



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

#### **“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES AL MERCURIO AISLADAS DE LA MICROCUENCA DEL RÍO GALA”**

##### **Trabajo de titulación**

Tipo: Proyecto de investigación

Presentado para optar por el grado académico de:

#### **INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTOR:** JENNIFER ANDREA NARANJO BARRENO

**TUTOR:** Ing. VERÓNICA CABALLERO PhD

Riobamba –Ecuador

2020

**© 2020, Jennifer Andrea Naranjo Barreno**

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.

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

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

Riobamba, 25 de Noviembre del 2020



**Jennifer Andrea Naranjo Barreno**

**230011329-3**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de titulación: tipo: proyecto de investigación **“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES AL MERCURIO AISLADOS DE LA MICROCUENCA DEL RÍO GALA”** realizado por la señorita **Jennifer Andrea Naranjo Barreno** ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos y legales, en tal virtud el Tribunal Autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dr. Fausto Manolo Yaulema Garces

\_\_\_\_\_

2020/11/25

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Ph. D. Verónica Lucía Caballero Serrano

\_\_\_\_\_

2020/11/25

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE  
TITULACION**

Dr. Celso Guillermo Recalde Moreno

\_\_\_\_\_

2020/11/25

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme dado las fuerzas para culminar esta etapa de mi vida, a mis padres Mario Naranjo y Fanny Barreno por haber depositado su confianza en mí, por darme su apoyo incondicional hasta el fin de mi carrera. A mi hermana Pamela Naranjo, por ser amiga y confidente en todo momento. A mi hijo Stefano Naranjo, el motor de mi vida que me impulsa a seguir adelante. Y a Romel Palaguachi, por haberme dado la mano cuando más lo necesitaba, por no dejar que me diera por vencida y darme ánimos cada día hasta llegar a la meta.

Jennifer N.

## **AGRADECIMIENTO**

Al Grupo de Energías Alternativas y Ambiente (GEAA), por haberme permitido formar parte de este gran equipo durante 3 años, En especial al Dr. Celso Recalde director del grupo de investigación por haber depositado su confianza en mí en la realización de distintas actividades en el periodo que realice las practicas pre profesionales y por incluirme en el proyecto REMIND del cual formó parte mi investigación.

Un agradecimiento infinito a la Ing. Verónica Caballero PhD directora de este trabajo, por estar presta a cualquier inquietud, al Dr Gerardo Medina por colaborar en esta parte del proyecto el cual ha contribuido con sus conocimientos, los cuales fueron una excelente guía para la realización de las diferentes actividades de mi trabajo de investigación. A la Biq. Yolanda Buenaño que me abrió las puertas del laboratorio de Análisis Clínicos y Bacteriológicos el cual está a su cargo y se realizó la investigación.

A mi familia, profesores, amigos y a mi novio, gracias infinitamente.

Jennifer N.

## TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	VIII
INDICE DE GRÁFICOS.....	X
INDICE DE ANEXOS .....	XI
RESUMEN .....	XII
SUMMARY .....	XIII
INTRODUCCIÓN .....	1

## CAPÍTULO I

1	MARCO TEORICO REFERENCIAL .....	5
1.1	Antecedentes .....	5
1.2	Aguas Residuales .....	6
1.3	Bioprospección.....	6
1.4	Estudio bioprospectivo en Ambientes extremos.....	7
1.5	Metales Pesados .....	7
1.6	Mercurio (Hg).....	8
1.7	Resistencia de Bacterias a metales pesados .....	9
1.8	Interacciones metal-microorganismo.....	9
1.9	Bacterias.....	10
1.10	Forma:.....	10
1.11	Estructura de la pared celular de las bacterias grampositivas .....	11
1.12	Estructura de la pared celular de las bacterias gramnegativas .....	12
1.13	Identificación Bacteriana .....	13

1.14	Pruebas Fenotípicas .....	13
1.15	Características microscópicas .....	14
1.16	Características macroscópicas.....	14

## CAPÍTULO II

2	MARCO METODOLÓGICO .....	17
2.1	Tipo y diseño de la investigación .....	17
2.2	Diseño de la investigación .....	17
2.3	Etapas de la investigación .....	17
2.3.1	<i>Localización del Estudio</i> .....	17
2.3.2	<i>Población de estudio</i> .....	18
2.3.3	<i>Tamaño de la muestra</i> .....	18
2.3.4	<i>Método de muestreo</i> .....	19
2.4	Toma de la muestra:.....	20
2.5	Aislamiento .....	20
2.6	Preparación del medio de cultivo .....	20
2.7	Recuento en placa de bacterias.....	21
2.8	Aislamiento de Colonias.....	21
2.9	Caracterización .....	22
2.10	Caracterización macroscópica.....	22
2.11	Caracterización microscópica .....	23
2.12	Tinción Gram: .....	23
2.13	Pruebas de tolerancia al mercurio: .....	25



## CAPÍTULO III

<b>3</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Aislamiento de colonias bacterianas .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.1</b>	<i>Siembra y estimación del número de UFC/ mL.....</i>	<i>27</i>
<b>3.1.2</b>	<i>Aislamiento de Colonias:.....</i>	<i>28</i>
<b>3.2</b>	<b>Caracterización de los clones bacterianos .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.1</b>	<i>Tinción Gram .....</i>	<i>29</i>
<b>3.3</b>	<b>Caracterización macroscópica.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.1</b>	<i>Forma .....</i>	<i>31</i>
<b>3.3.2</b>	<i>Borde .....</i>	<i>33</i>
<b>3.3.3</b>	<i>Superficie.....</i>	<i>35</i>
<b>3.4</b>	<b>Evaluación de la resistencia bacteriana al mercurio.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.1</b>	<i>Evaluación de resistencia de los clones aislados en medio PCA con Hg .....</i>	<i>39</i>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>49</b>
	<b>GLOSARIO</b>	
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b>	Límites de descarga industrial a un cuerpo de agua dulce .....	7
<b>Tabla 1-2:</b>	Características macroscópicas .....	14
<b>Tabla 2-1:</b>	Contenido de Agar PCA .....	21
<b>Tabla 2-2:</b>	Aislamiento de Colonias .....	22
<b>Tabla 2-3:</b>	Evaluación de concentraciones de cada prueba de tolerancia al Mercurio .....	26
<b>Tabla 3-1:</b>	Estimación del número de UFC/L.....	27
<b>Tabla 3-2:</b>	Clones Seleccionados.....	28
<b>Tabla 3-3:</b>	Resultados de la Tinción Gram de los clones seleccionados de cada muestra.....	29
<b>Tabla 3-4:</b>	Resultados de la resistencia a 25 ug/mL de Mercurio .....	39
<b>Tabla 3-5:</b>	Resultados de la resistencia a 50 ug/mL de Mercurio .....	40
<b>Tabla 3-6:</b>	Resultados de la resistencia a 100 ug/mL de Mercurio .....	41
<b>Tabla 3-7:</b>	Resultados de la resistencia a 200 ug/mL de Mercurio. ....	42
<b>Tabla 3-8:</b>	Resultados de la resistencia a 500 ug/mL de Mercurio .....	44
<b>Tabla 3-9:</b>	Resultados de la resistencia a 750 ug/mL de Mercurio .....	44
<b>Tabla 3-10:</b>	Resultados de la resistencia a 1000 ug/mL de Mercurio .....	45
<b>Tabla 3-11:</b>	Resultados de la resistencia a 1500 ug/mL de Mercurio .....	46

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b>	Morfología: .....	11
<b>Figura 1-2:</b>	Diagrama de la pared bacteriana. Grampositiva y Gramnegativa .....	12
<b>Figura 1-3:</b>	Diagrama de la síntesis del peptidoglicano.....	13
<b>Figura 1-4:</b>	Forma de las colonias .....	15
<b>Figura 1-5:</b>	<i>Bordes de las colonias</i> .....	15
<b>Figura 1-6:</b>	Elevación de las colonias .....	16
<b>Figura 2-1:</b>	Mapa de la cuenca del Río Gala .....	18
<b>Figura 2-2:</b>	Mapa de la zona de estudio .....	19
<b>Figura 2-3:</b>	Muestreo punto 2, Río Chico.....	19
<b>Figura 2-4:</b>	Muestreo punto 3, aguas abajo San Rafael .....	20
<b>Figura 2-5:</b>	Clones de la muestra Chico 2 a 1500 ug/l de Hg. ....	22
<b>Figura 2-6:</b>	Colorantes: Cristal violeta, Lugol, Alcohol cetona y Safranina .....	23
<b>Figura 2-7:</b>	Caracterización según su forma; Bacilos Gram + .....	24
<b>Figura 2-8:</b>	Caracterización según su forma; Bacilos Gram -.....	25
<b>Figura 2-9:</b>	Pruebas de tolerancia al mercurio, en cámara de flujo laminar .....	26

## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 3-1:</b>	Porcentaje de clones bacterianos Gram +y Gram - de muestra del punto Gala .....	30
<b>Gráfico 3-2:</b>	Porcentaje de clones bacterianos Gram+ y Gram - de muestra del punto Chico .....	30
<b>Gráfico 3-3:</b>	Porcentaje de clones bacterianos Gram+ y Gram - de muestra San Rafael .....	31
<b>Gráfico 3-4:</b>	Forma macroscópica de los clones de la muestra Gala .....	32
<b>Gráfico 3-5:</b>	Forma macroscópica de los clones de la muestra Chico .....	32
<b>Gráfico 3-6:</b>	Forma macroscópica de los clones de la muestra San Rafael.....	33
<b>Gráfico 3-7:</b>	Tipo de borde de los clones de la muestra Gala .....	34
<b>Gráfico 3-8:</b>	Tipo de borde de los clones de la muestra Chico.....	34
<b>Gráfico 3-9:</b>	Tipo de borde de los clones de la muestra Chico .....	34
<b>Gráfico 3-10:</b>	Tipo de borde de los clones de la muestra San Rafael .....	35
<b>Gráfico 3-11:</b>	Tipo de superficie de los clones de la muestra Gala.....	35
<b>Gráfico 3-12:</b>	Tipo de superficie de los clones de la muestra Chico.....	36
<b>Gráfico 3-13:</b>	Tipo de superficie de los clones de la muestra San Rafael .....	36
<b>Gráfico 3-14:</b>	Tipo de color de los clones de la muestra Gala .....	37
<b>Gráfico 3-15:</b>	Tipo de color de los clones de la muestra Gala.....	38
<b>Gráfico 3-16:</b>	Tipo de color de los clones de la muestra San Rafael .....	38

## **INDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** AISLAMIENTO

**ANEXO B:** REALIZACIÓN DE TINCIÓN GRAM

**ANEXO C:** CARACTERIZACIÓN SEGÚN SU FORMA RIO GALA

**ANEXO D:** REPIQUES DE LOS CLONES A UNA CONCENTRACIÓN DE HG

**ANEXO E:** CRECIMIENTO BACTERIANO A 25 PPM DE ACETATO DE MERCURIO

**ANEXO F:** CRECIMIENTO BACTERIANO A 100PPM DE ACETATO DE MERCURIO

**ANEXO G:** CRECIMIENTO BACTERIANO A 750 PPM DE ACETATO DE MERCURIO

**ANEXO H:** CRECIMIENTO BACTERIANO A 1500 PPM DE ACETATO DE MERCURIO

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue aislar microorganismos de la microcuenca del Río Gala del Cantón Camilo Ponce Enríquez en la provincia del Azuay, para evaluar su resistencia al mercurio. Se tomó 3 muestras por triplicado en tres diferentes puntos de la microcuenca geo-referenciados por un Sistema de Posicionamiento Global (GPS) marca Garmin: muestra 1. Lat. -2.987172, Long. -79.725952; muestra 2. Lat. -2.979343, Long -79.725684; muestra 3. Lat. -2.969681, Long. -79.771900. Las bacterias fueron inoculadas por la técnica de siembra en superficie en dos tipos de medios diferentes: Medio sin presión selectiva con agua destilada estéril (PCA-) y medio con presión selectiva (PCA+) suplementado con Acetato de Mercurio 25 ug/mL, se procedió al conteo y aislamiento de microorganismos representativos, se seleccionaron 170 clones las cuales fueron adaptadas y estabilizadas. Se realizó la Tinción Gram donde se evidenció la predominancia de Bacilos Gram negativos en el punto Gal(Gala) con un 56%, 74% en el punto Chi(Chico) y 67% en el punto SR(San Rafael). Estos clones fueron sometidos a pruebas de resistencia al mercurio en concentraciones crecientes (25, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500) ug/mL, dando como resultado varios niveles de resistencia, 7 clones en el punto Gal, 17 en el punto Chi y 9 clones en el punto SR dando un total de 33 clones que resistieron a 1500 ug/mL de Acetato de Mercurio. Mediante la caracterización y las pruebas de resistencia realizadas se pudo determinar por bibliografía que el género *Pseudomonas* son las que predominan en zonas con altas concentraciones de metales pesados.

**Palabras claves:** <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <MICROORGANISMOS>, <EXTREMOFILO>, <METALES PESADOS>, <MERCURIO>, <ACTIVIDAD MINERA>.



11-1-2021

0548-DBRAI-UPT-2021

## SUMMARY

The purpose of the research was to separate the microorganisms of Gala river micro-basin located in Camilo Ponce Enriquez County, Azuay Province in order to evaluate the mercury resistance. It was necessary to take three samples in triplicate from three different points of the micro-basin, the ones which were geo-referenced with the use of a Garmin brand Global Positioning System (GPS): sample 1. Lat. -2.987172, long.-79.725952; sample 2. Lat. -2.979343, Long -79.725684; sample 3. Lat. -2.969681, Long. -79.771900. Bacteria were inoculated by using the surface seeding technique in two different types of media: Medium without selection pressure with sterile distilled water (PCA-) and medium with selection pressure (PCA+) supplemented with mercury acetate 25 ug/mL; then, it was necessary to continue with the counting and isolation of representative microorganisms, 170 clones were selected, adapted and stabilized. Gram Staining was carried out, in which it was possible to evidence the predominance of Gram-negative bacilli in the Gal (Gala) point with a 56%, 74% in the Chi (Chico) point and 67% in the SR (San Rafael) point. These clones were put under mercury-resistance tests with increasing concentrations (25, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500) ug/mL, resulting in different resistance levels, 7 clones in the Gal point, 17 in the Chi point, and 9 in the SR point resulting a total 33 clones which presented a mercury acetate resistance of 1500 ug/mL. By means of the characterization and resistance tests carried out as well as bibliography, it was possible to determine that Pseudomonas is the predominant type in areas with high concentrations of heavy metals.

