. E. *Biorremediación De Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) Y Mercurio (Hg) Mecanismos Bioquímicos E Ingeniería Genética: Una Revisión*. Tunja-Colombia: Universidad Militar Nueva Granada, 2016, pp. 173-178

BENINTENDE, S. *Crecimiento Bacteriano*. [en línea]. Buenos Aires-Argentina: Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional Entre Rios, 2008, pp. 1-6. [Consulta: 20 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf.

BUSTOS, A. L. & BUSTOS, E. *La protección de la microcuenca del río chimborazo; a través de la implementación del plan de manejo ambiental, participativo y sustentable de los recursos agua y suelo*. Riobamba-Ecuador: CEAS, 2010, pp. 2-12.

CAÑIZARES VILLANUEVA, R. O. *Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana*. Mexico D.F.-México: Revista Latinoamericana de Microbiología, 2000, pp. 133-134.

CERVANTES, C., at al. *Interacciones microbianas con metales pesados*. Mexico D.F.-México: Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 48, No. 2, 2006, pp. 203-210.

CESA. *Proyecto de Gestión Integral de la Cuenca del Río Chambo*. [en línea]. Riobamba-Ecuador: Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas, 2010, [Consulta: 18 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://subcuencachambo.wordpress.com/lo-que-buscamos/>

CÓMITE SUBCUENCA DEL RÍO CHAMBO. *Aportes a la planificación para la gestión integral de los recursos hídricos*. [en línea]. Riobamba-Ecuador: Subcuenca Río Chambo, 2015, [Consulta: 18 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://subcuencachambo.wordpress.com/diagnostico-de-la-subcuenca/>

DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Montevideo-Uruguay: Instituto de Higiene. Facultad de Medicina. Universidad de la República, 2006, pp. 631-632.

DÍAZ-BORREGO, L., at al. *Utilización De Sustratos Orgánicos Y Resistencia A Metales Pesados Por Bacterias Asociadas A Lemna Spp*. Maracaibo-Venezuela: *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas Volumen 41*. Universidad del zulia, 2007, pp. 27-43.

DUQUE, ANABELL., *Evaluación de la Degradación de Arsénico con Cepas Bacterianas Aisladas de Relaves Mineros, en el Cantón Ponce Enríquez*. (Trabajo de Titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, Riobamba, Ecuador: 2016. pp. 54-61.

EL TELÉGRAFO. *El Chibunga, uno de los ríos más contaminados del país*. [En línea]. Quito-Ecuador: Diario El Telégrafo, 2013, [Consulta: 10 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional/1/el-chibunga-uno-de-los-rios-mas-contaminados-del-pais>.

EPA, *EPA en Español Terminos*. [En línea]. Washington-Ecuador: Environmental Protection Agency 2016, [Consulta: 12 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/espanol/terminos-m>

FAO, *Tema 4: El Agua*. [En línea]. Roma-Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016, [Consulta: 15 de noviembre de 2017] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/w1309s/w1309s06.htm>

FERNÁNDEZ, A., at al., *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Madrid-España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2010. pp. 6-8.

FERNANDEZ, F. & LÓPEZ, J. *Resistencia Bacteriana*. La Habana-Cuba: Revista Cubana de Medicina Militar, 2002. pp. 1-5.

GARBAYO, L. *Resistencia Bacteriana y como afecta nuestra salud*. [En línea] Barcelona-España: Centro de Estudios CEAC, 2017, [Consulta: 22 de Enero de 2018]. Disponible en: <https://www.ceac.es/blog/que-es-la-resistencia-bacteriana-y-como-afecta-nuestra-salud>.

GARCÍA ROMO, P. *Caracterización del agua recirculada y optimización de la dosificación de lechada de cal en el agua residual del ingenio RISARALDA S.A.* Pereira-Colombia: *Universidad Tecnológica de Pereira*, 2010. pp. 5-10.

HYNNINEN, A. *An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria*. Helsinki-Finlandia: Department of Applied Chemistry and Microbiology, Molecular microbiology, 2009. pp. 384-94.

