



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POST GRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

TESIS DE PREGRADO

**“EVALUACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A METALES
PESADOS, AISLADAS DEL SEGUNDO MUESTREO EN MANGLARES DE
CHAME, PANAMÁ”**

PRESENTADA POR:

GLENDHA N. BARRÍA O.

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR
POR LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

TUTOR

DRA. DALILA MONTAÑEZ

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ, 2021.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, darle gracias a Dios por darnos la vida, por poner en mi camino oportunidades que resultaron mejor que mis planes.

A mis padres Gladys y Jaime por su apoyo incondicional, dejando para mí el estudio como la mejor herencia, se los agradeceré toda mi vida, de igual manera a mis hermanas y a toda mi familia.

Agradecerles a mis compañeros, colegas, profesores de la escuela de Biología por todas las vivencias, por las grandes experiencias y enseñanzas, de las cuales aprendí que con esfuerzo y ganas de superación todo se logra.

En especial a Ronny Peralta, quien se convirtió en uno de mis motores principales y me acompañó en esta aventura, siempre estuvo allí apoyándome sin dudarlo ni una sola vez, eternamente gracias.

Por supuesto, a mis asesores de tesis la Dra. Dalila Montañez, el Mtr.Sc Humberto Cornejo y el Mtr. Fermín Mejía por sus comentarios y sugerencias sobre este trabajo que fueron vitales para terminar.

A SENACYT por el apoyo financiero a este proyecto que forma parte de un proyecto macro, a la Dra. Carla Laucevicius directora del laboratorio Toth *Research and Lab* por brindarme la oportunidad de trabajar con su equipo de investigación y a todos los colaboradores de la empresa Jenifer, Sean, Olmedo, Irving, Aminta y Ana que estuvieron desde el día uno apoyándome, guiándome y dándome todas las herramientas que necesité para culminar con este trabajo. **Gracias.**

DEDICATORIA

En estos años he aprendido que el camino no es fácil, pero si sientes pasión por lo que haces todo el esfuerzo valdrá la pena. El haber ingresado a esta carrera me enseñó la importancia de la protección, la conservación y la educación sobre el mundo que nos rodea, de los seres con quienes compartimos merecen respeto de parte de todos, gracias a este recorrido pude encontrar lo que realmente me apasiona: la Biología.

A mis padres que, con su amor incondicional, han sido el faro que ilumina mi camino, a mis hermanas quienes siempre estuvieron pendientes de mi recorrido.

A mis amigos, compañeros y profesores, que estuvieron brindándome su apoyo, mostrándome que los obstáculos solo son paredes que se pueden derrumbar y que en cada uno de ellos te acercas más al éxito.

A todos ellos, dedico mi esfuerzo.

Índice

1	RESUMEN.....	1
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3	JUSTIFICACIÓN	4
4	OBJETIVOS	5
4.1	Objetivo General.....	5
4.2	Objetivos Específicos	5
5	HIPÓTESIS DE TRABAJO	6
6	INTRODUCCIÓN	6
7	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
7.1	Manglares.....	8
7.1.1	Manglares y el secuestro del Carbono	11
7.1.2	Manglares en Panamá	11
7.1.3	Problemas presentes en los manglares	13
7.2	Clasificación de los seres vivos	14
7.2.1	Procariota	16
7.2.2	Eucariota	16
7.3	Bacteria	17
7.3.1	Morfología bacteriana	17
7.3.2	Vista Microscópica	18
7.3.3	Tipos de Tinciones	20
7.3.4	Vista Macroscópica.....	23
7.3.5	Reproducción bacteriana.....	23
7.4	Bacterias en los manglares.....	24
7.5	Metales pesados	24
7.5.1	Por medio natural.....	25

7.5.2	Por medio industrial	26
7.5.3	Por medios agrícolas	26
7.5.4	Por medio de la minería	26
7.5.5	Por medio de la tecnología.....	27
7.6	Toxicidad de los metales pesados y su impacto	27
7.7	Plomo.....	28
7.7.1	Presencia del plomo en la antigüedad, hasta nuestros días	28
7.7.2	Efectos del plomo en la salud y el medio ambiente.....	29
7.8	Cobre.....	30
7.8.1	Presencia del cobre en la antigüedad, hasta nuestros días.	30
7.8.2	Efectos del cobre en la salud y el medio ambiente	31
7.9	Hierro	32
7.9.1	Presencia del hierro en la antigüedad hasta nuestros días.....	32
7.9.2	Efectos del hierro en la salud y el medio ambiente.....	33
7.10	Evolución microbiana espacio-temporal en paisaje de antibióticos	34
7.11	Biorremediación	36
7.11.1	Interacciones bacterianas con los metales pesados	37
7.11.2	Bioacumulación	38
7.11.3	Biosorción	38
7.11.4	Bioadsorción	39
7.11.5	Sistemas de expulsión	39
7.11.6	Quelación	39
7.11.7	Metilación	40
7.11.8	Oxido-Reducción	41
8	MATERIALES Y MÉTODOS	42
8.1	Área de estudio	42

8.2	Tiempo de desarrollo del estudio.....	42
8.3	Tamaño de la muestra.....	43
8.4	Toma de las muestras.....	43
8.5	Preparación de los medios.....	43
8.6	Aislamiento.....	44
8.7	Preparación de Metales.....	44
8.8	Ensayos microbiológicos.....	44
8.9	Prueba de Q de Cochran en el paquete de SPSS.....	45
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
9.1	RESULTADOS.....	46
9.1.1	Identificación de tipo de bacteria.....	46
9.1.2	Concentración mínima inhibitoria en cepas control.....	48
9.1.3	Resistencia y susceptibilidad al cobre.....	48
9.1.4	Resistencia y susceptibilidad al hierro.....	50
9.1.5	Resistencia y susceptibilidad al plomo.....	52
9.1.6	Análisis de Q de Cochran.....	53
9.2	DISCUSIÓN.....	59
10	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
10.1	CONCLUSIONES.....	62
10.2	RECOMENDACIONES.....	63
11	BIBLIOGRAFÍA.....	63
12	ANEXOS.....	77

Índice de cuadros

Cuadro 1: Bacterias Gram positivas de las cepas analizadas.....	46
Cuadro 2: Bacterias Gram negativas de las cepas analizadas.....	47
Cuadro 3: Concentración Mínima Inhibitoria de las cepas control.....	48
Cuadro 4: Concentración Mínima Inhibitoria en Bacterias Gram negativas con Cobre.....	48
Cuadro 5: Concentración Mínima Inhibitoria en Bacterias Gram positivas con Cobre.....	49
Cuadro 6: Concentración Mínima Inhibitoria en Bacterias Gram negativas con Hierro.....	50
Cuadro 7: Concentración Mínima Inhibitoria en Bacterias Gram positivas con Hierro.....	51
Cuadro 8: Concentración Mínima Inhibitoria en Bacterias Gram negativas con Plomo.....	52
Cuadro 9: Concentración Mínima Inhibitoria en Bacterias Gram positivas con Plomo.....	53
Cuadro 10: Q de Cochran a través de SPSS.....	54
Cuadro 11: Porcentaje de resistencia a los metales pesados en bacterias Gram negativas.....	56
Cuadro 12: Porcentaje de resistencia a los metales pesados en bacterias Gram positivas.....	57
Cuadro 13: Porcentaje de resistencia a los metales pesados en forma general.....	58

Índice de gráficas

Gráfica 1: Resistencia y Susceptibilidad en Cobre.....	54
Gráfica 2: Resistencia y Susceptibilidad en Hierro.....	55
Gráfica 3: Resistencia y Susceptibilidad en Plomo.....	55
Gráfica 4: Porcentaje de resistencia en bacterias Gram negativas.....	56
Gráfica 5: Porcentaje de resistencia en bacterias Gram positivas.....	57
Gráfica 6: porcentaje de resistencia general.....	58

Índice de figuras

Fig.1: Asociación anfibia de plantas.....	9
Fig.2: Categorías tróficas de la fauna acuática de un ecosistema de manglar.....	10
Fig.3: Ecosistema marino-costero en el Pacífico panameño.....	12
Fig.4: Ecosistema marino-costero en el Atlántico panameño.....	13
Fig.5: Los tres dominios del árbol de la vida.....	15
Fig.6: Árbol filogenético universal.....	15
Fig.7: Variedad de formas que presentan las bacterias.....	20
Fig.8: Esquema de las diferencias estructurales entre las bacterias.....	22
Fig.9: Dispositivo experimental para estudiar la evolución microbiana.....	36
Fig.10: Vista satelital de las áreas de estudio.....	42

Índice de anexos

Fig.11: Recolección de las muestras en los manglares de Chame.....	78
Fig.12: Uno de los sitios de muestreos.....	78
Fig.13: Muestra recolectada en botella de 1 litro.....	78

Fig.14: Trabajo del primer aislamiento de las muestras.....	78
Fig.15: Placas Petri con el primer aislamiento.....	78
Fig.16: Segundo aislamiento por la técnica de estriado simple.....	78
Fig.17: Trabajo de preservación de las cepas.....	79
Fig.18: Tubos Eppendorf con las cepas preservadas.....	79
Fig.19: Almacenaje de cepas.....	79
Fig.20: Preparación de los metales en matraz aforado.....	79
Fig.21: Desarrollo de los cálculos para la preparación de los metales.....	79
Fig.22: Cepas control verificada <i>Escherichia coli</i> ATCC 8339.....	80
Fig.23: Cepas control verificada <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	80
Fig.24: Metales preparados y conservados en frascos estériles.....	81
Fig.25: Prueba realizada en microplacas para Cu en cepas control.....	81
Fig.26: Prueba realizada en microplacas para Fe en cepas control.....	81
Fig.27: Prueba realizada en microplacas para Pb en cepas control.....	81
Fig.28: Resultado de las cepas en Cu.....	82
Fig.29: Resultado de las cepas en Fe.....	82
Fig.30: Resultado de las cepas en Pb.....	82
Fig.31: Tinción de Gram cepa P2A6.....	83
Fig.32: Tinción de Gram cepa P1E2.....	83
Fig.33: Tinción de Gram cepa P2B5.....	83
Fig.34: Tinción de Gram cepa P2A10.....	83
Fig.35: Tinción de Gram cepa P3D2.....	84
Fig.36: Tinción de Gram cepa P1C3.....	84

Fig.37: Tinción de Gram cepa P2B19.....	84
Fig.38: Tinción de Gram cepa P1C2.....	84
Fig.39: Tinción de Gram cepa P1B4.....	85
Fig.40: Tinción de Gram cepa P1E5.....	85

1 RESUMEN

En el presente trabajo se estudió a la resistencia a metales pesados como el cobre (Cu), hierro (Fe) y plomo (Pb), utilizando bacterias aisladas de los Manglares de Chame, Panamá Oeste, Panamá. Donde se aislaron 161 cepas bacterianas entre las tres Parcelas, divididas en cinco Subparcelas, de las cuales se analizaron 80 cepas, obteniendo 41 cepas que mostraron resistencia. Para los bioensayos se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 8339 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, como cepas control, tomando su concentración mínima inhibitoria (CMI) como referencia para los ensayos. Para las pruebas con los metales, se realizó Microdilución en placa de 96 micropocillos, donde se inoculó la muestra junto con caldo LB (Caldo Luria o Luria Bertani L, contiene peptona de caseína 10g/L, extracto de levadura 5g/L a pH 7.2), con la concentración determinada en cada metal, incubado por 24H, realizando la lectura a través de la turbidez, tomando como CMI el último pocillo donde se observaba la turbidez. Se obtuvo que en Cobre el 3.7% de las bacterias aisladas presentaron resistencia, con el Plomo se obtuvo un 46.3% de resistencia, para finalizar con un 50% de resistencia en el Hierro. De igual manera se dividió el estudio en resistencia y susceptibilidad, mostrando que, en Cu las bacterias exhibieron susceptibilidad, para el Fe y el Pb resistencia. Por último, se evaluó el porcentaje de resistencia a cada metal en las bacterias Gram negativas y Gram positivas, obteniendo que para bacterias Gram negativas el 5% fue resistente a Cu, el 41% a Pb y el 54% a Fe, en el caso de las bacterias Gram positivas no hubo resistencia a Cu, el 41% a Fe y el 59% a Pb. Concluyendo que en los Manglares de Chame hay bacterias resistentes a los metales pesados.

Palabras clave: Manglares, metales pesados, bacterias, resistencia, susceptibilidad, concentración mínima inhibitoria, cobre, plomo, hierro.

ABSTRACT

In the present work, resistance to heavy metals such as copper (Cu), iron (Fe) and lead (Pb) was studied, using bacteria isolated from the Mangroves of Chame, Panama Oeste, Panama. Where 161 bacterial strains were isolated among the three Plots, divided into five Subplots, of which 80 strains were analyzed, obtaining 41 strains that showed resistance. For the bioassays, the strains *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 were used as control strains, taking their minimum inhibitory concentration (MIC) as a reference for the tests. For the tests with metals, Microdilution was carried out in a 96 microwell plate, where the sample was inoculated together with LB broth (Luria Broth or Luria Bertani L, contains 10g / L casein peptone, 5g / L yeast extract at pH 7.2), with the concentration determined in each metal, incubated for 24H, making the reading through the turbidity, taking as the MIC the last well where the turbidity was observed. It was obtained that 3.7% of the isolated bacteria presented resistance in Copper, with Lead 46.3% resistance was obtained, ending with 50% resistance in Iron. In the same way, the study was divided into resistance and susceptibility, showing that, in Cu the bacteria exhibited susceptibility, for Fe and Pb resistance. Finally, the percentage of resistance to each metal was evaluated in Gram negative and Gram positive bacteria, obtaining that for Gram negative bacteria 5% were resistant to Cu, 41% to Pb and 54% to Fe, in the case of the Gram positive bacteria there was no resistance to Cu, 41% to Fe and 59% to Pb. Concluding that in the Chame Mangroves there are bacteria resistant to heavy metals.

Keywords: Mangroves, heavy metals, bacteria, resistance, susceptibility, minimum inhibitory concentration, copper, lead, iron.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los manglares son muy conocidos por su alta capacidad de bioacumulación, en diferentes aspectos, en este caso en particular, utilizaremos su capacidad de acumular Metales Pesados (MP) entre el grupo de microorganismos, en este caso bacterias, y así determinar si realmente existe una resistencia a los MP, *H. Han et al., 2020* nos expresan en su estudio con bacterias que dos bacterias productoras de ureasa, *Bacillus megaterium* N3 y *Serratia liquefaciens* H12, permitieron la inmovilización de Cd y Pb por adsorción extracelular, bioprecipitación y aumento del pH, reduciendo así el contenido de Cd y Pb en suelos de la rizosfera, demostrando que las cepas eran altamente resistentes a la toxicidad de MP; con esto podemos guiarnos para la búsqueda de esos microorganismos en nuestros manglares.

Los manglares de Chame representan uno de los pocos lugares en Panamá donde el ecosistema de manglar se encuentra poco perturbado, esto nos indica que existe una fuerte zona biodiversidad que puede ser altamente investigada, sabiendo que son zonas donde ocurre la transición entre ambientes terrestres y marinos, tienen grandes funciones ecológicas, incluidas la conservación de la diversidad de flora y fauna, la protección de las costas, la purificación del agua y la atmósfera (*S. Wu et al., 2019*). Actualmente, los bosques de manglar representan aproximadamente el 5.6% de la cobertura boscosa nacional, es decir unas 170,000 hectáreas (ha), la mayor parte ubicadas en la costa del pacífico (*Berdiales y Chavarría, 2009*).

El 90% de las familias que dependen del manglar viven en condiciones de pobreza y pobreza extrema, esto genera una necesidad de explotar este recurso, provocando así una fuerte presión de las comunidades hacia el manglar que no puede ser ignorada (*Berdiales et al., 2009*). La excesiva utilización de este recurso puede generar a largo plazo un deterioro del ecosistema, sabiendo que no solo es el uso de la madera para la producción del carbón, sino también el uso en la extracción de alimentos como cangrejos, conchas, que sirven de sustento para estas familias, sin tener el conocimiento que estos pueden contener niveles de contaminación con MP en su organismo, que podría poner en riesgo la salud de quienes los consumen, tomando en cuenta existen límites permitidos de MP en alimentos mostrados por la Unión Europea (*REGLAMENTO (CE) N o 1881/2006 DE LA COMISIÓN, 2006*). Sabiendo que existen

varios problemas en torno al manglar, en este caso nos enfocaremos en las concentraciones de MP en aguas, así podemos definir el concepto de Metal Pesado como aquellos elementos (metales, metaloides, lantánidos y actínidos) que tienen una densidad atómica superior a 5 g/cm^3 (Rahman y Singh, 2018). Se sabe que los sedimentos de manglar tienen una alta capacidad para retener y acumular MP de los efluentes industriales y aguas residuales domésticas, y generalmente retienen MP que se encuentran en el agua, actuando como sumideros (S. Wu et al., 2019). Tomando en cuenta que la mayoría de las sustancias orgánicas pueden ser metabolizadas por la microbiota natural (microorganismos que se encuentran de manera normal), sin embargo, los MP por su composición resultan ser indestructibles y persisten en el medio ambiente durante mucho tiempo (Rahman et al., 2018).