**Keywords:** <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <MICROORGANISMS>, <EXTREMOPHILE>, <HEAVY METALS>, <MERCURY>, <MINING>.

## **INTRODUCCIÓN**

Las actividades mineras en la zona sur del país han sido monitoreadas constantemente, debido a la contaminación que estas producen, principalmente en áreas con antecedentes mineros como Ponce Enríquez, Nambija, Portovelo, Zaruma, Santa Rosa y otros, son de importancia económica que genera en la población residente y en sus alrededores (Duran, 2008).

La contaminación del medio ambiente por actividades mineras causa el deterioro de la flora y fauna de los ríos del Ecuador. El Cantón Ponce Enríquez en la provincia del Azuay posee los ríos más contaminados del sur del país debido a la actividad minera que se realiza en esa zona, la cuenca del Rio Gala tiene un total de 21772 hectáreas, y está conformada por dos efluentes principales: Gala y Chico. El Rio Gala posee altas concentraciones de metales pesados como el mercurio y arsénico (Llvisaca & Vargas, 2011).

Al mercurio se lo constituye como uno de los metales más tóxicos ya que afecta a los ecosistemas y pone en riesgo a la salud humana. Se ha hecho estudios los cuales confirman, que a nivel mundial las altas concentraciones de mercurio generan efectos adversos a la salud, tales como desordenes en el sistema nervioso central, cardiovascular, inmune y renal (Pérez et al., 2016). En plantas el Hg afecta el sistema de defensa por antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (GSH) y los tioles no proteínicos (NPSH), la exposición también afecta a la fotosíntesis, en la velocidad de la transpiración e incorporación de agua y la síntesis de clorofila (Azevedo & Rodriguez, 2012).

Aunque el mercurio es toxico tanto para eucariotas como para procariotas algunos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia al metal. De estos, uno puede enfatizar las bombas de flujo, quelación de polímeros, precipitación, metilación, y reducción enzimática relacionada con el operón mer. Bacterias que poseen el mer, los operones pueden reducir enzimáticamente el mercurio (II) a la forma volátil y menos toxica de mercurio Hg (0) (Giovannella et al., 2015). Estos mecanismos son muy importantes para la retención de compuestos metálicos solubles en la columna de agua. Presenta como una alternativa de remover metales de la fase acuosa.



## **ENUNCIADO DEL PROBLEMA**

El Río Chico recibe una considerable contaminación por las actividades mineras en el sitio la Fauna y San Gerardo. (Armijos, 2009).

En el Río Gala aguas abajo (Recinto San Rafael), se realizaban actividades turísticas y de pesca, estas aguas causan enfermedades a su población, en el 2007 estudios realizados por el Medio Ambiente del Municipio de Guayaquil, determinaron que las aguas del Río Gala y Chico se encuentran contaminadas con mercurio y arsénico, llegando a niveles de 24,14 y 12,5 respectivamente, sobre los límites permitidos (0,005 mg/L Hg y 0,2 mg/L As) (Fieweger, 2008). Uno de los principales contaminantes es el mercurio, el cual es un metal pesado altamente tóxico, que amenaza a la salud humana y al medioambiente. Se encuentra en la naturaleza en formas inorgánicas y orgánicas siendo todas tóxicas, especialmente la última, debido a su alta liposolubilidad, lo que facilita su biomagnificación en la cadena trófica. (Anguisaca & Castañeda, 2016)

El recinto Shumiral, es un territorio donde se da las principales actividades mineras, la población se encuentra expuesta a la contaminación del medio ambiente con los químicos (Cianuro, mercurio, ácido sulfúrico, ácido nítrico, nitrato de amonio, gasolina, diésel y acetileno) (Conant & Fadem, 2011). Los compuestos mercuriales son neurotóxicos y carcinogénicos.

Los residuos provenientes de la actividad minera están expuestos a biolixiviación natural (solubilización de metales por microorganismos) no controlada produciendo un lixiviado fuertemente ácido y contaminar bruscamente el ambiente (Anguisaca & Castañeda, 2016).

## **JUSTIFICACIÓN**

En altas concentraciones los metales pesados son tóxicos para la salud de las personas así como también para los ecosistemas, el aprovechamiento de ciertas características de algunas bacterias constituye una alternativa amigable con el ambiente. (Rodríguez, 2017)

El presente trabajo de investigación es de suma importancia, ya que se pretende estudiar bacterias resistentes a los metales pesados, lo que se requiere analizar de manera muy minuciosa dichos microorganismos que sean capaces de resistir a metales pesados, para ser utilizados como productores de energía en celdas de combustible microbianas en futuras investigaciones.

Debido a la demanda de microorganismos, existen los que son resistentes y los tolerantes a los metales, el mecanismo de desoxidación codificados genéticamente, constituidos o inducidos por la presencia del metal corresponde a los resistentes, mientras que los tolerantes son indiferentes ante la presencia o ausencia del elemento, por lo tanto, estos microorganismos son esenciales para la captura de metales en sitios contaminados en este caso por la actividad minera (Anguisaca & Castañeda, 2016).

Para poder cumplir con los objetivos planteados se cuenta con el aporte del Grupo de Energías alternativas y Ambiente (GEAA) de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, para la logística y recolección de muestras, con las instalaciones del Laboratorio de Análisis Químicos y Bacteriológicos de la Facultad.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Identificar bacterias resistentes al mercurio aisladas de la microcuenca del Río Gala.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar bacterias resistentes al mercurio presentes en la microcuenca del Río Gala.
- Realizar pruebas de sensibilidad de las bacterias a diferentes concentraciones de Acetato de mercurio.
- Caracterizar las colonias aisladas resistentes al Acetato de mercurio.

## CAPITULO I

### 1 MARCO TEORICO REFERENCIAL

#### 1.1 Antecedentes

Un estudio realizado en el 2011, se caracterizó bacterias existentes en el Río Gala usando la técnica molecular *PCR-DGGE*, cuenta con la presencia de microorganismos con capacidad metalofijadora, estas presentan un rango de resistencia a metales en este caso fue el mercurio.

La solubilidad microbiana de los metales en los lixiviados, son usados en la actividad minera. Este proceso implementa microorganismos quimiolitótrofos, pertenecientes a los extremófilo, gracias a presencia en altas concentraciones de acidez (pH 1 a 3.0) y a metales altamente tóxicos. (Llvisaca & Vargas, 2011, pp. 1-7)

La investigación se basó en la colección de muestras de agua contaminada, las bacterias obtenidas fueron caracterizadas y aisladas, sometiéndolas a pruebas de resistencia al mercurio a concentraciones diferentes, mediante la técnica de *PCR-DGEE*, en cual se sustrajo el material genético. (Llvisaca & Vargas, 2011, pp. 1-7) La DGEE es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos, para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturalizantes de ADN se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. (Fernandez M. , 2014, p. 33)

El género *Pseudomona* se encuentra en sitios donde existen altas concentraciones de mercurio, por lo tanto, demostraron que las técnicas moleculares *PCR-DGGE* determinan el número y especie presentes en las muestras específicamente.

En Cartagena de Indias, (Acevedo & Severiche, 2013) se identificaron bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos marinos de la playa, mediante el aislamiento, purificación y preservación de bacterias marinas resistentes a antibióticos. La investigación constituye a la ejecución para el monitoreo de la presencia de bacterias resistentes a compuestos mercuriales y a antibióticos.

Obtuvieron un total de nueve géneros de bacterias marinas resistentes al di-bromuro-mercurio, de las cuales una bacteria Gram positiva (*Staphylococcus sp*) y ocho corresponden a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Enteribacter sp*, *Serratia sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Salmonella sp*, *Acinetobacter sp*). El análisis bioquímico fue realizado mediante kit BD Crystal™ para bacterias Gram negativas no fermentadores aerobias, así como también para las Gram positivas (Acevedo & Severiche, 2013).

En la Universidad Politécnica Salesiana, han realizado investigaciones correspondientes a la identificación de consorcios bacterianos que tengan resistencia a metales pesados, como es el caso de (Anguisaca & Castañeda, 2016), los cuales identificaron molecularmente consorcios bacterianos aislados de aguas residuales de industrias hidrocarburíferas en la provincia de Esmeraldas, realizaron pruebas de sensibilidad a metales de acuerdo a los límites permisibles de descarga estipulados por el TULSMA: Cromo (2,25 y 50ppm) y plomo (2, 10 y 20ppm) Cadmio (0,2 y 20 ppm) (TULSMA, 2012). Aislaron cinco consorcios, tres presentaron un porcentaje de remoción significativo: ReO4Pb2(1)A (22,49%), ReO6Cr1(2)A (21%) y ReO3As1 (20,78%), dentro de los microorganismos con forma de bacilo Gram negativos fueron *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*. En cuanto a cocos Gram positivos constituyen *Staphylococcus*, *Planococcus*, *Stomacoccus* y *Micrococcus*. Para la extracción y purificación del ADN genómico de bacterias utilizaron un método bioquímico utilizando dodecilsulfato sódico para la lisis celular y se trataron la muestra con proteinasa K (Anguisaca & Castañeda, 2016, pp. 20-50).

## **1.2 Aguas Residuales**

Aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos industriales, comerciales, servicios agrícolas, pecuarios, domésticos, etc, que hayan sufrido degradación en su calidad original. (TULSMA, 2012, p. 240)

## **1.3 Bioprospección**

Se encamina a la explotación sistemática, y a la biodiversidad sostenible, cuya finalidad es identificar y obtener fuentes de componentes naturales y microorganismos los cuales puedan ser aprovechados en biotecnología a nivel industrial y ambiental. (Serrano, 2014)

#### 1.4 Estudio bioprospectivo en Ambientes extremos

El estudio bioprospectivo se centra en ambientes naturales con poca exploración, presentando condiciones extremas, su objetivo principal es el hallazgo de genes, proteínas, microorganismos, compuestos químicos y sustancias para el beneficio del ser humano. (CIMERA, 2013, p. 1-5)

#### 1.5 Metales Pesados

Metales de número atómico elevado, como cadmio, cobre, cromo, hierro, mercurio, manganeso, níquel, plomo y zinc, entre otros, que son tóxicos en concentraciones reducidas y tienden a la bioacumulación. (TULSMA, 2012)

**Tabla 1-1** Límites de descarga industrial a un cuerpo de agua dulce

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
<b>Aluminio</b>	<b>Al</b>	mg/l	5,0
<b>Arsénico total</b>	<b>As</b>	mg/l	0,1
<b>Bario</b>	<b>Ba</b>	mg/l	2,0
<b>Boro total</b>	<b>B</b>	mg/l	2,0
<b>Cianuro total</b>	<b>CN<sup>-</sup></b>	mg/l	1,0
<b>Cobre</b>	<b>Cu</b>	mg/l	1,0
<b>Cobalto</b>	<b>Co</b>	mg/l	0,5
<b>Cromo</b>	<b>Cr<sup>+6</sup></b>	mg/l	0,5
<b>Estaño</b>	<b>Sn</b>	mg/l	0,5
<b>Hierro total</b>	<b>Fe</b>	mg/l	10,0
<b>Manganeso total</b>	<b>Mn</b>	mg/l	2,0
<b>Mercurio total</b>	<b>Hg</b>	mg/l	0,005
<b>Níquel</b>	<b>Ni</b>	mg/l	2,0
<b>Plata</b>	<b>Ag</b>	mg/l	0,1
<b>Plomo</b>	<b>Pb</b>	mg/l	0,2
<b>Selenio</b>	<b>Se</b>	mg/l	0,1
<b>Zinc</b>	<b>Zn</b>	mg/l	5,0

Fuente: (TULSMA, 2012)

Realizado por: Naranjo, J. 2020

Estos elementos químicos representan una amenaza biológica ya que no pueden ser degradados cuando se cambia el estado de oxidación, como ocurre con los compuestos orgánicos tóxicos.

Ciertos metales de transición como el cobalto, cobre, níquel y zinc traza ( $10^{-1}$  mml/L), son esenciales para algunos procesos celulares, ya que ejercen funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, actúan como micronutrientes o cofactores enzimáticos, a concentraciones superiores ejercen un efecto citotóxico, por lo que el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de ellos constituye un factor importante para lograr la homeostasis celular. (Marrero & Coto, 2010)

## 1.6 Mercurio (Hg)

Es de color plateado, a temperatura ambiente se lo encuentra también en estado líquido. A concentraciones pequeñas de exposición al mercurio puede causar graves daños a la salud, dañando principalmente al sistema nervioso, neurológico, al aparato digestivo, riñones, los ojos, y pulmones. (OMS, 2016)

Naturalmente el mercurio se encuentra en el ambiente de varias formas y de forma, se clasifican en tres tipos:

- *Mercurio metálico*: Metal de color brillante blanco-plateado, es utilizado en los termómetros en su forma líquida, así como también en ciertos interruptores eléctricos, se producen cuando el mercurio se combina con cloro, azufre u oxígeno.
- *Mercurio inorgánico*: Los compuestos de mercurio inorgánico, llamados sales de mercurio.
- *Mercurio orgánico*: Llamados también organomercuriales, se forman mercurio con carbono. (Lema, 2019, p. 18)

El mercurio al ser usado en la minería puede llegar directamente a las fuentes hídricas especialmente como mercurio elemental, formando complejos de alta biodisponibilidad siendo biometilados, muy nocivo para la salud. (Días et al., 2019)

El mercurio se encuentra en el ambiente en diferentes especies químicas, con diferente solubilidad, reactividad y toxicidad, causando diferentes impactos en los ecosistemas. El mercurio es liberado al medio ambiente por agentes naturales y fuentes antropogénicas a través de combinaciones complejas que implican reacciones químicas, físicas y biológicas.

Las fuentes antropogénicas más comunes de mercurio están relacionadas con actividades industriales petroquímicas y de equipos (medición, tintas y gaseosas de cloro), además de su uso en la extracción de oro y amalgamas. (Giovanella et al., 2015)

## 1.7 Resistencia de Bacterias a metales pesados

Varias células contienen dos tipos de sistemas de captura de cationes de metales pesados. Uno es inespecífico y rápido, expresado y utilizado por variedad de sustratos. Estos sistemas son generalmente dependientes del gradiente quimiosmótico que existe a través de la membrana citoplasmática bacteriana. El segundo tipo de sistema de captura posee una gran especificidad de sustrato, es más lento y generalmente utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía en adición al gradiente quimiosmótico. Cuando el gen se codifica el sistema transportador rápido e inespecífico muta, entonces se obtienen mutantes que son tolerantes a metales. (Marrero & Coto, 2010)

El mecanismo de resistencia a metales pesados, se lo ha estudiado en *E. Coli*, en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Se han realizado estudios en muestras aisladas de lagos, plantas de tratamiento, efluentes industriales. La *Pseudomona aeruginosa*, es una de las bacterias más usada en bioensayos, ya que detecta concentraciones bajas de metales pesados en agua, a su presencia mayoritaria en aguas contaminadas, considerada también como un indicador para riesgos en la salud.

