

**Efecto del cobre y zinc en la comunidad  
microbiana del río Arkansas, Leadville,  
Colorado, Estados Unidos**

**Shisbeth Danyra Tábor Sarmiento**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO  
CARRERA DE AMBIENTE Y DESARROLLO

# **Efecto del cobre y zinc en la comunidad microbiana del río Arkansas, Leadville, Colorado, Estados Unidos**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniera en Ambiente y Desarrollo en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Shisbeth Danyra Tábor Sarmiento**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2017

## **Efecto del cobre y zinc en la comunidad microbiana del río Arkansas, Leadville, Colorado, Estados Unidos**

**Shisbeth Danyra Tábora Sarmiento**

**Resumen.** Una de las actividades más contaminantes de cuerpos de agua es el drenaje ácido de minas, el cual resulta en elementos tóxicos, como metales a fuentes de agua. El cobre y zinc son metales pesados que, en altas concentraciones, pueden tener alta toxicidad para los ecosistemas acuáticos. Las bacterias son de los primeros organismos afectados por la presencia de metales pesados. El objetivo del estudio fue determinar el efecto del cobre y zinc en la comunidad microbiana del río Arkansas. Se determinó el efecto de estos metales en el número de bacterias provenientes de este río y se crearon perfiles de resistencia bacteriana hacia el cobre, zinc y a ambos metales. Adicionalmente, se realizó un análisis de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) para identificar bacterias encontradas en las muestras e identificar genes de resistencia hacia el cobre y zinc. Se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) y una prueba post hoc de Duncan para comparar los efectos de los metales en el comportamiento de las bacterias. Los resultados demuestran que las concentraciones de metales pesados tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias. El cobre fue el metal con mayor toxicidad, la cual aumentó al agregarle zinc al medio. Se encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el número de bacterias entre sitios, siendo la fuente de contaminación el sitio con mayor número de bacterias resistentes. De acuerdo a los perfiles de resistencia, se encontraron dos bacterias resistentes al cobre y una bacteria con un gen de resistencia al zinc (CzCc).

**Palabras clave:** Bacterias, metales pesados, minería, PCR, resistencia.

**Abstract.** One of the most pollutant activities to water bodies is acid mine drainage, which results in toxic elements, like metals in water sources. Copper and zinc are heavy metals that, in higher concentrations, could have high toxicity to aquatic ecosystems. Because they accumulate in the sediments, bacteria are one of the first organisms to be affected by its presence. The purpose of this study is to determine the effect of copper and zinc in the microbial community of the Arkansas River, in Leadville, Colorado. The effect of copper and zinc in the number of bacteria from this river was determined and resistance profiles to copper and zinc were created. Also, this study includes Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis to identify the bacteria found in the samples and to identify the metal resistance genes. An Analysis of Variance (ANOVA) and a post hoc test of Duncan was used to compare the effect of metals on the behavior of bacteria. The results show that heavy metal concentrations had an inhibitory effect on bacteria growth. Copper was the metal with higher toxicity and it increased when adding zinc to the media. Significant differences were found between sites ( $P < 0.05$ ). The tributary with high concentrations of heavy metals was the site with higher number of resistant bacteria. Resistance to copper was found in two strains and a resistance gene for zinc (CzCc) was also found.

**Key words:** Bacteria, heavy metals, mining, PCR, resistance.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. METODOLOGÍA .....</b>	<b>5</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>22</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>23</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>24</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>29</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Cebadores utilizados en el análisis de PCR.....	9
2. Parámetros fisicoquímicos.....	11
3. Unidades formadoras de colonia (UFC/mL) en medio agar R2A diluido (DR2A), diferentes concentraciones de metales y sitio de muestreo del río Arkansas. ....	12
4. Unidades formadoras de colonia (UFC/ml) en medio basal microbiológico (BMM), diferentes concentraciones de metales y sitios de muestreo del río Arkansas. ....	12
5. Prueba de Kruskal-Wallis para concentración de metales en medio DR2A ...	13
6. Comparación de medias por concentración de metales en medio DR2A .....	13
7. Análisis de Varianza con dos factores para los UFC/mL del medio BMM ....	14
8. Comparación de medias por sitio en medio BMM.....	14
9. Comparación de medias por concentración de metales en medio BMM .....	15
10. Bacterias resistentes identificadas .....	15
Figuras	Página
1. Mapa del río Arkansas, Estados Unidos.....	6
2. Localización de los sitios de muestreo en el río Arkansas, Leadville, Colorado. ....	7
3. Diseño experimental del estudio .....	8
4. Crecimiento de bacteria ST21, proveniente de medio DR2A sitio AR1, inoculada en medios líquidos DR2B con metales y sin metales .....	16
5. Crecimiento de <i>Sphingobacterium</i> , proveniente de medio DR2A + Cu sitio AR1, inoculada en medios líquidos con metales y sin metales .....	17
6. Crecimiento de bacterias en medio líquido DR2B + Cu .....	18
7. Crecimiento de bacterias en caldo DR2B + Cu + Zn .....	19
8. Gel de electroforesis para genes resistentes .....	20
9. Gel de electroforesis de <i>Sphingomonas</i> con primer CzCc .....	21

Anexos	Página
1. Bacteria ST152, proveniente de medio DR2A, sitio AR5 inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc. ....	29
2. Bacteria ST244, proveniente de medio DR2A + Zn, sitio AR5 inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc. ....	30
3. Bacteria ST547, proveniente de medio DR2A + Cu, sitio CG inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc. ....	30
4. Bacteria ST486, proveniente de medio DR2A + Cu + Zn, sitio CG inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc. ....	31
5. Bacteria ST300, proveniente de medio DR2A, sitio CG inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc. ....	31
6. Crecimiento de bacterias en caldo DR2B. ....	32
7. Crecimiento de bacterias en caldo DR2B con presencia zinc. ....	32
8. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para número de bacterias en el medio DR2A. ....	33
9. Prueba de homogeneidad de la varianza en número de bacterias en medio DR2A. ....	33
10. Prueba de Kruskal-Wallis para número de bacterias entre sitios, en medio DR2A. ....	33
11. Comparación de medias de número de bacterias en medio DR2A con concentraciones de metales. ....	34
12. Comparación de medias por sitio en medio DR2A. ....	34
13. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los sitios en medio BMM. ....	34
14. Protocolo para elaboración de un litro de medio agar R2A. ....	34
15. Protocolo para elaboración de un litro de medio BMM. ....	35
16. Componentes para un análisis de PCR. ....	35
17. Bacterias en medio DR2A y BMM sin metales, provenientes de AR5. ....	35
18. Bacterias en medio DR2A y BMM con cobre, provenientes de AR5. ....	36
19. Bacterias en medio DR2A y BMM con zinc, provenientes de AR5. ....	36
20. Bacterias en medio DR2A y BMM con cobre y zinc, provenientes de AR5. ...	36

# 1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso indispensable para cualquier organismo vivo, sin embargo, a pesar de ser un componente fundamental para el funcionamiento de la Tierra, su disponibilidad es limitada. La distribución del agua disponible en el mundo es de 1,386 millones de km<sup>3</sup>, de los cuales aproximadamente el 97% es agua salada y el resto es agua dulce. Del 3% de agua dulce disponible, aproximadamente 70% se encuentra en los glaciares (Comisión Nacional del Agua [CONAGUA], s.f.). El agua, además de ser indispensable para sobrevivir, también es un componente crucial para la economía a nivel mundial, ya que es un requerimiento para la producción agrícola e industrial.

La contaminación del agua es uno de los grandes problemas que limita el acceso a agua y el deterioro de ecosistemas. Muchos países están estancados económicamente debido al incremento de enfermedades por deficiente calidad de agua e inadecuado manejo del recurso (Academia Nacional de Ciencias, 2007). Asimismo, a este problema se le suma el crecimiento poblacional exponencial que se está experimentando. Para el año 2014, la población era de 7,200 millones de habitantes y con la elevada tasa de crecimiento demográfico se prevé que para el 2025 la población mundial sea de 8,100 millones de habitantes y 9,600 millones para el 2050 (Naciones Unidas, 2014).

La contaminación de los ríos se origina de diferentes actividades humanas, entre ellas la minería, industria alimentaria, actividades agrícolas o forestales, entre otras actividades. La contaminación de los ríos afecta las actividades económicas como el turismo, la pesca y la recreación. Asimismo, esta contaminación también afecta a la salud de las personas cuando utilizan el agua contaminada para consumo humano o incluso cuando se ingieren mariscos provenientes de aguas contaminadas. Debido a la contaminación del agua, no solamente seres humanos son afectados, también animales, plantas y microorganismos que consumen el agua contaminada (Escobar, 2002).

La minería, a pesar de brindar muchos beneficios económicos, es una de las principales industrias contaminantes. El drenaje ácido de minas es agua con pH menor a 5 proveniente de los residuos de las minas. Este se da cuando el potencial ácido de los componentes es mayor al potencial de neutralización de los mismos (Xu, Xie, Chen, Wang y Wu, 2008). Para la generación de ácidos con altas concentraciones de metales se requiere de minerales, agua o un ambiente húmedo y un agente oxidante, el cual en la mayoría de los casos es el oxígeno (Akcil y Koldas, 2006). Cuando una mina está activa, este proceso no es de mucha importancia, sin embargo en minas cerradas y abandonadas, el nivel freático puede incrementar y causar una descarga de agua contaminada con ácidos y metales pesados (Johnson y Hallberg, 2005).

El río Arkansas tiene 1,469 millas de largo, con su origen cerca de la ciudad de Leadville, Colorado. Este río atraviesa cuatro Estados de Estados Unidos (Colorado, Kansas, Oklahoma y Arkansas) hasta confluir con el río Mississippi. En Colorado, un área de 26,150 mi<sup>2</sup> drenan este río. El río divide dos provincias fisiográficas, Great Plains al este y las Montañas Rocosas al oeste. Una de las principales actividades recreativas en Colorado es la pesca, lo cual aporta al sector económico, por lo que si se reduce la población de peces debido a contaminación de los ríos, también se reducen los ingresos económicos. Debido a su extensión y a la variedad de usos, el río Arkansas transporta muchos contaminantes (L. Harrington y J. Harrington 2003).

El río Arkansas ha sido afectado por operaciones mineras en años anteriores, por lo cual se han realizado muchos estudios acerca de la contaminación y calidad de su agua (Clements y Kiffney, 1994). Solamente en Colorado, 230 minas continúan drenando ácidos y metales pesados, contaminando 1,645 millas de flujo de agua en los ríos y arroyos del Estado, incluyendo segmentos del río Arkansas (Finley, 2015). Se realizó un programa de 17 años para la restauración de la calidad del río y se evaluó la efectividad de diferentes actividades como reforestación y plantas de tratamiento de agua. Estudios posteriores mostraron que aún se encuentran elevadas concentraciones de algunos metales que afectan los ecosistemas acuáticos (Clements, Vieira y Church, 2010).

La biomagnificación es la acumulación de nutrientes u otros elementos en diferentes niveles de la cadena trófica. Este término es de suma importancia cuando se habla de contaminación de ríos, ya que entre los diferentes niveles están las plantas, microorganismos, animales y humanos. Cada ser vivo responde de manera diferente a cada contaminante, sin embargo niveles superiores en la cadena trófica pueden bioacumular más que organismos en niveles inferiores (Plata, Campos y Ramírez, 1993).

Los metales pesados conforman un grupo de alrededor de 40 elementos en la tabla periódica. Dentro del grupo de los metales más tóxicos se encuentran el mercurio (Hg), cobalto (Co), cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), zinc (Zn), plomo (Pb) y níquel (Ni) (Hassen, Saidi, Cherif y Boudabous, 1998). Los metales pesados tienen una alta movilidad en ecosistemas acuáticos, incluyendo macro y microorganismos. Debido a que los metales no son biológicamente degradables, suelen acumularse en distintos niveles de la cadena trófica (Villanueva y Botello, 1992). Es por ello que se le debe tomar importancia a las alteraciones ecosistémicas que resulten en deposición de metales pesados a cuerpos de agua.

Los metales pesados pueden modificar la flora bacteriana y alterar las funciones de algunos organismos vivos, incluso estos seres vivos pueden generar resistencia a los metales pesados e incrementar la bioacumulación de ellos (Moraga, Merino y Mondaca, 2003). Las bacterias son uno de los principales organismos que son objeto de estudio, ya que realizan funciones vitales en los ecosistemas. Adicionalmente, las bacterias son microorganismos que contienen grandes cantidades de carbono orgánico particulado, transfiriendo este carbono a niveles superiores de la cadena alimenticia, como a peces y plantas (Artolozaga, Ayo, Azúa, Unanue e Iriberry, 2010). Las bacterias producen polisacáridos que brindan cohesión a las partículas del suelo, incrementando su capacidad de retener nutrientes para el fitoplancton (Rosas, Cravioto y Escurra, 2004).