En Panamá los manglares son utilizados para el desarrollo de la industria de la maricultura del camarón, para la construcción de infraestructuras, puertos, carreteras, actividades agrícolas y la producción de carbón, especialmente en los manglares de la Bahía de Chame. Estas presiones están contribuyendo en parte, con la destrucción indiscriminada de los manglares, lo cual trae consigo la alteración de las funciones naturales y ecológicas del estuario, causando problemas de erosión y contaminación (Berdiales et al., 2009). La peligrosidad de la acumulación de los metales pesados en los manglares no solo va desde los microorganismos, sino también se ven afectadas otros organismos puesto que, los metales pueden ser tóxicos en pequeñas concentraciones y también ser acumulados en la cadena trófica, empezando por el fitoplancton que son incorporados a la cadena alimenticia y que a su vez pueden producir un efecto de biomagnificación en los niveles más altos de la cadena ya que, otros organismos como las conchas bivalvas se alimentan de éstos, y éstas forman parte en la dieta del hombre, constituyendo un riesgo para la salud humana (Acosta y Lodeiros, 2004).

3 JUSTIFICACIÓN

Desde hace años la ciencia ha dado grandes giros en pro del bienestar común, los estudios realizados en bacterias, cada día nos demuestran que se pueden utilizar de amplias maneras, géneros como *Microbacterium*, compuesto de bacterias Gram positivas del

filo *Acintobacterias* son conocidas por su producción de antibióticos, con una descripción general de las características del subsistema del genoma muestra que un microorganismo que no solo puede conservado una alta resistencia a los metales, sino también la capacidad de patogenicidad oportunista a través de una combinación de factores de resistencia a antibióticos y virulencia que incluyen múltiples fármacos (*Iyer et al., 2017*).

Hoy en día, las grandes producciones que van de la mano con la industrialización, traen consigo consecuencias como los contaminantes peligrosos de diversas fuentes, sin embargo ante este problema se están desarrollando diferentes mecanismos en búsqueda de soluciones, que en su mayoría sean amigables con el ambiente, la biorremediación es una de estas posibles soluciones ya que con el uso de la ingeniería genética, se pueden generar organismos genéticamente modificados que probablemente pueden reducir los diferentes tipos de contaminantes (*Verma y Kuila, 2019*).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Aislar e identificar bacterias resistentes a metales pesados en el segundo muestreo de los manglares de Chame, provincia de Panamá Oeste.

4.2 Objetivos Específicos

1. Registrar presencia de bacterias resistentes a metales pesados en los manglares de Chame.
2. Aislar y preservar bacterias que presenten resistencia a metales pesados como el Cu, Fe, y Pb.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de bacterias resistentes a cada metal.
4. Identificar el género o especie de los aislamientos que presentan resistencia a cada metal.

5 HIPÓTESIS DE TRABAJO

- H_i : Las bacterias aisladas en los manglares de Chame presentan resistencia a metales pesados.
- H_0 : Las bacterias aisladas en los manglares de Chame no presentan resistencia a los metales pesados.

6 INTRODUCCIÓN

Los bosques de manglar desempeñan un papel importante en la protección, estabilización y en prevención en las zonas costeras de efectos nocivos como huracanes y tsunamis, considerados desastres naturales. Los componentes biológicos hacen que los manglares se adapten rápidamente a condiciones ambientales desfavorables y enfrentan con eficiencia las inundaciones periódicas provocadas por las mareas, la salinidad cambiante, las condiciones de ausencia de oxígeno (anóxicas) y las altas temperaturas (*Kulkarni et al., 2018*).

Las bacterias son los microorganismos más abundantes en el planeta tierra, ya que pueden habitar una amplia gama de ecosistemas debido a su gran diversidad metabólica, su pequeño tamaño, su rápido crecimiento (en la gran mayoría de ellas) y su alta capacidad mutagénica (*Yin et al., 2018*). Estos microorganismos son importantes impulsores de los ciclos bioquímicos alrededor del mundo, que es reflejada en su amplia diversidad funcional, taxonómica y metabólica (*Booth et al., 2019*).

Los metales y los antibióticos son elementos naturales presentes principalmente en suelos, algunos metales son bioelementos indispensables para la vida, ya que son importantes cofactores para las enzimas. Las bacterias requieren estos compuestos para su crecimiento, sin embargo, en altas concentraciones suelen ser compuestos tóxicos (*Argudín et al., 2019*). Por lo que también, la introducción de ciertas concentraciones de metales pesados en el ambiente ejerce una presión selectiva sobre la microflora, dejando así solo aquellos microorganismos que desarrollen en su metabolismo mecanismos de resistencia a los metales pesados (*Kang y So, 2016*). Esto resulta ser una grave amenaza

para los diferentes ecosistemas marinos, como los arrecifes de coral, los manglares y los pastos marinos. De igual manera esto tiene un impacto en el riesgo de la salud, especialmente para la población humana que depende de las fuentes de pesca. Los metales pesados de origen litogénico y antropogénico entran libremente en el medio marino, a través de los transportes hidrodinámicos, los vertidos industriales, los efluentes y las actividades de transporte (*Sany et al., 2011*).

Los iones de los metales pesados tóxicos que se encuentran en forma activa tienden a influir en la actividad metabólica de los microorganismos y de igual modo, los microorganismos pueden desarrollar mecanismos de resistencia para sobrellevar el estrés provocado por los iones de metales pesados tóxicos. Los microorganismos pueden remediar esta resistencia a través de la transformación de los iones de metales pesados activos a iones de metales pesados en formas inactivas, que se pueden ser utilizadas en la biorremediación de áreas contaminadas (*Yin et al., 2018*).

El plomo (Pb) es un metal que se encuentra de forma natural en el ambiente, pero a lo largo de los años diferentes las actividades antropogénicas han contribuido significativamente el incremento de sus niveles en muchos ambientes, provocando contaminaciones de este metal tóxico que ponen en riesgo la salud humana, y a su vez el estado de los ecosistemas (*Pérez et al., 2015*).

El cobre está ampliamente distribuido en la naturaleza, se presenta principalmente en forma de sulfatos, carbonatos, sulfuros de Fe y Cu, calcopirita, bornita, cuprita (óxido de cobre), malaquita y azurita (carbonatos de cobre) (*Monge et al., 2008*). Es un metal de transición que como nutriente posee esta característica, el cual es un cofactor de enzimas que participan en diversos procesos biológicos esenciales para la vida. Este elemento puede adoptar distintos estados de reducción, tanto oxidado como Cu (II) o en la forma reducida como Cu (I) y posee un elevado potencial redox que puede ser usado por las cuproenzimas para la oxidación directa de sustratos fácilmente oxidables tales como superóxido, ascorbato, catecol o fenolatos (*Marrero y Fando, 2009*).

El hierro es el cuarto metal más abundante y es uno de los micronutrientes esenciales para prácticamente todos los seres vivos. En condiciones fisiológicas, el hierro puede existir en la forma ferrosa (Fe²⁺) o en la forma férrica (Fe³⁺) (*Aguado et al., 2012*). Las

bacterias necesitan una concentración de hierro entre 10^{-6} y 10^{-8} M lo que significa que una célula requiere del orden de 10^5 - 10^6 iones de hierro por generación para poder crecer. A densidades celulares altas (10^9 células/ ml) cada generación puede consumir 1018 átomos de hierro por litro. El Fe^{2+} es soluble y accesible para las bacterias y tan solo requiere el transporte a través de la membrana celular. No obstante, en presencia de O_2 y a $pH \geq 7$ se oxida a Fe^{3+} , siendo insoluble y no biodisponible. Las bacterias pueden proveerse de hierro solubilizando los óxidos férricos a través de distintas estrategias que a las que se han adaptado (Oca, 2005).

Hoy día existen diversas actividades antropogénicas que generan un impacto en los ecosistemas, y que, a la larga, si estos impactos no son sufragados o disminuidos, generará fuertes repercusiones hacia todo el habitat. En Panamá contamos con diferentes actividades como las del sector agrícola, ganaderas, acuícolas, construcciones, hasta actividades mineras, que generan un gran impacto a nuestros recursos (Fishery Country Profile Food and Agriculture Organization of the United, 2007).

A pesar de la clara necesidad de herramientas de evaluación de riesgos precisas que se adaptan a los ecosistemas marinos tropicales, las técnicas para identificar contaminantes preocupantes y predecir los peligros asociados con la contaminación marina en los trópicos han permanecido en el olvido haciéndolas inadecuadas y poco eficientes, de esta manera a través de esta investigación se obtendrá información que nos revele el estado de los manglares de Chame, para así poder protegerlos conociendo ya su gran importancia (van Dam et al., 2018).

7 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

7.1 Manglares

Los bosques de manglar son asociaciones anfíbias de plantas leñosas arbóreas o arbustivas (fig.1), con una alta tolerancia a la salinidad. Se encuentran ubicados al nivel del mar dentro de la zona de influencia directa de las mareas, en los estuarios y desembocaduras de los ríos. Estos ecosistemas reciben el nombre de manglar debido a que su especie vegetal dominante se conoce comúnmente con el nombre de “mangle”

(MAE y FAO, 2014). Los manglares bordean las costas subtropicales y tropicales del mundo, a nivel mundial, los manglares cubren un estimado de 137,760 km². La mayor parte de los de manglares se encuentra en el sudeste asiático, siendo Indonesia quien ocupa una quinta parte de los manglares del mundo (Friess, 2016). A los manglares se les otorga gran importancia no solo por considerarse entre los mayores sumideros de CO₂, alcanzando entre 830 y 1218 contenidos de carbono (Mg C/ ha⁻¹), sino también porque albergan una alta diversidad de fauna de vertebrados e invertebrados al brindarle refugio y alimento, además generan gran cantidad de servicios ecosistémicos (Urrego C., 2018). Los servicios ecosistémicos, así llamados, son los beneficios proporcionados al hombre por los ecosistemas que comprenden diversos bienes, servicios, beneficios culturales (Barbier, 2017), productos para las comunidades humanas asentadas a su alrededor, y por esta razón se encuentran altamente amenazados e inclusive algunos, en vía de desaparición (Urrego C., 2018).

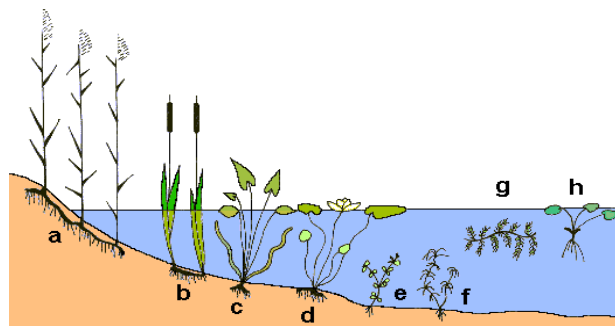


Fig.1: a-b. Plantas anfibias o palustres; c-d. Plantas acuáticas arraigadas con hojas flotantes; e-f. Plantas acuáticas arraigadas totalmente sumergidas; g-h. Plantas acuáticas libres, sumergida (g), y flotante libre (h). Imagen modificada de Camefort (1972) fuente: http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema3/tema3_4hidrofitas.htm

Es importante entender la dinámica dentro del manglar, tomando en cuenta que entre los factores abióticos y bióticos existe una estrecha relación, dando lugar así a la cadena trófica, sabiendo que, la cadena comienza con la producción de carbohidratos y carbono de las plantas mediante la fotosíntesis y continúa de la siguiente manera: **Detritus de hojas del manglar - Bacterias y hongos - Consumidores de detritus (herbívoros y omnívoros) - Carnívoros inferiores - Carnívoros superiores** como se muestra en la Fig.2. La hojarasca es fragmentada por la acción de los anfípodos y los cangrejos. La descomposición continúa mediante la putrefacción del detritus de las hojas por una variedad de comedores de detritus comenzando con los invertebrados muy pequeños

(meiofauna) y finalizando con especies como los gusanos, los moluscos, los camarones y los cangrejos, que a su vez son presas de los carnívoros inferiores; la cadena trófica termina con los carnívoros más grandes como grandes peces, aves de caza, gatos salvajes y el hombre (*Food and Agriculture Organization, 1994*). En el medio marino, los animales, los protistas y las bacterias en conjunto representan el $\approx 80\%$ de la biomasa marina total, mientras que en tierra representan solo el $\approx 2\%$ de la biomasa total. Esto se debe a que en la tierra las plantas son los productores primarios dominantes y representan el $\approx 95\%$ de la biomasa terrestre total. En el océano, los productores primarios representan $\approx 20\%$ de la biomasa total, distribuida casi por igual en varios reinos. La explicación inmediata de la disparidad entre la biomasa de los productores primarios en la tierra y en los océanos es la enorme masa de tejidos leñosos de apoyo en las plantas terrestres (*Bar-On y Milo, 2019*).



Fig.2: Categorías tróficas de la fauna acuática de un ecosistema de manglar (Díaz, Castro, y Manjarrez, 2010). Fuente. Barrionuevo, R y Marcial, R, 2006.

7.1.1 Manglares y el secuestro del Carbono

El Carbono Azul (BC, por sus siglas en inglés) se refiere al carbono orgánico que es capturado y almacenado por los océanos y los ecosistemas costeros, particularmente por los ecosistemas costeros con vegetación: praderas de pastos marinos, marismas y manglares. El interés mundial en BC está enraizado en su potencial para mitigar el cambio climático mientras se logran beneficios colaterales, como la protección costera y la mejora de la pesca (*Macreadie et al., 2019*). Los manglares son ecosistemas altamente productivos que se reconocen cada vez más como puntos de excelencia para el secuestro y entierro global de carbono. En promedio, los manglares tienen un stock C (valor de carbono) promedio de todo el ecosistema de $\sim 950 \text{ t C ha}^{-1}$, que es alrededor de 2.5 a 5 veces mayor que el stock C promedio del ecosistema que se encuentra en los bosques tropicales templados, boreales y de tierras altas ($200\text{-}400 \text{ t C ha}^{-1}$) (*Elwin, Bukoski, Jintana, Robinson, y Clark, 2019*).

Un aspecto clave en el éxito de los ecosistemas de BC como sumideros de carbono natural es su capacidad de acumular carbono orgánico (CO) que resiste o evade el ataque microbiano. Los microbios controlan las vías biogeoquímicas clave, por lo tanto, los cambios en la actividad microbiana y la estructura de la comunidad podrían afectar la estabilidad del BC, en este sentido podemos mencionar cuatro vías clave en las que el carbono podría permanecer preservado dentro de los ambientes de BC y evadir la descomposición (remineralización) por microbios: estabilidad química intrínseca; mecanismos físicos de protección (por ejemplo, adsorción o unión a minerales); la ausencia de comunidades microbianas in situ con la capacidad de producir enzimas para que ocurra la degradación; y condiciones ambientales hostiles a la actividad microbiana (*Macreadie et al., 2019*).

7.1.2 Manglares en Panamá

En Panamá, los manglares se encuentran a lo largo de ambas costas, pero están más desarrollados en la costa del Pacífico. Estos bosques están estructuralmente bien desarrollados con rodales de mangles que alcanzan los 30-40 m de altura y constituyen las especies dominantes en áreas amplias, mientras que otras especies forman comunidades más mixtas a lo largo de los gradientes de salinidad en ríos y estuarios.

Los manglares del Caribe generalmente no están bien desarrollados, con árboles de menos de 5 m de altura (*Spalding, Blasco, y Field, 1997*), sin embargo, incluso se piensa que los manglares panameños son los más diversos del continente americano (*ANAM y ARAP, 2013*). Puesto que su geografía incluye extensas costas, Panamá se ha convertido en un foco importante de Centroamérica para la conservación y gestión de los manglares. La topografía, el clima y las condiciones variables oceánicas a través del istmo da lugar a una gran variedad de especies de manglares en ambas costas del Pacífico y del Caribe; con 172,000 ha de bosque de manglares en Panamá representando un 5,6% de la cobertura total de bosques. De las trece especies de mangle presentes en América, once especies son nativas de Panamá que se incluyen en los géneros de *Laguncularia*, *Avicennia*, *Rhizophora* o *Pelliciera*. Las especies más comunes son los mangles rojos y blancos, *Rhizophora mangle* y *Rhizophora racemosa* respectivamente. A pesar de las diferentes especies pueden tener muy diferentes fenotipos, comparten características comunes: la dispersión de propágulos por el agua de mar, viviparidad y su capacidad de adaptarse fácilmente (*Bulow y Ferdinand, 2013*).

En las siguientes figuras (3 y 4) se muestra la interacción entre los manglares y los ecosistemas marinos-costeros en las costas del Pacífico y Caribe.