JAPAC. *Los distintos tipos de agua que existen en nuestro planeta*. [En línea] Culiacán-México: Junta Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Culiacán, 2013, [Consulta: 16 de enero de 2018]. Disponible en: <http://japac.gob.mx/2015/11/02/los-distintos-tipos-de-agua-que-existen/>

JAQUE, E. & POTOĆÍ, C. *Evaluación del Índice de Calidad de Agua (Ica) de la Microcuenca del Río Chibunga, en Variaciones Estacionales, Provincia De Chimborazo – Ecuador, Durante El Periodo 2014. (Trabajo de Titulación)*. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. Facultad De Ciencias. Escuela de Ciencias Químicas. Riobamba-Ecuador: 2015, pp. 54-57.

LENNTECH BV. *Propiedades químicas del Plomo - Efectos del Plomo sobre la salud - Efectos ambientales del Plomo*. [En línea] Delfgauw-Países Bajos: Lenntech. 2016, [Consulta: 15 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/pb.htm>

LÓPEZ GUTIÉRREZ, J. *Técnicas de biorrecuperación in situ en acuíferos contaminados por metales pesados*. Valencia-España: Instituto Geológico y Minero de España. Oficina de Proyectos de Valencia, 2001, pp. 233-240.

MADIGAN, M. T., at al. *Brock Biología de los Microorganismos*. Illinois-USA: Pearson Education, 2003. pp. 607-609.

MARRERO-COTO, J., at al. *Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación.* La Habana-Cuba: Revista CENIC Ciencias Biológicas, 2010. pp. 67-78.

MARTÍNEZ, A. ET AL. *Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares.* La Habana-Cuba: Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 2010, pp. 1-6.

MEDINA, G., at al. *Evaluación Microbiológica de la resistencia de bacterias a los metales pesados en la microcuenca del río Chibunga, Provincia de Chimborazo, Cantón Riobamba.* Riobamba-Ecuador: Feria Expositiva asociada de tecnologías, proyectos y experiencias ambientales en el marco de la II Jornada Iberoamericana en saludo al día Mundial del Medio Ambiente-Ecuador, 2016. pp. 3-8.

METCALF & EDDY. *Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y Reutilización.* Madrid-España: McGraw-Hill Interamericana, 1995. pp. 508-515;538-551;555-557;605-682.

MORAGA, R., at al. *Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique.* Iquique-Chile: Investigaciones marinas, 2003. pp. 91-93.

OJEDA RIOS, M. *Bacterias Gram positivas y Gram negativas.* Ciudad de México-México: Microbioenergetica, 2018. pp. 3-7.

OMS. *Intoxicación por plomo y salud.* Organización Mundial de la Salud. [En línea] Ginebra-Suiza: 2017, [Consulta: 21 de enero de 2018] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>

PALACIOS, W. *Estudio de impacto ambiental (ex post).* Madre Tierra, Mera(Pastaza): Concesion "B&B-2", 2013. pp. 8-10.

PANIAGUA C., at al. *Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de Staphylococcus aureus.* Ciudad de México-México: Revista Medica del Hospital General de México, S.S., 2003 pp. 13-21.

PÉREZ , P. E. *Los efectos del cadmio en la salud.* Ciudad de México-México: *Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas*, 2012. pp. 199-205.

RAMALHO, R. *Tratamiento de aguas residuales.* Barcelona, España: Reverte, 2003. pp. 8-23

REGISTRO ESTATAL DE EMISIONES Y FUENTES CONTAMINANTES ESPAÑA. *Sustancias Contaminantes.* PRTR. [En línea] Madrid-España: 2016, [Consulta: 21 de enero de 2018] Disponible en: <http://www.prtr-es.es/conozca/Sustancias-contaminantes-1026062012.html>.

ROMERO, Y. *Métodos de identificación bacteriana y sus aplicaciones en la investigación odontológica.* Santa Marta-Colombia: Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud., 2010. pp. 247-251.

SCRAGG, A. *Sistemas biológicos en procesos tecnológicos.* Ciudad de México-México: Biotecnología para ingenieros. Limusa S.A. de C.V, 1996. pp. 191-192.

SECRETARIA NACIONAL DEL AGUA. *Delimitación y Codificación de Unidades Hidrográficas del Ecuador.* Quito-Ecuador: Metodología de Pfafstetter, SENAGUA, 2009. pp. 3-8.