## 1.8 Interacciones metal-microorganismo

Existen microorganismos que son capaces de captar metales en sitios contaminados; hay microorganismos tolerantes, presentan mecanismos de detoxificación genéticamente codificados incluidos por la presencia del metal, por lo que son muy importantes.

Mecanismos de tolerancia a los metales de las bacterias:

- Neutralizan su toxicidad. Por efecto de componentes celulares que capturan los iones metálicos.
- Encimas que logran modificar el estado redox de los metales o metaloides, transformándolos en estructuras menos tóxicas.



- Transportadores localizados en la membrana los cuales son expulsados por las especies tóxicas desde el citoplasma celular. (Lema, 2019, pp 20-21)

## 1.9 Bacterias

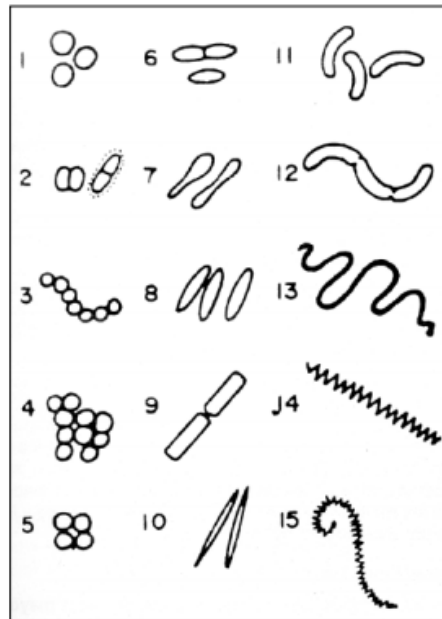
Microorganismos procariotas muy sencilla en su organización, su reproducción es por fisión binaria (difusión simple). Están constituidos por información genética, sistemas de producción de energía y sistemas bioinformáticos los cuales son necesarios para el crecimiento y reproducción (Pirez, 1998) cuya célula consta de:

- Citoplasma: En su zona central se encuentra el nucleoide que contiene la mayor parte de ADN bacteriano, y en algunas bacterias aparecen fragmentos circulares de ADN con información genética.
- Membrana Citoplasmática: Está constituida por mesosomas, donde se encuentran enzimas que intervienen en la síntesis de ATP.
- Flagelos: Muchas bacterias los tienen implantados en la membrana mediante un corpúsculo basal. Las fimbrias y los pili, sirven como pelos sexuales para el paso de ADN de una célula a otra.
- Ribosomas y ARN para la síntesis de proteínas. (Bailón et al., 2003)

## 1.10 Forma:

Las bacterias se constituyen con una morfología definida la cual está determinada por su pared rígida. Pueden presentarse como ovaladas, esféricas, denominándose cocos. Por otra parte si la forma es cilíndrica se denominan bacilos o bastones. Las células bacterianas pueden permanecer unidas en grupos después de que se hayan dividido, pero conservando su independencia una célula de otra. Cocos o bacilos se agrupan en cadenas, denominándose diplococos o estreptococos.

Los bacilos pueden ser muy cortos, denominados coco bacilos. Los extremos pueden ser rectos o redondeados, pueden estar aislados. (Pirez, 1998)



**Figura 1-1** Morfología: 1. Cocos; 2. Diplococos; 3. Cocos en cadena; tétradas; 6. Cocobacilos; 7. Bacilos; 8. Bacilos bordes redondeados; 9. Bacilos bordes rectos; 10. Bacilos fusiformes; 11, 12 bacilos curvos; 13

Fuente: (Pirez, 1998)

### 1.11 Estructura de la pared celular de las bacterias grampositivas

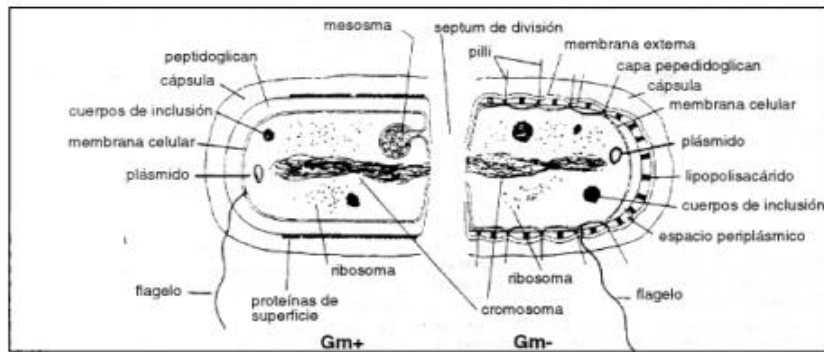
La pared celular está constituida principalmente por peptidoglicano la cual es determinante de que estas bacterias retengan el cristal violeta de la coloración de Gram. Estas células contienen también una gran cantidad de ácido teicoico: polisacáridos que se unen al ácido N-acetilmurámico o los lípidos de la membrana plasmática.

Tanto los ácidos teicoicos como los lipoteicos, tienen la función de estabilizar la pared celular. Los ácidos teicoicos tienen un rol en la virulencia de estos microorganismos, porque actúan como antígenos de superficie que se unen a receptores específicos en las células del huésped. (Pirez, 1998)

## 1.12 Estructura de la pared celular de las bacterias gramnegativas

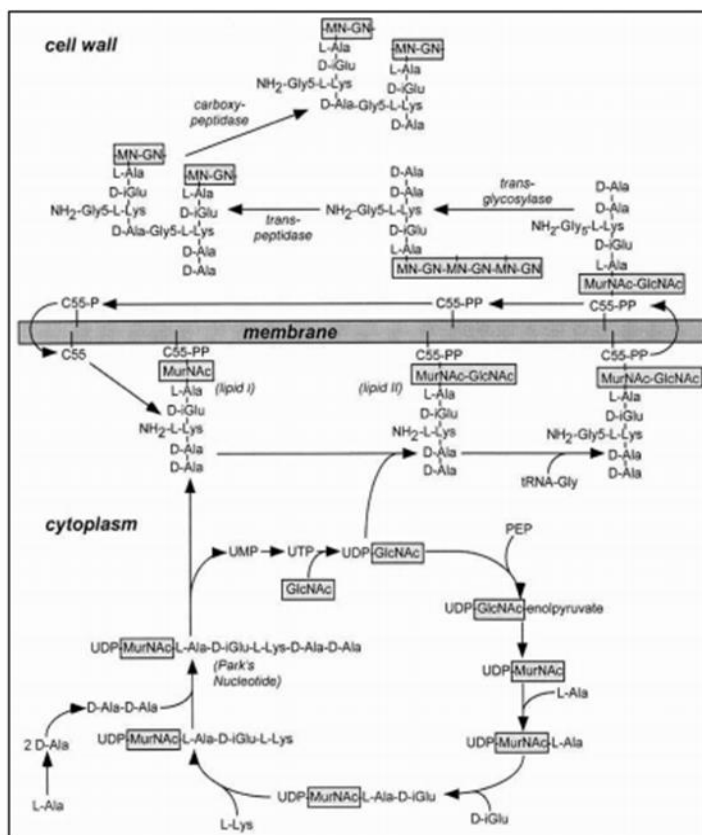
En el microscopio se observan tres zonas: la membrana plasmática. El espacio periplasmático la cual incluye una fina capa de peptidoglicano y la membrana externa. Esta última, exclusiva de las bacterias gramnegativas, es una bicapa lipídica que difiere de otras membranas por su capa externa, que está constituida por una molécula anfipática: el lipopolisacárido o endotoxina y la membrana externa contiene fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano.

Una de las funciones importantes de la membrana externa es servir como barrera protectora. Evita o disminuye la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían disminuir o lesionar la bacteria. (Pirez, 1998)



**Figura 1-2 Diagrama de la pared bacteriana.** Grampositiva a la derecha y Gramnegativa a la izquierda.

Fuente: (Pirez, 1998)



**Figura 1-3** Diagrama de la síntesis del peptidoglicano

Fuente (Pirez, 1998)

### 1.13 Identificación Bacteriana

Los microorganismos en la naturaleza se encuentran formando poblaciones mixtas de gran variedad y tipos. El desarrollo de la microbiología se ha logrado mediante el estudio de especies aisladas en medios con otra forma de vida contaminante. (Bailón et al., 2003)

La identificación consiste en asignar un microorganismo en su determinado taxón de acuerdo con la clasificación establecida, de acuerdo a sus características genóticas y fenotípicas.

Puede realizarse por métodos tradicionales, por la observación de las características fenotípicas, son de bajo costo siendo así una técnica viable. (Anguisaca & Castañeda, 2016: pp 20-50)

### 1.14 Pruebas Fenotípicas

La identificación fenotípica bacteriana se basa en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas.

El cultivo cuando es factible continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación. (Fernandez et al., 2010)

### 1.15 Características microscópicas

El estudio microscópico en fresco y tras tinciones revela forma, como se agrupan, su tamaño, la estructura de las células. Las tinciones son el primer paso, y ocasionalmente el único, para la identificación bacteriana.

La tinción Gram es, a menudo, la única herramienta que sirve para realizar diagnósticos provisionales, en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta el tipo de muestra y el diagnóstico de procesos infecciosos. (Fernandez et al.,2010)

### 1.16 Características macroscópicas

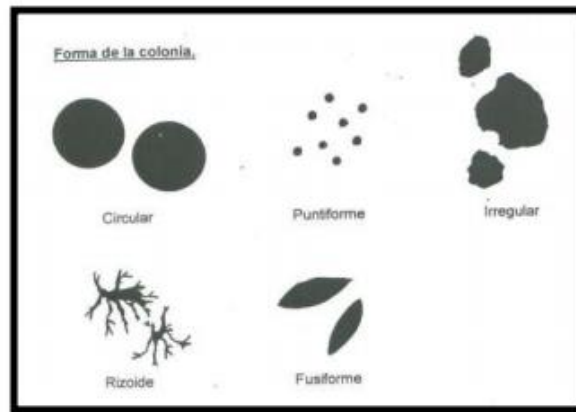
La morfología de las colonias es primordial en la identificación preliminar así como también la diferenciación de los microorganismos. Para la poder observar la morfología es preferible examinar colonias de cultivos frescos que han crecido en medios no selectivos. En este paso de identificación el aislamiento de bacterias en cultivo puro es muy importante ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y proceder de una única célula. Las colonias de una sola especie que crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de forma, tamaño, consistencia y en ocasiones por su color. (Fernandez et al., 2010)

**Tabla 1-2** Características macroscópicas

Características		Detalle	Clasificación
		Forma	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Puntiforme</li> <li>- Circular</li> <li>- Irregular</li> </ul>

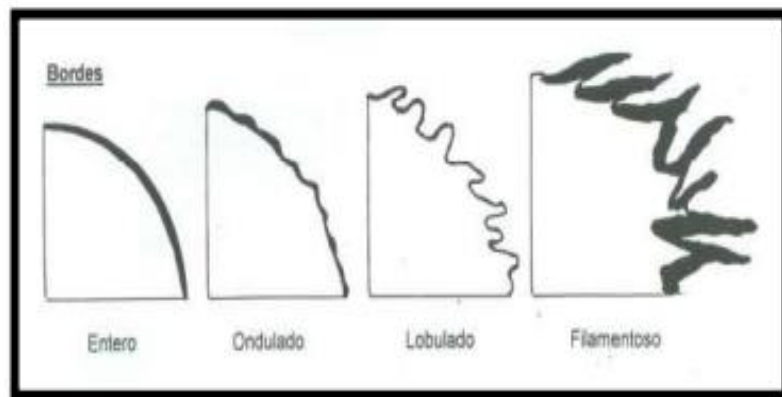
<b>Morfología de la colonia</b>			- Rizoides
		Borde	- Entero - Ondulado - Lobulado - Filamentoso
		Superficie	- Lisa/Rugosa - Mate/Rugosa - Mate/Brillante - Seca/Cremosa - Invasiva/Superficial
		Elevación	- Plana - Convexa - Elevada - Umbiculada
		Consistencia	- Cremosa - Membranosa - Viscosa
		Apariencia	- Opacidad Transparente, opaca, translúcida - Pigmentación

Realizado por: Naranjo, J. 2020



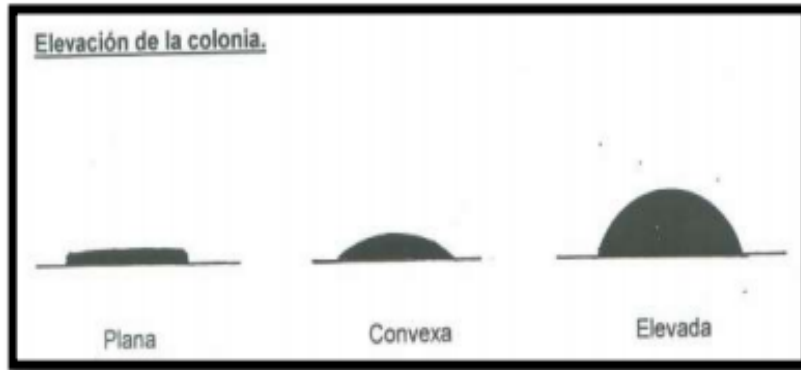
**Figura 1-4** Forma de las colonias

Fuente (Pirez, 1998)



**Figura 1-5** Bordes de las colonias

Fuente (Pirez, 1998)



**Figura 1-6** Elevación de las colonias

**Fuente:** (Pirez, 1998)

## CAPÍTULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Tipo y diseño de la investigación

Es de tipo Experimental- Descriptiva, debido a que representa a un estudio del que no presenta mucha información y poco explorado en el Ecuador. Cuya finalidad es indagar y encontrar nueva información para así determinar el grado de resistencia de los microorganismos a distintas concentraciones de Acetato de Mercurio.

#### 2.2 Diseño de la investigación

Se trata de un diseño experimental ya que el factor de crecimiento microbiano depende de la temperatura, se maneja la variable independiente para determinar el efecto de las distintas concentraciones de Acetato de Mercurio a las cuales fueron sometidas las bacterias.