Todos los metales pesados, en diferentes concentraciones, tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias (Hassen et al., 1998). Existen dos causas de la resistencia de metales en bacterias, la primera es cuando las bacterias han sido expuestas a estos contaminantes por períodos prolongados de tiempo y generan un grado de tolerancia hacia ellos mediante una transformación fisiológica. La segunda es cuando las bacterias evolucionan genéticamente para obtener esta resistencia por selección natural de genes resistentes (Klerks y Weis, 1987).

El estudio de microorganismos es muy complejo ya que ellos son muy influenciados por el ambiente en el que habitan. No es lo mismo comparar el crecimiento microbiológico en medios de crecimiento con condiciones controladas con el crecimiento microbiológico en su medio natural. Al hablar del crecimiento microbiológico, existe una gran variedad de medios de cultivo dependiendo del organismo que se quiere hacer crecer. Para que un microorganismo crezca, este necesita alimentarse de nutrientes y otros elementos que le brinden energía para realizar los ciclos celulares (Instructions Fetch Unit [IFU], s.f.).

Para la identificación de genes resistentes a metales pesados en bacterias, el método más utilizado es el de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), amplificando el gen ARNr 16S de cada miembro de la comunidad microbiana seguido de su secuenciación. Esta técnica se caracteriza por ser eficiente y obtener resultados fáciles de analizar (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013). Mediante esta técnica, se amplifica un fragmento del ADN de manera exponencial y se hacen réplicas de él (Rodríguez y Rodríguez 2006). El PCR consiste en tres pasos, primero la desnaturalización, el alineamiento de los primers o cebadores y finalmente la elongación mediante la enzima Taq ADN polimerasa (González, s.f.). La amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S es utilizado para hacer comparaciones filogenéticas entre organismos procariontes y su identificación (Rodicio y Mendoza, 2004).

El límite permitido de concentración de Cu es de 0.02 mg/L para ecosistemas de agua dulce. En cambio, el valor máximo permitido para Zn en ecosistemas de agua dulce es de 1 mg/L (Schneider, 1971). Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (2002), la toxicidad de los metales pesados depende de la dureza expresada como carbonatos de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Para concentraciones de dureza de 50, 100 y 200 mg/L, la concentración de zinc no debe exceder los 180, 320 y 570  $\mu\text{g/L}$  respectivamente (EPA, 2002). En cambio, para concentraciones de dureza de 50, 100 y 200 mg/L, la concentración de cobre no debe exceder los 12, 22 y 43  $\mu\text{g/L}$  respectivamente (EPA, 1980). Un estudio realizado sobre metales pesados en el río Arkansas en Colorado, muestra concentraciones de Zn en un rango de 1 – 1,000  $\mu\text{g/L}$  y de 0.1 – 15  $\mu\text{g/L}$  con respecto al Cu. Ese mismo estudio también midió metales en el sitio de origen, California Gulch, y se encontraron concentraciones de hasta 1,300 mg/L de Cu y 14,000 de Zn (Kimball, Callender, y Axtmann, 1995).

Con el fin de evaluar los impactos de la minería metálica en ecosistemas acuáticos del Río Arkansas, esta investigación contó con los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto de metales pesados en el número de bacterias presentes en el río Arkansas.
- Comparar la toxicidad del cobre, zinc y su interacción de acuerdo al efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias.

- Comparar el crecimiento bacteriano entre los sitios aguas arriba, fuente de contaminación y aguas abajo.
- Caracterizar la resistencia de las bacterias hacia los metales pesados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Ubicación.**

El estudio se realizó en el río Arkansas, Leadville, Colorado, Estados Unidos (Figura 1). Las muestras de agua y sedimentos fueron tomadas a finales de invierno, el día 20 de marzo de 2017. Se muestrearon tres sitios diferentes del río Arkansas, aguas arriba; Arkansas River 1 (AR1), aguas abajo; Arkansas River 5 (AR5) y California Gulch (CG) como tributario de metales pesados provenientes de viejas minas. (Figura 2). El sitio AR1 se encuentra localizado previo a la contaminación por metales pesados provenientes del sitio CG y se tomó como el área de control. AR5 está localizado después de CG y se tomó como el área impactada. Se tomaron tres muestras de agua con sedimentos en cada sitio, para así tener tres réplicas de los tres diferentes sitios. Las muestras fueron tomadas con intervalos de cinco minutos entre cada muestra por sitio.

Las muestras fueron colectadas en tubos cónicos de plástico y transportadas en hielo hacia el Laboratorio de Ecología y Recursos Naturales (NREL) de la Universidad Estatal de Colorado, Fort Collins, Colorado, donde se almacenaron en un cuarto frío a 4 °C hasta el momento de inocular las bacterias en los medios de crecimiento. Se midieron las concentraciones de metales con ayuda de un espectrómetro, la temperatura y el pH se midieron directamente con un multiparámetro y la dureza se midió en laboratorio. El caudal se midió mediante un aforo con molinete.

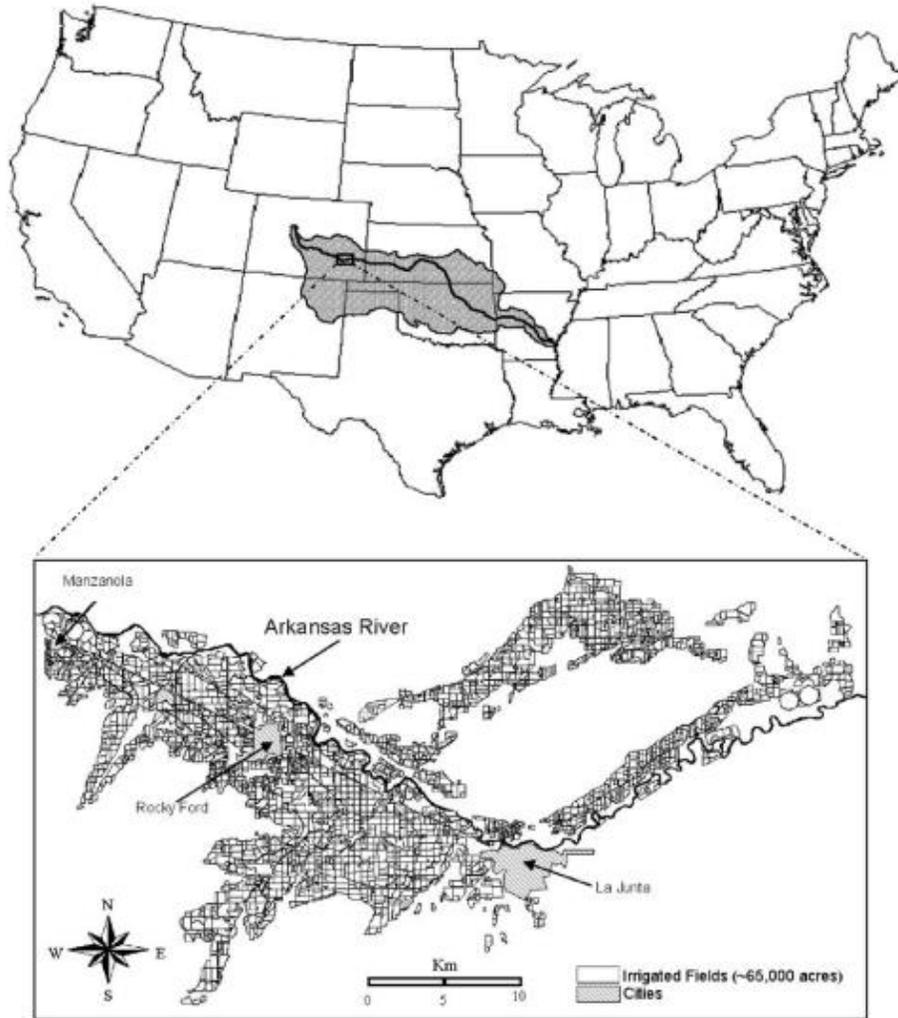


Figura 1. Mapa del río Arkansas, Estados Unidos.  
Fuente: Houk et al. (2006).

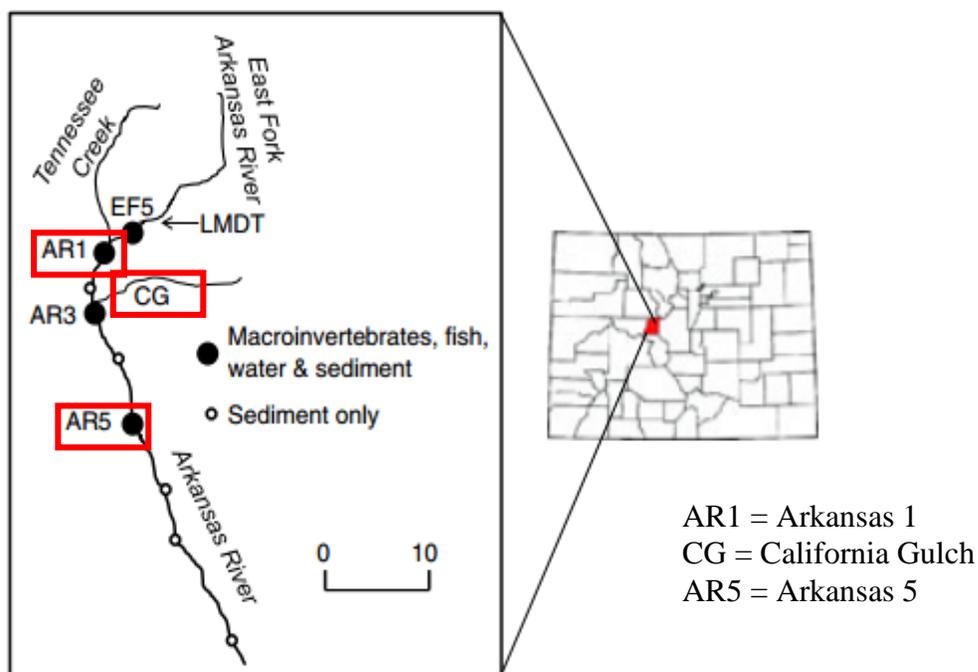


Figura 2. Localización de los sitios de muestreo en el río Arkansas, Leadville, Colorado. Adaptado de Clements et al. (2010).

### Preparación de medios de crecimiento.

Los medios de crecimiento utilizados fueron: (1) Medio Basal Microbiológico (BMM por sus siglas en inglés), el cual es utilizado para inocular bacterias de agua dulce, pues provee un medio de crecimiento con la combinación apropiada de diferentes componentes como carbono y energía (Tanner, 2007) y (2) medio agar R2A, el cual está diseñado para inocular bacterias en agua potable. El medio agar R2A se utilizó en forma diluida (DR2A por sus siglas en inglés) para proveer un ambiente más oligotrófico. Adicionalmente, se agregaron los metales cobre y zinc en forma de sulfatos,  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$  respectivamente, a los medios para que solamente las bacterias con genes resistentes pudieran crecer. Se inocularon muestras en platos Petri solamente con BMM y DR2A como control, solamente cobre, zinc y finalmente la combinación de ambos, cobre y zinc. Estas combinaciones se realizarán con el motivo de obtener las bacterias resistentes solamente al cobre, solamente al zinc y las bacterias resistentes a ambos metales.