SENAGUA. *Boletín Anual 2017.* [En línea] Quito-Ecuador: 2017, [Consulta: 17 de enero de 2018] Disponible en: https://www.agua.gob.ec/wp-content/uploads/2018/02/Boletin-Estadistico-ARCA-SENAGUA_08feb.compressed-2.pdf.

SHERAMETI, I., et al. *Detoxification of Heavy Metals: State of Art.* London-England: Springer, 2011. pp. 1-6.

SUÁREZ, P. & REYES, R. *La Incorporación de Metales Pesados en las Bacterias y su Importancia para el Ambiente.* Caracas-Venezuela: Asociación Interciencia, 2002. pp. 160-164.

SUEIRO, F. *Tesis Caracterización de la resistencia a metales pesados y búsqueda de integrones en cepas de Delftia sp.* Montevideo-Uruguay: Universidad de la Republica. Facultad de Ciencias. Sección Bioquímica y Biología Molecular, 2012. pp. 12-15.

TCHOBANOGLIOUS, G. & CRITES, R. *Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones.* Bogotá-Colombia: McGraw Hill, 2000. pp. 233-244

TÉLLEZ, J. *Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres.* Bogotá-Colombia: Revista de la Facultad de Medicina, 2004. pp. 50-61.

TULSMA. LIBRO VI. ANEXO 1. *Tabla 1. Tabla 2. Tabla 3.* Quito-Ecuador: Norma De Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua, 2014. pp. 10-13.

VARGAS, C. *Lagunas de Estabilización. Características Microbiológicas de las Aguas Residuales.* Lima-Perú: OPS/CEPIS, 1996. pp. 1-2.

VAZQUEZ, E. *Contaminación del agua: causas, consecuencias y soluciones.* [En línea] Ciudad de México-México: Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, A.C, 2017 [Consulta: 27 de enero de 2018] Disponible en: <https://agua.org.mx/contaminacion-del-agua-causas-consecuencias-soluciones/>

VULLO, D. L. *Microorganismos y Metales Pesados: una Interacción en Beneficio del Medio Ambiente*. Buenos Aires-Argentina: Revista Química Viva, Universidad de Buenos Aires, 2003. p. 94.

ZARAGOSA CRESPO, R. & GIMENO CARDONA, C. *Microbiología Aplicada al Paciente Crítico*. Bogotá-Colombia: Editorial Médica Panamericana S.A., 2008. pp. 28-30.

ANEXOS

ANEXO A: Tablas sin procesar del conteo microbiológico inicial

1A. Estimación Crecimiento en la muestra M1						2A. Estimación Crecimiento en la muestra M2							
MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES			
			10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵				10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
M1	Control PCA	A	125	65	23	9	M2	Control PCA	A	210	102	43	19
		B	148	79	31	11			B	31	98	54	21
	PCA+Pb	A	26	11	6	4		PCA+Pb	A	175	36	4	2
		B	5	6	4	4			B	23	5	4	3
	PCA+Hg	A	0	0	0	0		PCA+Hg	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0			B	0	0	0	0
	PCA+Cd	A	0	1	0	0		PCA+Cd	A	0	0	0	0
		B	5	0	0	0			B	0	0	0	0
	PCA+Cr	A	33	12	8	2		PCA+Cr	A	10	8	3	2
		B	29	17	6	2			B	27	16	3	2
	3A. Estimación Crecimiento en la muestra M3							4A. Estimación Crecimiento en la muestra M4					
	MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES				MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES		
10 ²				10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ²				10 ³	10 ⁴	10 ⁵
M3	Control PCA	A	16	13	12	1	M4	Control PCA	A	121	31	11	10
		B	66	18	9	2			B	87	21	9	4
	PCA+Pb	A	39	11	3	1		PCA+Pb	A	2	0	0	1
		B	48	26	11	1			B	4	0	0	0
	PCA+Hg	A	0	0	0	0		PCA+Hg	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0			B	0	0	0	0
	PCA+Cd	A	0	0	0	0		PCA+Cd	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0			B	0	0	0	0
	PCA+Cr	A	10	8	3	2		PCA+Cr	A	0	0	0	0
		B	27	16	3	2			B	0	0	0	0
	5A. Estimación Crecimiento en la muestra M5							6A. Estimación Crecimiento en la muestra M6					