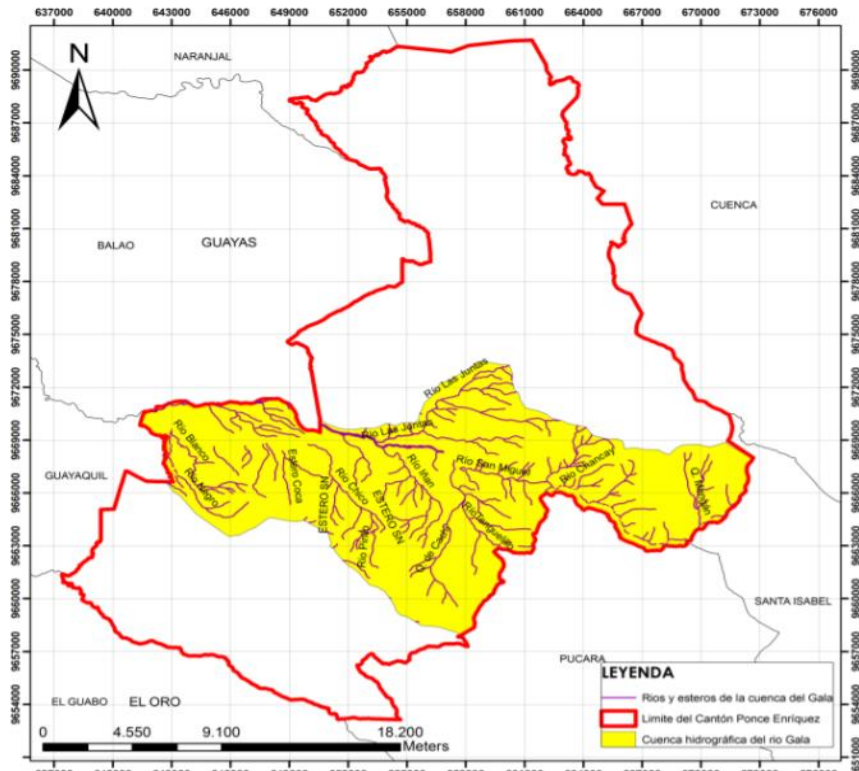
#### 2.3 Etapas de la investigación

##### 2.3.1 *Localización del Estudio*

La cuenca del Río Gala se encuentra en la zona del recinto Shumiral del Cantón Ponce Enríquez, en la provincia del Azuay. En las estribaciones sur occidente del Ecuador.

La cuenca del Río Gala tiene un total de 21772 hectáreas y está conformada por dos afluentes principales: Gala y Chico. Tienen sus orígenes en la Cordillera Occidental, con curso en dirección Este-Oeste, en las coordenadas 679600 E – 9663850 N el Río Gala y 653750 E- 3661525 N el Río Chico. El nacimiento de estos se da a una altitud de 3880 y 2000msnm. El principal efluente del Río Gala es el Río Chico, quien se une a su tributario, desde el sudeste, cuyo caudal es aproximadamente la décima parte del Río Gala y su confluencia está ubicada al oeste de la carretera Panamericana Machala-Guayaquil a una longitud aproximada de 42msnm. La altura va desde los 2000 a 30msnm, temperatura 23°C promedio, precipitación promedio de 1455,2mm y humedad relativa promedio de 90%. (Armijos, 2009, pp. 1-45)





**Figura 2-1** Mapa de la cuenca del Río Gala

**Fuente:** Equipo Técnico de GAD Municipal de C.P.E, 2015

### 2.3.2 Población de estudio

Bacterias resistentes al mercurio presentes en el agua contaminada por la actividad minera de la microcuenca del Río Gala en el Cantón Ponce Enríquez.

### 2.3.3 Tamaño de la muestra

Se toman muestras por triplicado de agua en tres puntos de la microcuenca del Río Gala, georreferenciados por un sistema de posicionamiento global (GPS) marca Garmin: muestra 1. Lat. -2.987172, Long. -79.725952; muestra 2. Lat. -2.979343, Long. -79.725684; muestra 3. Lat. -2.969681, Long. -79.771900.



**Figura 2-2** Mapa de la zona de estudio

**Fuente:** GEAA-ESPOCH, 2019

### **2.3.4** *Método de muestreo*

Se aplicó el método de muestreo simple, recogiendo la muestra en cada punto por triplicado. Este tipo de muestreo es muy utilizado para análisis microbiológicos, el cual consiste en recoger la muestra en un lugar y momento determinado. (Agrocalidad, 2015)



**Figura 2-3** Muestreo punto 2, Río Chico

**Fuente:** Naranjo, J. 2020



**Figura 2-4** Muestreo punto 3, Río Gala aguas abajo San Rafael

Fuente: Naranjo, J. 2020

#### **2.4 Toma de la muestra:**

Se recolectó muestras por triplicado de agua de los puntos de muestreo en el Río Gala y Chico localizados en el límite del cantón Camilo Ponce Enríquez, Guayaquil y Balao. Las muestras se envasaron en frascos de recolección de orina, se enjuaga tres veces los envases con agua de la muestra, se recolectó la muestra de agua hasta llenar el frasco, posteriormente se tapa y se sella con parafilm para evitar posibles contaminaciones, se inmediato se realiza la respectiva etiqueta.

Con un multiparámetro Hach Hd40d se realiza las mediciones de los parámetros físicos *in situ*; pH, temperatura, oxígeno disuelto y conductividad.

Una vez recolectadas las muestras se las conservara dentro de un cooler, para ser transportadas a la ESPOCH, Laboratorio de Análisis Químicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias.

#### **2.5 Aislamiento**

Para el aislamiento y la respectiva selección de colonias bacterianas a partir de las distintas muestras tomadas del agua de la microcuenca del Río Gala, se utilizó agar PCA (Plate Count Agar)

#### **2.6 Preparación del medio de cultivo:**

Se utiliza PCA, el cual es un medio utilizado para la enumeración de bacterias aeróbicas en aguas, aguas residuales y alimentos. Se mesclarán 360 mL del mismo con acetato de Hg como agente de precisión selectiva.

**Tabla 2-1** Contenido de Agar PCA

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Triptona	5,00 g.
Extracto de levadura	2,50 g.
Glucosa	1,00 g.
Agar-Agar	15,00 g.
pH final	7.0 ± 0,2

Realizado por: Naranjo, Jennifer, 2020

## 2.7 Recuento en placa de bacterias

- Se preparó 360 ml de agua destilada y se mezcló 7,38 gramos de PCA.
- Diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  en agua estéril (9,5ml de agua destilada + 0,5 ml de agua de muestra)
- Se extendió 0,1 ml de la muestra de agua en las placas con PCA + Hg, con ayuda de una espátula Drigraski
- Se dejó incubar las placas con y sin presión selectiva a temperatura Ambiente hasta que haya crecimiento por 48 horas
- Finalmente se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL), de cada una de las cajas Petri.

## 2.8 Aislamiento de Colonias:

- Se escogió las colonias al azar que crecieron en PCA con Hg.
- Las placas sembradas se dividen para repicar, con una cuadrícula dividida en cuadros de 1cm x 1 cm

- luego se seleccionó colonias las cuales fueron replicadas con la ayuda de un palillo de madera estéril a temperatura ambiente para los clones.
- Se lo realizó por duplicado de cada punto de muestreo.

**Tabla 2-2** Aislamiento de Colonias

MUESTRA	GalR1	GalR2	GalR1	GalR2	ChR1	ChR2	ChR1	ChR2	SR1	SR2	SR1	SR2
N. COLONIAS	25	23	23	23	23	24	25	27	35	32	20	20

Realizado por: Naranjo, Jennifer, 2020

## 2.9 Caracterización

Para la correspondiente caracterización se procedió a realizar un análisis de cada uno de los clones, tomando en cuenta las siguientes características:

### 2.10 Caracterización macroscópica

Se realizó con los clones aislados por repique, mediante observación de cada una de sus características; forma, borde y color desarrollados en cada uno de ellos.



**Figura 2-5** Clones de la muestra Chico 2 a 1500 ug/l de Hg.

Fuente: Naranjo, J. 2020

## 2.11 Caracterización microscópica

Los clones de las bacterias de estudio se les realizaron tinción Gram, lo que permitió la identificación y clasificación según su coloración, gramnegativas y grampositivas, así como también se distinguió su morfología en cocos y bacilos.

## 2.12 Tinción Gram:



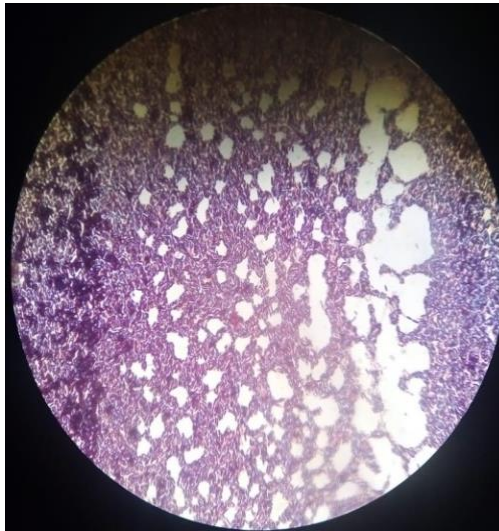
**Figura 2-6** Colorantes: Cristal violeta, Lugol, Alcohol cetona y Safranina

**Fuente:** Naranjo, J. 2020

Cuando las colonias se encuentren purificadas, mediante el proceso de tinción se visualiza su morfología y si pertenecen a las Gram positivas o Gram negativas.

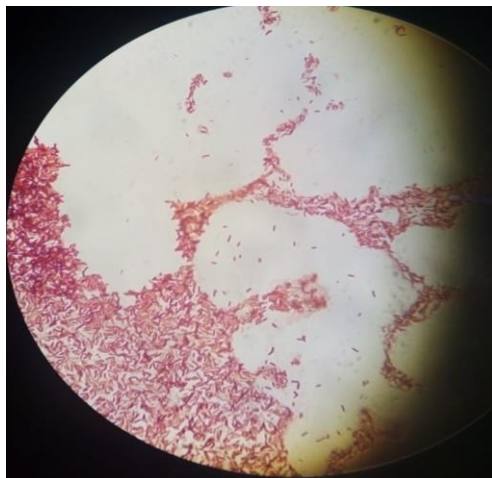
- Se colocó una gota de suero fisiológico en el portaobjetos, tomándose un inóculo de una colonia purificada con la ayuda de un asa estéril
- Sobre la gota de suero fisiológico se colocó la muestra, homogenizándola con la gota de suero fisiológico,

- Se fijó la muestra con calor flameando sobre el mechero, se coloca una gota de cristal violeta durante un minuto, en seguida se lavó con agua sin exponer directamente la muestra
- Se colocó una gota de Lugol durante un minuto, así mismo inmediatamente se lavó con agua, se vierte alcohol cetona por 30 segundos para decolorar, inmediatamente se lava con agua
- Durante un minuto se dejó reposar una gota de safranina, se lavó inmediatamente con agua
- Se procedió a secar la muestra flameando en el mechero hasta una temperatura que la piel pueda soportar.
- Se añadió una gota de aceite de inmersión para su correspondiente visualización en el microscopio usando el lente de 100x.



**Figura 2-7** Caracterización según su forma; Bacilos Gram +

**Fuente:** Naranjo, J. 2020



**Figura 2-8** Caracterización según su forma; Bacilos Gram –

Fuente: Naranjo, J. 2020

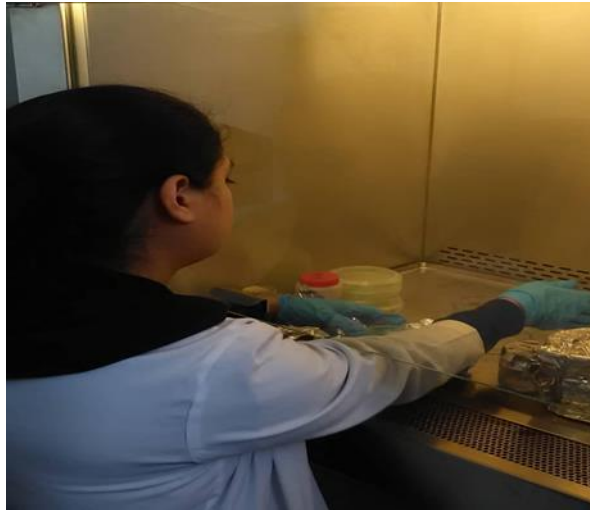
### ***2.13 Pruebas de tolerancia al mercurio:***

Una vez aisladas y replicadas las colonias, se realizó las pruebas de tolerancia aumentando la concentración de Hg (Acetato de Mercurio). Para la evaluación de la resistencia de los clones seleccionados, fueron sembrados en medio PCA con Acetato de mercurio a concentraciones crecientes. (Lema, 2019, p. 49)

Los clones se replicaron al medio suplementado con Acetato de Mercurio, usando palillos previamente esterilizados sin volver a tocar con el palillo la colonia original.

Se fue replicando los clones por duplicado en las cajas petri con medio más mercurio, esto se realizó por concentración desde 25 ug/mL esperando hasta 48 horas de su crecimiento y se fue aumentando la concentración respectivamente hasta los 1500 ug/mL, observando la resistencia de cada una de ellas.





**Figura 2-9** Pruebas de tolerancia al mercurio, cámara de flujo laminar

**Fuente:** Naranjo, J, 2020

**Tabla 2-3** Evaluación de concentraciones de cada prueba de tolerancia al Mercurio

<b>Metal</b>	<b>Concentración (ug/mL)</b>							
	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>
Hg	25	50	100	200	500	750	1000	1500

**Elaborado por:** Naranjo, Jennifer. 2020

## CAPÍTULO III

### 3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Aislamiento de colonias bacterianas

##### 3.1.1 Siembra y estimación del número de UFC/ mL

Se realizó diluciones desde  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , no se realizó más diluciones debido a que se iba a experimentar directamente con el mercurio, en el punto tres al que corresponde San Rafael(S); S1R1  $10^{-5}$  no hubo crecimiento, así como tampoco en S2R2  $10^{-5}$ . Se sembró por recuento en placa en cada caja por duplicado.

**Tabla 3-1** Estimación del número de UFC/L

Muestras	Dilución	Medio de Cultivo PCA (UFC/ml)	
		R1	R2
Gal 1	1		
	2		
	3	26500	12700
	4		120000
	5		
	Promedio	26500	66350
Gal 2	1	107	
	2	190	650
	3		
	4		
	5	340000	10000
	Promedio	113432	5325
Chi 1	1	62	61
	2		470
	3		1500
	4		61000

	5	280000	80000
	Promedio	140031	17626
Chi 2	1	303	
	2	480	790
	3	2800	5300
	4	6000	8000
	5	20000	60000
	Promedio	5916	18522
SR 1	1		
	2	200	80
	3	2400	500
	4	5000	3000
	5	0	20000
	Promedio	2533	5895
SR 2	1		
	2		
	3	4700	1400
	4	6000	3000
	5	10000	0
	Promedio	6900	2200

R: Replica

Realizado por: Naranjo, Jennifer, 2020

### 3.1.2 Aislamiento de Colonias:

**Tabla 3-2** Clones Seleccionados

Muestra	Clones seleccionados	
	Replica 1	Replica 2
Gal 1	26	26
Gal 2	24	24
Chi 1	25	25
Chi 2	35	35
SR 1	40	40
SR 2	20	20
TOTAL	170	170

Realizado por: Naranjo, Jennifer, 2020

Se aisló por duplicado las colonias de las cajas más representativas de la siembra. Gala 94 colonias, Chico 99 colonias y de San Rafael 107. Se aislaron más colonias del punto San Rafael debido ya que era el menos contaminado.