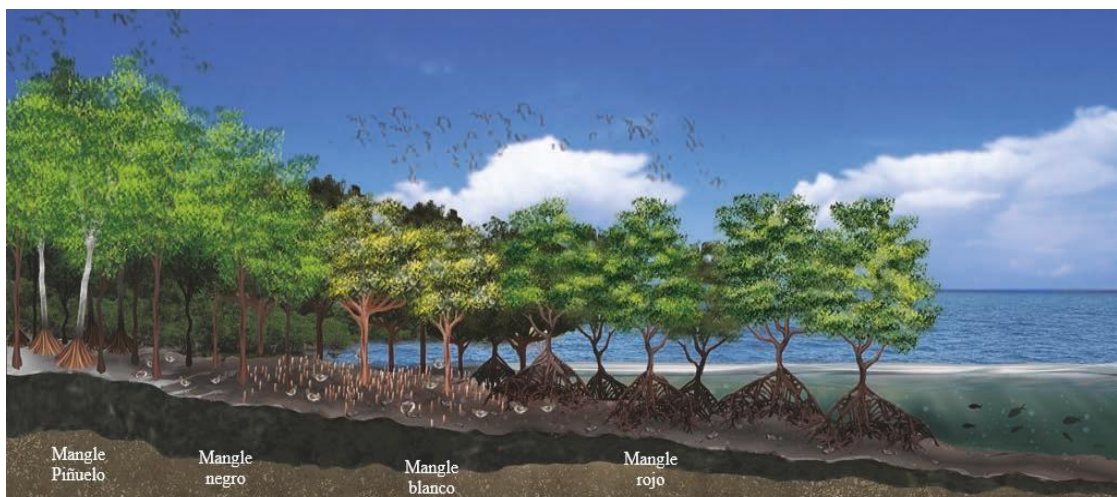


Fig. 3: Interacción de ecosistemas marino-costeros en el Pacífico panameño (*ANAM y ARAP, 2013*). Fuente: Elaborada por Alexis Peña, ARAP. Dibujo: Gabriel Contreras.

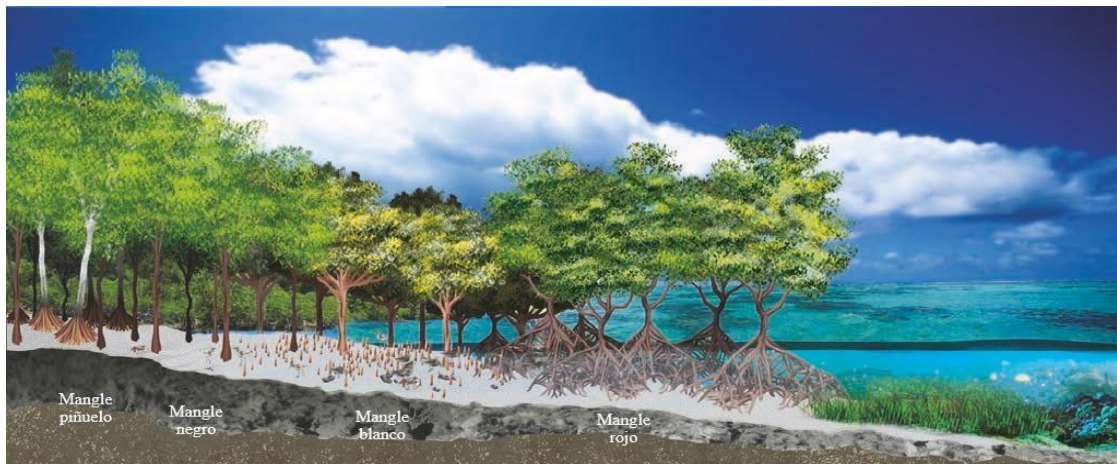


Fig.4: Interacción de ecosistemas marino-costeros en el Atlántico panameño (ANAM y ARAP, 2013). Fuente: Elaborada por Alexis Peña, ARAP. Dibujo: Gabriel Contreras.

7.1.3 Problemas presentes en los manglares

Los bosques de manglar están considerados entre los ecosistemas más vulnerables de la zona tropical/subtropical del planeta y sometidos a tensiones ambientales diversos en la interface continente/océano, muchos autores coinciden en que el cambio climático tiene diversos componentes que actúan a diferentes escalas (Yañez, Day, Twilley, y Day, 2014), sin embargo, el cambio climático no es solo una fuente de amenaza contra los manglares, sino también, tenemos actividades antropogénicas que golpean fuertemente este ecosistema siendo utilizados para el desarrollo de la industria de la maricultura del camarón, para la construcción de infraestructuras, puertos, carreteras, actividades agrícolas y la producción de carbón (Berdiales y Chavarría, 2009).

A nivel mundial se estima una pérdida anual del 2.5% de la superficie de manglares, por lo que existe una crisis ambiental en lo que se refiere a su deterioro, mucha de esta pérdida se debe al mal manejo de este recurso (Gaxiola, 2011), en Panamá existe un persistente problema con la gestión de residuos, aproximadamente 1.300 toneladas de basura están producidas diariamente en la ciudad capital, número que está aumentando rápidamente con el crecimiento de la población y el turismo. Se estima que el 70% de los residuos de Panamá se recogen en las zonas urbanas y se traslada a vertederos locales para ser quemadas. El 30% restante se acumula en las zonas comunes, incluyendo playas, bosques y cursos de agua. Eso es aproximadamente 390 toneladas de basura cada día que se desecha en los sistemas ambientales (Bulow y Ferdinand, 2013)

Esto genera una gran preocupación en los sistemas de manglar, ya que, al tener una presión constante de contaminantes como la basura, puede generar efectos negativos en el mismo ecosistema que afectarían directamente a la biodiversidad. Entre estos problemas podemos destacar los producidos por la acumulación de metales pesados, que va desde la bioacumulación en los árboles de mangle, hasta la acumulación y resistencia en microorganismos. Diversos estudios a nivel mundial han revelado elevadas concentraciones de metales en sedimentos de los humedales, esto representa un serio problema para los ecosistemas de manglar por su cercanía con las poblaciones humanas y su alta productividad primaria (*De la Cruz, Alderete, y Laffón, 2013*).

7.2 Clasificación de los seres vivos

Inicialmente, los biólogos agruparon el mundo de los seres vivos en cinco reinos, sin embargo, en la década de 1970 Carl R. Woese, de la universidad de Illinois, descubrió que unos extraños procariotas, identificados como arqueobacterias, tenían más diferencias bioquímicas con las bacterias que con las eucariotas (*Vázquez, 2014*). La filogenia molecular, ha puesto de manifiesto que los cinco reinos no representan grandes líneas evolutivas, sino que la vida celular en la Tierra ha evolucionado siguiendo sólo tres grandes linajes, donde se distinguen **dos tipos de células**, unas complejas o **eucariotas** y otras simples o **procariotas** (fig.5). Las dos líneas procariotas son *Bacteria* y *Archea*. La línea eucariótica se denomina *Eukarya*, éstos términos definen los tres dominios de la vida (fig.6) (*Madigan et al., 2014*). De acuerdo con las características básicas que hoy se conocen de la célula, es de suponerse que los primeros seres vivos, probablemente microorganismos semejantes en tamaño y complejidad a las actuales bacterias, debieron reunir los mismos requisitos para intercambiar sustancias con su entorno, realizar con el material que obtienen como nutriente una serie de reacciones químicas que conduce a la obtención de la energía requerida para sus funciones vitales y tener la capacidad de reproducirse (*Vázquez, 2014*).

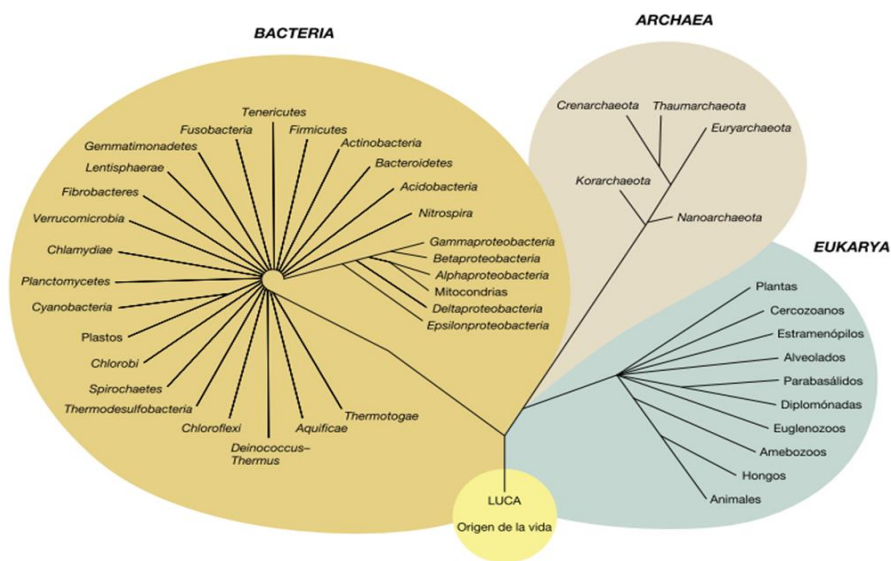


Fig.5: Los tres dominios del árbol de la vida propuestos por Woese. Estudios bioquímicos apoyan la división de la vida a partir de los tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya. Las bacterias y las arqueobacterias posiblemente aparecieron primero, derivadas de un conjunto de células primitivas, y más tarde los eucariontes surgieron a partir de las arqueobacterias (Vázquez, 2014).

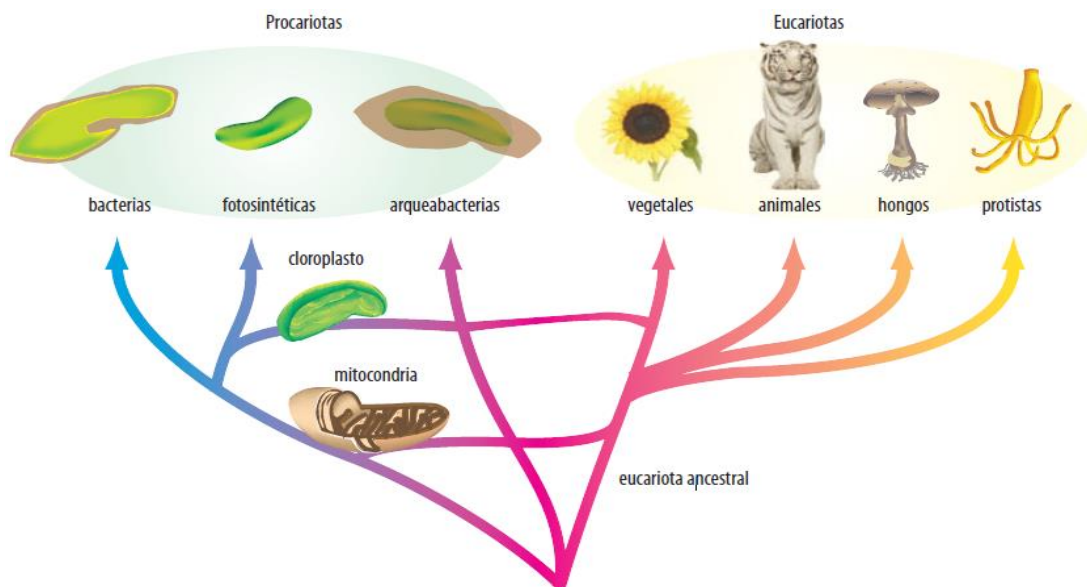


Fig.6: Árbol filogenético universal determinado por análisis comparativo de secuencias SSU rRNA. Se muestran únicamente algunos organismos o linajes fundamentales de cada dominio. Hasta el momento se han identificado al menos 84 filos de Bacteria, si bien muchos de ellos aún no han sido cultivados. LUCA, último antepasado común universal (Madigan et al., 2014).

Los seres vivos se clasifican en función del tipo celular y, más recientemente, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular por sus relaciones filogenéticas. Estas últimas, por ejemplo, se basan en comparar las identidades, semejanzas o diferencias que existen entre secuencias de aminoácidos y, de forma especial, entre secuencias cortas de oligonucleótidos existentes en el ácido ribonucleico ribosómico (ARNr), sobre todo en el ARNr 16S de las células procariotas y en el ARNr 18S de las eucariotas (secuencias signaturas) Estas regiones del ARNr están unas veces muy conservadas mostrando una gran estabilidad, mientras que otras, por el contrario, son variables modificadas con el transcurso de los años, además de establecer semejanzas y diferencias entre los seres vivos, permite evaluar la distancia que entre ellos se ha producido a lo largo del tiempo a partir de un ancestro común (*Liélibana, 2002*).

7.2.1 Procariota

Recordemos que las células más tempranas carecían de núcleo y fueron los primeros procariontes (*Pro* significa antes, *Karyon* quiere decir núcleo). Los procariotas modernos también carecen de núcleo y en sentido estructural son simples (*Starr et al., 2008*). Son procariotas las bacterias y las arqueobacterias. Normalmente las células procariotas son más pequeñas que las células eucariotas. En efecto, el diámetro promedio de la célula procariota es sólo de aproximadamente 1/10 del diámetro promedio de la célula eucariota. En las células procariotas, el ADN se encuentra en una región limitada de la célula llamada área nuclear, o nucleoide. A diferencia del núcleo de la célula eucariota, el área nuclear no está encerrado por una membrana (*Solomon et al., 2013*). A la membrana plasmática de los procariotas por lo general la protege una cubierta llamada pared celular, formada principalmente de peptidoglicano (polímeros de aminoácidos y carbohidratos). Se encuentran adaptadas a vivir en diferentes tipos de ambiente: en el suelo húmedo, en el desierto, en el aire, en aguas termales, en glaciares y mares; en distintas partes del cuerpo: en la boca, en el intestino, sobre la piel, en fin, en todo sitio donde pueda existir la vida (*Vázquez, 2014*).

7.2.2 Eucariota

La célula eucariota (del griego *Eu*, “verdadero”, y *Karyon*, “núcleo”) son más complejas y grandes que las procariotas y sus medidas oscilan entre 10 y 100 μm . Su material

genético se encuentra encerrado dentro de un núcleo, que lo protege y aísla de los demás organelos, característica que da nombre a este tipo de células. El citoplasma tiene una parte sólida, llamada protoplasma, y una semilíquida, el citosol. Contiene ribosomas, citoesqueleto y organelos membranosos. Hay tres tipos de células eucariotas, desde el punto de vista morfológico y funcional: fúngica, vegetal y animal (*De Erice y González, 2012*)

7.3 Bacteria

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas. En este dominio, según criterios evolutivos, diferenciamos el grupo de las eubacterias, y el de las arqueobacterias. Este último comprende bacterias sin peptidoglicano, como las anaerobias que viven en condiciones ácidas calientes, las que viven en condiciones salinas, y las que reducen el anhídrido carbónico (CO₂) a metano. Por lo tanto, éstas viven en las profundidades del mar, en las aguas saladas y en las fuentes ácidas. Las eubacterias, en cambio, viven en el suelo, el agua y los organismos vivos. Entre ellas se encuentran las bacterias de interés médico, las bacterias verdes fotosintetizadoras, las cianobacterias o algas verde azules, y las bacterias púrpuras fotosintetizadoras (*Algorta et al., 2008*).

Las bacterias causan enfermedades a los hongos, plantas y animales. En el hombre, causan enfermedades importantes en los distintos órganos del cuerpo. Por otro lado, se encuentran en el intestino de muchos mamíferos y ayudan a formar la flora intestinal, que protege de enfermedades, y producen vitaminas. Las bacterias tienen una enorme capacidad de adaptación a cualquier ambiente, por lo que forman parte de muchas cadenas alimenticias y, en conjunto con los hongos, constituyen los organismos descomponedores de materia orgánica. En laboratorio son fuente de experimentación porque su tasa de reproducción en un medio de cultivo adecuado es muy alta. Industrialmente se utilizan en la fabricación de medicamentos; además, se utilizan en la elaboración de alimentos como yogurt vinagre, queso y vinos (*De Erice y González, 2012*).

7.3.1 Morfología bacteriana

Las bacterias presentan distintas formas de vida, algunas son anaeróbicas, anaerobias

facultativas y otras aerobias. La pared celular de las bacterias gramnegativas está formada por peptidoglucano (mureína), fosfolípidos y proteínas. Por su parte, la pared celular de las bacterias grampositivas está formada por peptidoglucano, ácidos teicoicos y polisacáridos. Realizan síntesis de proteínas a través de ribosomas llamados 70S; los ribosomas se encuentran en cadenas largas ordenadas alineadas a lo largo del ARNm. Algunas bacterias presentan una envoltura amorfa de polímeros orgánicos (polisacáridos) llamada cápsula o capa mucosa, que se encuentra fuera de la pared celular. Algunas presentan flagelos para el movimiento (*De Erice y González, 2012*). Las bacterias, que son las células más pequeñas, sólo se pueden visualizar con ayuda de un microscopio. Las bacterias de menor tamaño (*Chlamydia* y *Rickettsia*) miden sólo 0,1-0,2 µm de diámetro, mientras que las bacterias más grandes pueden alcanzar varias micras de longitud. Una especie recientemente descrita es cientos de veces mayor que las células bacterianas promedio y se puede ver a simple vista. Sin embargo, la mayoría de las especies miden aproximadamente 1 µm de diámetro y sólo se visualizan con el microscopio óptico, cuya resolución es 0,2 µm. En comparación, las células de las plantas y los animales son mucho más grandes, y oscilan entre 0,7 µm (el diámetro de un eritrocito) y varios metros (la longitud de algunas células nerviosas) (*Murray et al., 2014*).