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES			
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
M5	Control PCA	A	157	61	33	9
		B	164	74	31	7
	PCA+Pb	A	25	2	1	1
		B	19	10	3	1
	PCA+Hg	A	26	2	1	1
		B	8	1	1	1
	PCA+Cd	A	6	2	1	1
		B	10	3	1	1
	PCA+Cr	A	10	5	1	1
		B	11	6	3	1

MUESTRA	MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES			
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
M6	Control PCA	A	231	134	79	21
		B	189	101	56	24
	PCA+Pb	A	17	6	2	1
		B	4	4	1	1
	PCA+Hg	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
	PCA+Cd	A	8	6	4	1
		B	19	11	10	0
	PCA+Cr	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0

7A. Estimación Crecimiento en la muestra M7

MEDIO	Serie Duplicada	DILUCIONES			
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
PCA	A	300	280	231	172
	B	288	221	187	151
PCA+Pb	A	300	211	131	120
	B	300	198	151	130
PCA+Hg	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
PCA+Cd	A	17	13	9	2
	B	95	92	90	86
PCA+Cr	A	77	66	65	60
	B	157	61	63	58

Muestra	Concentración	50 µg/ml				100 µg/ml				200 µg/ml				400 µg/ml				600 µg/ml				750 µg/ml				1000 µg/ml				2000 µg/ml				3000 µg/ml			
		Metal Pesado	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cr	Cd	Hg	Cr	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	
M1	C1	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C2	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C3	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C4	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
M2	C5	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C6	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C7	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C8	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
M3	C9	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C10	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C11	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C12	+	+	-	-	+	+	---	---	+	+	---	---	+	+	---	---	-	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
M4	C13	+	-	-	-	+	---	---	---	+	---	---	---	+	---	---	---	---	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
	C14	+	-	-	-	+	---	---	---	+	---	---	---	+	---	---	---	---	+	---	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	+	---	---	---		
M5	C15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---	---	+	+	---	+	-	---	-	---	-	---	-	---	---	---			
	C16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---	---	+	+	---	+	-	---	-	---	-	---	-	---	---	---			

Muestra	Concentración	50 µg/ml				100 µg/ml				200 µg/ml				400 µg/ml				600 µg/ml				750 µg/ml				1000 µg/ml				2000 µg/ml			3000 µg/ml
		Metal Pesado	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cr	Pb	Cr	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb		
M5	C17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---	---	+	+	---	+	-	---	-	---	---			
	C18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---	---	+	+	---	+	-	---	-	---	---			
	C19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---	---	+	+	---	+	-	---	-	---	---			
	C20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---	---	+	+	---	+	-	---	-	---	---			
	C21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---	---	+	+	---	+	-	---	-	---	---			
	C22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---	---	+	+	---	+	-	---	-	---	---			
M6	C23	+	-	+	-	+	---	+	---	+	---	+	---	+	---	+	---	---	+	---	+	---	+	-	---	+	---	---	---	---			
	C24	+	-	+	-	+	---	+	---	+	---	+	---	+	---	+	---	---	+	---	+	---	+	-	---	+	---	---	---	---			
	C25	+	-	+	-	+	---	+	---	+	---	+	---	+	---	+	---	---	+	---	+	---	+	-	---	+	---	---	---	---			
	C26	+	-	+	-	+	---	+	---	+	---	+	---	+	---	+	---	---	+	---	+	---	+	-	---	+	---	---	---	---			
M7	C27	+	+	+	-	+	+	+	---	+	+	+	---	+	+	+	---	-	+	---	+	---	+	+	---	+	-	---	---				
	C28	+	+	+	-	+	+	+	---	+	+	+	---	+	+	+	---	-	+	---	+	---	+	+	---	+	-	---	---				
	C29	+	+	+	-	+	+	+	---	+	+	+	---	+	+	+	---	-	+	---	+	---	+	+	---	+	-	---	---				
	C30	+	+	+	-	+	+	+	---	+	+	+	---	+	+	+	---	-	+	---	+	---	+	+	---	+	-	---	---				
	C31	+	+	+	-	+	+	+	---	+	+	+	---	+	+	+	---	-	+	---	+	---	+	+	---	+	-	---	---				
	C32	+	+	+	-	+	+	+	---	+	+	+	---	+	+	+	---	-	+	---	+	---	+	+	---	+	-	---	---				