## 3.2 Caracterización de los clones bacterianos

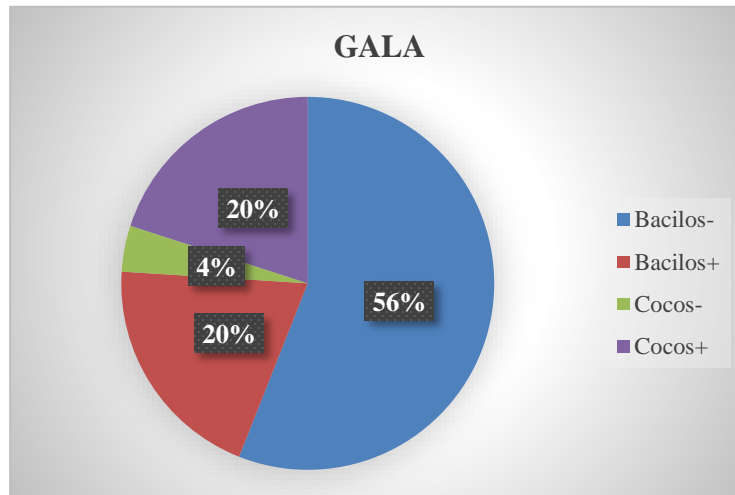
### 3.2.1 Tinción Gram

Se realizó Tinción Gram de cada clon aislado y estabilizado, posteriormente de su aislamiento de cada punto por duplicado. En los gráficos se presentan los resultados de la tinción de los clones aislados a partir del medio de cultivo PCA+Hg.

**Tabla 3-3** Resultados de la Tinción Gram de los clones seleccionados de cada muestra

Clones aislados								
Gala 1			Chico 1			San Rafael 1		
Num. De Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia	Num. De Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia	Num. De Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia
1	-	Bacilos	1	+	Bacilos	1	-	Bacilos
2	-	Bacilos	2	+	Bacilos	2	-	Bacilos
3	+	Cocos	3	-	Bacilos	3	-	Bacilos
4	-	Bacilos	4	-	Bacilos	4	+	Bacilos
5	+	Bacilos	5	-	Bacilos	5	-	Bacilos
6	-	Bacilos	6	-	Bacilos	6	-	Cocos
7	-	Cocos	7	-	Bacilos	7	-	Bacilos
8	-	Bacilos	8	-	Bacilos	8	+	Bacilos
9	-	Bacilos	9	-	Bacilos	9	+	Cocos
10	-	Bacilos	10	-	Bacilos	10	-	Bacilos
11	+	Cocos	11	+	Bacilos	11	-	Bacilos
12	+	Bacilos	12	+	Bacilos	12	+	Bacilos
13	-	Bacilos	13	-	Bacilos	13	-	Bacilos
14	-	Bacilos	14	-	Bacilos	14	-	Bacilos
15	+	Bacilos	15	-	Bacilos	15	-	Bacilos
16	-	Bacilos	16	-	Bacilos	16	-	Cocos
17	+	Bacilos	17	-	Bacilos	17	-	Bacilos
18	+	Bacilos	18	-	Bacilos	18	-	Bacilos
19	+	Cocos	19	-	Bacilos	19	-	Bacilos
20	-	Bacilos	20	+	Bacilos	20	-	Bacilos
21	-	Bacilos	21	+	Cocos	21	+	Bacilos
22	+	Cocos	22	-	Bacilos	22	-	Bacilos
23	-	Bacilos	23	-	Bacilos	23	-	Bacilos
24	+	Cocos	24	+	Bacilos	24	+	Bacilos
25	-	Bacilos	25	-	Bacilos	25	-	Bacilos
			26	-	Bacilos	26	-	Bacilos
			27	-	Bacilos	27	-	Cocos

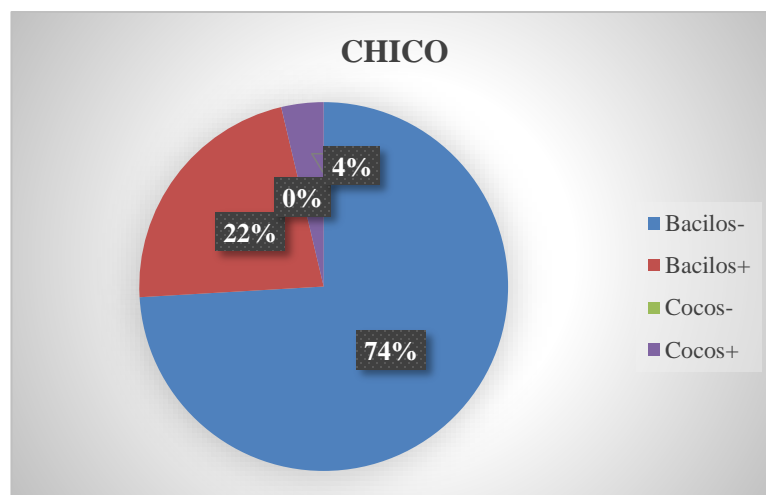
"+"Gramnegativas, "-"Grampositivas  
 Realizado por: Naranjo, Jennifer. 2020



**Gráfico 3-1** Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos de muestra del punto Gala

Realizado por: Naranjo, J. 2020

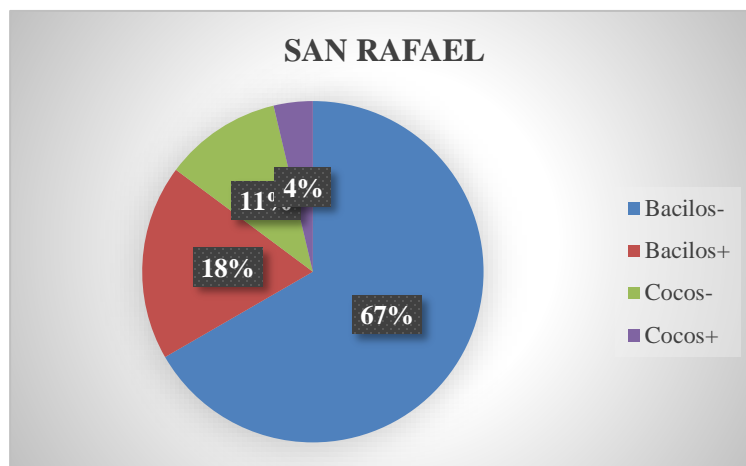
En el gráfico 3-1 que representa a la muestra del punto Gala se presentan los siguientes resultados; (56%) Bacilos Gram negativos y (20%) Bacilos Gram positivos, así como también se presentó (4%) de Cocos Gram negativos y (20%) Cocos Gram positivos. Por lo tanto en este punto de muestra predominan Bacilos Gram negativos.



**Gráfico 3-2** Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos de muestra del punto Chico.

Realizado por: Naranjo, J. 2020

En este punto de muestreo perteneciente a Chico, se notó la ausencia de Cocos Gram positivos como se puede observar en la gráfica 3-2, representando con un (74%) Bacilos Gram negativos y un (22%) Bacilos Gram positivos, mientras que existió una leve presencia de Cocos Gram negativos con un porcentaje de 4%.



**Gráfico 3-3** Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos de muestra San Rafael

Realizado por: Naranjo, J. 2020

En el gráfico 3-3 se observa que en el punto de muestreo que representa a San Rafael, así mismo se nota la predominancia de Bacilos Gram negativos con un 67%, mientras que un (18%) Bacilos Gram positivos, mientras que (4%) Cocos Gram positivos y un 11% Cocos Gram negativos.

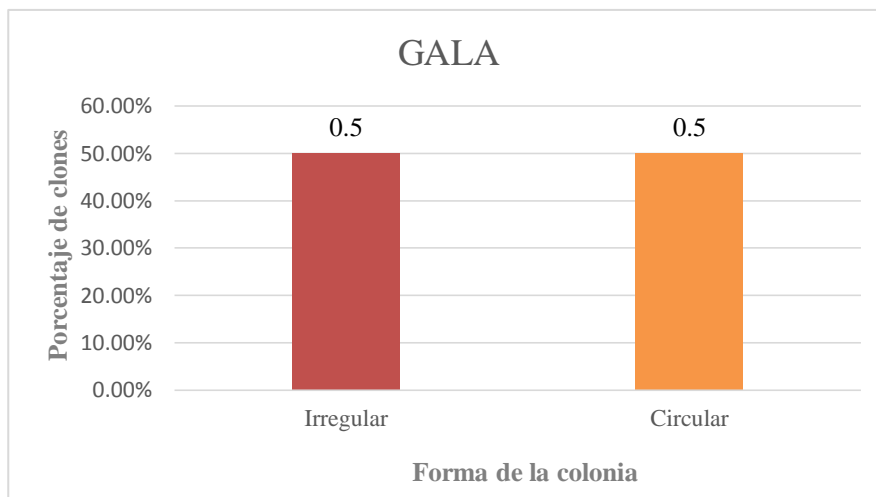
### 3.3 Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica se realizó con los clones que resultaron resistentes al mercurio, resultaron un total de 37 colonias tomando 4 aspectos: forma, borde, superficie y color.

#### 3.3.1 Forma

La forma de los clones de los diferentes puntos se notó diferencias ya que en las colonias de la muestra del punto Chico presentaron 4 tipos de formas como se puede apreciar en la gráfica 3.5

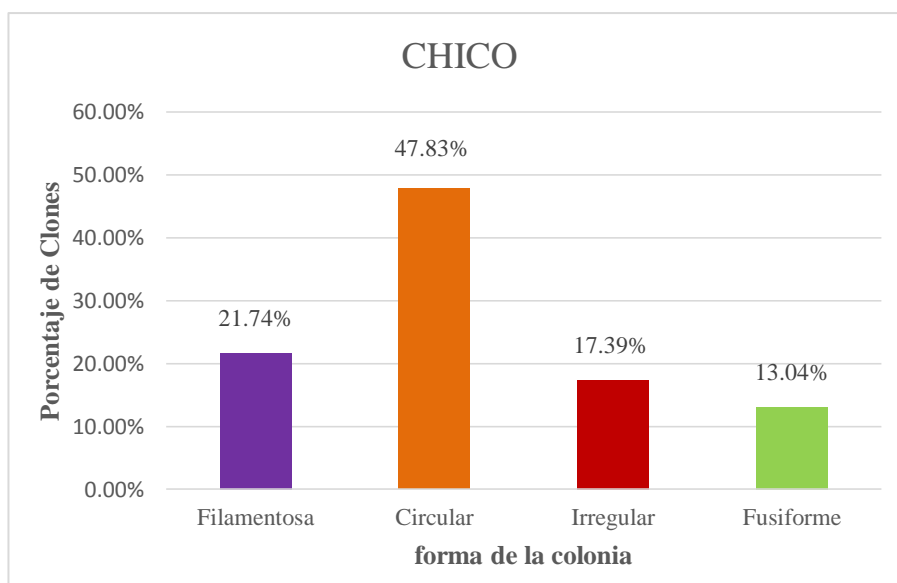
Cabe mencionar que los resultados referentes a esta característica, depende del tiempo de crecimiento, así como también del medio de cultivo y la concentración de Acetato de mercurio a las que fueron sometidas.



**Gráfico 3-4** Forma macroscópica de los clones de la muestra Gala

Realizado por: Naranjo, J. 2020

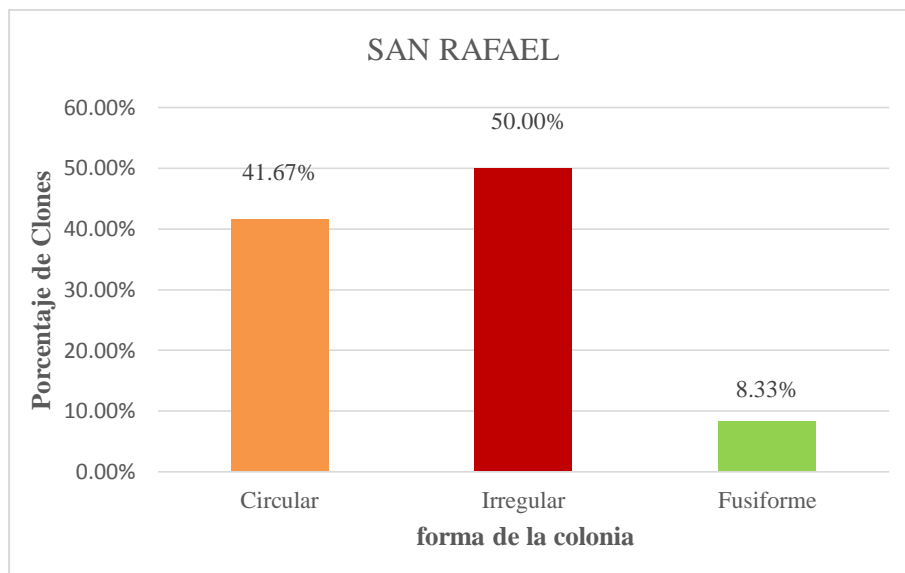
Como se puede notar en el gráfico 3-4 los clones de las colonias de la muestra del punto gala se identificaron dos formas 50% irregular y 50% circular.



**Gráfico 3-5** Forma macroscópica de los clones de la muestra Chico

Realizado por: Naranjo, J. 2020

En la muestra del punto Chico, los clones presentaron cuatro formas diferentes como se observa en el grafico 3-5 representados con el 47,83% circular, 21,74% filamentosa, 17,39% irregular y un 13,04% fusiforme.