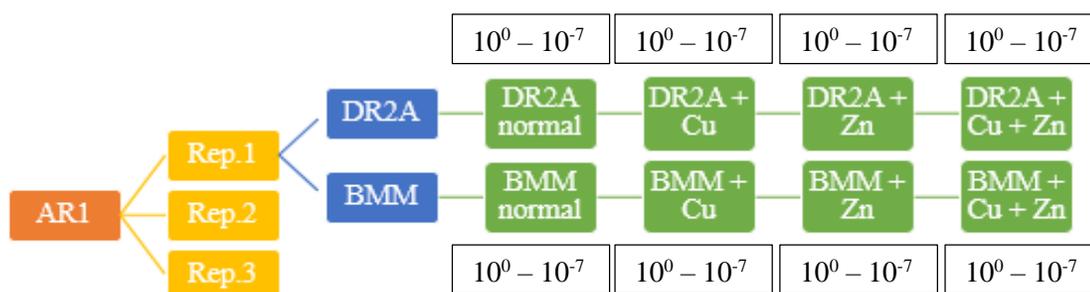
Estudios preliminares con diferentes concentraciones de metales fueron realizados en el mes de enero y febrero de 2017 en Fort Collins, Colorado. Se probó con 25 ppb para Cu y 650 ppb para Zn con agua de un arroyo cerca de la Universidad Estatal de Colorado llamado Spring Creek, pero el crecimiento de las bacterias era el mismo en los platos Petri con metales y sin metales, por lo que se decidió probar con concentraciones más altas. Se realizaron ensayos preliminares con Cu a 25 ppm y Zn a 650 ppm. En este caso, la concentración de Cu fue muy baja pero la de Zn muy alta. Se realizaron pruebas con ambos metales a 200 ppm, pero no se encontró crecimiento alguno. Seguidamente se realizaron pruebas con ambos metales a 100 ppm, pero los resultados fueron igual que con 200 ppm. Finalmente se probó Cu a 25 y 50 ppm y Zn a 150, 100, 50 y 25 ppm. De acuerdo al conteo

de UFC/mL se decidió utilizar concentraciones de Cu y Zn a 50 ppm ambos metales. Los metales en estas concentraciones inhiben el crecimiento de bacterias, sin embargo, bacterias resistentes pueden crecer en los platos Petri.

Después de optimizar las concentraciones de metales y comprobar que las concentraciones fueran las adecuadas para el estudio, se realizaron ensayos previos con agua y sedimentos de dos ríos de la ciudad Fort Collins, Colorado, Cache la Poudre y El Dorado. Se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) con nivel de significancia del 5% y se demostró que ambos ríos no son significativamente diferentes en cuanto al crecimiento bacteriano. El crecimiento de bacterias fue similar en ambos ríos y cuando se agregaron los metales, las poblaciones de ambos ríos decrecieron, ya que ambos ríos son considerados saludables y expuestos a las mismas condiciones. De acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos preliminares, se decidieron las concentraciones a utilizar en el estudio. En cuanto a la replicabilidad de los ensayos en el río Arkansas, se esperaba que el crecimiento de bacterias aguas arriba fuera similar a estos dos ríos, Cache la Poudre y El Dorado, ya que es la zona no impactada por contaminación por metales pesados y se esperaba encontrar diferencias significativas aguas abajo por ser la zona impactada.

### Diseño experimental.

El estudio se desarrolló en diseño factorial de bloques completos al azar con un arreglo de 3 x 3 x 4, donde los bloques fueron los sitios y los factores fueron: sitio (AR1, AR5 y CG), réplica (1, 2 y 3) y concentración de metales (control, Cu, Zn y Cu + Zn) en dos diferentes medios de cultivo, BMM y Agar DR2A. Adicionalmente, se contó con ocho diluciones en serie ( $10^0 - 10^{-7}$ ) en cada medio con concentraciones de metales. Para esto se prepararon 576 platos Petri, tomando en cuenta los tres sitios, las tres réplicas por sitio, los ocho tratamientos y ocho diluciones en serie (Figura 3).



BMM = Medio Basal Microbiológico.  
DR2A = Agar R2A en forma diluida.

Figura 3. Diseño experimental del estudio.

### Inoculación y cuantificación de la comunidad microbiana.

Se realizaron ocho diluciones en serie de cada muestra de agua colectada en los diferentes sitios, con el fin de obtener un número de bacterias posibles de contar (30-300 UFC). Tomando 100  $\mu$ L de la cada dilución se inocularon las muestras en platos Petri con los

medios de crecimiento previamente descritos. Después de dos semanas se realizó el primer conteo de bacterias que pudieron crecer en diferentes condiciones. Se realizaron conteos de bacterias los lunes de cada semana, durante cuatro semanas. Las muestras fueron incubadas a 20 °C durante toda la investigación (Kalmbach, Manz, Werner y Szewzyk, 1997).

### **Identificación de bacterias resistentes.**

Se realizó análisis de PCR para identificar las bacterias con alguna resistencia al cobre, al zinc o a ambos metales. Para su preparación, se agregó una pre mezcla de GoTaq Green que contiene una enzima Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y buffers. Seguido de realizar la mezcla de GoTaq Green, se tomó 10 µL de ella para cada bacteria a secuenciar, 1 µL de cada cebador (27F y 1492R), 8 µL de agua molecular y finalmente una alícuota de la bacteria, es decir, con ayuda de la punta de una pipeta se tomó una colonia y se colocó dentro de la mezcla. Se dejaron las muestras en el termociclador, el cual realizó el proceso con un inicio a 95 °C por 10 minutos, con el objetivo de activar por calor las polimerasas, luego la desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C y la extensión a 72 °C por 10 minutos, este proceso se realizó en 30 ciclos. Luego, se confirmó la presencia de la banda para secuenciar e identificar las bacterias. Para este proceso, se preparó un gel con 1% de agarosa y se realizó una electroforesis para medir el fragmento de ADN amplificado, con ayuda de una escalera llamada “GenRuler” y rayos UV (Bhakta, Munekage, Ohnishi, Jana y Balcazar, 2014).

### **Determinación de perfiles de resistencia y genes resistentes a metales.**

Utilizando una placa de microtitulación de 96 pocillos y un lector de plato fluorescente, se crearon gráficas y perfiles de resistencia de nueve bacterias, de diferente proveniencia, en diferentes tipos de medio con concentraciones de metales en cortos períodos de tiempo. Con esto se determinó qué bacterias o grupo de bacterias son resistentes y su desarrollo con y sin metales. Con estas poblaciones, utilizando PCR y añadiendo cebadores para los genes resistentes ya identificados (CopA y CzCc para cobre y zinc respectivamente), se determinó qué gen resistente es responsable de la resistencia de las bacterias (Silver y Walderhaug, 1992) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cebadores utilizados en el análisis de PCR.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'- 3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Referencia</b>
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	(Morillo y Miño, 2011)
1492R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1500	(Morillo y Miño, 2011)
CopA	GGGCAGCGCTTACTGGTAGGCTCAC	1200	(Altamira, 2010)
CzCc	GGTCAGCATCGGCAGCAAGTACG	1200	(Perron et al., 2004)

**Análisis estadístico.**

A las variables de sitio y medios de cultivo se les aplicó el test de Shapiro-Wilk para conocer la normalidad de los datos y el test de Levene para conocer la homocedasticidad de varianza. Para aquellos datos cuya distribución no fue normal, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0.05. Para datos con distribución normal se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con un modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés) de dos factores y una prueba post hoc de Duncan con un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó el programa “IBM SPSS Versión 19.0” para el análisis estadístico de los datos obtenidos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Parámetros fisicoquímicos.

Los parámetros físicos y químicos medidos en los tres sitios de muestro en el río Arkansas (AR1, AR5 y CG) fueron pH, temperatura, dureza, conductividad eléctrica y caudal. Una muestra por sitio fue tomada para determinar la concentración de zinc en laboratorio y los valores reportados para cobre son valores históricos. El cuadro 2 presenta los resultados de los parámetros físicos y químicos del agua del río Arkansas.

Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo seleccionados, Arkansas 1, Arkansas 5 y California Gulch.

Sitio	Zn ( $\mu\text{g/L}$ )	Cu ( $\mu\text{g/L}$ )	Dureza ( $\text{mg/L}$ )	pH	Conductividad Eléctrica ( $\mu\text{S/cm}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Caudal ( $\text{m}^3$ )
AR1	21.5	0.1-15	112	8.26	231.7	3.1	0.174
AR5	139.8	&	114	8.86	267.5	3.1	0.678
CG	604.5	1,300	699	8.10	1315	4.3	0.578

&Sin datos.

Fuente: Kimball et al. (1995).

El pH se encontró en un rango de 8.26 – 8.10. La temperatura se encontró en un rango de 3 – 4.3  $^{\circ}\text{C}$  debido a encontrarse en época de invierno. En cuanto a dureza, en los sitios AR1 y AR5 fue de 112 y 114  $\text{mg/L}$  respectivamente, en cambio en CG, la dureza encontrada fue de 699  $\text{mg/L}$ . Los valores de dureza han incrementado desde el 2010, los cuales eran valores de 77.9  $\text{mg/L}$  en AR1 y 84.9  $\text{mg/L}$  en AR5 (Clements et al., 2010). La dureza es un parámetro de importancia al hablar de metales pesados, ya que al incrementar la dureza, disminuye la toxicidad de los metales (EPA, 2002). De acuerdo a la dureza y su relación con los metales pesados, todos los valores encontrados se encuentran bajo la normativa. Los valores de zinc fueron medidos en el laboratorio de la Universidad Estatal de Colorado, sin embargo, no se logró determinar las concentraciones actuales de cobre en el río Arkansas, por lo que se decidió utilizar los valores encontrados en estudios previos.

La contaminación por metales pesados provenientes de drenaje de minas suele persistir y ser transferidos a ecosistemas acuáticos, incluso hasta 100 años después del cierre de la mina (Merrington y Alloway, 1994). Johnson y Thornton (1987), en su estudio sobre los factores hidrológicos y químicos que controlan las concentraciones de metales pesados en

un río contaminado por drenaje ácido de minas encontraron que las concentraciones de Cu y Zn son directamente proporcionales al caudal (Johnson y Thornton, 1987).

### **Cuantificación de la comunidad microbiana.**

El cuadro 3 presenta el conteo de bacterias en UFC/mL en el medio DR2A con los tratamientos, DR2A, DR2A + Cu, DR2A + Zn y DR2A + Cu + Zn; expresados en forma logarítmica después de los cuatro conteos. Se promedió el número de bacterias encontradas en las ocho diluciones, para los ocho tratamientos en todas las réplicas y los sitios.

Cuadro 3. Unidades formadoras de colonia ( $\text{Log}_{10}$  UFC/mL) en medio agar R2A diluido (DR2A), diferentes concentraciones de metales y sitio de muestreo del río Arkansas.

<b>Medio</b>	<b>AR1</b>			<b>AR5</b>			<b>CG</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
DR2A	5.56	5.73	5.04	5.26	5.98	5.23	5.67	6.70	5.29
DR2A + Cu	1.36	1.06	0.81	0.93	1.26	0.74	1.63	2.52	1.30
DR2A + Zn	4.13	4.06	3.47	3.60	4.52	3.41	4.68	5.63	4.40
DR2A + Cu + Zn	1.79	0.78	1.04	1.33	1.52	0.85	1.26	1.97	1.60

En el cuadro 4 se presenta el conteo de bacterias en UFC/mL en el medio BMM con los tratamientos, BMM, BMM + Cu, BMM + Zn y BMM + Cu + Zn; expresados en forma logarítmica.

Cuadro 4. Unidades formadoras de colonia ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ml) en medio basal microbiológico (BMM), diferentes concentraciones de metales y sitios de muestreo del río Arkansas.

<b>Medio</b>	<b>AR1</b>			<b>AR5</b>			<b>CG</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
BMM	6.12	5.36	5.40	5.38	5.32	5.33	3.94	6.37	5.69
BMM + Cu	2.48	2.32	1.58	2.05	2.47	1.91	3.14	3.65	2.44
BMM + Zn	3.25	3.04	3.19	2.81	3.31	3.06	3.60	5.53	4.11
BMM + Cu + Zn	1.36	1.64	1.18	2.34	2.03	0.90	1.85	3.23	1.90

Todos los datos obtenidos fueron transformados a escala logarítmica y se aplicó un test de normalidad de Shapiro-Wilk y un test de homocedasticidad de Levene. Para el medio DR2A no se encontró una distribución normal, por lo tanto se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La prueba mostró diferencias significativas en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de metales (Cuadro 5). Sin embargo, en la prueba de Kruskal-Wallis para los sitios, no se encontró diferencias significativas. Este resultado pudo haber sido obtenido debido al tipo de medio utilizado, DR2A, ya que provee un ambiente oligotrófico para el crecimiento de bacterias. En cambio, para el medio BMM si se encontró diferencias significativas entre los sitios de muestreo (Cuadro 7).

Cuadro 5. Prueba de Kruskal-Wallis para crecimiento de bacterias en medio DR2A con concentraciones de Cu y Zn.