ANEXO B: Tabla de pruebas de resistencia de todos los aislados bacterianos

Indicadores de crecimiento: (+) con crecimiento, (-) nulo crecimiento, (---) no se sembró

ANEXO C: Registro Fotográfico de la investigación



1C. Punto de muestreo M1 en el Río Chimborazo



2C. Punto de muestreo M2 en la comunidad de San Juan



3C. Punto de muestreo M3 en Gatazo Grande sector de la fábrica Cemento Chimborazo



4C. Punto de muestreo M4 en Ricpamba



5C. Punto de muestreo M5 en Parque Ecológico



6C. Punto de muestreo M6 en sector de San Luis



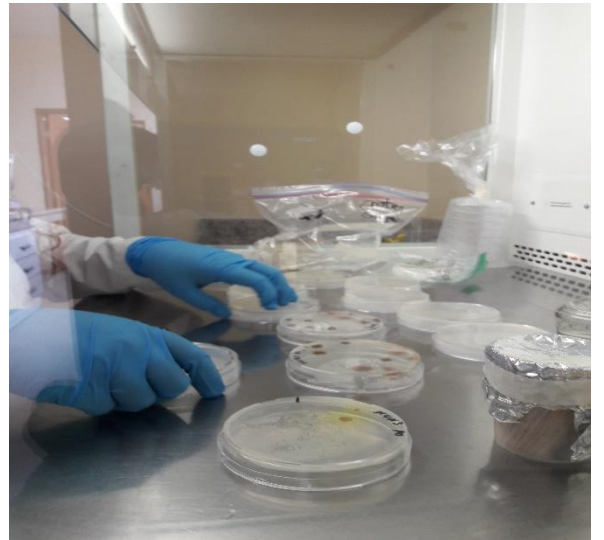
7C. Punto de muestreo M7 en descarga del río Chibunga en el río Chambo



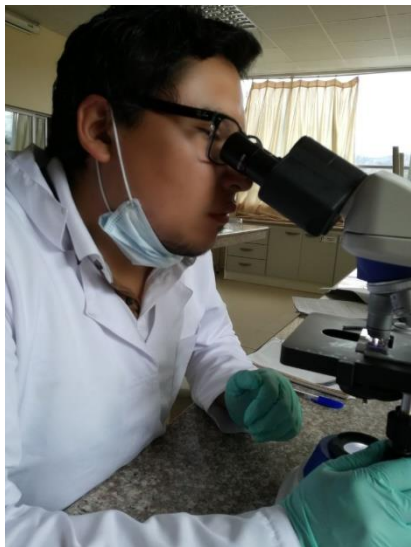
8C. Preparación de diluciones para estimación de crecimiento inicial



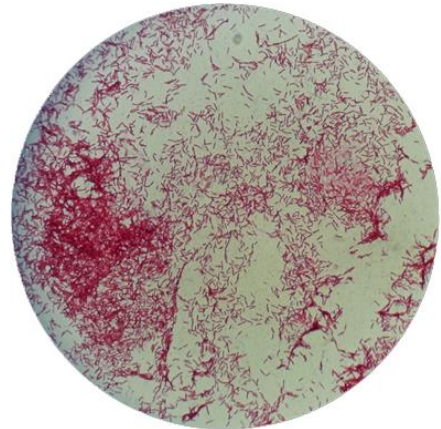
9C. Pesaje de PCA para la preparación de medios de cultivo