**Gráfico 3-6** Forma macroscópica de los clones de la muestra San Rafael

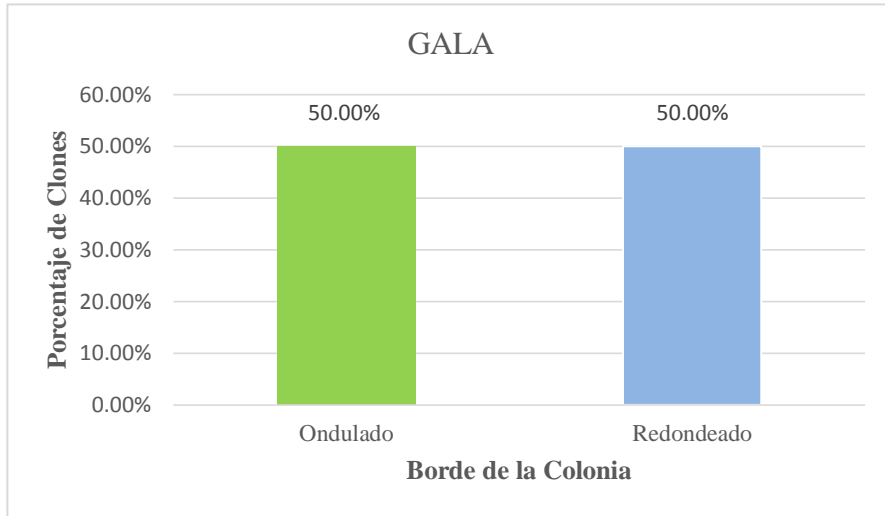
Realizado por: Naranjo, J. 2020

Como se observa en el grafico 3.6 los clones de las colonias de la muestra San Rafael, presentaron 3 tipos de colonias, 50% irregulares, 41,67% circulares y 8,33% fusiformes.

### 3.3.2 Borde

Con lo que respecta a los bordes observados, se pudo identificar ciertos bordes característicos de los clones de cada muestra.

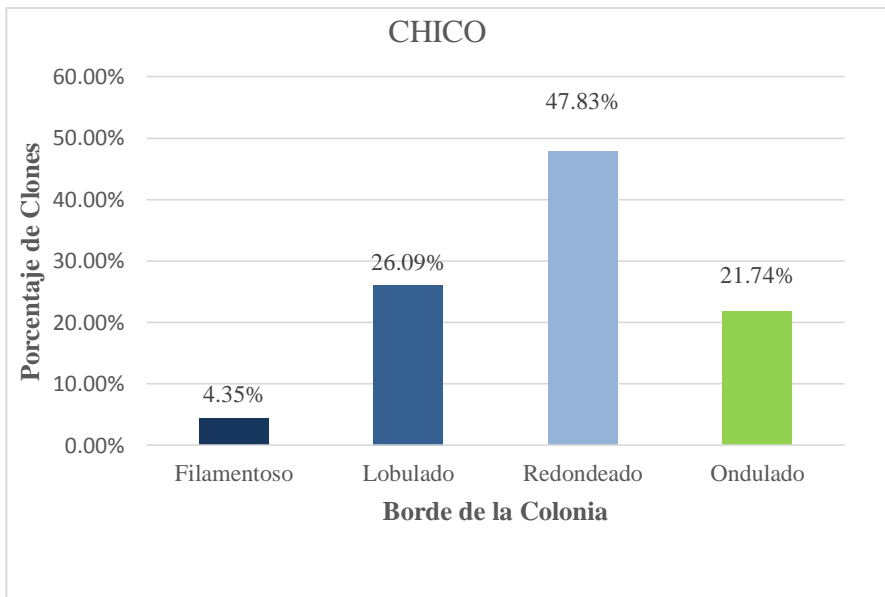




**Gráfico 3-7** Tipo de borde de los clones de la muestra Gala

Realizado por: Naranjo, J. 2020

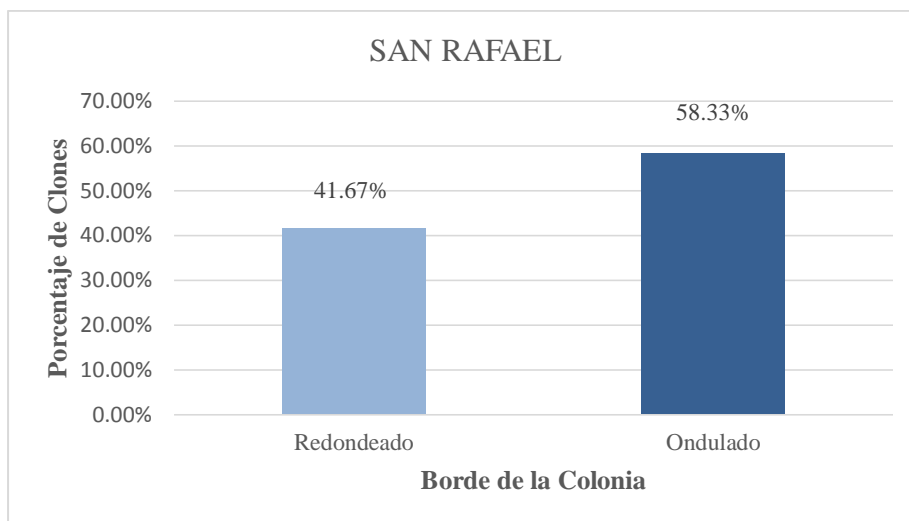
Los bordes de los clones de la muestra Gala son dos, 50% ondulado y 50% redondeado, como se puede observar en el Gráfico 3-7



**Gráfico 3-8** Tipo de borde de los clones de la muestra Chico

Realizado por: Naranjo, J. 2020

En este punto en los clones se observaron cuatro tipos de bodes, 47,83% redondeado, 26,09% lobulado, 21,74% ondulado y 4,33% filamentosos, como se aprecia en el gráfico 3.8.

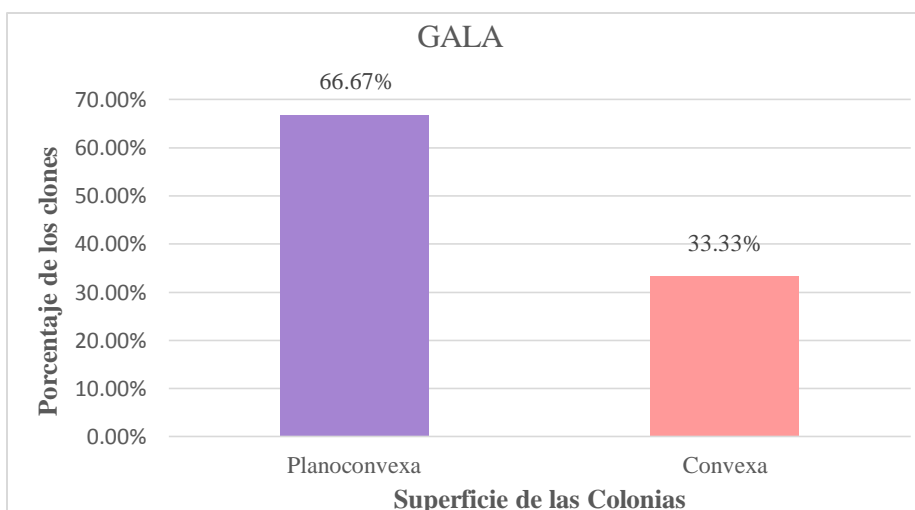


**Gráfico 3-9** Tipo de borde de los clones de la muestra San Rafael

Realizado por: Naranjo, J. 2020

Como se puede observar en el gráfico 3-10, en los clones de la muestra San Rafael presentaron bordes redondeado y ondulado con un 41,67% y 58,33% respectivamente.

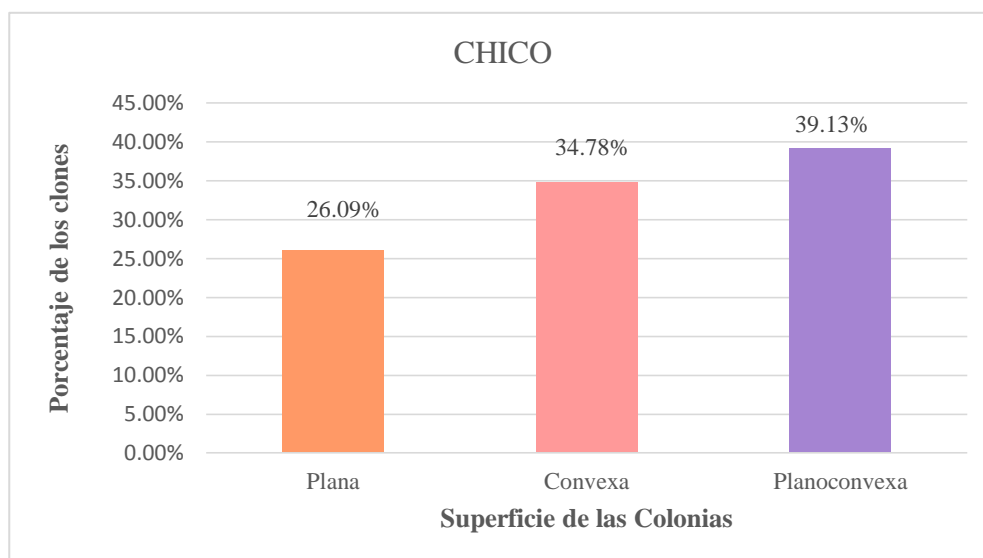
### 3.3.3 Superficie



**Gráfico 3-10** Tipo de superficie de los clones de la muestra Gala

Realizado por: Naranjo, J. 2020

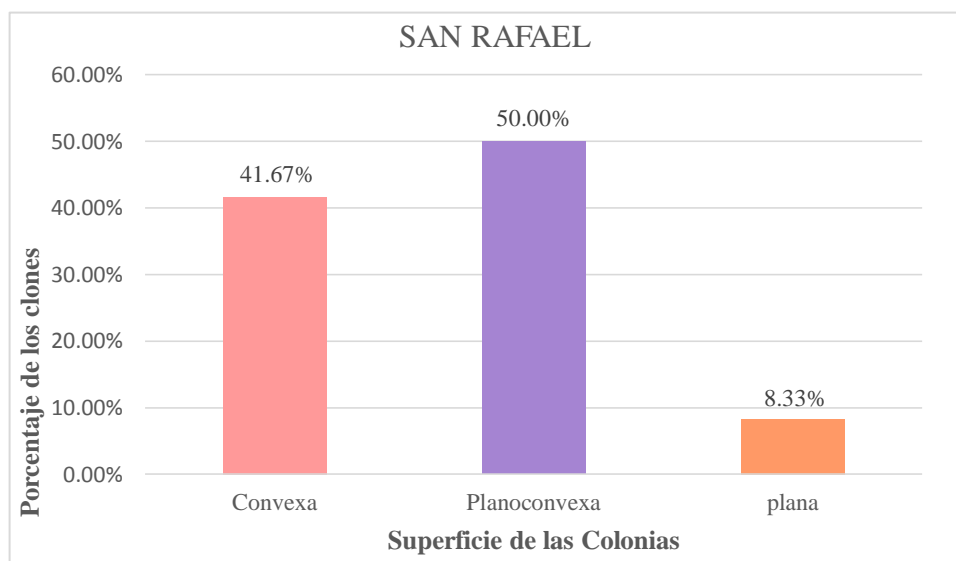
La muestra Gala sus clones presentan dos tipos de superficie los cuales representan el 66,67% planoconvexa y el 33,33% convexa, como se puede observar en el grafico 3-11.



**Gráfico 3-11** Tipo de superficie de los clones de la muestra Chico

Realizado por: Naranjo, J. 2020

La grafica 3-12 que representa a la muestra Chico, está compuesto por clones los cuales presentan superficie plana con un 26,09%, convexa 34,78% y planoconvexa 39,13%.



**Gráfico 3-12** Tipo de superficie de los clones de la muestra San Rafael

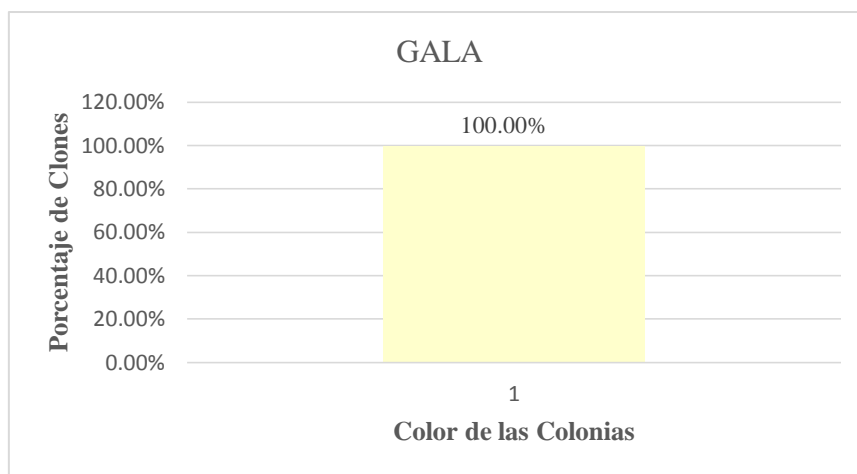
Realizado por: Naranjo, J. 2020

Los clones de la muestra San Rafael presentaron superficies del 41,67% convexa, 50% planoconvexa y 8,33% plana como se aprecie el grafico 3.13.

### 3.2.4 Color

Los resultados fueron obtenidos bajo la observación de los colores de los clones de cada muestra, notándose la predominancia de clones con una coloración ploma.

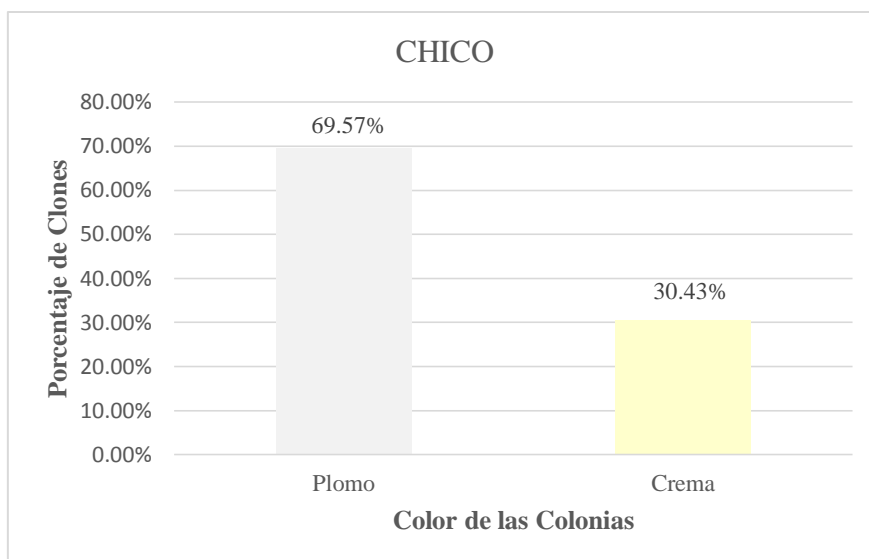
Cabe mencionar que la coloración de los clones fue cambiando a medida que se fue aumentando la concentración de Acetato de Mercurio.