7.3.2 Vista microscópica

Vistas al microscopio, por lo general, las bacterias presentan tres formas básicas: las bacterias esféricas se denominarán cocos, las alargadas serán bacilos, las bacterias curvadas y las que tienen forma de espiral serán los espirilos, espiroquetas, comas o vibriones; cada una de ellas presentarán distintas características como se muestran en la Fig.7 (*Vargas y Kuno, 2014*).

7.3.2.1 Forma de cocos

Una célula de morfología esférica u ovoide (*Madigan et al., 2014*). El tamaño de los cocos oscila entre los 0,8 a 1,0 µm y pueden presentar y tomar diversas formas (*Vargas y Kuno, 2014*). Estas agrupaciones pueden ser:

- Diplococos: Estos, después de su división, permanecen en pares
- Tétradas: Estos cocos se dividen en dos direcciones perpendiculares, formando

una agrupación de cocos en una disposición cuadrada.

- Sarcinas: Producto de la división de los cocos en tres direcciones perpendiculares, formando una agrupación de cocos con una disposición cúbica.
- Estreptococos: Estos cocos se dividen en un solo plano, formando una secuencia de cuatro o más células como si se tratase de una cadena.
- Estafilococos: Formados por la agrupación irregular de cuatro o más cocos, en ocasiones se asemejan a racimos de uvas (*Vargas & Kuno, 2014*)

7.3.2.2 Forma de bacilos

Aquellos que presentan formas cilíndricas (*Madigan et al., 2014*), en forma de bastón, largos y delgados, pequeños y gruesos, también pueden presentar variaciones en sus extremos pudiendo ser rectos, afilados o redondeados (*Vargas y Kuno, 2014*).

- Diplobacilos: Formados por bacilos agrupados en pares.
- Estreptobacilos: Agrupación semejante a una cadena formada por cuatro o más bacilos.
- Empalizado: Son bacilos agrupados lado a lado como palitos de fósforo.
- Formas filamentosas: Son bacilos que crecen en forma de fibras y toman distintas disposiciones por lo que esta formación se denomina también letras chinas (*Vargas y Kuno, 2014*).

7.3.2.3 Forma de espirilos

Son aquellos bacilos que presentan forma de espiral (*Madigan et al., 2014*). Dentro de este grupo se encuentran:

- Vibriones: Son espirilos bastante cortos, por lo general presenta la forma de una coma.
- Espirilos: Estas bacterias, relativamente rígidas, presentan una forma helicoidal; se mueven a través de flagelos externos dando una o más vueltas alrededor de su propio eje.

- Espiroquetas: Presentan una forma helicoidal, pero a diferencia de los espirilos, poseen un cuerpo flexible, se mueven con la ayuda de filamentos axiales que son flagelos periplasmáticos, lo que les permite dar varias vueltas completas alrededor de su propio eje (Vargas Kuno, 2014).

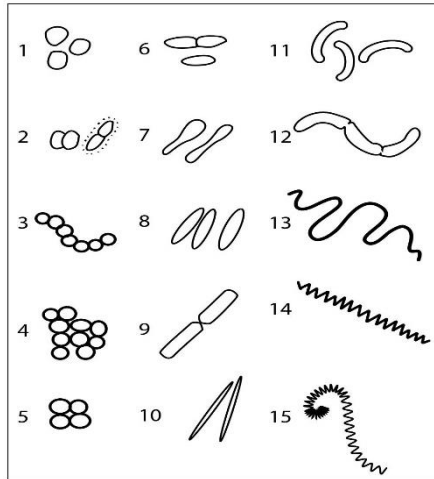


Fig.7: 1. Cocos; 2. Diplococo; 3. Cocos en cadenas; 4. Cocos en racimos; 5. Cocos en tétradas; 6. Cocobacilos; 7. Bacilos; 8. Bacilos bordes redondeados; 9. Bacilos bordes rectos; 10. Bacilos fusiformes; 11, 12. Bacilos curvos; 13 al 15. Espiroquetas (Algorta et al., 2008).

7.3.3 Tipos de tinciones

Los microorganismos, concretamente las bacterias, pueden observarse directamente al microscopio de campo claro. Sin embargo, debido al bajo contraste entre las células y su entorno, estos procedimientos se utilizan en ocasiones muy limitadas, como por ejemplo para la observación de la movilidad bacteriana. La tinción es un método sencillo para incrementar el contraste entre la célula y su entorno y por lo tanto contribuye a mejorar la imagen observada. Las técnicas de tinción con diversos colorantes facilitan la observación al aumentar notablemente el contraste (Vázquez, Martín, de Silóniz, y Serrano, 2011).

7.3.3.1 Tinción simple

Se pueden usar colorantes para teñir las células y mejorar el contraste, de modo que sea más fácil observarlas al microscopio de campo. Los colorantes son compuestos orgánicos, y cada clase de colorante tiene una afinidad por materiales celulares concretos. Muchos de los usados en microbiología tienen carga positiva, y por esta razón reciben el nombre de colorantes básicos (Madigan et al., 2014). Se denominan colorantes básicos si el cromóforo (porción coloreada) de la molécula está cargada positivamente, por ejemplo, cristal violeta y azul de metileno son colorantes básicos.

Otros colorantes de esta categoría utilizados con frecuencia en bacteriología son safranina, fuchina básica y verde malaquita. Bajo condiciones normales de crecimiento, la mayor parte de los procariotas tienen un pH interno próximo a la neutralidad (pH 7.0) y una superficie celular cargada negativamente, así los colorantes básicos son los más eficaces. Colorantes ácidos con rojo Congo, rosa de bengala, eosina y fuchina ácida tienen un cromóforo cargado negativamente y son utilizados para teñir positivamente ciertos componentes como las proteínas. La tinción simple nos proporciona exclusivamente información acerca de la forma, tamaño y tipo de agrupación de los microorganismos. Sin embargo tiene la ventaja de ser un método muy sencillo y rápido (Vázquez, Martín, de Silóniz y Serrano, 2011).

7.3.3.2 Tinción diferencial

Tinción que tiñe de colores diferentes a distintos tipos de células (Madigan *et al.*, 2014) aquí mostraré algunas de las más conocidas.

7.3.3.3 Tinción de Gram

La tinción de Gram o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram (1853- 1938), que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana. Christian Gram, desarrolló una técnica de tinción que permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas (Artega, Farfan, y Pinto, 2015). La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales (Figura 8).

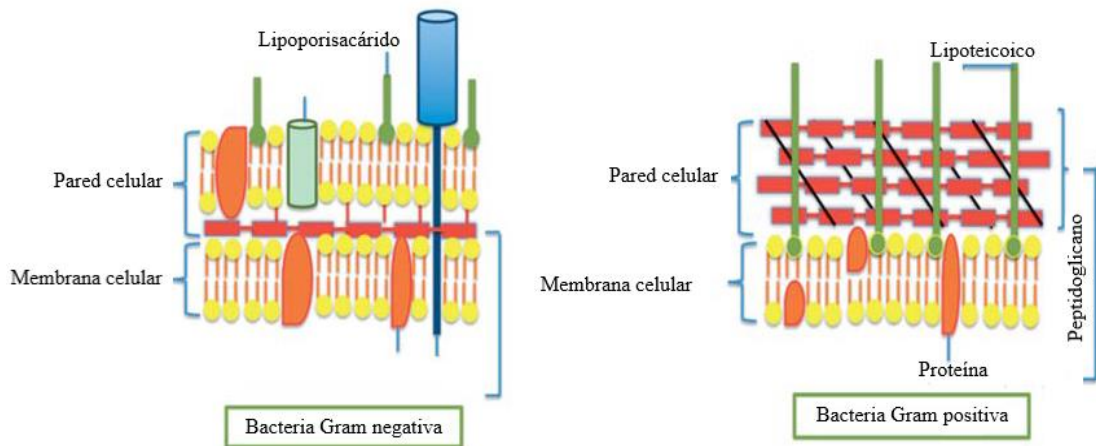


Fig.8: Esquema de las diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y Gram positivas (López et al., 2014).

La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca Lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. En seguida, se coloca una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contra tinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo (López et al., 2014).

7.3.3.4 Tinción de ácido-alcohol resistencia

Se trata de un procedimiento de tinción diferencial, conocido como método de **Ziehl-Neelsen**, que tiene gran relevancia por su aplicación clínica. Permite poder distinguir aquellos microorganismos cuya coloración resiste la acción de alcoholes y ácidos suaves (ácido-alcohol resistentes) de otros que no resisten la decoloración (no ácido-alcohol resistentes) (Vázquez et al., 2011).

7.3.4 Vista macroscópica

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente, y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima. Una colonia está constituida por los descendientes de una o unas pocas células. Las características de la colonia también dependen de la movilidad de la bacteria. La forma de la colonia puede ser circular, irregular, o filamentosa. Los bordes pueden ser ondulados característicos de los bacilos largos, en sierra o dentados, o lisos. La superficie de la colonia también es orientadora y puede ser: plana, convexa, mamelonada, o umbilicada. En relación al pigmento que adquieren, éste puede ser: verde, amarillo, etc. También es diferente el comportamiento frente a la luz: brillante u opaca. Pueden presentar olores particulares, o el putrefacto de los anaerobios. Por último, hay que destacar, que la consistencia de la colonia varía en los diferentes grupos de bacterias, pudiendo ser mucoide (**M**), liso (**S**) o rugoso (**R**) (*Algorta et al., 2008*).

7.3.5 Reproducción bacteriana

En algunas especies, la descendiente brota de la célula madre. Con frecuencia, una célula se reproduce por fisión procarionte. Una célula madre replica su cromosoma único, y la réplica de ADN se une a la membrana plasmática adyacente a la molécula madre. La adición de más de dos membranas permite que las dos moléculas de ADN se separen. Con el tiempo la membrana y la pared de la célula se extienden por la parte media de ésta, dividiéndola en dos células hijas. Además de heredar el ADN “verticalmente” de una célula madre, los procariontes experimentan transferencia horizontal de genes: recogen genes de la misma especie o de otra. Un mecanismo de transferencia horizontal de genes, llamado conjugación, incluye transferencia entre células procariontes. Un plásmido es un segmento pequeño de ADN circular que se separa del cromosoma bacteriano. En el curso de la conjugación, un pilus sexual especial atrae a dos células juntándolas. Luego, una célula coloca una copia de un plásmido y quizá algunos genes cromosomales en la otra. Las bacterias y las arqueas tienen plásmidos que pueden realizar la conjugación. Los miembros de estos dos grupos en ocasiones intercambian genes por este proceso. Los bacteriófagos también desplazan genes de manera horizontal entre los procariontes por el proceso llamado transducción. El virus recoge el

ADN de una célula a la cual infecta, y después lo transfiere a su siguiente huésped. Las procariotas también adquieren ADN al captarlo del entorno por el proceso llamado transformación (*Starr et al., 2008*). El ADN de una bacteria pasa a través de la pared celular y la membrana plasmática a otra bacteria, para después integrarse al ADN de la bacteria receptora, dándole nuevas características (*Vázquez, 2014*).

7.4 Bacterias en los manglares

Los manglares albergan diversas comunidades bacterianas, que representan el mayor grupo de biodiversidad en la tierra. Aquí, las bacterias realizan reacciones redox en varios ciclos biogeoquímicos, como el carbono, el nitrógeno, el azufre y el fósforo. Los metales pesados, por ejemplo, Ag, Cd, Cu, Pb, Sn, Zn, producen estrés oxidativo al interrumpir el sistema de defensa antioxidante o agotar el estado de tiol en los sedimentos que habitan en las bacterias. Este estrés oxidativo produce cambios en la abundancia y diversidad bacteriana en los manglares contaminados, lo que luego afectará el funcionamiento de los manglares (*Fernández et al., 2020*). Las bacterias que se encuentran en la mayoría de los ambientes, incluidos los desiertos, bosques, praderas, tundra ártica y manglares, comparten una prevalencia de Proteobacterias (manglares que tienen la mayor proporción), así como una gran abundancia de *Actinobacterias*, *Cloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Acidobacterias* y *Cianobacterias*. La abundancia relativa de cada filo varía según las condiciones ambientales particulares, pero los perfiles microbianos en estos altos niveles taxonómicos parecen ser adecuados para caracterizar los diferentes ambientes (*Ceccon, Faoro, Lana, de Souza, y Pedrosa, 2019*).

7.5 Metales pesados

Los metales pesados (MP) se clasifican como metales que ocurren naturalmente en la corteza terrestre y exhiben una gravedad específica de más de 5 g/cm³. Dichos metales incluyen plomo (Pb), mercurio (Hg), arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr) y niveles más altos de micronutrientes (por ejemplo, hierro (Fe), cobre (Cu), níquel (Ni) y zinc (Zn)). Su alta presencia en el medio ambiente surge de actividades antropogénicas que incluyen minería, pintura, baterías, desechos municipales, desechos metálicos, aceite de motor y la aplicación de pesticidas, herbicidas y fertilizantes. La presencia de tales metales en el ecosistema es motivo de gran preocupación debido a su alta toxicidad

relativa (Agbeshie, Adjei, Anokye, y Banunle, 2020).

La contaminación por MP es un problema ambiental común en muchos sistemas fluviales del mundo debido al rápido crecimiento de la población, la urbanización y la industrialización. Los sedimentos contaminados con MP tienen gravemente amenazado ecosistemas acuáticos. Teniendo las características de alto enriquecimiento y baja migración, los MP no pueden degradarse y tienden a reservarse en sedimentos asociados con materia orgánica u otros compuestos, que amenazan gravemente el ecosistema natural y la salud humana debido a su toxicidad, bioacumulación y nivel de persistencia en el medio ambiente (Zeng *et al.*, 2020). Los niveles elevados de MP en el agua y los sedimentos pueden conducir a su absorción por la biota. Por ejemplo, las plantas que crecen en un ambiente contaminado acumulan metales tóxicos en altas concentraciones, lo que finalmente representa un grave riesgo para la salud humana cuando se consume. Las plantas absorben estos metales del suelo y el agua en ambientes contaminados. De acuerdo con las concentraciones de MP, se propusieron cinco categorías de agua, desde la categoría I, que es agua dulce pura adecuada para todas las especies de peces, hasta la categoría V, que puede usarse solo para aplicaciones de mineralización. Los iones de MP poco solubles en agua se adsorben y acumulan fácilmente en sedimentos incluso a niveles traza. Por lo tanto, los sedimentos costeros se consideran el eventual sumidero de metales traza. Sin embargo, algunos metales pesados se movilizan de regreso al agua dependiendo de las condiciones fisicoquímicas como la salinidad, el pH, el estado redox y la tasa de descomposición de la materia orgánica (Elmorsi, Abou-El-Sherbini, Abdel-Hafiz Mostafa, y Hamed, 2019). Los MP pueden ingresar al medio de distintas muchas maneras, aquí mostraré unas de las más comunes.

7.5.1 Por medio natural

La condición geológica de muchos elementos en la corteza terrestre hace que los MP se encuentren en forma natural, disueltos en todos los sistemas acuáticos y en diferentes grados de concentración, mediante los procesos orogénicos; los ecosistemas acuáticos se ven sometidas a aportes de compuestos metálicos provenientes de los suelos, por parte la actividad volcánica y la erosión que son factores que contribuyen al aumento de las concentraciones de metales en el medio, siendo las fuentes de transporte más comunes las fuentes de agua y los vientos (Pinzón y Sotelo, 2016).

7.5.2 Por medio industrial

Las grandes industrias, por su parte, son grandes generadores de contaminación, ya sea a través de los gases, líquidos o sólidos, todo esto va a depender de los productos que generen, una de las fuentes de contaminación es a través de las aguas residuales, ya que estas pueden contener MP que con el tiempo se acumulan en los depósitos del suelo a lo largo de los canales de aguas residuales, así como en los organismos que habitan dichos canales. La exposición de los humanos a las aguas residuales contaminadas a menudo es posible, especialmente en áreas urbanas altamente pobladas o donde las aguas residuales se reutilizan para actividades agrícolas. Sin embargo, estudios anteriores han demostrado que la reutilización efectiva de las aguas residuales es un desafío importante en muchos países del mundo (*Kinuthia et al., 2020*).