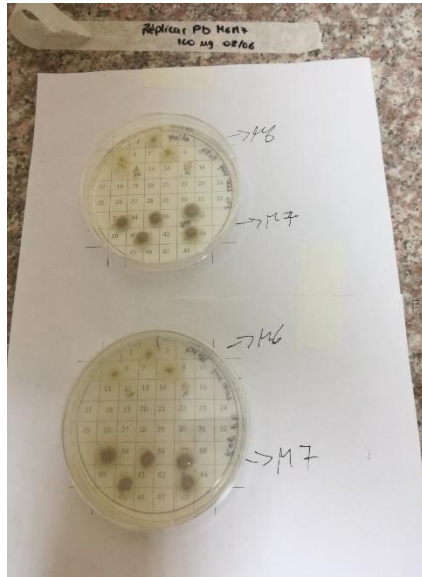
10C. Siembra de las muestras para conteo microbiológico inicial



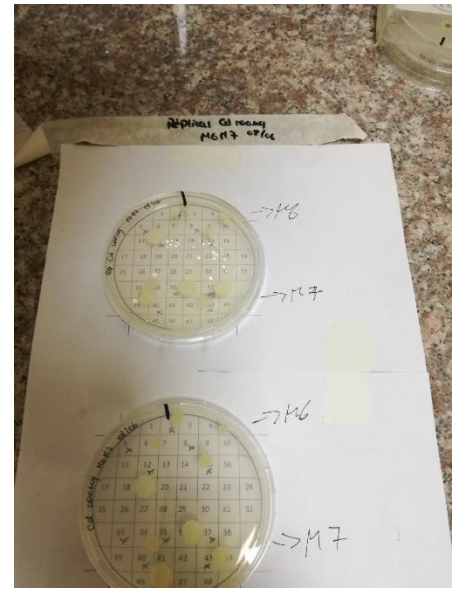
11C. Observación al microscopio de la prueba de tinción gram



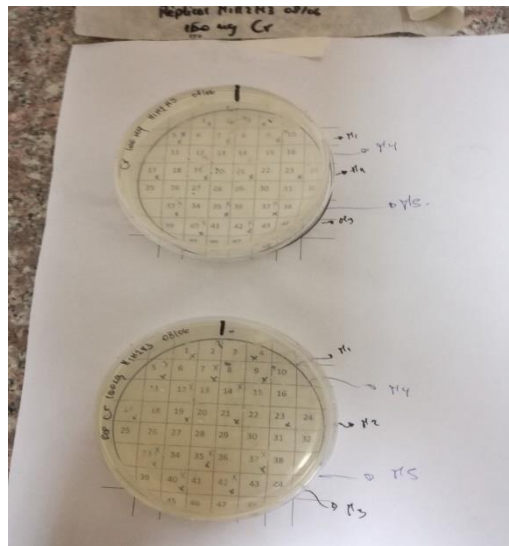
12C. Resultado de tinción de muestra de clon gram negativo



13C. Resultado de pruebas de resistencia para clones de las muestras M6 y M7 en medios suplementados con plomo (100 µg/ml)



14C. Resultado de pruebas de resistencia para clones de las muestras M6 y M7 en medios suplementados con cadmio



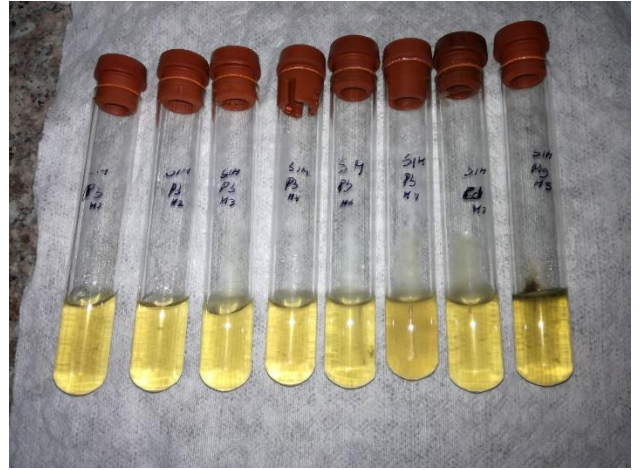
15C. Resultado de pruebas de resistencia para clones de las muestras M1, M2 y M3 en medios suplementados con cromo



16C. Resultados pruebas de resistencia de medio PCA control



17C. Resultado de pruebas de resistencia para clones de las muestras M5 en medios suplementados con mercurio



18C. Resultado de la prueba bioquímica SIM



19C. Resultado de la prueba bioquímica TSI



20C. Resultado de la prueba bioquímica Citrato