**Gráfico 3-13** Tipo de color de los clones de la muestra Gala

Realizado por: Naranjo, J. 2020

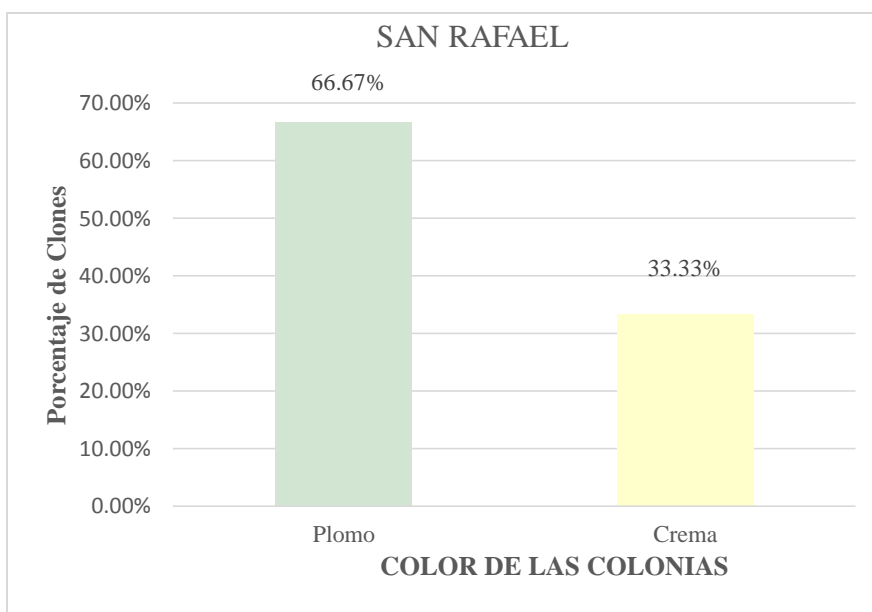
Todos los clones presentes en la muestra Gala presentaron un 100% coloración crema.



**Gráfico 3-14** Tipo de color de los clones de la muestra Gala

Realizado por: Naranjo, J. 2020

En el siguiente punto los clones mostraron 2 tipos de colores, 69,57% plomo y 30,43% crema, como se puede notar el grafico 3-15.



**Gráfico 3-15** Tipo de color de los clones de la muestra San Rafael

Realizado por: Naranjo, J. 2020

Como se puede apreciar en el gráfico 3.13 los clones de la muestra San Rafael dieron color 66,67% plomo y 33,33% crema.

### 3.4 Evaluación de la resistencia bacteriana al mercurio

#### 3.4.1 Evaluación de resistencia de los clones aislados en medio PCA con Hg

##### *Primer experimento*

Para determinar la resistencia de los clones aislados al mercurio, se realizó una serie de pruebas evaluando su resistencia por duplicado. Primeramente, se hizo el estudio con una concentración inicial de 25 ug/mL. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla que se muestra a continuación.

**Tabla 3-4** Resultados de la resistencia a 25 ug/mL de Mercurio

Muestra	Concentración (ug/mL)	Clones Crecimiento a las 48h	Clones sin crecimiento
Gal 1 R1	25	C1;C2;C3;C4;C5;C9; C10;C11;C12;C13;C14 C15;C16;C17;C18;C19 C20;C21;C22;C23;24	C7;C8
Gal1 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22;C23, C24	
Gal2 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22	
Gal2 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C14;C15; C16;C17;C18;C19;C20; C21;C22	C12;C13
Chi1 R1	25	C2;C3;C4;C5;C6;C8;C9, C10;C13;C14;C16;C21, C22	C1;C2;C7;C11;C12; C15;C17;C18;C20;C23 C24;C25
Chi1 R2		C2;C3;C5;C6;C7;C8;C9; C11;C12;C13;C14;C15; C18;C19;C20;C22;C23; C24;C25	C1;C4;C10;C16;C17 C21
Chi2 R1		C2;C3;C4;C11;C15;C16 C17;C21;C22;C24	C1;C5;C6;C7;C8;C9;C10 C12;C13;C14;C18;C19 C20;C23;C25;C26
Chi2 R2		C3;C4;C12;C13;C14;C20;	C1;C2;C4;C6;C7;C8;C9;

		C21,C22;C24;C26	C10;C12;C15;C16,C17 C18;C19;C23;C25
SR1 R1	25	C1;C2;C3;C4;C10;C11,12 C14;C16	C5;C6,C7,C8,C9;C13;C15
SR1 R2		C1;C2;C3;C4;C5,C8;C9 C12	C6,C7;C10;C11;C13,C14; C15;C16
SR2 R1		C3;C4;C5;C6;C7;C9;C10 C11;C12;C13;C14;C15,C16 C17;C18;C19;C20,C22;C23 C24;C25;27;C28;C29;C30 C31;C32;C33,C34	C1;C2;C8;C21;C26;C35; C36;C37;C38
SR2 R2		C1;C2;C4;C5;C6;C7;C8;C9; C11;C12;C13;C14;C15,C16; C17;C18;C19;C20,C22;C24; C25;27;C28;C30;C32;C33, C34;C35;36;C37;C38	C3;C10;C21;C23;C26; C29;C31

Realizado por: Naranjo, Jennifer. 2020

En el primer experimento se puede observar en la tabla 3-4, que hubo mortalidad de los clones debido a que dichas bacterias no resistieron a esta concentración de mercurio. Las muestras Gala (Gal1 R1 y Gal2 R2) no se vieron afectados por lo tanto no hubo inhibición alguna, únicamente en Gala 1 R2 no crecieron 2 clones y en Gal2 R1 así mismo 2 clones, a diferencia de las muestras Chico (Chi1, Chi2), San Rafael (SR1 y SR2) si presentaron inhibición de ciertos clones, por ejemplo Chi1R1 no crecieron 12 clones, en Chi1 R2 6; Ch1 R1 y Chi2 R2 no crecieron 16 clones respectivamente, a su vez SR1 R1 no crecieron 7 clones, SR1 R2 8 clones; finalmente SR2 R1 no crecieron 9 clones y SR2 R2 7 clones.

### **Segundo Experimento**

Debido a los resultados que se evidencio en el primer experimento, se optó por aumentar la concentración 25 más es decir 50 ug/mL de acetato de mercurio. Como se puede observar en la tabla.

**Tabla 3-5** Resultados de la resistencia a 50 ug/mL de Mercurio

Muestra	Concentración (ug/mL)	Clones Crecimiento a las 48h	Clones sin crecimiento
Gal 1 R1	50	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C8C9; C10;C11;C12;C13;C14 C15;C16;C17;C18;C19 C20;C21;C22;C23	C7
Gal1 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22	C23
Gal2 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20	C21;C22

Gal2 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22	
Chi1 R1	50	C1;C2;C4;C6;C7;C8;C9, C10;C11;C12;C13;C14;15	C3;C5
Chi1 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21	
Chi2 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;C10;C11	
Chi2 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;	C10
SR1 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8	
SR1 R2	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8		
SR2 R1	50	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8 C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C23;C24;C25; 27;C28;C29	
SR2 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C24;C25;27;C28;C2	

Realizado por: Naranjo, Jennifer, 2020

Como se puede observar en la tabla, el segundo experimento presenta una clara resistencia de los clones al Acetato de Mercurio, las inhibiciones son mínimas en cada muestra. Gal1 R1 y R2 no creció un clon, en Gal2 R1 2 clones no crecieron mientras que en el Gal2 R2 todas crecieron; Chi1 R1 no crecieron 2 clones y en Chi2 R2 únicamente no creció un clon.

### ***Tercer Experimento***

Debido a la notable resistencia de los clones al mercurio y, pero aun así existió una mínima inhibición de los clones se procedió a aumentar la dosis de concentración a 100ug/mL de Acetato de Mercurio.

**Tabla 3-6** Resultados de la resistencia a 100 ug/mL de Mercurio

Muestra	Concentración (ug/mL)	Clones Crecimiento a las 48h	Clones sin crecimiento
Gal 1 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8 C9;C10;C11;C12;C13; C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22	
Gal 1 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18;	



		C19;C20;C21;C22	
Gal2 R1	100	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20	
Gal2 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22	
Chi1 R1	100	C1;C2;C4;C5;C6;C7;C8;C9, C10;C11;C12;C13;	
Chi1 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21	
Chi2 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;C10;C11	
Chi2 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;	C10
SR1 R1	100	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8	
SR1 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8	
SR2 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8 C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C23;C24;C25; 27;C28;C29	
SR2 R2		C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C24;C25;27;C28;C2	C1

Realizado por: Naranjo, Jennifer, 2020

Como se puede observar en la tabla los clones han de mostrado una fuerte resistencia al Acetato de Mercurio ya que todos los colonos de casi todas las muestras por duplicado crecieron a la concentración de 100 ug/mL a excepción del Chi2 R2 y SR2 R2 que no creció un clon respectivamente.

#### ***Cuarto Experimento***

En el cuarto experimento que corresponde a 200 ug/mL se replicó en una sola caja Petri las réplicas 1 y 2 de la muestra Chico, así como también de San Rafael, a continuación se presentan los resultados del crecimiento de los clones a esta concentración.

**Tabla 3-7** Resultados de la resistencia a 200 ug/mL de Mercurio.

Muestra	Concentración (ug/mL)	Clones Crecimiento a las 48h	Clones sin crecimiento
Gal 1 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8 C9;C10;C11;C14;C15;C16;	C12;C13;C17

		C18;C1920;C21;C22	
Gal1 R2	200	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C14;C15; C16;C18;C19;C20;C21	C12;C13;C17
Gal2 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20	
Gal2 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7 C8;C9;C10;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C22	
Chi1 R1y2	200	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8, C9;C10;C11;C12;C13;C14;C15; C16;C17;C18;C19;C20;C21; C22;C23;C24;C25;C26C27; C28;C29;C30;C31;C32;C33;C34	
Chi2 R1y2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14;C15; C16;C17;C18;C19;C20;C21	
SR1 R1y2	200	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8C9; C10;C11;C12;C13;C14;C15;C16	
SR2 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8 C9;C10C11;C12;C13;C14; C15;C16C17;C18;C19;C20, C21;C22;C23;C24;C25; 27;C28;C29	
SR2 R2		C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C24;C25;27;C28; C29	

Realizado por: Naranjo, Jennifer, 2020

A pesar de que los clones se los han sometido a una concentración de 200 ug/mL de Acetato de Mercurio presentan una alta resistencia al mercurio, como se puede notar en la tabla 3-7 no ha muerto casi ningún clon a diferencia del Gal que han comenzado a inhibir; en Gal 1 no crecieron 3 clones tanto de la R1 como de la R2.

### ***Quinto Experimento***

Ya que los clones han demostrado ser muy resistentes al mercurio se aumentó la dosis de concentración 200 a 500 ug/ mL, a continuación, se mostraran la reacción que han presentado los clones a dicha dosis en la tabla.

**Tabla 3-8** Resultados de la resistencia a 500 ug/mL de Mercurio

Muestra	Concentración (ug/mL)	Clones Crecimiento a las 48h	Clones sin crecimiento
Gal 1 R1	500	C1;C2;C3;C5;C8;C15;C16;C22	C4;C6;C7;C9;C10;C11;C12, C13;C14;C17;C18;C19; C20;C21
Gal1 R2		C11;C12;C13;C15;C16;C17;C18	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8, C9,C10;C14
Gal2 R1		C1;C5;C6;C7;C11;C12;C13 C15;C16;C17;C19;C20;21	C2;C3;C4;C8;C9;C10;C14
Gal2 R2		C1;C3;C5;C6;C8;C11;C12;C13 C14;C15;C16;C18	C2;C4;C7;C9;10
Chi1 R1y2	500	C2;C4;C5;C6;C9;C11;C12, C13;C14;C15;C16;C17;C18; C19;C20;C21;C23;C25;C26C27; C28;C29;C30;	C1;C3,C7,C8;10,C22;C24 C31;C32;C33;C34
Chi2 R1y2		C5;C11;C12;C13;C14;C15;C16;	C1;C2;C3;C4; C6;C7;C8; C9;C10
SR1 R1y2	500	C2;C3;C4;C5;C11;C12	C1;C6;C7;C8;C9;C10;C13 C14;C15;C16
SR2 R1		C1;C3;C8;C10;C15;C16C17; C20,C21;C22;C23;C24;C25; 27;C28	C2;C4;C5;C6;C7;C9 C11;C12,C13;C14;C18;C19
SR2 R2		C2;C3;C4;C5;C6;C7;C10;C11; C12;C13;C14;C16;C17;C19; C23,C24;C26;27	C1;C3;C8;C9;C15;C18 C20,C21;C22;C25

Realizado por: Naranjo, Jennifer. 2020

Al observar en la tabla 3-8, se puede notar muy claramente como una cantidad considerable de clones no han crecido especialmente de las muestras Gala y San Rafael. Quedando en clones que han presentado resistencia al mercurio; en la muestra de Gala 40 clones, Chico 30 clones, San Rafael 39 clones.

### *Sexto Experimento*

En esta etapa de los experimentos se ha procedido a juntar ciertas replicas, como por ejemplo se juntaron las réplicas y quedaron únicamente Gal 1 y Gal 2, así mismo como se juntó replicas en el experimento anterior como fue en el caso Chico en este caso se replicó por duplicado, como se lo puede apreciar en la tabla.

**Tabla 3-9** Resultados de la resistencia a 750 ug/mL de Mercurio

Muestra	Concentración (ug/mL)	Clones Crecimiento a las 48h	Clones sin crecimiento
---------	-----------------------	------------------------------	------------------------

Gal 1	750	C10;C11,12	C1;C2;C3;C4;C6;C7;C8; C9
Gal 2		C9;C10;12;C16	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8 C11;C13;C14;C15;C9;C16; C17;C18;C19;C20;C21; C22;C24;C25
Chi R1	750	C1;C2;C3;C4;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C24;C25;27;C28; C29	C5
Chi R2		C1;C2;C3;C4;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C24;C25;27;C28; C29	C5
SR1 R1y2	750	C1;C2;C3;C4;C7;C6;C7	
SR2 R1		C1;C2;C3;C4;C5;C7;C8; C9;C11;C12;C13;C14; C15;C16	C6;C10
SR2 R2		C1;C2;C3;C4;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17	

Realizado por: Naranjo, Jennifer. 2020

A partir de la concentración a 500 ug/mL, permaneció una cantidad muy representativa de clones resistentes al mercurio, pero se puede notar aún más que los clones de la muestra Gala ha ido decreciendo su resistencia al mercurio, como se puede apreciar en la tabla 3-9 a 750 ug/mL han quedado únicamente 7 clones, mientras que de los otros puntos su decaimiento ha sido relativamente mínimo.