7.5.3 Por medios agrícolas

Es importante destacar que existe una falta de estudio sobre el impacto del uso intensivo de la tierra en MP, en aguas superficiales y sedimentos de la red fluvial (*Zeng et al., 2020*) en este caso sabemos que el suelo agrícola es esencial para la seguridad alimentaria porque afecta directamente la salud humana; Los MP son los contaminantes más peligrosos debido a su acumulación en los cultivos, el crecimiento explosivo de la población ha aumentado el requisito de seguridad alimentaria, lo que resulta en un uso más intensivo de tierras cultivables y, por lo tanto, aumenta la contaminación por MP en las tierras agrícolas debido a la aplicación. de fertilizantes, estiércol de ganado y pesticidas. Los académicos han sugerido que los MP se han introducido en el suelo agrícola tanto por las actividades naturales de los materiales parentales como por las actividades antropogénicas de descarga industrial, insumos agrícolas, deposición atmosférica y escape de vehículos. Debido a que la contaminación por MP se encuentra no solo en el suelo agrícola sino también en los tejidos vivos, donde es, en su mayor parte, irrecuperable, el estudio de los MP en el suelo agrícola incluye la evaluación de la contaminación por MP, la distribución de la fuente y el riesgo para la salud (*Wang et al., 2020*).

7.5.4 Por medio de la minería

Los relaves generados por las plantas mineras y de procesamiento de minerales

representan la mayor proporción de desechos globales de actividades industriales. A pesar de la falta de datos precisos sobre la producción de desechos mineros, algunas estimaciones sugieren que anualmente se producen alrededor de 20,000–25,000 millones de toneladas de desechos mineros sólidos en todo el mundo (*Larsson et al., 2018*). El tratamiento inadecuado de minas y relaves abandonados también puede causar una mayor contaminación por metales pesados en suelos agrícolas adyacentes, aguas superficiales y subterráneas (*Wu, Qu, Nel, y Ji, 2020*).

7.5.5 Por medio de la tecnología

Desechos electrónicos significa equipos eléctricos y electrónicos desechados, como electrodomésticos (por ejemplo, aires acondicionados, refrigeradores y televisores), computadoras y teléfonos móviles (*Y. Han et al., 2019*). Los equipos electrónicos contienen hasta 17 metales preciosos incluyendo oro, plata y cobre, los cuales siguen teniendo un valor económico significativo cuando los aparatos caen en desuso. Si bien el reciclaje de los residuos electrónicos es considerado como un ámbito de negocio lucrativo, en muchos países faltan tanto reglamentaciones específicas como iniciativas empresariales (*UNESCO, 2010*). Los desechos electrónicos se han convertido en contaminantes ubicuos debido al rápido desarrollo de nuevas tecnologías. Se ha informado que alrededor de 20–50 millones de toneladas de desechos electrónicos generados en todo el mundo por año, y entre el 50–80% de los desechos electrónicos de los países industrializados se exportaron a países de Asia. Las actividades de reciclaje de desechos electrónicos no estándar y crudas son las principales fuentes de contaminantes ambientales, por ejemplo, MP, éteres de difenilo polibromados (PBDE), que están presentes en los sitios de reciclaje de desechos electrónicos, se han convertido en los principales contaminantes en los sitios de reciclaje de desechos electrónicos en China que representan grandes amenazas tanto para los ecosistemas como para la salud humana (*Wu, Gao, y Wang, 2019*).

7.6 Toxicidad de los metales pesados y su impacto

Los MP tienen un papel importante en los organismos al ser parte fundamental de sus funciones bioquímicas y fisiológicas. Algunos son oligoelementos imprescindibles para el mantenimiento de los sistemas bioquímicos de los seres vivos, como por ejemplo, el

cobre, el manganeso o el zinc, que son esenciales en el metabolismo de los mamíferos (Ferré, Schuhmacher, Llobet, y Domingo, 2007). Sin embargo, una escasa o excesiva concentración de éstos pueden alterar procesos bioquímicos y/o fisiológicos en el organismo. Y realmente lo que hace tóxico a los MP no son sólo sus características químicas, sino las concentraciones en las que pueden presentarse, y más importante aún, el tipo de compuesto o metabolito que forman. Además, las interacciones entre los metales y sus efectos tóxicos pueden complicar las enfermedades. La presencia en un alto porcentaje de MP como: el plomo, mercurio, cadmio, arsénico entre otros, en el ambiente contribuye en aumentar los índices de la problemática. Son frecuentes los reportes de MP asociados a la industria, producción agrícola y minería así: mercurio en fuentes de agua, quebradas, lagunas, entre otras, el arsénico en cultivos de hortalizas y legumbres en, diversos vegetales y aguas contaminadas con plomo y mercurio, uso indiscriminado de cientos de toneladas de mercurio y cianuro en explotación minera, especialmente de oro. Asimismo, muchos países reportan presencia de MP en peces y camarones en Indonesia, Japón, México y Chile, cerdo contaminado con plomo proveniente de Australia, salmón fresco con niveles peligrosos de plomo y cadmio en Noruega y Rusia reporta materias primas para fabricación de alimentos contaminadas con zinc provenientes de China (Londoño, Londoño, y Muñoz, 2016).

7.7 Plomo

El plomo (del latín *plumbum*) se denomina con el símbolo Pb, es un metal presente de forma natural en la corteza terrestre. Es un catión divalente que se une fuertemente a los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Azcona, Ramírez, y Vicente, 2015). Se trata de un MP, blando, resistente a la corrosión, de color gris azulado, que oscurece rápidamente con el aire, siendo su punto de ebullición de 1740°C, emitiendo vapores a partir de los 550°C, no es biodegradable (Burger et al., 2010).

7.7.1 Presencia del plomo en la antigüedad, hasta nuestros días

Las primeras extracciones de plomo se llevaron a cabo en la región de Anatolia alrededor del año 3500 a.C., lo que sugiere que la contaminación e intoxicación por plomo es uno de los primeros riesgos ambientales descritos en la historia de la humanidad. A partir de entonces, los humanos hemos estado expuestos a este metal por

medio de fuentes naturales y de desechos industriales y a pesar de que la concentración ambiental ha disminuido en épocas recientes, la exposición crónica continúa siendo un problema de salud pública asociado con un incremento en el riesgo de presentar diabetes mellitus 2, hipertensión arterial, enfermedad renal crónica, daño cognitivo y retraso en el crecimiento infantil (*Robles y Sabbath, 2014*).

Hoy en día aún existen fuentes de contaminación ambiental por plomo, entre las que destacan la explotación minera, la metalurgia, las actividades de fabricación y reciclaje y, en algunos países, el uso persistente de pinturas y gasolinas con plomo. También puede contener plomo el agua potable canalizada a través de tuberías de plomo o con soldadura a base de este metal. En la actualidad, buena parte del plomo comercializado en los mercados mundiales se obtiene por medio del reciclaje. Las personas pueden verse expuestas al plomo en su puesto de trabajo o en su entorno, principalmente a través de la inhalación de partículas de plomo generadas por la combustión de materiales que contienen este metal, también la ingestión de polvo, agua o alimentos contaminados. Otra posible fuente de exposición al plomo es el uso de determinados productos cosméticos y medicamentos no regulados (*Organización Mundial de la Salud [OMS], 2019*).

7.7.2 Efectos del plomo en la salud y el medio ambiente

Los niveles elevados de plomo en sangre (por sus siglas en inglés BLL) están relacionados con efectos adversos en los sistemas nervioso, gastrointestinal, cardiovascular, hematológico, reproductivo y renal. Se observan efectos neurocognitivos a lo largo del plazo incluso con BLL relativamente bajos. Gracias a las medidas de salud pública, los BLL promedio han disminuido precipitadamente con el tiempo. Sin embargo, el envenenamiento por el plomo todavía presenta una carga significativa para la salud pública, se estima que muchos niños alrededor del mundo tienen un nivel de BLL superior al nivel de referencia de 5mcg/dL (*Stierman et al., 2020*). La absorción del plomo depende del estado de salud, nutrición y edad de la persona. Los adultos generalmente absorben 20% del plomo que ingieren y casi todo ese plomo es inhalado. La mayor parte del plomo que ingresa al cuerpo es excretada por la orina o a través de la bilis por las heces (*Poma, 2008*).

El Plomo ocurre de forma natural en el ambiente, pero las mayores concentraciones son el resultado de las actividades humanas. El plomo se acumula en los cuerpos de los organismos acuáticos y organismos del suelo. Estos experimentarían efectos en su salud por envenenamiento, como por ejemplo las funciones en el fitoplancton; el fitoplancton es una fuente importante de producción de oxígeno en mares y muchos grandes animales marinos lo comen. Las funciones del suelo son perturbadas por la intervención del plomo, especialmente cerca de las autopistas y tierras de cultivos, donde concentraciones extremas pueden estar presente organismos del suelo. Es un elemento químico particularmente peligroso, y se puede acumular en organismos individuales, pero también entrar en las cadenas alimenticia (*Lenntech, 2012*).

7.8 Cobre

El cobre del latín *cuprum*, y este del griego *kypros*, Chipre (*Corominas, 1987*) cuyo símbolo es Cu, de número atómico 29, es un metal comparativamente pesado, el cobre sólido puro, tiene una densidad de 8.96 g/cm³ a 20°C, mientras que el del tipo comercial varía con el método de manufactura, oscilando entre 8.90 y 8.94. Su punto de ebullición normal es de 2595°C (4703°F) (*Lenntech, 2012*). Es un metal dúctil muy abundante sobre la corteza terrestre, se encuentra mezclado con otros metales (Au, Ag, Bi y Pb) y con sulfuros, sulfatos carbonatos y óxidos minerales. Tiene poca actividad química: únicamente se oxida lentamente en el aire húmedo recubriéndose con una capa de carbonato básico que es anticorrosivo. Su oxidación se favorece en medios ácidos (*Jaramillo, Sanchez, y Amaris, 2006*).

7.8.1 Presencia del cobre en la antigüedad, hasta nuestros días.

La historia del cobre siempre ha estado ligada al progreso de la humanidad. Las sociedades han sufrido grandes cambios desde que hace unos 10.000 años el cobre comenzó a utilizarse por sus propiedades únicas y, hoy en día, su importancia es cada vez mayor. El cobre fue probablemente el primer material utilizado por la humanidad, ya que es uno de los pocos metales que puede encontrarse en su estado nativo. Los primeros humanos en trabajar el cobre descubrieron que se podía martillar fácilmente en láminas, que moldeaban con formas cada vez más complejas a medida que aumentaba su habilidad. Los objetos hechos por estos primeros trabajadores del cobre (como puntas

de flecha, cabezas de hacha, sierras, raspadores y herramientas de corte) eran mucho más resistentes que los hechos de piedra y sílex, lo que supuso un gran avance (*Instituto Europeo de Cobre, 2018*). En la actualidad el consumo de cobre a nivel mundial es del orden de 18 millones de toneladas anuales (2,6 kg per cápita, estimando una población mundial de 6.800 millones). Este uso solamente es superado por el hierro y el aluminio (*Prado, Vidal, y Durán, 2012*).

7.8.2 Efectos del cobre en la salud y el medio ambiente

El cobre es esencial para mantener buena salud. Sin embargo, la exposición a dosis altas puede ser perjudicial. La exposición prolongada a polvos de cobre puede irritar la nariz, la boca, los ojos y causar dolores de cabeza, mareo, náusea y diarrea. Si usted bebe agua que contiene niveles de cobre más altos que lo normal, puede que sufra náusea, vómitos, calambres estomacales o diarrea (*Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2004*). El cobre es altamente tóxico, pues en su estado oxidado (Cu^{2+}) participa en reacciones en las que se producen radicales hidroxilos libres (OH), además del anión superóxido (O_2^{2-}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) atacan a las biomembranas a través del proceso peroxidación lipídica, desestabilizan su estructura y afectan sus funciones celulares. También pueden oxidar directamente a las proteínas y desnaturalizar el ADN y el ARN, lo que puede provocar daños que contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y al envejecimiento celular (*Feoktistova et al., 2018*).

El Cobre es a menudo encontrado cerca de minas, asentamientos industriales, vertederos y lugares de residuos. Cuando el Cobre termina en el suelo este es fuertemente atado a la materia orgánica y minerales. Como resultado este no viaja muy lejos antes de ser liberado y es difícil que entre en el agua subterránea. En el agua superficial el cobre puede viajar largas distancias, tanto suspendido sobre las partículas de lodos como iones libres. El Cobre no se rompe en el ambiente y por eso se puede acumular en plantas y animales cuando este es encontrado en suelos. En suelos ricos en Cobre sólo un número pequeño de plantas pueden vivir. Por esta razón no hay diversidad de plantas cerca de las fábricas de Cobres, debido al efecto del Cobre sobre las plantas, es una seria amenaza para la producción en las granjas. El Cobre puede seriamente influir en el proceso de ciertas tierras agrícolas, dependiendo de la acidez del suelo y la presencia de materia

orgánica. A pesar de esto el estiércol que contiene Cobre es todavía usado. El Cobre puede interrumpir la actividad en el suelo, su influencia negativa en la actividad de microorganismos y lombrices de tierra. La descomposición de la materia orgánica puede disminuir debido a esto. Cuando los suelos de las granjas están contaminados con Cobre, los animales pueden absorber concentraciones de Cobre que dañan su salud. Principalmente las ovejas sufren un gran efecto por envenenamiento con Cobre, debido a que los efectos del Cobre se manifiestan a bajas concentraciones (*Lenntech, 2012*).

7.9 Hierro

Del lat. *Ferrum* íd. *Fierro* que significa ancla (*Carter y Corominas, 1962*). El hierro cuyo símbolo es Fe, es un elemento que se caracteriza por ser magnético, al calentarse pierde su magnetismo, es blando, con brillo metálico y de color gris acerado a negro, el de ebullición de 2740°C y tiene una densidad de 7.8 g/ml. Se magnetiza fácilmente a temperatura ordinaria, es difícil magnetizarlo en caliente, y a unos 790 °C desaparecen las propiedades magnéticas. Su masa atómica es 55.847. (*Mineria, 2013*). El hierro es el segundo metal más abundante y el cuarto de todos los elementos, superado únicamente por el oxígeno, el silicio y el aluminio (*Dufrense, 1998*).

7.9.1 Presencia del hierro en la antigüedad hasta nuestros días

Si bien el hierro es conocido por el hombre desde hace más de 6000 años, se tienen muy pocos datos sobre su modo de obtención en la antigüedad. En los Pirineos tuvo origen un procedimiento de obtención denominado “forja catalana”, que se utilizó hasta el siglo XIV. Las forjas catalanas consistían en pequeños pozos o en crisoles, con las paredes revestidas de arcilla, dentro de los cuales se introducía el mineral junto con una gran cantidad de carbón vegetal, de esta manera, apenas si se obtenía un tercio del hierro, el resto se perdía con la escoria. A partir del siglo XIV se comenzó a utilizar un horno llamado alto fuego, precursor de los actuales hornos de cuba. En estos hornos se alcanzaba una temperatura más elevada lo que provocaba una fusión parcial del hierro. Todos estos procedimientos eran directos, es decir, se obtenía el hierro a partir del mineral. Posteriormente, fueron sustituidos por el proceso indirecto (*Katz, 2011*).

A lo largo de la historia, muchos países han desarrollado una próspera industria siderúrgica basada en los suministros locales de mineral y en la proximidad de bosques

para obtener carbón vegetal como combustible (*Moffit, 2012*). Hoy en día el hierro es el metal más utilizado, representando un 95% de la producción mundial metálica. Los principales usos del hierro son en obtención de aceros estructurales, hierro fundido y de hierro forjado. El hierro puro (pureza a partir de 99,5%) no tiene tantas aplicaciones, excepto usos en base a su potencial magnético. Otros usos del hierro y de sus compuestos son la fabricación de aceros estructurales para la construcción, fierros, instrumentos de cocina, automóviles, aparatos eléctricos, entre otros elementos de uso diario (*Becerra, 2016*).

7.9.2 Efectos del hierro en la salud y el medio ambiente

El hierro es un mineral necesario para el crecimiento y desarrollo del cuerpo. El cuerpo utiliza el hierro para fabricar la hemoglobina, una proteína de los glóbulos rojos que transporta el oxígeno de los pulmones a distintas partes del cuerpo, y la mioglobina, una proteína que provee oxígeno a los músculos. El cuerpo también requiere hierro para elaborar hormonas y tejido conectivo. La cantidad de hierro diaria que necesita varía según la edad, el sexo, y si consume una dieta principalmente vegetal (*National Institute of Health, 2019*). Como se mencionó anteriormente, aunque el hierro es un nutriente esencial para el ser humano un exceso en el organismo implica una amenaza para células y tejidos. En condiciones fisiológicas, la cantidad total de hierro en el organismo es dependiente de la absorción de dicho elemento y en ella intervienen mecanismos genéticamente regulados. En numerosas enfermedades, genéticas o adquiridas, se puede producir acumulación del micronutriente (*Toxqui et al., 2010*). En este sentido el hierro puede comprometer diferentes órganos y sistemas provocando una intoxicación aguda por hierro (*Alfonso, 2011*). El hierro (III)-O-arsenito, pentahidratado puede ser peligroso para el medio ambiente; se debe prestar especial atención a las plantas, el aire y el agua. Se recomienda encarecidamente que no se permita que el producto entre en el medio ambiente porque persiste (*Lenntech, 2012*).