<b>Parámetros</b>	<b>UFC/mL</b>
Chi-cuadrado	28.869
Significancia	0.000

Al encontrar diferencias significativas entre los medios de cultivo con metales pesados, se procedió a realizar una prueba de medias. El medio de control, DR2A sin metales pesados, obtuvo la media más alta. Esto debido a que los metales pesados tienen un efecto inhibitorio en las bacterias. Asimismo, el medio con zinc obtuvo la segunda media más alta (Cuadro 6). Esto concuerda con el estudio de Hassen et al. (1998), en el cual muestran que zinc tiene menor toxicidad y efecto inhibitorio en bacterias en comparación con el cobre.

Cuadro 6. Comparación de medias para crecimiento de bacterias en medio DR2A con concentraciones de Cu y Zn.

<b>Medio</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típica</b>
DR2A	5.6067 A	.50540
DR2A + Cu	1.2910 C	.54301
DR2A + Zn	4.2104 B	.70332
DR2A + Cu + Zn	1.3324 C	.40350

<sup>ABC</sup>Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba post hoc de Duncan.

Debido a que los datos obtenidos del medio BMM siguieron una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk ( $P > 0.05$ ), se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de dos factores con un nivel de significancia del 5% ( $P < 0.05$ ). Se encontró diferencias significativas entre sitios y entre medios ( $P < 0.05$ ), sin embargo no se encontró diferencias en su interacción ( $P < 0.05$ ). El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue alto (88.6%), expresando que los datos se ajustaron bien al modelo lineal, es decir, los factores explican un 88.6% la variación con respecto al número de bacterias. El  $R^2$  también indica que se

controló muy bien el error experimental al momento de tomar los datos (Cuadro 7). Después de encontrar diferencias significativas, se realizó una prueba post hoc de Duncan.

Cuadro 7. Análisis de varianza con dos factores para los UFC/mL del medio BMM.

<b>Origen</b>	<b>F</b>	<b>Significancia</b>
Modelo corregido	17.023	.000
Intersección	996.107	.000
Medio	56.810	.000
Sitio	5.096	.014
Interacción	1.105	.388

R cuadrado = .886 (R cuadrado corregida = .834).

El sitio con la media más alta, de acuerdo a la prueba post hoc de Duncan, fue California Gulch (CG) (Cuadro 8), esto puede relacionarse con bacterias resistentes a los metales presentes en dicho sitio, tributario del río Arkansas. Las bacterias, al estar en presencia de metales por períodos prolongados, se exponen a una selección de genes capaces de resistir a estos contaminantes (Silver y Walderhaug, 1992).

Cuadro 8. Comparación de medias del crecimiento de bacterias por sitio de muestreo en medio BMM con concentraciones de Cu y Zn.

<b>Sitio</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típica</b>
AR1	3.07 B	1.69
AR5	3.07 B	1.49
CG	3.78 A	1.45

<sup>AB</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba post hoc de Duncan.

De acuerdo a la prueba post hoc de Duncan, el medio de cultivo con mayor número de bacterias fue el medio BMM sin metales pesados. Con base en estos resultados se puede decir que los metales si tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias (Cuadro 9). Como mencionan Hassen et al. (1998), en su estudio sobre la resistencia de las bacterias hacia metales pesados, todos los metales pesados, generalmente tienen un efecto inhibitorio en las bacterias (Hassen et al., 1998). En los tratamientos, el cobre presentó mayor toxicidad en comparación con el zinc. Esto debido a que, según Akinbowale et al. (2007), el cobre tiene menor concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) que el zinc. Según Gaete y Chávez (2008), el cobre y zinc pueden presentar sinergia, adición o antagonismo en diferentes concentraciones. Para concentraciones de 1:1 en ambos metales, mostraron que se presentan como aditivos. Es decir, que el cobre y zinc en las mismas concentraciones se comportan de manera individual, aún en la mezcla de ambos.

Sin embargo, en el presente estudio se buscó determinar las bacterias resistentes a cobre, zinc y aquellas resistentes a ambos metales.

Cuadro 9. Comparación de medias del crecimiento de bacterias en medio BMM con concentración de metales.

Medio	Media	Desviación típica
BBM	5.4351 A	.67678
BBM + Zn	3.5455 B	.83480
BBM + Cu	2.4498 C	.62829
BBM + Cu + Zn	1.8253 D	.68962

<sup>ABCD</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba post hoc de Duncan.

#### **Bacterias resistentes identificadas.**

Con el análisis de PCR se identificaron tres géneros de bacterias resistentes a cobre y zinc, *Sphingomonas*, *Luteibacter* y *Sphingobacterium*. En el cuadro 10 se describen las bacterias resistentes encontradas y sus características.

Cuadro 10. Bacterias resistentes identificadas.

Género	Gram	Características	Referencia
<i>Sphingomonas</i> (ST244)	[-]	Estrictamente aerobia, monoflagelados con pigmentación amarilla, relacionada con plantas y no se ve afectada por ZnCl <sub>2</sub> .	(White, Sutton y Ringelberg, 1996)
<i>Luteibacter</i> (ST486)	[-]	Aerobia, monoflagelado con pigmentación amarilla, pertenece a la familia <i>Xanthomonadaceae</i> y está relacionada con suelo o rizósfera.	(Johansen, Binnerup, Kroer y Molbak, 2005)
<i>Sphingobacterium</i> (ST536)	[-]	Aerobia, pigmentación amarilla, usualmente encontrada en suelo, agua estancada o vegetación.	(Gupta, Logan, Elhag y Almond, 2016)

#### **Perfiles de resistencia.**

En cuanto al comportamiento, en la mayoría de los casos las bacterias tienen un crecimiento similar con medios sin presencia de metales. Debido a que las bacterias fueron tomadas de los platos Petri con concentraciones de cobre y zinc, algunas bacterias provenientes de platos Petri con medio con cobre o zinc presentan un crecimiento normal al inocularse en

caldos con cobre o zinc. Esto se puede relacionar con la realidad del río Arkansas, bacterias y otros organismos pueden generar resistencia a metales pesados.

Al inocularse en caldos DR2B, DR2B + Zn, DR2B + Cu y DR2B + Cu + Zn, la bacteria ST 121 mostró un comportamiento normal en el medio sin presencia de metales. Sin embargo, al agregar los metales, la bacteria no tuvo crecimiento alguno (Figura 4).

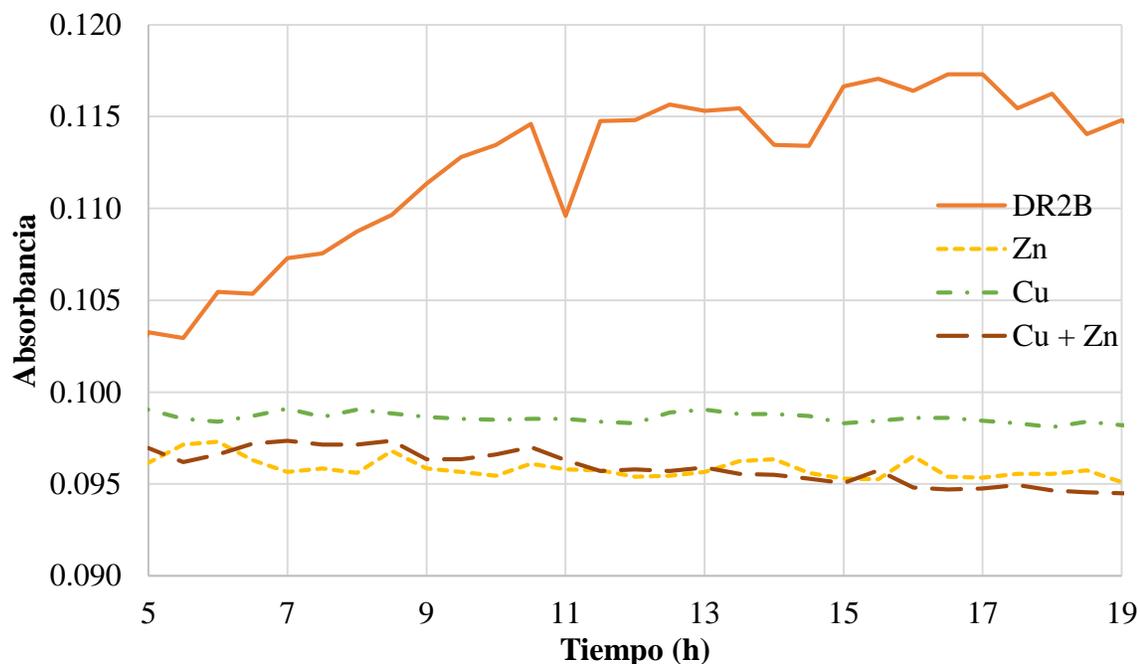


Figura 4. Crecimiento de bacteria ST21, proveniente de medio DR2A sitio AR1, inoculada en medios líquidos DR2B con metales y sin metales.

El género *Sphingobacterium* proviene de AR5 e inoculada previamente en plato Petri con medio DR2A + Cu. Al inocularse en medio líquido, DR2B con cobre, zinc y cobre y zinc, la bacteria presenta crecimiento normal sin presencia de metales y con presencia de cobre. La bacteria pudo haber generado cierta resistencia hacia el cobre debido a su crecimiento normal en presencia de dicho metal. En cambio, no hubo crecimiento en presencia de zinc, sin embargo en presencia de cobre y zinc su crecimiento fue poco, pero mayor en comparación con solamente zinc (Figura 5).

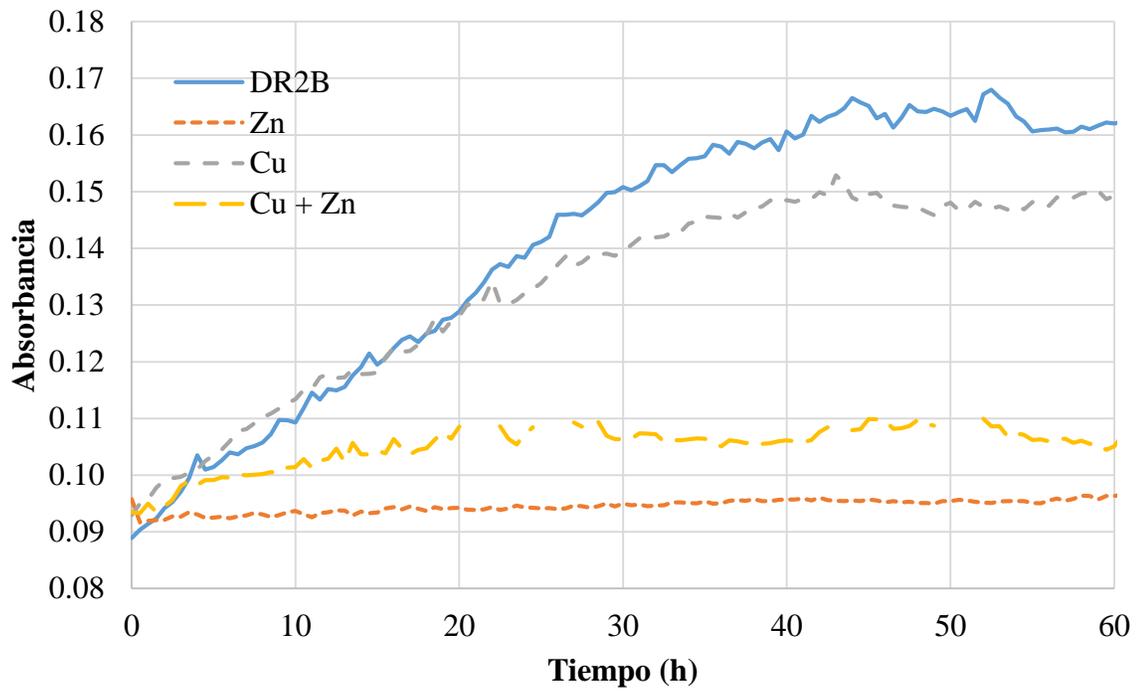


Figura 5. Crecimiento de *Sphingobacterium*, proveniente de medio DR2A + Cu sitio AR1, inoculada en medios líquidos con metales y sin metales.

El género *Luteibacter*, proveniente de CG e inoculada previamente en DR2A con cobre y zinc, también desarrolló un comportamiento normal con presencia de cobre. Los géneros *Sphingobacterium* y *Luteibacter* fueron los únicos de los seleccionados que lograron un crecimiento en medios con presencia de cobre (Figura 6).