### *Séptimo Experimento*

En el correspondiente experimento se han juntado las réplicas de cada punto de las muestras, permaneciendo tres, pero así mismo se ha realizado el duplicado de cada una como se observa en la tabla 3-10.

**Tabla 3-10** Resultados de la resistencia a 1000 ug/mL de Mercurio

Muestra	Concentración (ug/Ml)	Clones Crecimiento a las 48h	Clones sin crecimiento
---------	-----------------------	------------------------------	------------------------

Gal R1	1000	C3;C4;C6;C5;C7;C8;C9	
Gal R2		C3;C4;C5;C6;C7;C8;C9	
Chi R1	1000	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C24;C25;C26;27	C28
Chi R2		C1;C2;C3;C6;C7;C8; C9;C10;C11;C12;C13;C14; C15;C16;C17;C18;C19;C20, C21;C22;C24;27;C28;	C4;C5;C25;C29
SR R1	1000	C1;C2;C4;C5;C6;C7;C8;C9; C11;C12;C14;C15;C16; C17;C18;C19;C20;C22; C25;27;C28;C30;C32, C34;C35;36;C37;C38	C13;C24;C31;33
SR R2		C1;C4;C5;C6;C7;C8;C10 C11;C12;C13;C14;C15;C16; C17;C18;C19;C20;C22;C24; C25;27;C28;C30;C32;C33, C34;C35;36;C37;C38	C2;C9

Realizado por: Naranjo, Jennifer, 2020

Los clones son altamente resistentes al mercurio, como se puede notar en la tabla 3.7 a una concentración de 1000 ug/mL, siguen sin inhibirse demostrando su capacidad de tolerancia a dicho metal, los clones que han dejado de crecer son mínimos, notándose también que los clones del Gala permanecen 7.

### Octavo Experimento

Una vez seleccionadas las cajas Petri con clones más representativos de cada replica, se tomó una réplica de cada muestra para realizar el último experimento que fue con la aumentación de 1500 ug/mL de Acetato de Mercurio.

**Tabla 3-11** Resultados de la resistencia a 1500 ug/mL de Mercurio

Muestra	Concentración (ug/mL)	Clones Crecimiento a las 48h	Clones sin crecimiento
Gal	1500	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7	

Chi	1500	C1;C2;C3;C4;C5;C6;C7;C8; C11;C12;C13;C14;C17;C18;C19 C21;C27	C9;C10;C15;C16;C20; C22;C23;C24;C25;C26 C28
SR	1500	C1;C8;C9;C16;C21;C22;C26; C28;C33	C13;C2;C3;C4;C5;C6;C7; C10;C11;C12;C13;C14; C15;C17;C18;C19;C20;C23 C24;C25;C27;C29;C30 C31;C32

**Realizado por:** Naranjo, J. 2020

En este último experimento, se lograron obtener los clones con mayor resistencia al mercurio como se puede apreciar en la tabla 3-11, los clones con mayor cantidad de resistencia son del punto Chico, pero las más resistentes y estables son las del Gala ya que desde la concentración de 750 ug/mL permanecieron con 7 clones.

## CONCLUSIONES

- En la microcuenca del Río Gala, se presencia elevadas concentraciones de metales pesados como el mercurio debido a las actividades antropogénica que se llevan a cabo especialmente la minería, contribuyendo al surgimiento y dispersión de cepas microbianas potencialmente resistentes a concentraciones altas de mercurio.
- Las pruebas de resistencia al mercurio, demostraron que los clones de cada punto de muestreo son demasiado resistentes, ya que sobrepasaron los 1000 ug/mL de concentración y siguieron resistiendo algunas de ellas, quedando 33 clones a una concentración de 1500 ug/mL de Acetato de Mercurio.
- Mediante la caracterización y las pruebas realizadas se pudo determinar bibliográficamente que el género *Pseudomona* predomina en zonas con altas concentraciones de metales pesados, especialmente mercurio.
- Las colonias estudiadas son capaces de acumular metales pesados, por lo que se las consideraría como indicadores biológicos de contaminación, y pueden ser utilizadas a su vez como una importante herramienta en el tratamiento biológico para aguas contaminadas con metales pesados.

## **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar las pruebas pertinentes para la identificación de estas bacterias de preferencia por métodos moleculares para mayor precisión, al secuenciar su ADN se podría explicar su comportamiento de adaptación a agentes de presión selectiva.
- Se debería aprovechar estos microorganismos ya que han presentado una gran resistencia al mercurio, su aplicación biotecnológica como biorremediadores serían favorables para el medio ambiente.
- Hacer uso de estos microorganismos como biosensores para el control de la contaminación de metales pesados en muestras ambientales.



## **GLOSARIO**

**Aguas Residuales:** Aguas de composición variada, provenientes de las descargas de usos industriales, comerciales, servicios agrícolas, pecuarios, domésticos, etc., que hayan sufrido degradación en su calidad original. (TULSMA, 2012, p. 240)

**Ambientes Extremos:** Se consideran ambientes extremos aquellos que poseen condiciones físico- químicas inhabitables como altas y bajas temperaturas, acidez elevada, altas concentraciones de sal, altas presiones. A pesar de estas condiciones existen microorganismos capaces de crecer y desarrollarse sin problema alguno en este tipo de ambientes utilizando mecanismos de adaptación a estos parámetros atípicos. (Lema, 2019, p. 19)

**Bacterias:** Microorganismos eucariotas muy sencillas en su composición, su reproducción es por fisión binaria (difusión simple). Están constituidas por información genética, sistemas de producción de energía y sistemas bioinformáticos los cuales son necesarios para el crecimiento. (Pirez, 1998)

**Bio-absorción:** Es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el mercurio, cadmio, cromo, plomo, zinc y cobre. Los microorganismos utilizados como bio-absorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. (Llvisaca & Vargas, 2011, pp. 40-41)

**Bio-lixiviación:** Es un mecanismo de solubilización que es utilizado en la industria minera. Por medio de la acción microbiana, los metales presentes en los minerales resultan extraídos en fase acuosa. (Llvisaca & Vargas, 2011, pp. 40-41)

**Bioprospección:** Se refiere a la explotación sistemática, y a la biodiversidad sostenible, cuya finalidad es identificar y obtener fuentes de componentes naturales y microorganismos los cuales puedan ser aprovechados en biotecnología a nivel industrial y ambiental. (Serrano, 2014)

**Biorremediación:** Es un tipo de remediación en la cual se implementa organismos vivos con ciertos nutrientes en los ambientes contaminados, se produce la descontaminación gracias a la capacidad natural de los organismos para transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas las cuales resultan menos nocivas y menos tóxicas, logrando una disminución de la contaminación ambiental. (Anguisaca & Castañeda, 2016, p. 10)

**Metales Pesados:** Son aquellos metales cuyo número atómico es elevado, tales como: cadmio, cobre, cromo, hierro, mercurio, manganeso, níquel, plomo, zinc, entre otros, que son tóxicos en concentraciones reducidas y tienden a la bioacumulación. (TULSMA, 2012, p. 240)

**Mercurio:** Metal pesado de color plateado, a temperatura ambiente se lo encuentra también en estado líquido, a concentraciones pequeñas de exposición puede causar graves daños a la salud, dañando principalmente al sistema nervioso, neurológico, al aparato digestivo, riñones, ojos y pulmones. En la actividad minera es usado para la extracción de oro del mineral. (OMS, 2016)

**Microorganismos Extremófilos:** Son aquellos microorganismos que tienen la capacidad de resistir a ambientes extremos como altas y bajas temperaturas, acidez elevada, altas concentraciones de sal, altas presiones y a la presencia de metales tóxicos. (Llvisaca & Vargas, 2011)

**PCA (Plate Count Agar):** Es un medio de cultivo muy utilizado para la enumeración de bacterias aeróbicas en aguas, aguas residuales y alimentos. (Lema, 2019)

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ACEVEDO, R., & SEVERICHE, C.** Unilibre. *Identificación de bacterias resistentes a dibromo mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano*.1. 2013. pp. 1-7.

**AGROCALIDAD.** *Instructivo para la toma de muestra de aguas*. [en línea]. [Consulta:11 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec>

**AGUILAR, P., RUIZ, S.** Pcr En Tiempo Real. *Researchgate*. 2014. pp. 175-201.

**ANGUISACA, C., & CASTAÑEDA, E.** *Identificación molecular de consorcios bacterianos resistentes a metales pesados provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas-Ecuador*.(tesis). (Pregrado) Universidad Politécnica Salesiana, Quito. 2017. pp. 20-50.

**ARMIJOS, J.** *Influencia de las actividades antropogénicas en la calidad del agua en la subcuenca del Río Gala mediante el estudio de bioindicadores y parámetros fisicoquímicos en el recinto Shumiral provincia del Azuay*. (tesis). (Pregrado) Universidad del Azuay, Cuenca. 2018. pp. 1-45.

**AZEVEDO, R., & RODRIGUEZ, E.** Toxicidad del Mercurio en las Plantas *.Boletín Biológica*, 2012, pp. 30-36.

**BAILÓN, L., CRUZ, R., & CERVANTES,** Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. A. *Atlas de Universidad Autónoma de México*, 2012,(México)

**BIOTED.** *Obtenido de PCR gen 16S ARNr bacteriano* [En línea].Atlanta,2009 [Consulta: 03 febrero 2020]. Disponible en: <https://www.bioted.es>

**BOU, G., OLMOS, A., & GARCÍA,** *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*,2010, (United State of América) pp. 601-608.

**SHIMADZU, A.,** 2019. Quantitative Analysis of Pyrethroids in Soil and Sediment. [en línea], 2019, (United State of America) 5(1), pp. 1-5. [Consulta: 27 marzo 2019]. ISSN 1090-7807. Disponible en: [www.shimadzu.com.ec](http://www.shimadzu.com.ec)

**CIMERA,** Bioprospección en ambientes acuáticos extremos o aislados.[en línea], 2019, (Ecuador) 5(1), pp. 1-5. [Consulta: 27 marzo 2020].Disponible en: <http://www.cimera.es/en/bioprospecciones-en-ambientes-acuaticos-extremos/>

**CLARRIDGE.** Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, (United State of America) 17(4), pp. 23.-206

**CONANT, J., & FADEM, P.** *Hesperian Guías de salud*. [En línea].California, 2011 [Consulta: 03 febrero 2020]. Obtenido de :<https://es.hesperian.org>

**DEALTRY, S., GHIZELINI, A., & MOREIRA, R.** Petroleum contamination and bioaugmentation in bacterial rhizosphere communities from *Avicennia schaueriana*. *Brazilian Journal of Microbiology*. [en línea], 2018, (Brasilia), pp. 757-7669. [Consulta: 04 enero 2020]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/en-revista-brazilian-journal-microbiology-490-articulo-petroleum-contamination-bioaugmentation-in-bacterial-S1517838217304616?referer=buscador>

**DÍAS, S., VARONA, M., SÁNCHEZ, C., & IDROVO, A.** Ministerio Salud de Colombia. *Exposición al plomo y mercurio en poblaciones de la ribera del río Bogotá*, n°1 (2019),(Colombia). pp. 1-8.

**DORADO, G.** Purificación y análisis de DNA cromosómico. Córdoba. Argentina,2017. P. 30 .

**DURAN, J. C.** *Diagnóstico de la contaminación por mercurio en aguas y sedimentos de ríos que reciben efluentes de la minería de oro en los sectores de Nambija, Ponce Enríquez y Portovelo* . [En línea] (Tesis). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Ejercito, Sangolquí, Ecuador, 2008. pp. 20-30 [Consulta: 2020-02-19]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec>

**FERNANDEZ, A., GARCÍA, C., & VALVERDE, S.** *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. [en línea]. documentoscientificos. 2010. [Consulta: 5 enero 2020]. Disponible en: [https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/Procedimientos\\_microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf](https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/Procedimientos_microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf)

**FERNANDEZ, M.** electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. *INECC*. 2004. p.33

**FIWEGER, M.** La minería sustentable, limpia y responsable. *Terra Incógnita*, 2014, p 20.

**GARRIGUES, F.** *Estrategia de secuenciación de Primera Generación*. [en línea]. Sanger. 2017 [Consulta: 5 febrero 2020]. Disponible en:<http://revistageneticamedica.com/blog/sanger/>

**GIOVANELLA, P., CABRAL, L., & CLESIO, G.** (2015). *Mercury (II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric (II) reductase activity in a new strain of Pseudomonas sp.* California: elsevier,2015. pp1-8.

**LEMA, J.** *Evaluación de la tolerancia a metales pesados: cobalto, mercurio y plomo en microorganismos aislados de la laguna de Ozogoché en la parroquia Achupallas del cantón Alausí.* [En línea] (Tesis). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. 2019. p 67 [Consulta: 2020-02-19]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec>

**LLIVISACA, S., & VARGAS, F.** ResearchGate: Caracterización de Bacterias Metalofijadoras de Mercurio, A Través de la Subunidad 16srna, Mediante la Técnica de PCR-DGGE del Río Gala (Aguas Abajo en el Recinto San Rafael) en la Parroquia Tenguel. Cuenca, 2011, pp. 1-7.

**MARRERO, J., & COTO, O.** Cenic: Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones. Colombia, 2010, pp.67-78.

**OMS.** Organización Mundial de Salud. *El mercurio y la salud* [en línea]. 2016. Disponible en: <http://www.who.int>

**PÉREZ, A., MARTINEZ, D., & MARRUGO, J.** Scielo: Endophytic Bacteria Associated to Genus *Cyperus* And *Paspalum* In Soils with Mercury Contamination, (2016), (Ecuador). pp.67-76.

**PIREZ, M.** *Morfología y Estructura Bacteriana.* [En línea]. Bogotá, 1998 [Consulta: 03 enero 2020]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%209.pdf>

**RODICIO, M., & MENDOZA, M.** Identificación de bacterias mediante secuenciación del ARNr 16s. [en línea], 2004, (Colombia), pp. 238-245. [Consulta: 27 enero 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-13059055>

**RODRIGUEZ, L.** Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a metales pesados obtenidas de ambientes contaminados con derivados de hidrocarburos en la ciudad de Riobamba. [En línea] (Tesis). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. 2017. p 54 [Consulta: 2020-02-19]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec>

**SERRANO, E.** Aporte a la bioprospección conducente a definir las aplicaciones en la plasticultura de un biopolímero tipo PHAs. [En línea] (Tesis). (Pregrado) Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2014. P 34 [Consulta: 2020-02-19]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/40053/1/6699687.2014.pdf>

**TULSMA.** Texto Unificado De Legislación Secundaria. Quito, Ecuador, 2016. p. 240.