En las aguas subterráneas anaerobias puede haber concentraciones de hierro ferroso de hasta varios miligramos por litro sin que se manifieste alteración alguna del color ni turbidez al bombearla directamente desde un pozo. Sin embargo, al entrar en contacto con la atmósfera, el hierro ferroso se oxida a férrico, tiñendo el agua de un color marrón rojizo no deseable. El hierro también potencia la proliferación de bacterias ferruginosas,

que obtienen su energía de la oxidación del hierro ferroso a férrico y que, en su actividad, depositan una capa viscosa en las tuberías. En el agua potable el hierro, se presenta por corrosión de las tuberías de distribución de aguas, en estos fenómenos intervienen las bacterias férricas la cuales propician la aparición de ciertas características en el agua como: sabor metálico, color marrón rojizo, turbidez, manchas en la ropa lavada y en artefactos sanitarios (*Valencia, 2006*).

7.10 Evolución microbiana espacio-temporal en paisaje de antibióticos

Un estudio pionero que se centró en poblaciones pequeñas mostró que los microambientes estructurados aumentan la tasa de adaptación a los antibióticos a través de cambios genéticos altamente reproducibles. Se desconoce cómo la evolución está determinada por el potencial de diversificación y las diferencias en las limitaciones adaptativas de las grandes poblaciones en entornos espaciales. A continuación, se presenta un dispositivo para la evolución de bacterias que permite la migración y la adaptación en un entorno grande y estructurado espacialmente. La placa de arena de crecimiento y evolución microbiana (MEGA) consiste en una placa acrílica rectangular, de 120 × 60 cm, en las que sucesivas regiones de agar de color negro que contienen diferentes concentraciones de antibióticos se superponen con agar blando que permite la motilidad bacteriana (Fig. 9A). Las bacterias móviles inoculadas en un lugar de la placa agotan los nutrientes localmente y luego se propagan por quimiotaxis a otras regiones. Sólo los mutantes cada vez más resistentes pueden diseminarse en secciones que contienen niveles más altos de antibiótico. El gran tamaño de las placas tiene dos propósitos: proporciona una gran población y suministro mutacional, y mantiene el gradiente de antibióticos a pesar de la difusión (el tiempo de difusión del fármaco escala cuadráticamente con la distancia mientras que el frente bacteriano avanza linealmente; por lo tanto, el tamaño de la placa grande evita que el gradiente de antibiótico se equilibre durante la duración del experimento). Una vez que un mutante ha agotado los recursos de una región de la placa, otros mutantes no migran por completo por quimiotaxis a esa región (porque se mueven de manera difusa sin un gradiente de nutrientes). De esta manera, los linajes mutacionales pueden bloquearse físicamente entre sí, un fenómeno que se observa notablemente en la formación de biopelículas. Esta

partición de mutantes en dominios espaciales estables también permite el muestreo de mutantes individuales para análisis posteriores. Combinando estos con el análisis de aislamientos, este sistema permite la reconstrucción de las historias evolutivas fenotípicas y genotípicas de bacterias en evolución. Las bacterias desafiantes en gradientes espaciales de antibióticos conducen a grandes aumentos en la resistencia a través de pasos adaptativos secuenciales a través de linajes en competencia (Fig.9B). Primero se configuró la placa MEGA con gradientes simétricos de cuatro pasos de trimetoprima (TMP) o ciprofloxacina (CPR) avanzando hacia adentro con incrementos de orden de magnitud en la concentración por paso [Fig. 9A; TMP: 0, 3, 30, 300 y 3000 \times concentración inhibitoria mínima de tipo salvaje (CMI); CPR 0, 20, 200, 2000 y 20.000 \times CMI] e inocularon las regiones libres de fármaco con *Escherichia coli*. Las bacterias se propagan hasta que alcanzan una concentración en la que ya no pueden crecer (TMP, Fig. 9C; CPR). A medida que surgen mutantes resistentes en la población, sus descendientes migran al siguiente paso de concentración de fármaco y se despliegan (Figura 9C, 88 horas). Los linajes mutantes adyacentes se excluyen entre sí y compiten por un espacio limitado, lo que resulta en algunas líneas que bloquean por completo el crecimiento de otros. En entornos naturales y clínicos las bacterias migran entre regiones de selección espacialmente distintos. Los modelos teóricos muestran que espacialmente las presiones estructurales cambian la naturaleza de la selección: en lugar de competir con sus vecinos por recursos limitados, un individuo adaptado solo necesita ser el primero con la capacidad de aventurarse y sobrevivir en una nueva región. A medida que surgen los mutantes resistentes en la población, sus descendientes migran al siguiente paso de concentración de fármaco y se despliegan. Cuando los linajes ganadores alcanzan un nivel mayor en concentración de fármacos en el que ellos tampoco pueden crecer, surgen mutaciones secundarias y el proceso se repite. En última instancia, las bacterias alcanzan y se extienden por encima de la concentración de fármacos más alta, mostrando marcados incrementos en la resistencia a los fármacos. A diferencia de un gradiente temporal, un gradiente espacial no impone un tiempo mínimo para la operación y propagación de un mutante que aparece en el frente estancado puede expandirse y evolucionar más, siempre que sea resistente para colonizar el siguiente paso (Baym et al., 2016).

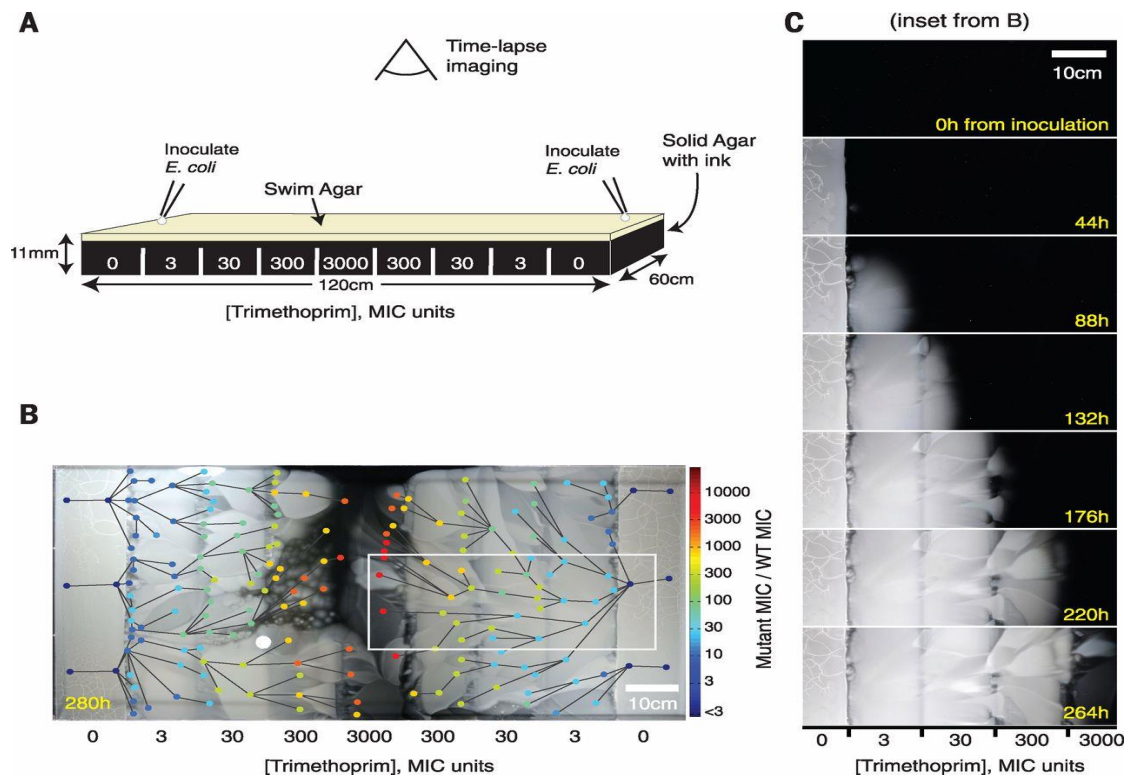


Fig. 9: Un dispositivo experimental para estudiar la evolución microbiana en un entorno estructurado espacialmente.

(A) Configuración del gradiente de cuatro pasos de trimetoprima (TMP). El antibiótico se agrega en secciones para hacer un gradiente exponencial que se eleva hacia adentro. (B) La placa TMP MEGA de cuatro pasos después de 12 días. *E. coli* aparece como blanco sobre fondo negro. Los 182 puntos muestreados de clones están indicados por círculos, coloreados por su CMI medida. Las líneas indican ascendencia. (C) Imágenes de lapso de tiempo de una sección de la placa MEGA. En cada paso se pueden observar mutaciones y selecciones repetidas. Las imágenes se han alineado y mejorado el contraste linealmente, pero por lo demás están sin editar (Baym et al., 2016).

7.11 Biorremediación

Particularmente, la biorremediación juega un rol sustancial en la remoción de compuestos contaminantes y desperdicios. Ésta se basa en el uso de sistemas biológicos para degradar o transformar los contaminantes en compuestos no tóxicos o menos

daños. La biorremediación es una tecnología promisorio que utiliza sistemas biológicos, estrictamente microorganismos o sus productos, para reducir, eliminar, o transformar los compuestos tóxicos presentes en suelos, sedimentos, agua y/o aire, en sustancias “inocuas” o menos contaminantes (*Cota et al., 2018*). Casi todos los compuestos orgánicos y algunos inorgánicos pueden degradarse biológicamente si se da el tiempo suficiente y se proporcionan las condiciones físicas y químicas requeridas (*Iturbe, 2010*).

7.11.1 Interacciones bacterianas con los metales pesados

Las comunidades de microbios son un impulsor clave de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes del suelo y son sensibles a los cambios ambientales, lo que significa que pueden adaptarse rápidamente a los cambios cambiando su composición y estructura (*Xi et al., 2021*). Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos. Entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (*Cervantes et al., 2006*). En este sentido, podemos clasificar las interacciones microorganismo-metal como: Bioacumulación, Sistemas de Expulsión, Quelación, Metilación, Oxido/Reducción, Bioadsorción. Es difícil clasificar las interacciones microorganismo-metal, ya que en la mayoría de los casos están relacionadas entre sí (*Hernández, 2008*).

Por otro lado, los ambientes contaminados proporcionan un ambiente de interés, ya que posee organismos resistentes a los metales pueden ser utilizados para limpiar ambientes contaminados a través de aplicaciones biotecnológicas gracias a que poseen mecanismos de sobrevivencia y desintoxicación que les permite tolerar y acumular los metales pesados; es así que, los microorganismos tolerantes aislados de ambientes contaminados con metales pesados son una buena alternativa para limpiar y remediar estos ecosistemas. Así mismo como primer paso para el diseño de los procesos de biorremediación se sugiere determinar los microorganismos existentes en las áreas perturbadas, porque los microorganismos nativos además de tolerar los metales también

están adaptadas a las condiciones ambientales de temperatura, humedad, pH, etc. del área interés (Muñoz *et al.*, 2019).

7.11.2 Bioacumulación

El proceso de bioacumulación implica una primera etapa que es la bioadsorción, sin embargo, luego le siguen otras etapas las cuales permiten el transporte de los contaminantes a través de un sistema de transporte activo que permite el consumo de energía al interior de la célula, mediante mecanismos de acumulación dentro de las células de biomasa vivas (Tejada *et al.*, 2015). Siguiendo con la captación intracelular, en la que los iones metálicos penetran en la membrana celular y entran en la célula para unirse a los sitios activos proporcionados por polisacáridos y proteínas (Mwandira *et al.*, 2020). Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema H⁺-ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Vullo, 2003).

7.11.3 Biosorción

Se trata de la captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa (viva o muerta), a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico. Cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir en el proceso. El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente) y una fase líquida (solvente, que es normalmente el agua) que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, e. g. iones metálicos) (Cañizares, 2000). En condiciones extremas en presencia de metales pesados tóxicos y antibióticos, las bacterias comúnmente producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) como respuesta protectora. Los EPS bacterianos son polímeros naturales de alto peso molecular secretados por microorganismos en su entorno. El EPS bacteriano

normalmente contiene polisacáridos con grupos funcionales ionizables como carboxilo, sulfato y fosfato (*Mwandira et al., 2020*).

7.11.4 Bioadsorción

Es la adsorción de los iones en la superficie de la célula. El fenómeno puede ocurrir por intercambio iónico, precipitación, complejación o atracción electrostática. Es un proceso fisicoquímico que incluye los fenómenos de adsorción y absorción de moléculas e iones usando como sorbente diferentes materiales de origen biológico (vivo o muerto). Involucra una fase sólida (biomasa) y una fase líquida (agua) que contiene disueltos la sustancia de interés que será adsorbida (en este caso, los iones de los metales pesados). Es necesario que exista una gran afinidad entre los grupos funcionales de la biomasa y el contaminante, ya que este último debe ser atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos (*Tejada et al., 2015*).

7.11.5 Sistemas de expulsión

Es la habilidad de exportar el metal al exterior de la célula microbiana. Es claramente un mecanismo de desintoxicación específico y dependiente de la presencia del metal, ya que su activación es inducida por éste. Estos sistemas de expulsión son dependientes de energía y codificados por plásmidos, la resistencia a metales en procariontes es mediada principalmente por plásmidos y es altamente específica a un metal en particular, el caso más conocido y estudiado es la reducción del arsénico con la posterior expulsión celular del metal (*Hernández, 2008*).

7.11.6 Quelación

Bacterias u hongos son capaces de producir muchas sustancias formadoras de complejos o quelantes. Pueden acomplejar los metales en materiales poliméricos, intra o extracelularmente (*Hernández, 2008*). Los sideróforos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por una variedad de microorganismos, hongos y plantas, mientras crecen en condiciones limitantes de hierro. Estos compuestos quelatan principalmente el hierro férrico (Fe^{3+}) de diferentes fuentes y, por lo tanto, lo hacen disponible para las células. Además de facilitar el suministro de hierro para diversas funciones celulares, incluida la fotosíntesis, la respiración, la biorremediación, los

factores promotores del crecimiento y la complejación con otros elementos esenciales como Mo, Mn, Co y Ni los sideróforos también están relacionados con la patogenicidad en diversas bacterias (Sinha y Parli, 2020).

7.11.7 Metilación

Representa un mecanismo general de resistencia a metales, activado por la presencia de éstos. Algunos microorganismos pueden transformar los metales por alquilación, es una forma especial de quelación que involucra transferencia de uno o más grupos de ligandos orgánicos (ej. grupos metilo) al metal, formando compuestos organometálicos estables. Las propiedades físicas y químicas de los organometales son diferentes de aquellas de los metales puros, algunos ejemplos incluyen formación de estructuras metiladas y posiblemente etiladas de mercurio, selenio, estaño, telurio, arsénico y plomo, por lo que se considera un mecanismo general que se ve activado por la presencia metálica (Hernández, 2008). Tenemos como ejemplo la transformación de mercurio inorgánico (iHg) en metilmercurio (MeHg) ocurre principalmente en sedimentos o suelo y está mediada principalmente por microorganismos. Muchos estudios se han centrado en la biometilación anaeróbica de iHg en diversos entornos, es decir, bacterias reductoras de sulfato (SRB) bacterias reductoras de hierro (FeRB) y metanógenos (Cao *et al.*, 2021). Estudios más recientes han revelado la existencia de SRB tales como *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* que son capaces de realizar la metilación del mercurio. La transformación del mercurio en metilmercurio en SRB es producida por intermedio de la cobalamina (B12), de tal manera que cuando *Desulfovibrio desulfuricans* tiene un crecimiento fermentativo y existe una reducción del sulfato, los rangos de metilmercurio son bajos. *Desulfovibrio desulfuricans* metila el mercurio en presencia de tetrahidrofolato (THF) y cobalamina. El carbono empleado en esta vía de biometilación pertenece al C-3 del piruvato y es donado al tetrahidrofolato como C-3 a la serina por la serina hidrometiltransferasa. Se cree que el compuesto químico que proporciona el grupo metilo es la metilcobalamina y que los compuestos S-adenosilmetionina y N-5- metiltetrahidrofolato no son capaces de donar el grupo metilo al Hg^{+2} , porque éste en estos dos compuestos se transfiere como CH^{3+} , mientras que metilcobalamina transfiere el grupo metilo como CH^{3-} , ocurriendo esta transferencia de

forma intracelular. El grupo metilo de la metilcobalamina es transferido a los iones mercurio formándose el metilmercurio (*Sánchez et al., 2005*).