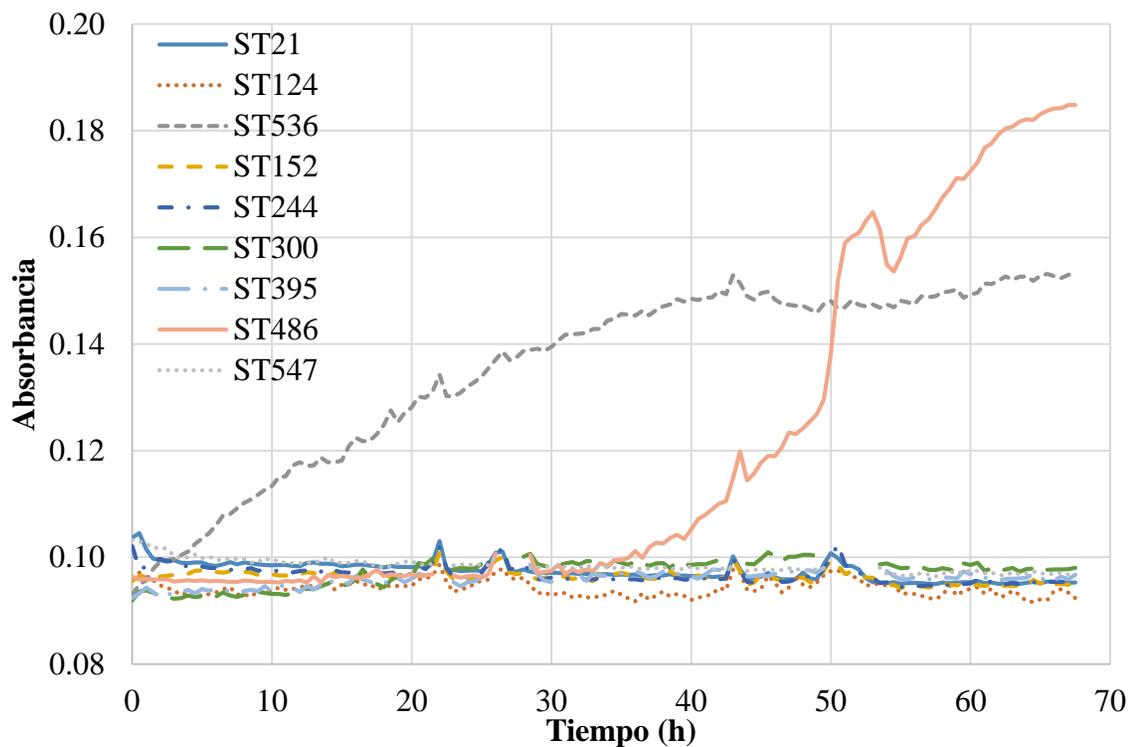


Figura 6. Crecimiento de bacterias en medio líquido DR2B + Cu.

En la figura 7 se muestra que a pesar del buen crecimiento del género *Luteibacter* en medio con cobre, al agregar zinc se presenta un efecto inhibitorio en su crecimiento. Sin embargo, el género *Sphingobacterium* sí tuvo un crecimiento en presencia de ambos metales.

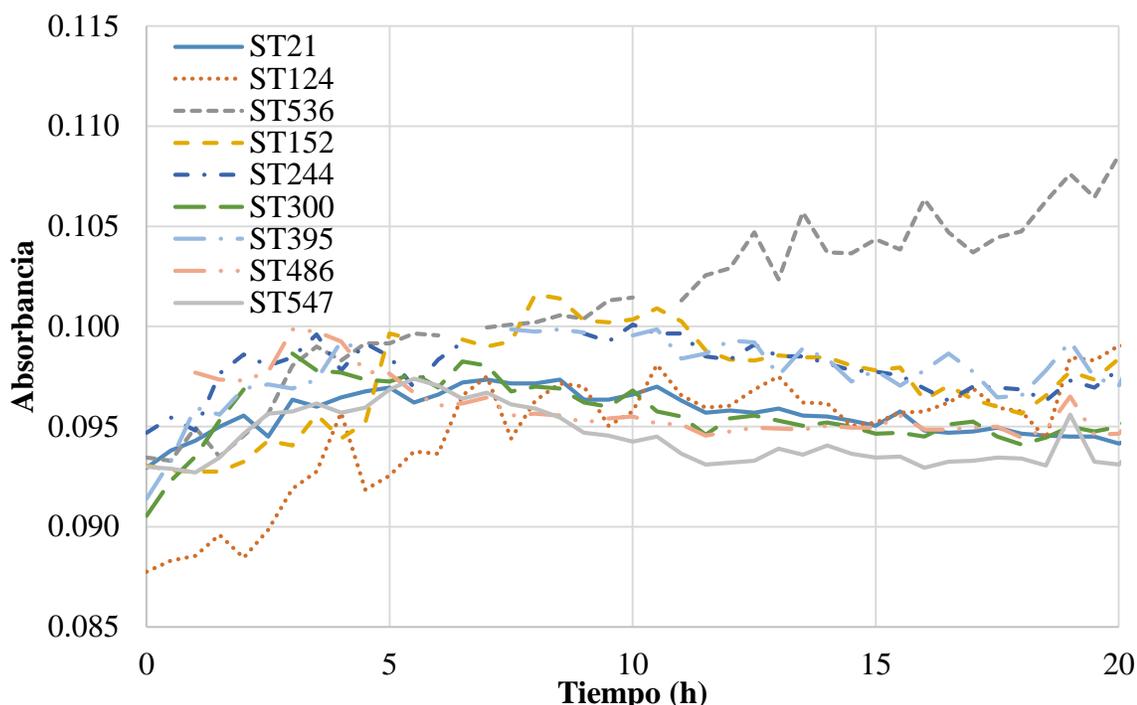


Figura 7. Crecimiento de bacterias en caldo DR2B + Cu + Zn.

La toxicidad de los metales concuerda con el estudio realizado por Cabrera et al. (2006), en el cual se utilizó  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$  para determinar la toxicidad de metales pesados en dos diferentes bacterias. Este estudio muestra una relación inversa entre la población de bacterias y el incremento de la concentración de metales (Cabrera, Pérez, Gómez, Abalos y Cantero, 2006). Otro estudio donde se evaluó la toxicidad de metales pesados en insectos acuáticos mostró que los insectos tienen una alta sensibilidad hacia los metales pesados y el metal más tóxico es el cobre. Asimismo, los peces son incluso más sensible a estos contaminantes (Warnick y Bell, 1969). Un estudio sobre la resistencia a metales pesados en bacterias de la bahía de Iquique mostró 11 cepas con cierta resistencia hacia el cobre, mayormente *Pseudomonas* (Moraga et al., 2003).

### Genes de resistencia.

Una vez conocida la identidad de las nueve bacterias, se procedió a realizar un análisis de PCR, pero esta vez con cebadores para genes resistentes ya conocidos. Los cebadores utilizados fueron CopA para resistencia en cobre y CzCc para resistencia en zinc. Solamente una de las cepas obtuvo la banda de amplificación con el cebador de Zinc, *Sphingomonas* (ST244) proveniente de AR5, DR2A + Zn. Esto muestra que las *Sphingomonas* presentan

un gen de resistencia hacia el zinc (Figura 8). El cebador CzCc fue utilizado anteriormente por Silver y Walderhaug (1992), en un estudio para evaluar la regulación genética de plásmidos y cromosomas en el transporte de iones inorgánicos en bacterias, en el cual encontraron bacterias sensibles a cadmio y cobalto, sin embargo todas las bacterias con el gen CzCc fueron resistentes a zinc (Silver y Walderhaug, 1992). Las *Sphingomonas* son un género de bacterias Gram negativo que no se ven afectadas por algunas sales, entre ellas el  $ZnCl_2$  (White et al., 1996). Esta podría ser una razón por la cual se obtuvo un gen de resistencia hacia el zinc en los ensayos realizados.

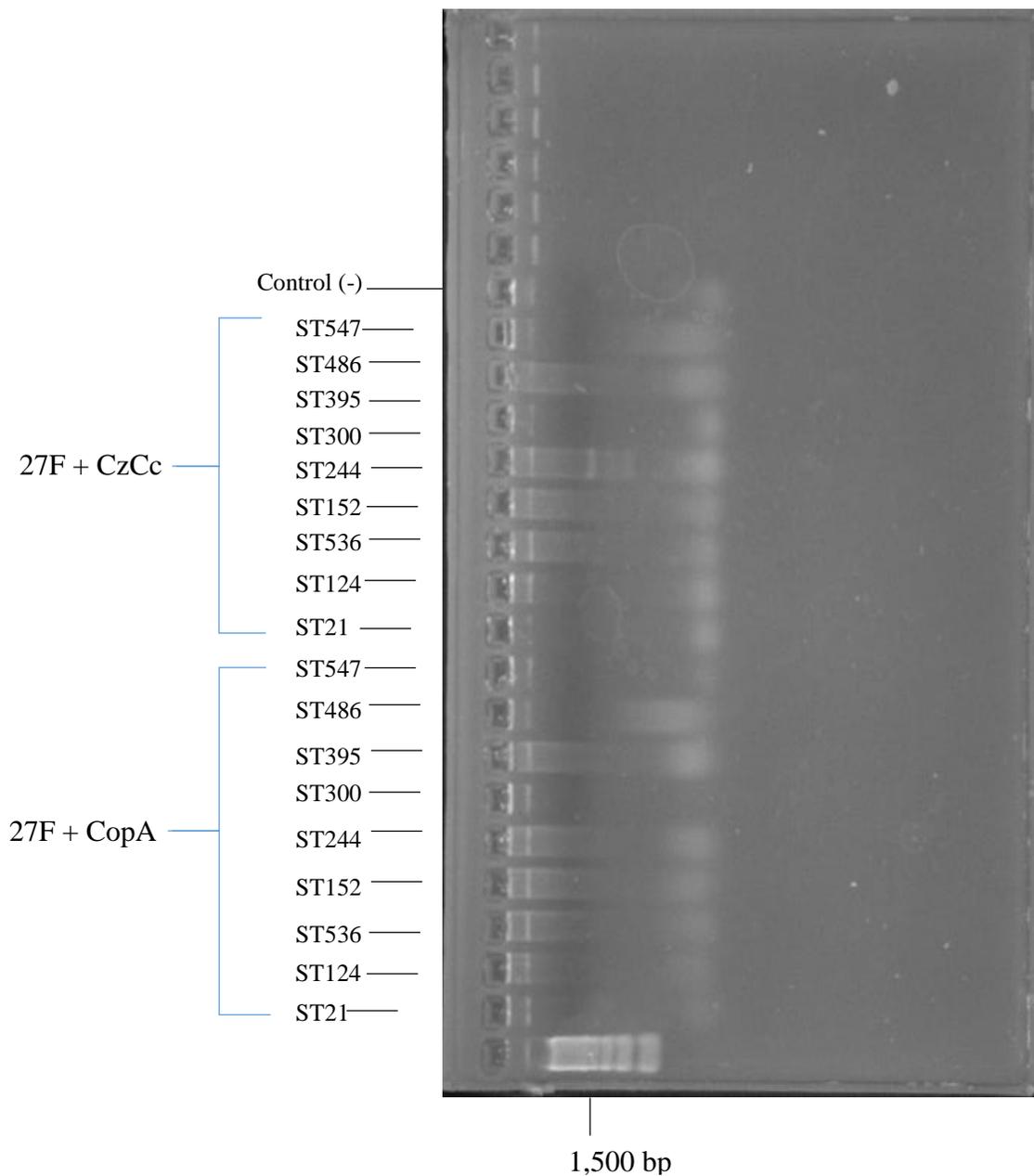


Figura 8. Gel de electroforesis para genes resistentes.

Para confirmar la presencia del gen resistente a zinc en *Sphingomonas* se realizó una repetición del PCR solamente para *Sphingomonas* (ST244) y nuevamente se obtuvo la banda de amplificación para dicho gen con el cebador CzCc (Figura 9).

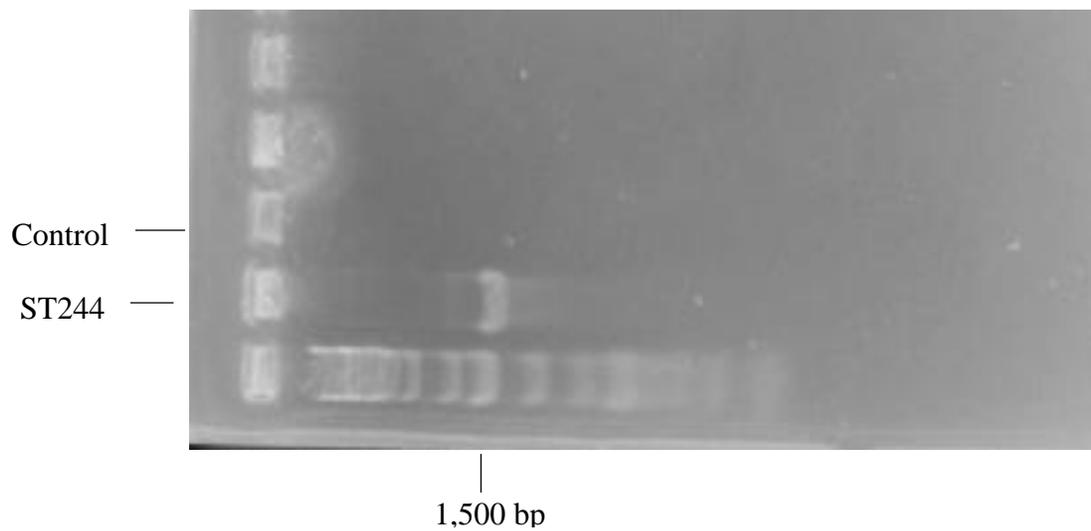


Figura 9. Gel de electroforesis de *Sphingomonas* con primer CzCc.

## 4. CONCLUSIONES

- Los metales pesados, cobre y zinc, tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias. Sin embargo, las concentraciones de metales pesados en el río sí cumplen con la normativa de la EPA en cuanto a la toxicidad de metales pesados en ecosistemas de agua dulce.
- El cobre a 50 mg/L fue el metal con mayor toxicidad y efecto inhibitorio en el número de bacterias del río Arkansas en comparación con el zinc. La inhibición fue aún mayor en los medios con presencia de ambos metales, cobre y zinc a 50 mg/L.
- Sí se encontraron diferencias significativas en el número de bacterias entre los sitios, aguas arriba (AR1), aguas abajo (AR5) y la fuente de contaminación (CG). El sitio CG fue el sitio con mayor crecimiento de bacterias en medios con metales pesados, por lo que la resistencia de bacterias hacia los metales pesados evaluados fue mayor en el sitio donde se encuentran mayormente expuestas a estos contaminantes.
- Los géneros *Sphingobacterium* y *Luteibacter* presentan una resistencia al cobre a 50 mg/L. Al agregar zinc a 50 mg/L solamente *Sphingobacterium* continúa con crecimiento normal. Con respecto a los genes de resistencia determinados con análisis de PCR, el género de las *Sphingomonas* muestra una banda del gen resistente a zinc, en cambio *Sphingobacterium* y *Luteibacter* no presentaron ninguna banda en ninguno de los cebadores para los metales evaluados en este estudio.

## 5. RECOMENDACIONES

- Replicar el estudio en las épocas de verano, primavera y otoño para conocer la variabilidad de bacterias y otros parámetros a lo largo del año. Debido a que muchos microorganismos son fuertemente influenciados por el ambiente en el que viven, la temperatura es un parámetro de importancia en su crecimiento. El tipo de bacterias puede variar de acuerdo a la temperatura del agua y el nivel de estrés en el que se encuentren.
- Al replicar el estudio, evaluar también la adición, sinergia y antagonismo entre los metales pesados. Puede ser que el cobre en presencia de zinc presente menor toxicidad que solamente en medio con cobre y viceversa.
- Tomar en cuenta un mayor número de bacterias para identificar genes de resistencia a los metales. Por razones de tiempo, solamente se tomaron nueve especies en este estudio.
- Aumentar el número de repeticiones en la medición de parámetros fisicoquímicos para poder realizar análisis estadísticos y comparaciones entre los sitios de estudio. Para realizar análisis estadísticos se necesitan tres o más repeticiones, sin embargo en esta investigación solo se tomó una medición de los parámetros fisicoquímicos por cada sitio. Es importante analizar estadísticamente los datos encontrados para evitar resultados subjetivos y poder respaldar la información brindada.

## 6. LITERATURA CITADA

- Academia Nacional de Ciencias (2007). *El agua potable segura es esencial*. Recuperado de: <https://www.koshland-science-museum.org/water/html/es/Overview/Why-is-Safe-Water-Essential.html>.
- Akcil, A. y Koldas, S. (2006). Acid Mine Drainage (AMD). Causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production* 14 (12-13), pp. 1139–1145. DOI: 10.1016/j.jclepro.2004.09.006.
- Akinbowale, O. L., Peng, H., Grant, P. y Barton, M. D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International journal of antimicrobial agents* 30 (2), pp. 177–182. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012.
- Altamira, F. (2010). Efectos de la exposición a cobre en altas concentraciones sobre la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas de la región de Valparaíso.
- Artolozaga, I., Ayo, Be., Azúa, I., Unanue, M. e Iriberry, J. (2010). Comunidades microbianas en sistemas acuáticos naturales. Recuperado de: [http://www.ehu.es/docuements/1622424/1627473/Microbios\\_marinos\\_ActSEM50.pdf](http://www.ehu.es/docuements/1622424/1627473/Microbios_marinos_ActSEM50.pdf).
- Bhakta, Ja. N., Munekage, Y., Ohnishi, K., Jana, B. B. y Balcazar, J. L. (2014). Isolation and characterization of cadmium and arsenic-absorbing bacteria for bioremediation. *Water Air Soil Pollut* 225 (10), pp. 997. DOI: 10.1007/s11270-014-2151-2.
- Bruce, F. (2015). 230 Colorado mines are leaking heavy metals into state rivers. Recuperado de: <http://www.denverpost.com/2015/08/15/230-colorado-mines-are-leaking-heavy-metals-into-state-rivers/>.
- Cabrera, G., Pérez, R., Gómez, J. M., Abalos, A. y Cantero, D. (2006). Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *Journal of hazardous materials* 135 (1-3), pp. 40–46. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2005.11.058.
- Clements, W. H. y Kiffney, P. M. (1994). Integrated laboratory and field approach for assessing impacts of heavy metals at the Arkansas River, Colorado. *Environmental Toxicology Chemistry* 13 (3), pp. 397–404. DOI: 10.1002/etc.5620130306.

- Clements, W., Vieira, N. K. M. y Church, S. E. (2010). Quantifying restoration success and recovery in a metal-polluted stream. A 17-year assessment of physicochemical and biological responses. *Journal of Applied Ecology* 47 (4), pp. 899–910. DOI: 10.1111/j.1365-2664.2010.01838.x.
- Comisión Nacional del Agua (2016). Agua en el Mundo. Recuperado de: [http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Contenido/Documentos/SINA/Capitulo\\_8.pdf](http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Contenido/Documentos/SINA/Capitulo_8.pdf).
- Escobar, J. (2002). La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. Santiago de Chile: CEPAL División de Recursos Naturales e Infraestructura (Serie Recursos naturales e infraestructura, 50).
- Environmental Protection Agency (EPA) (1980). Ambient water quality criteria for copper. Recuperado de: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100C6QX.PDF?Dockey=P100C6QX.PDF>.
- Environmental Protection Agency (EPA) (2002). National recommended water quality criteria: 2002. En: Daniel Gottlieb (ed.): Environmental Technology Resources Handbook: CRC Press. Recuperado de: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1005EYQ.PDF?Dockey=P1005EYQ.PDF>.
- Gaete, H. y Chávez, C. (2008). Toxicidad de mezclas de cobre, cinc y arsénico en *Daphnia obtusa*. Recuperado de: [http://www.limnetica.com/Limnetica/Limne27/L27a001\\_Toxicidad\\_mezclas\\_cobre\\_cinc\\_Daphnia.pdf](http://www.limnetica.com/Limnetica/Limne27/L27a001_Toxicidad_mezclas_cobre_cinc_Daphnia.pdf).
- González, C. (s.f.). Reacción en Cadena Polimerasa (PCR). Recuperado de: <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/Dibulgeneral/PCR/PCR.htm>.
- Gupta, A., Logan, J., Elhag, N. y Almond, M. (2016). Sphingobacterium spiritivorum infection in a patient with end stage renal disease on haemodialysis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 15, pp. 25. DOI: 10.1186/s12941-016-0141-5.
- Harrington, L. y Harrington, J. (2003). When winning is losing: Arkansas River interstate water management issues. *Epilepsia* 44, pp. 1–2. DOI: 10.1046/j.15281157.44.s.51x
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. y Boudabous, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology* 64 (1), pp. 7–15. DOI: 10.1016/S0960-8524(97)00161-2.
- Houk, E., Frasier, M. y Schuck, E. (2006). The agricultural impacts of irrigation induced waterlogging and soil salinity in the Arkansas Basin. *Agricultural Water Management* 85 (1-2), pp. 175–183. DOI: 10.1016/j.agwat.2006.04.007.
- Instructions Fetch Unit (IFU) (2017). R2A agar. Recuperado de: [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/R2AAgar.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/R2AAgar.htm).

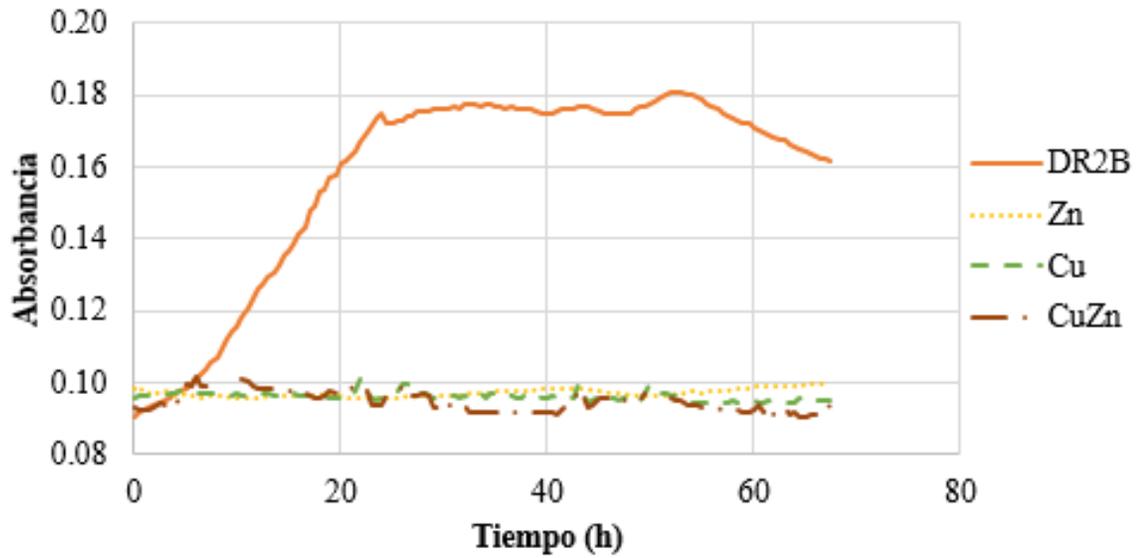
- Johansen, J. E., Binnerup, S. J., Kroer, N. y Molbak, L. (2005). *Luteibacter rhizovicius* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55, pp. 2285–2291. DOI: 10.1099/ijs.0.63497-0.
- Johnson, A. y Thornton, I. (1987). Hydrological and chemical factors controlling the concentrations of Fe, Cu, Zn and As in a river system contaminated by acid mine drainage. *Water Research* 21 (3), pp. 359–365. DOI: 10.1016/0043-1354 (87)90216-8.
- Johnson, B. y Hallberg, K. (2005). Acid mine drainage remediation options: a review. *The Science of the total environment* 338 (1-2), pp. 3–14. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.09.002.
- Kalmbach, S., Manz, W. y Szewzyk, U. (1997). Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *American Society for Microbiology*. Recuperado de: <http://aem.asm.org/content/63/11/4164.short>.
- Kimball, B. A., Callender, E. y Axtmann, E. V. (1995). Effects of colloids on metal transport in a river receiving acid mine drainage, upper Arkansas River, Colorado, U.S.A. *Applied Geochemistry* 10 (3), pp. 285–306. DOI: 10.1016/0883-2927(95)00011-8.
- Klerks, P. y Weis, J. (1987). Genetic Adaptation to Heavy Metals in Aquatic Organisms. *Environmental Pollution* 45 (3), pp. 173–205. DOI: 10.1016/0269-7491(87)900571
- Merrington, G. y Alloway, B. (1994). The transfer and fate of Cd, Cu, Pb and Zn from two historic metalliferous mine sites in the U.K. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0883292794900272>.
- Moraga, R., Merino, C. y Mondaca, M. A. (2003), Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigación. marina.* 31 (1). DOI: 10.4067/S0717-71782003000100010.
- Morillo, E. y Miño, G. (2011). Manual de biología molecular. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/258803041\\_MANUAL\\_Biologia\\_Molecular\\_INIAP](https://www.researchgate.net/publication/258803041_MANUAL_Biologia_Molecular_INIAP).
- Naciones Unidas (2014). La situación demográfica en el mundo. Recuperado de: <http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/trends/Concise%20Report%20on%20the%20World%20Population%20Situation%202014/es.pdf>.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., van Delden, C., Dumas, J. y Köhler, T. (2004). CzcR-zcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* 279 (10), pp. 8761–8768. DOI: 10.1074/jbc.M312080200.