7.11.8 Oxido-Reducción

Dependiendo del estado de oxidación del metal un microorganismo puede realizar dos posibles transformaciones, una corresponde a la movilización del metal, es decir la transformación del estado insoluble inicial que corresponde a una fase sólida a un estado soluble final que se presenta en fase acuosa, este proceso se conoce como lixiviación; la otra transformación es la inmovilización del metal que es un proceso en donde la fase soluble inicial en fase acuosa pasa a un estado insoluble final en fase sólida de su estado de oxidación y de su forma iónica. Los metales de diferentes valencias varían en su toxicidad; cuando se excretan enzimas redox especiales, los microorganismos pueden transformar el metal a formas menos tóxicas. Las reacciones redox se agrupan en dos categorías, las asimilatorias y las desasimilatorias; en las reacciones asimilatorias el metal está involucrado en las reacciones metabólicas del organismo actuando como aceptor final de los electrones; mientras que en las reacciones desasimilatorias no se conoce el rol del metal en el metabolismo del organismo e indirectamente inicia las reacciones redox (*Beltrán y Gómez, 2016*).

8 MATERIALES Y METODOLOGÍA



Fig. 10: Vista satelital de las áreas de estudio con su coordenada geográfica, donde el área 1 es el del vertedero, el área 2 pertenece a la zona intermedia y el área 3 es la zona de la costa. (Editada por Dra. Carla Laucevicius Laboratorio Toth Research and Lab).

8.1 Área de estudio

Está formada por las localidades que limitan desde el norte con parte de los corregimientos de Cermeño y Capira, en el distrito de Capira; al este con el Golfo de Panamá; al sur con el Golfo de Panamá y parte del corregimiento de Chame, El Líbano y Punta Chame; y al oeste con parte del corregimiento de Campana, Sajalices y Bejuco; formando para de los Distritos de Capira y Chame, Provincia de Panamá (*Gaceta Oficial*, 2009). El área protegida cuenta con una superficie total de ocho mil ochocientos noventa y nueve hectáreas con nueve mil ciento ochenta y un metros cuadrados aproximadamente (8,899 Ha + 9,181 m².)

8.2 Tiempo de desarrollo del estudio

Este trabajo cuenta con un estudio previo realizado un año antes, con similitudes en ambos, ya que fueron realizados en el mes de septiembre y en los mismos sitios de muestreo.

Cabe destacar que en las fechas en que se realizó la toma de muestras fueron días lluviosos.

8.3 Tamaño de la muestra

Consistió en tres parcelas de las cuales se dividió en cinco subparcelas, en total fueron 15 muestras.

8.4 Toma de las muestras

Las muestras fueron recolectadas por el Laboratorio Toth *Research & Lab*, de la cual no pude participar, ya que tomé el proyecto tiempo después de que fueran recolectadas.

La toma de las muestras se realizó utilizando la metodología que presenta el *Standard Methods of Examination of Water & Wastewater* para el análisis de agua, las mismas fueron tomadas en los manglares de Chame, distrito de Panamá Oeste, Panamá, cuyas coordenadas están en la Fig.10 los recipientes fueron previamente esterilizados y con su debida preservación. Se tomó como referencia los impactos de los vertederos de basura, trazando una línea imaginaria paralela a la costa y de ésta, dos líneas perpendiculares que van desde el punto de la entrada del vertedero hasta el final del mismo, abarcando 343 hectáreas, con 40 hectáreas entre cada parcela; estas con rangos de longitud de 100m, con 5 subparcelas de 100m² c/u y una distancia de 10m entre subparcelas. De las cinco subparcelas se tomó 1 galón por cada subparcela, y de este se tomó un litro en un envase esterilizado para los análisis microbiológicos. Las muestras fueron conservadas para análisis de metales pesados, almacenándose a 4 ° C siendo trasladadas al laboratorio.

8.5 Preparación de los medios

Para el aislamiento de las cepas utilizamos TSA (Agar Tríplico de Soya, peptona de caseína 15g/L, peptona de soja 5g/L, Na Cl 5g/L, agar 15g/L a pH 7,3) (*Scharlau, 2013*), y para las pruebas de resistencia, se utilizó caldo LB (Caldo Luria o Luria Bertani L, contiene peptona de caseína 10g/L, extracto de levadura 5g/L a pH 7.2) (*Scharlau, 2012*), estos medios fueron esterilizados en autoclave (2340M-B/L Heidolph) a 121° C por 15 min, al igual que las placas de vidrio fueron esterilizadas antes de verter el medio.

8.6 Aislamiento

Se realizó diluciones en serie para el aislamiento de las bacterias provenientes de las muestras (Cervera, 2011), en cada placa se escogieron cepas por sus características fenotípicas, que a su vez fueron llevadas a un segundo o tercer aislamiento (si fuese necesario) para lograr a una cepa pura y para respectivamente codificarlas (Soto et al., 2016).

De igual manera para su preservación se utilizó la técnica de conservación por enfriamiento que consiste en conservar las bacterias en frío, utilizando como agente protector el glicerol al 10%, en caldo LB, esto para utilizarlas las veces que fuese necesario sin perder su potencial (Arencibia et al., 2008).

8.7 Preparación de Metales

Al preparar los metales, fue necesario determinar la concentración madre con la que partiría para hacer las diluciones, sabiendo que cada uno de estos metales estaban en forma de sal, se realizó el cálculo a través de estequiometria química, iniciando con una concentración alta, la cual nos ayudó a mantener un equilibrio entre las otras sustancias a las que se iba a complementar y así no diluir la concentración deseada. Utilizando sales de metales como $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{Pb (CH}_3 \text{ COO)}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, todos estos fueron preparados en una concentración madre de 60 000 ppm, de las cuales, dependiendo del comportamiento de las cepas control (*Escherichia coli* ATCC 8339 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) frente a cada metal, se determinó su CMI, a partir de estas CMI se estableció un rango en el cual expusimos nuestras bacterias, tomando en cuenta que en cada metal las concentraciones variaron.

8.8 Ensayos microbiológicos

Para la determinación de su Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) fue necesario preparar cada cepa en una concentración de 0.5 McFarland (CDC-OMS, 2009) que corresponde a una suspensión de 1.5×10^8 UFC. para incubar en los pocillos de poliestireno con 50 μL de las mismas, teniendo la concentración madre de cada metal lo dividí de la siguiente manera.

Cu: se utilizaron concentraciones de 60 ppm, 80 ppm, 100ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, a su vez utilizando pocillos control negativo y control positivo.

Fe: concentraciones de 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm, junto con los controles negativos y controles positivos.

Pb: concentraciones de 200 ppm, 400 ppm, 1000 ppm, 1200 ppm, 1400 ppm, 1600 ppm, junto con sus controles negativos y controles positivos.

Conociendo la concentración a usar se realizó un cálculo con la ayuda de la formula $C_i V_i = C_f V_f$ para así poder distribuir la cantidad de metal en μL que se agregaron en el pocillo y no diluir nuestra concentración del metal.

Los pocillos tienen una capacidad de 400 μL de los cuales fueron utilizados 300 μL , distribuido de la siguiente manera: 0.50 μL serían llenados con la muestra de cepas previamente preparadas; para el volumen del metal, se determinaron las concentraciones de los metales a las que serían expuestas, teniendo este valor por estequiometría determinando así el volumen que se agregaría del metal en el pocillo para evitar su dilución, y se agregaba el resto del medio de cultivo para aforar el volumen necesario del pocillo, y así se mantuvo todo en equilibrio (Coyle *et al.*, 2006). A su vez se le realizó una caracterización de las cepas a través de la tinción de Gram (Rodríguez y Arenas, 2018).

La lectura se realizó observando turbidez en los pocillos o formación de pellets en el fondo del pocillo, de presenciarse, se consideraba como crecimiento y se tomaba como referencia el último pocillo donde se observaba la turbidez, en algunos pocillos y/o metales específicos se realizó siembra en placas, ya que la solución con el metal no permitía la distinción del crecimiento.

8.9 Prueba de Q de Cochran en el paquete de SPSS

La prueba de Q de Cochran fue realizada en el programa estadístico SPSS 26.0 (IBM, SPSS 26.0, NY). En el paquete estadístico se tiene la prueba Q de Cochran está en Analizar/ Pruebas no paramétricas/ k muestras relacionadas, la primera parte describe la frecuencia de las respuestas por cada medición, finalmente se presenta el valor de Q, con los grados de libertad y la significancia asociados (Juárez, Villatoro y López, 2002).

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 RESULTADOS

9.1.1 Identificación de tipo de bacteria

Se aislaron un total de 161 cepas divididas de la siguiente manera: 42 en la Parcela #1, 72 en la Parcela #2 y finalmente 47 en la Parcela #3; de las cuales 80 fueron tomadas para realizar los análisis, de estas 80 cepas 73 presentaron crecimiento después de su preservación.

Con el objetivo de determinar el tipo de bacteria, se realizó una Tinción de Gram conforme a los resultados de los bioensayos, ya que las bacterias eran totalmente desconocidas para este punto.

Cuadro 1

Bacterias Gram positivas de las cepas analizadas

Parcela	Nombre de la cepa
Parcela 1	P1C1
Parcela 2	P2B19
Parcela 2	P2B25
Parcela 2	P2B5
Parcela 2	P2B8-B
Parcela 2	P2B9
Parcela 2	P2E1
Parcela 3	P3A1
Parcela 3	P3B12
Parcela 3	P3C5
Parcela 3	P3D1
Parcela 3	P3E5

De las 41 bacterias analizadas, 12 de ellas presentaron el Tipo de Gram positivas.

Cuadro 2

Bacterias Gram negativas de las cepas analizadas

Parcela	Nombre de la cepa
Parcela 1	P1A4
Parcela 1	P1A6
Parcela 1	P1A9
Parcela 1	P1B3
Parcela 1	P1B4
Parcela 1	P1B7
Parcela 1	P1C3
Parcela 1	P1C4
Parcela 1	P1D6
Parcela 1	P1D7
Parcela 1	P1E2
Parcela 1	P1E5
Parcela 1	P1E6
Parcela 2	P2A10
Parcela 2	P2A12
Parcela 2	P2A6
Parcela 2	P2B11
Parcela 2	P2C24
Parcela 2	P2C7
Parcela 2	P2D8
Parcela 2	P2E4
Parcela 2	P2E7
Parcela 3	P3A6
Parcela 3	P3A9
Parcela 3	P3B13
Parcela 3	P3B6
Parcela 3	P3D2
Parcela 3	P3D3
Parcela 3	P3D5

De las 41 bacterias analizadas, 29 de ellas presentaron Tipo Gram -

9.1.2 Concentración mínima inhibitoria en cepas control

Para realizar los ensayos se tomó como referencia la CMI de las cepas control ATCC en este caso para bacterias Gram negativa se usó *E. coli* y para bacterias Gram positivas se usó *S. aureus*, su CMI era el punto de partida para determinar las CMI de las cepas de los manglares de Chame.

Cuadro 3

Concentración mínima inhibitoria de las cepas control

Nombre de la cepa	Cu	Fe	Pb
<i>E. coli</i>	100 ppm	200 ppm	1200 ppm
<i>S. aureus</i>	100 ppm	200 ppm	1600 ppm

9.1.3 Resistencia y susceptibilidad al cobre

Conociendo la CMI de las cepas control se determinó la Resistencia y Susceptibilidad en las bacterias aisladas en los manglares de Chame, en este caso mostramos el comportamiento ante el Cu.

Cuadro 4

Concentración mínima inhibitoria en bacterias Gram negativas con cobre

Cepa	CMI ppm	Resistencia y Susceptibilidad
P1A4	100	S
P1A6	100	S
P1A9	100	S
P1B3	80	S
P1B4	200	R
P1B7	100	S
P1C3	100	S
P1C4	100	S
P1D6	100	S
P1D7	100	S
P1E2	100	S
P1E5	200	R
P1E6	100	S

Cepa	CMI ppm	Resistencia y Susceptibilidad
P2A10	80	S
P2A12	100	S
P2A6	100	S
P2B11	80	S
P2C24	80	S
P2C7	100	S
P2D8	100	S
P2E4	80	S
P2E7	0	S
P3A6	0	S
P3A9	0	S
P3B13	0	S
P3B6	100	S
P3D2	80	S
P3D3	100	S
P3D5	0	S

Cuadro 5

Concentración mínima inhibitoria en bacterias Gram positivas con cobre

Cepas	CMI ppm	Resistencia y Susceptibilidad
P1C1	100	S
P2B19	100	S
P2B25	100	S
P2B5	100	S
P2B8-B	80	S
P2B9	100	S
P2E1	100	S
P3A1	100	S
P3B12	100	S
P3C5	80	S
P3D1	100	S
P3E5	100	S

Se considera cepa resistente aquella cuya CMI sea superior a la CMI presentada por las cepas control, en el caso del Cu una CMI superior a 100 ppm en bacterias Gram positivas y Gram negativas como se muestra en ambos cuadros.

9.1.4 Resistencia y susceptibilidad al hierro

Conociendo la CMI de las cepas control pudimos determinar la Resistencia y Susceptibilidad en las bacterias aisladas en los manglares de Chame, en este caso mostramos el comportamiento ante el Fe.

Cuadro 6

Concentración mínima inhibitoria en bacterias Gram negativas con hierro

Cepas	CMI ppm	Resistencia y Susceptibilidad
P1A4	800	R
P1A6	400	R
P1A9	600	R
P1B3	400	R
P1B4	600	R
P1B7	0	S
P1C3	800	R
P1C4	0	S
P1D6	400	R
P1D7	100	S
P1E2	0	S
P1E5	200	S
P1E6	600	R
P2A10	400	R
P2A12	400	R
P2A6	800	R
P2B11	600	R
P2C24	0	S
P2C7	0	S
P2D8	800	R
P2E4	0	S
P2E7	600	R
P3A6	400	R
P3A9	0	S
P3B13	400	R
P3B6	600	R
P3D2	600	R
P3D3	400	R
P3D5	400	R

Cuadro 7

Concentración mínima inhibitoria en bacterias Gram positivas con hierro

Cepas	CMI ppm	Resistencia y Susceptibilidad
P1C1	600	R
P2B19	0	S
P2B25	0	S
P2B5	600	R
P2B8-B	400	R
P2B9	200	S
P2E1	400	R
P3A1	400	R
P3B12	100	S
P3C5	100	S
P3D1	400	R
P3E5	400	R

Se considera cepa resistente aquella cuya CMI sea superior a la CMI presentada por las cepas control, en el caso del Fe una CMI superior a 200 ppm en bacterias Gram positivas y Gram negativas como se muestra en ambas tablas.

9.1.5 Resistencia y susceptibilidad al plomo

Conociendo la CMI de las cepas control pudimos determinar la Resistencia y Susceptibilidad en las bacterias aisladas en los manglares de Chame, en este caso mostramos el comportamiento ante el Pb.

Cuadro 8

Concentración mínima inhibitoria en bacterias Gram negativas con plomo

Cepas	CMI ppm	Resistencia y Susceptibilidad
P1A4	0	S
P1A6	0	S
P1A9	0	S
P1B3	0	S
P1B4	1400	R
P1B7	1400	R
P1C3	1400	R
P1C4	1400	R
P1D6	0	S
P1D7	1400	R
P1E2	1400	R
P1E5	0	S
P1E6	1400	R
P2A10	0	S
P2A12	0	S
P2A6	0	S
P2B11	1800	R
P2C24	1800	R
P2C7	1800	R
P2D8	1800	R
P2E4	1800	R
P2E7	0	S
P3A6	0	S
P3A9	1800	R
P3B13	0	S
P3B6	0	S
P3D2	1800	R
P3D3	1800	R
P3D5	0	S

Cuadro 9

Concentración mínima inhibitoria en bacterias Gram positivas con plomo

Cepas	CMI ppm	Resistencia y Susceptibilidad
P1C1	1400	S
P2B19	1800	R
P2B25	1800	R
P2B5	1800	R
P2B8-B	0	S
P2B9	1800	R
P2E1	1800	R
P3A1	1800	R
P3B12	1800	R
P3C5	1800	R
P3D1	1800	R
P3E5	1800	R

Se considera cepa resistente aquella cuya CMI sea superior a la CMI presentada por las cepas control, en el caso del Pb una CMI superior a 1200 ppm en bacterias Gram negativas y 1600 Gram positivas como se muestra en ambos cuadros.

9.1.6 Análisis de Q de Cochran

A continuación, se presentan los resultados de la prueba Q de Cochran, de acuerdo a la resistencia y susceptibilidad presentada en las muestras.

La Q de Cochran se utiliza para hacer la comparación de dos o más tratamientos sobre datos enumerativos cuando la variable de respuesta es dicotómica (Navarro, 1996).

Hipótesis:

Ho: Las bacterias aisladas en los manglares de Chame no presentan resistencia a los metales pesados.

Hi: Las bacterias aisladas en los manglares de Chame presentan resistencia a metales pesados.

Cuadro 10

Q de Cochran a través del programa SPSS.