- Plata, J., Campos, N. y Ramírez, G. (1993). Flujo de compuestos organoclorados en las cadenas tróficas de la Ciénaga de Santa Marta 17. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/20946/1/17199-54430-1-PB.pdf>.
- Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica 22. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>.
- Rodríguez, M. y Rodríguez, W. (2006). PCR en tiempo real. Recuperado de: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime\\_pcr.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf).
- Rosas, I., Cravioto, A., Ezcurra, E. (2004). Microbiología ambiental. Recuperado de: <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/440.pdf>.
- Schneider, R. (1971). The impact of various metals on the aquatic environment. edit. por EPA. Office of Enforcement and Standards Compliance. Denver, Colorado. Recuperado de: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/91014DZ5.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=Prior%20to%201976&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&UseQField=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C70THRU75%5CTXT%5C00000018%5C91014DZ5.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1>.
- Silver, S. y Walderhaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological reviews* 56 (1), pp. 195–228. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372861/pdf/microrev00028-0213.pdf>.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real 2. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>.
- Tanner, R. S. (2007). Cultivation of bacteria and fungi. manual of environmental microbiology, third edition. *American Society of Microbiology*, pp. 69–78.
- Villanueva, S. y Botello, A. (1992). Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe mexicano.

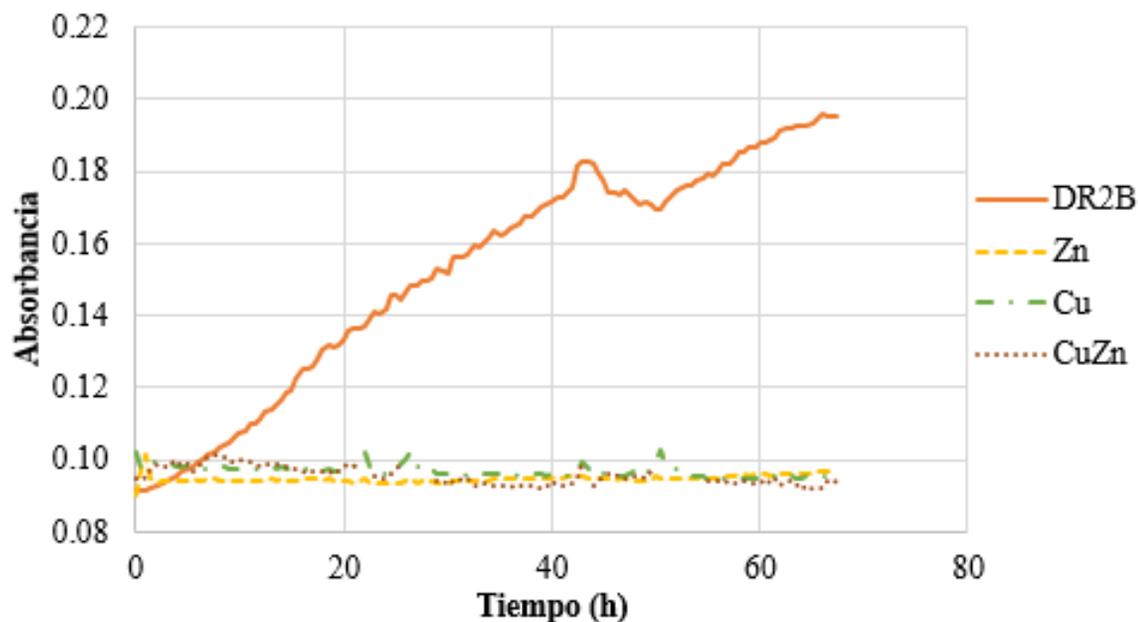
- Warnick, S. y Bell, H. (1969). The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insects. *Water Pollution Control Federation*. Recuperado de: <http://www.jstor.org/stable/pdf/25036240.pdf?refreqid=excelsior:ec90470893d19ac82db4f9c81ec37be2>.
- White, D., Sutton, S. y Ringelberg, D. (1996). The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/712a/820893c3085e2bee44b33ef07ec528723e31.pdf>.
- Xu, X., Xie, Q., Chen, F., Wang, J. y Wu, W. (2008). Acid mine drainage and heavy metal pollution from solid waste in the Tongling Mines, China, pp. 1–17. DOI: 10.1002/9783527617272.ch1.

## 7. ANEXOS

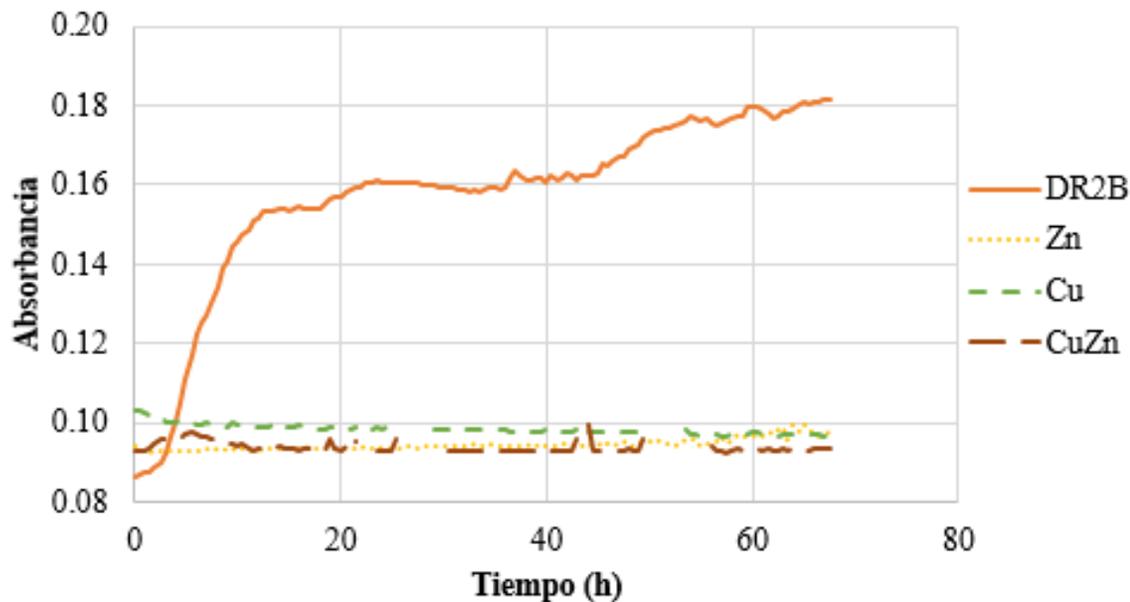
**Anexo 1.** Bacteria ST152, proveniente de medio DR2A, sitio AR5 inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc.



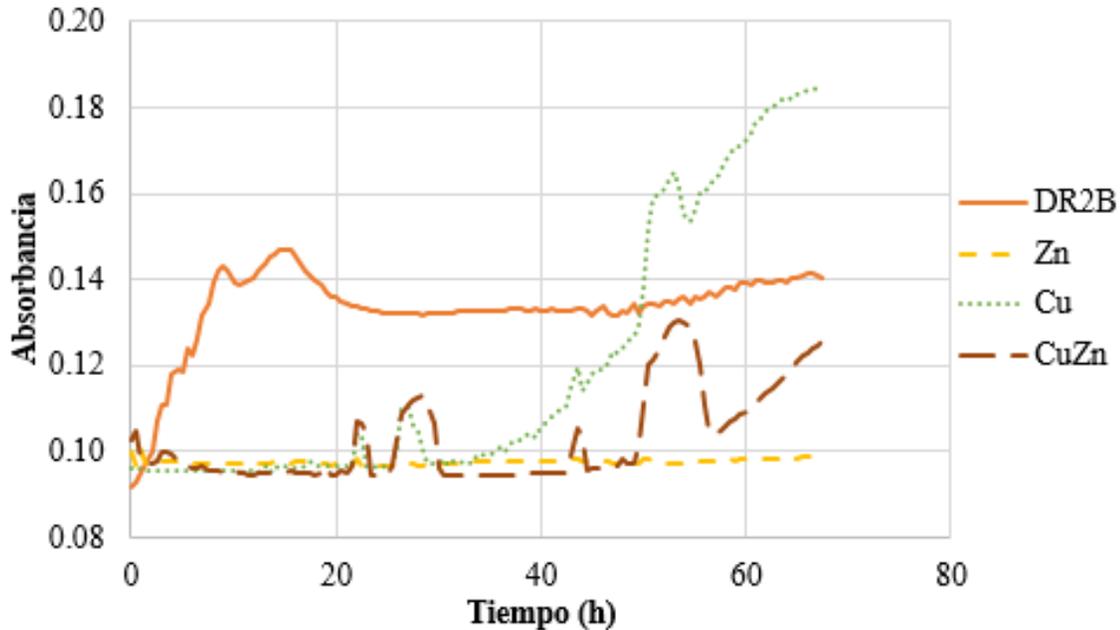
**Anexo 2.** Bacteria ST244, proveniente de medio DR2A + Zn, sitio AR5 inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc.



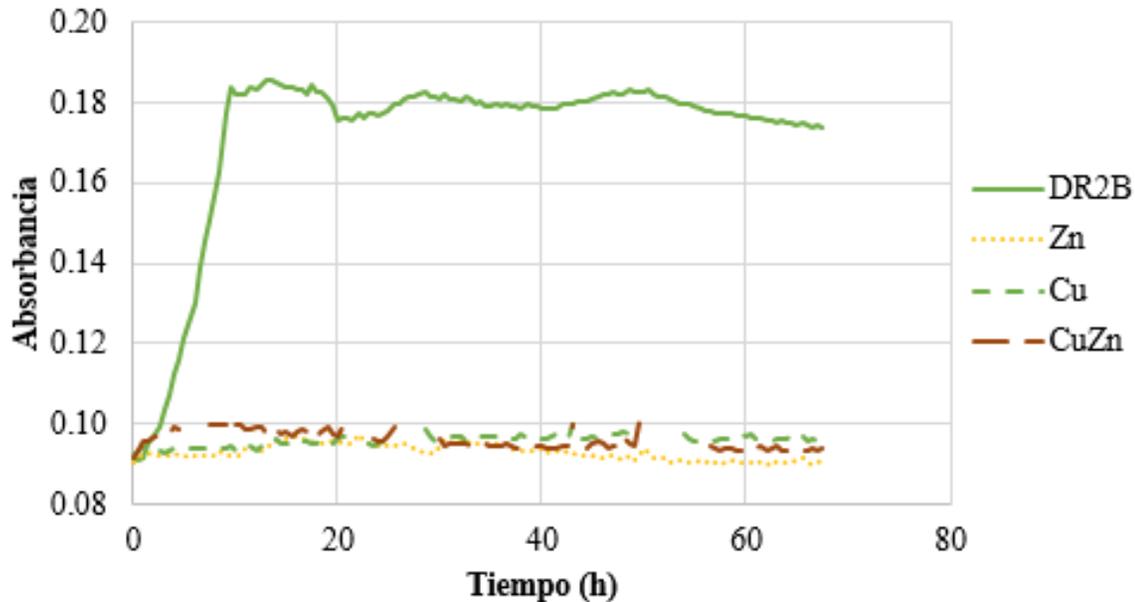
**Anexo 3.** Bacteria ST547, proveniente de medio DR2A + Cu, sitio CG inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc.



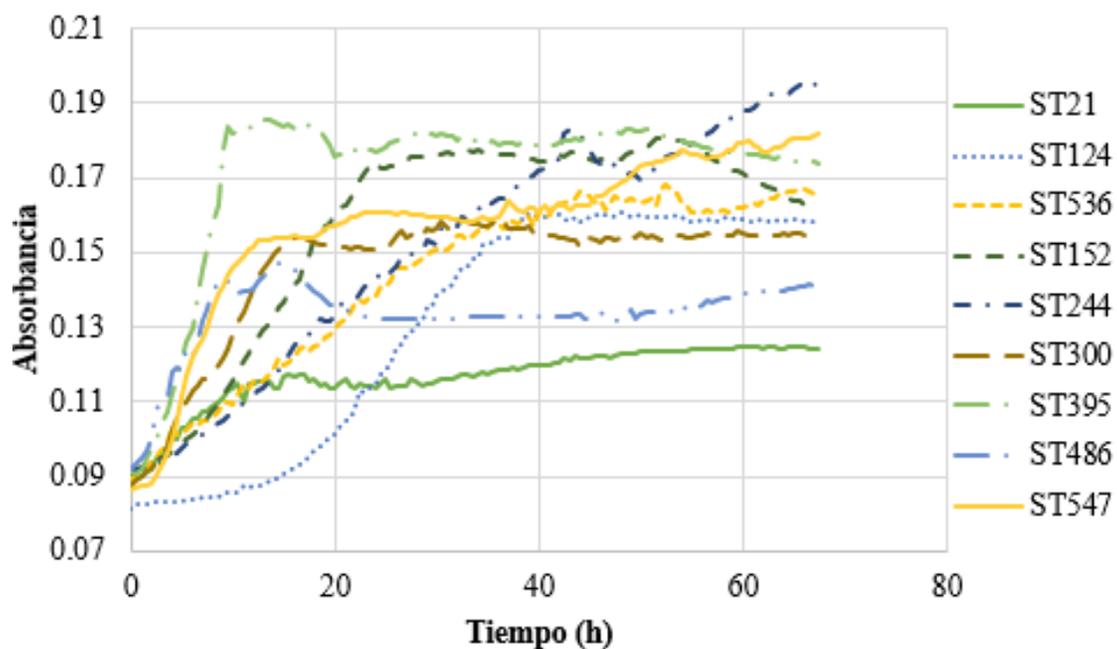
**Anexo 4.** Bacteria ST486, proveniente de medio DR2A + Cu + Zn, sitio CG inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc.



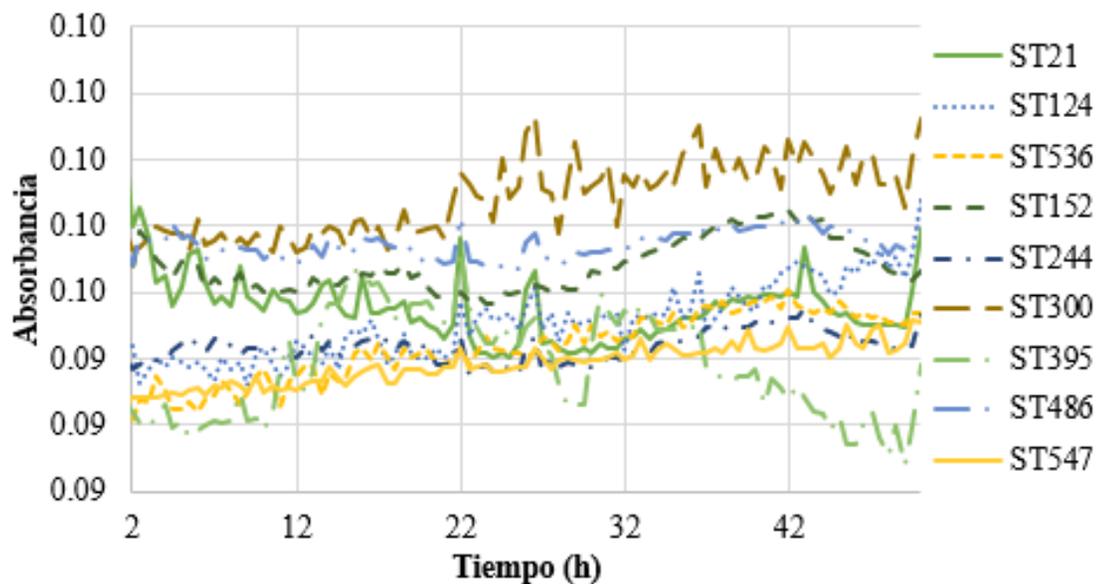
**Anexo 5.** Bacteria ST300, proveniente de medio DR2A, sitio CG inoculada en caldo DR2B con y sin cobre y zinc.



**Anexo 6.** Crecimiento de bacterias en caldo DR2B.



**Anexo 7.** Crecimiento de bacterias en caldo DR2B con presencia zinc.



**Anexo 8.** Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para número de bacterias en el medio DR2A.

<b>Medio</b>	<b>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></b>			<b>Shapiro-Wilk</b>		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DR2A	.371	9	.001	.533	9	.000
DR2A + Cu	.423	9	.000	.483	9	.000
DR2A + Zn	.433	9	.000	.489	9	.000
DR2A + Cu + Zn	.253	9	.102	.829	9	.043

**Anexo 9.** Prueba de homogeneidad de la varianza en número de bacterias en medio DR2A.

<b>Valores</b>	<b>Estadístico de</b>			
	<b>Levene</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
Basándose en la media	4.966	3	32	.006
Basándose en la mediana.	1.896	3	32	.150
Basándose en la mediana y con gl corregido	1.896	3	8.128	.208
Basándose en la media recortada	3.381	3	32.0	.030

**Anexo 10.** Prueba de Kruskal-Wallis para número de bacterias entre sitios, en medio DR2A.

<b>Parámetro</b>	<b>UFC/mL</b>
Chi-cuadrado	1.850
gl	2.0
Sig. asintót.	0.397

**Anexo 11.** Comparación de medias de número de bacterias en medio DR2A con concentraciones de metales.

<b>Medio</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>Desv. típ.</b>
DR2A	5.6067	9	.50540
DR2A + Cu	1.2910	9	.54301
DR2A + Zn	4.2104	9	.70332
DR2A + Cu + Zn	1.3324	9	.40350
Total	3.1101	36	1.96311

**Anexo 12.** Comparación de medias por sitio en medio DR2A.

<b>Sitio</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>Desv. típ.</b>
AR1	2.9021	12	1.95742
AR5	2.8850	12	1.99313
CG	3.5433	12	2.03734
Total	3.1101	36	1.96311

**Anexo 13.** Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los sitios en medio BMM.

<b>Sitio</b>	<b>Kolmogorov-Smirnov</b>			<b>Shapiro-Wilk</b>		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
AR1	.210	12	.151	.883	12	.094
AR5	.187	12	.200*	.871	12	.067
CG	.162	12	.200*	.938	12	.470

**Anexo 14.** Protocolo para elaboración de un litro de medio agar R2A.

<b>R2A</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Levadura	0.50
Peptona	0.50
Casaminoácidos	0.50
Dextrosa	0.50
Almidón	0.50
Piruvato de sodio	0.30
Fosfato de dipotasio	0.30
Sulfato de magnesio	0.05
Agar	15.00

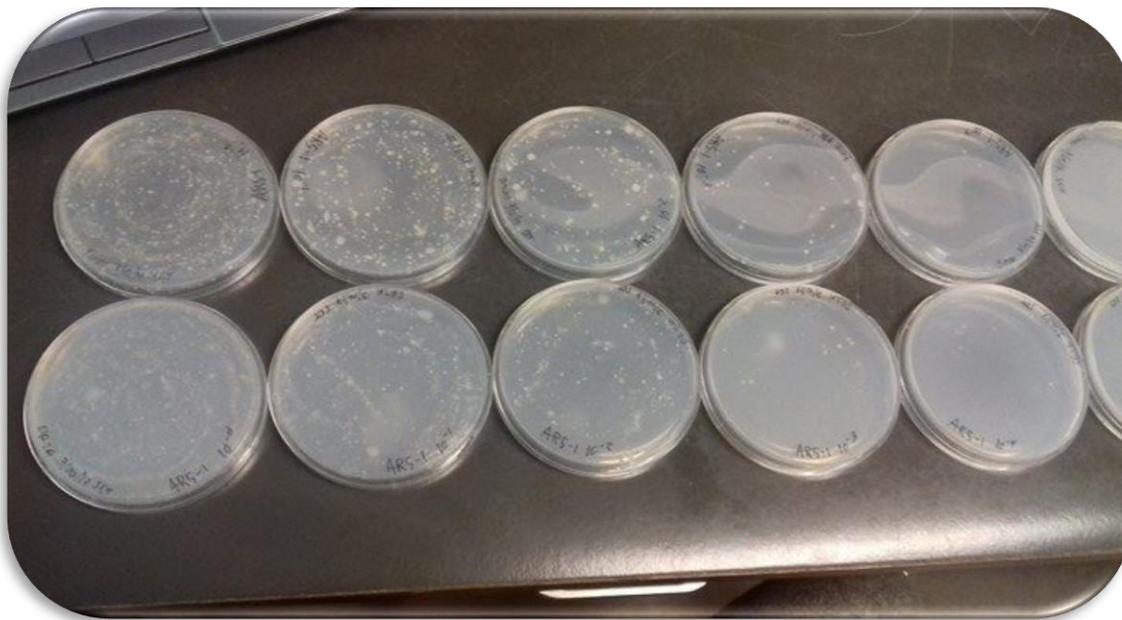
**Anexo 15.** Protocolo para elaboración de un litro de medio BMM.

<b>BMM</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>
Solución mineral	mL	10.000
Solución de vitaminas	mL	10.000
Metales en trazos	mL	2.500
Glucosa	g	0.717
MOPS	g	2.400
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	mL	1.000
Agar	g	15.000

**Anexo 16.** Componentes para un análisis de PCR.

<b>Reactivos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Volumen</b>
Agua molecular	μL	8
Gotaq Green mix	μL	10
Primer 27F	μL	1
Primer 1492R	μL	1
Muestra de bacteria	colonias	1

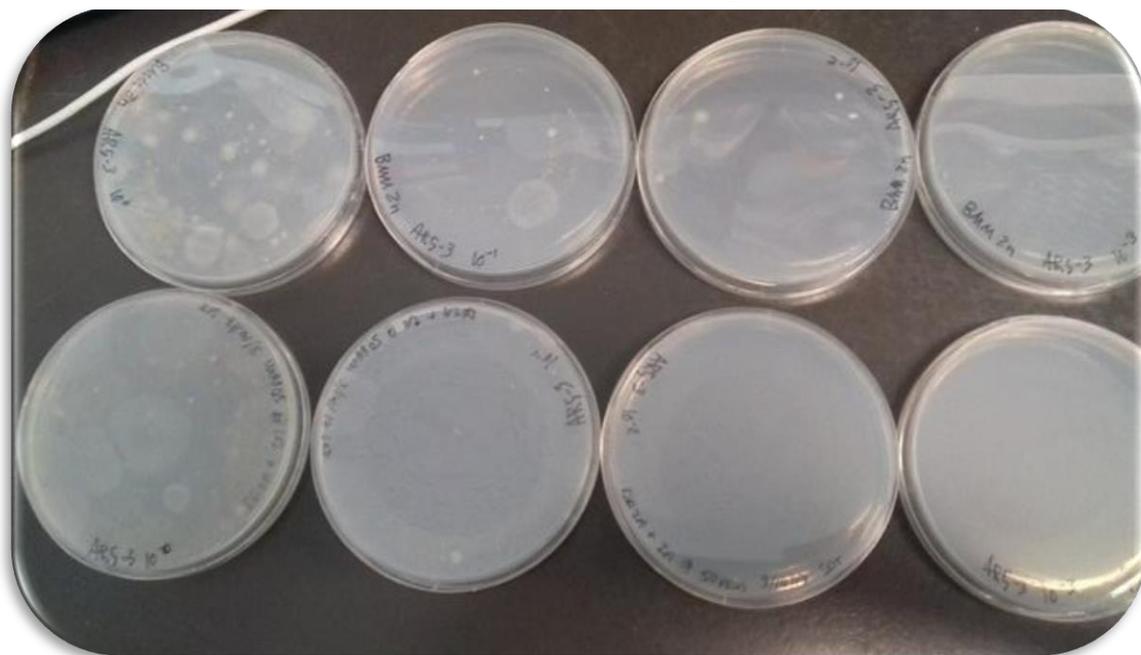
**Anexo 17.** Bacterias en medio DR2A y BMM sin metales, provenientes de AR5.



**Anexo 18.** Bacterias en medio DR2A y BMM con cobre, provenientes de AR5.



**Anexo 19.** Bacterias en medio DR2A y BMM con zinc, provenientes de AR5.



Anexo 20. Bacterias en medio DR2A y BMM con cobre y zinc, provenientes de AR5.