	Frecuencias	
	0	1
Resiste a Cu	39	2
Resiste a Fe	14	27
Resiste a Pb	16	25

Estadísticos de prueba	
N	41
Q de Cochran	31.400 ^a
gl	2
Sig. asin.	<.001

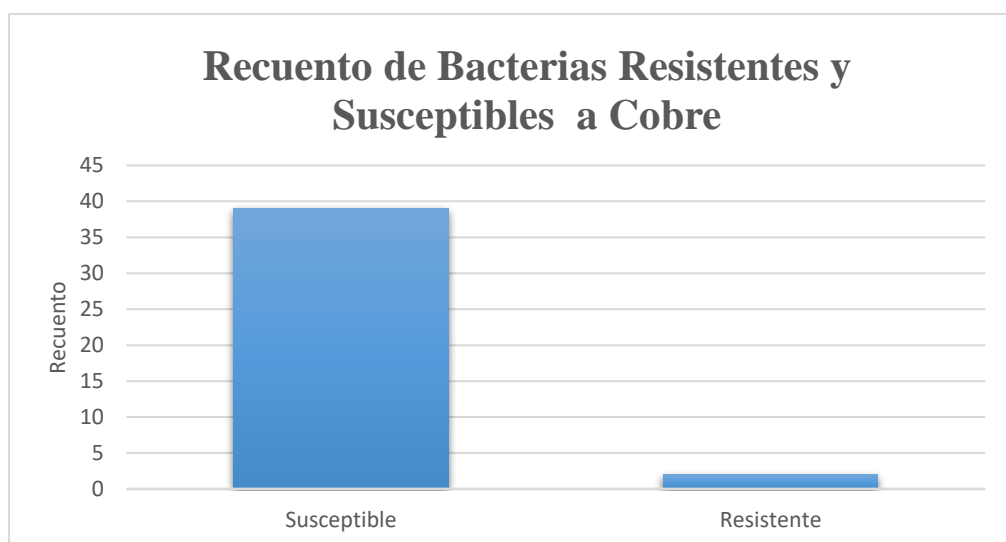
a. 0 se trata como un éxito.

Estas tablas muestran el estadístico realizado en el programa de SPSS con la Q de Cochran donde se observa la frecuencia y la significancia.

En la primera parte se describe la frecuencia de Resistencia (1) y Susceptibilidad (0) para cada metal. El valor de Q se representa con los grados de libertad y la significancia asociados, en este caso se tiene una significancia o Pvalor de <.001, al ser menor a 0.05 se rechaza la hipótesis nula dando como resultado: Las bacterias aisladas en los manglares de Chame presentan resistencia a metales pesados.

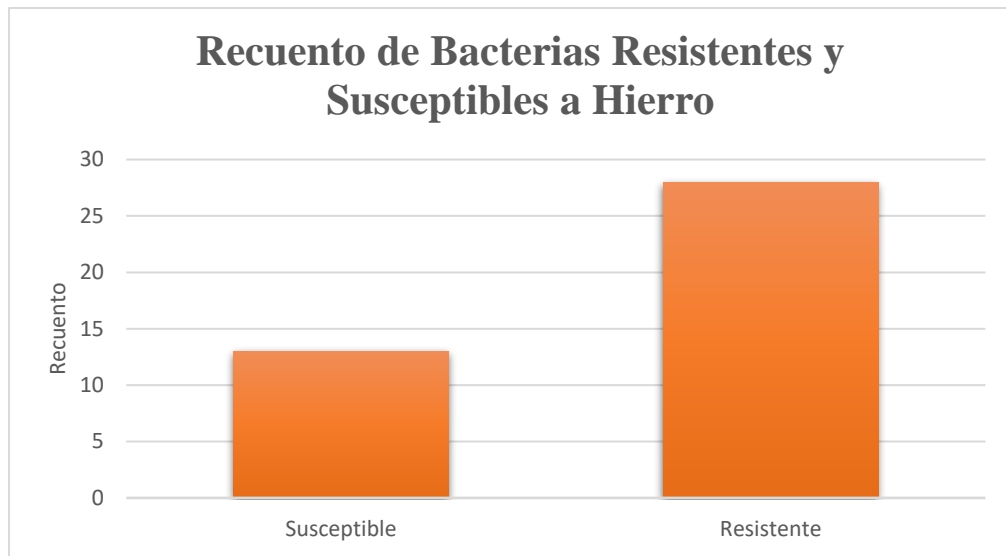
Gráfica 1

Resistencia y susceptibilidad en cobre, hierro y plomo.



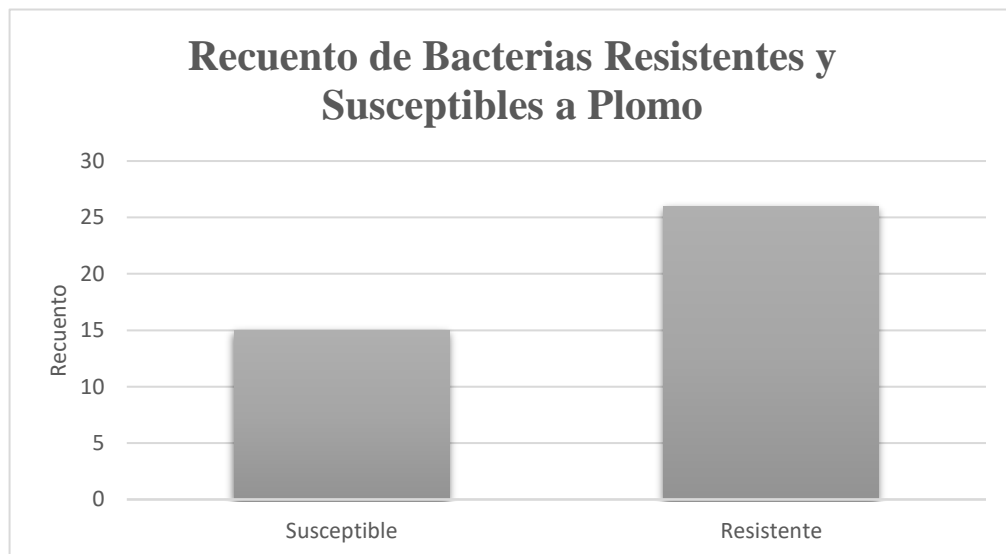
Se observa la Resistencia y Susceptibilidad presentada en los manglares de Chame hacia el Cu, donde la mayoría fue Susceptible.

Gráfica 2



Se observa la Resistencia y Susceptibilidad presentada en los manglares de Chame hacia el Fe, donde la mayoría fue Resistente.

Gráfica 3



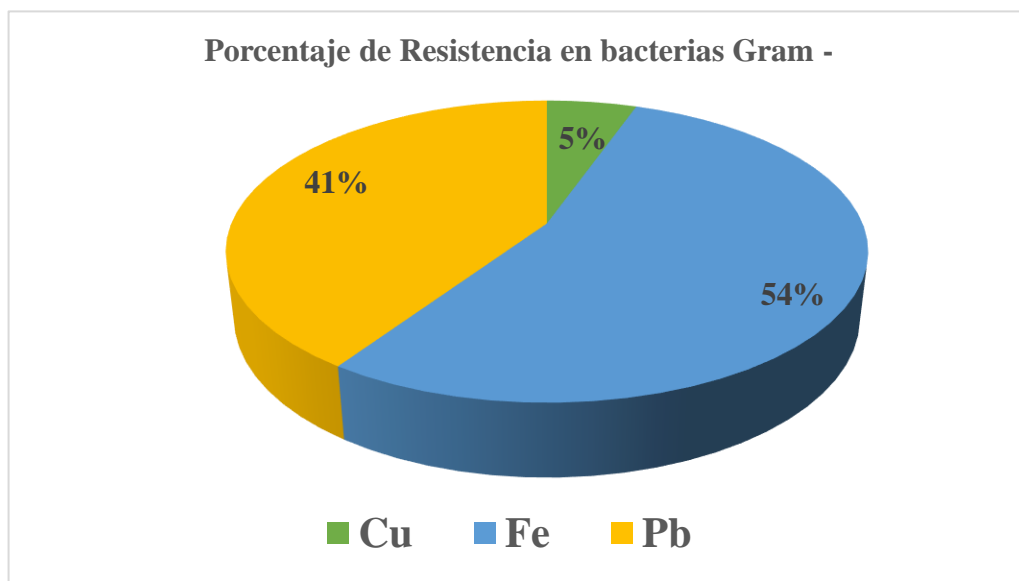
Se observa la Resistencia y Susceptibilidad presentada en los manglares de Chame hacia el Pb, donde la mayoría fue Resistente.

Cuadro 11

Porcentaje de resistencia a los metales pesados en bacterias Gram negativas

Metal	Bacterias Resistentes	Porcentaje de Resistencia
Cu	2	5
Fe	20	54
Pb	15	41
Total general	37	100

Gráfica 4



El porcentaje de resistencia para bacterias Gram - entre las tres parcelas de los manglares de Chame es de: 5% en Cu, 41% en Pb y 54% en Fe.

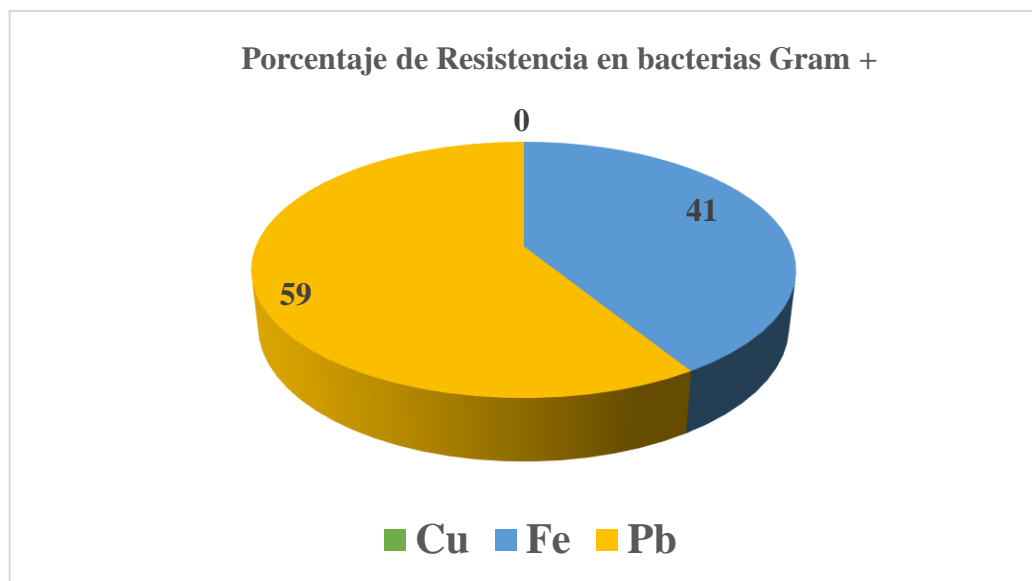
Según la distribución porcentual de las Bacterias Resistentes Gram positivas se tiene que el 5% resiste a el Cobre, el 41% resiste al Plomo y el 54% resiste al Hierro.

Cuadro 12

Porcentaje de resistencia a los metales pesados en bacterias Gram positivas

Metal	Bacterias Resistentes	Porcentaje de Resistencia
Cu	0	0
Fe	7	41
Pb	10	59
Total general	17	100

Gráfica 5



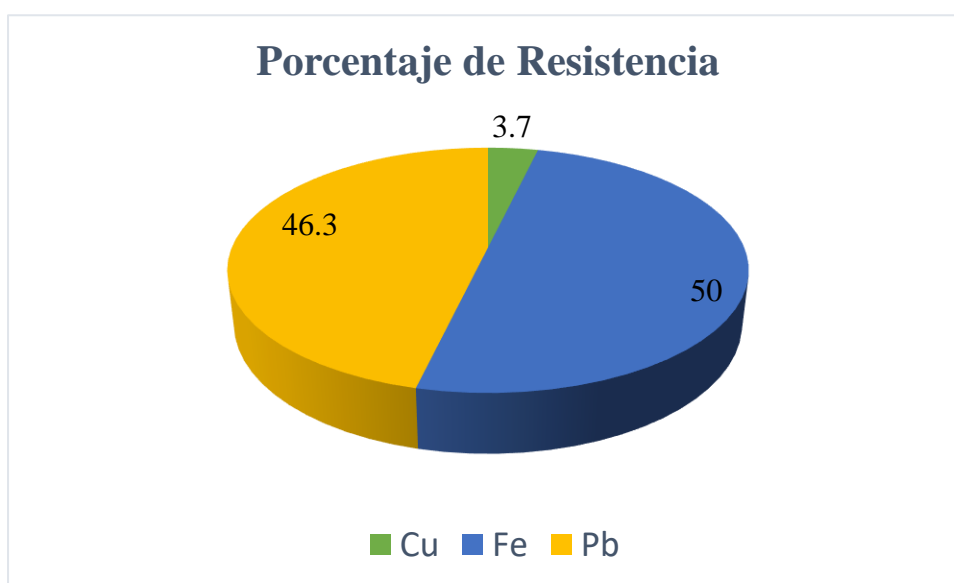
El porcentaje de resistencia para las bacterias Gram + entre las tres parcelas de los manglares de Chame es de: 0% en Cu, 41% en Fe y 59% en Pb.

Según la distribución porcentual de las bacterias resistentes Gram negativas se tiene que, el 41% resiste al plomo y el 59% resiste al hierro, mientras que para el cobre no se muestra una resistencia.

Cuadro 13

Porcentaje de resistencia a los metales pesados de forma general

Metal	Bacterias Resistentes	Porcentaje de Resistencia
Cu	2	3.7
Fe	27	50
Pb	25	46.3
Total general	54	100



El porcentaje de resistencia de forma general entre las tres parcelas de los manglares de Chame es de: 3.7% en Cu, 46.3% en Pb y 50% en Fe.

Según la distribución porcentual de forma general en las bacterias resistentes se tiene que, el 50% resiste al hierro y el 46.3% resiste al plomo y un 3.7% resiste al cobre.

9.2 DISCUSIÓN

Los manglares, corresponden al ecosistema constituido por árboles o arbustos conocidos como “mangles”, que crecen en las zonas costeras de regiones tropicales y subtropicales (*Gaxiola, 2011*). En el transcurso del tiempo y por diversas razones, el área de manglares ha sido impactada negativamente con una reducción de su superficie (*Olguín et al., 2007*). Comprender los impactos de la contaminación por metales pesados en las comunidades microbianas asociadas es muy importante para evaluar sus consecuencias ecológicas y las implicaciones del calentamiento global en los manglares (*Ma et al., 2021*). Los manglares en Panamá son utilizados para el desarrollo de la industria de la maricultura del camarón, para la construcción de infraestructuras, puertos, carreteras, actividades agrícolas y la producción de carbón, especialmente en los manglares de la Bahía de Chame (*Berdiales y Chavarría, 2009*). Si bien es cierto, estas actividades comprenden el sustento de muchas familias, sin embargo, es importante conocer el estado del manglar para evaluar cuáles son los impactos a largo plazo. A nivel nacional no existe bibliografía disponible con información suficiente sobre la distribución de metales pesados, en el estudio realizado por *Araúz, García, Rodríguez y Zárate en el 2013* en la Bahía de Damas, Isla Coiba, encuentran que parte de la contaminación por metales pesados se debe a las características dinámicas de las mareas y los cambios de la densidad del agua que pueden influenciar la recurrencia de la contaminación, además la contaminación de origen antropogénico llega a estas áreas con la crecida de los ríos que podrían estar arrastrando gran cantidad de material a lo largo de su recorrido.

El Cobre en bajas concentraciones es un micronutriente, pero en elevadas concentraciones posee actividad citotóxica (*Kappes et al., 2012*). En este estudio se obtuvo un 3.7 % de resistencia al cobre, a diferencia del estudio realizado por *Moraga, Merino y Mondaca en el 2003*, donde encontró que hubo una resistencia a este metal del 77% en sus cepas, debido a la presencia constante de un emisario submarino que descarga las aguas residuales de la ciudad, incrementando la contaminación de origen antropogénico en el lugar. Tomando en cuenta este dato, se podría decir que, para que se presente una mayor resistencia, es posible que el incremento de la concentración del contaminante puede ejercer una presión selectiva capaz de modificar la flora microbiana. El cobre representa un metal antimicrobiano respaldado por La Agencia de

Protección Medioambiental de Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA, por sus siglas en inglés), que reconoció en el 2008 las propiedades antimicrobianas del cobre, demostrando a través de pruebas de laboratorio que a partir de dos horas de exposición a este metal, se lograba la destrucción del 99,9% de patógenos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* (Romero et al., 2016).

En este estudio se encontró que la resistencia de las bacterias al hierro fue del 50%, existe una probabilidad que bajo concentraciones bajas de hierro, las bacterias tienden a producir más sideróforo para quelar el hierro para las actividades metabólicas, por el contrario, en concentraciones más altas de hierro, este elemento puede absorberse mediante vías alternativas distintas del mecanismo del sideróforo (Sinha & Parli, 2020). El Hierro al igual que el cobre, es un metal esencial para la mayoría de los seres vivos, siendo necesario para realizar actividades fisiológicas, sin embargo, cuando los microorganismos se encuentran libres en el suelo la adquisición del hierro se complica (Aguado et al., 2012), durante el crecimiento aeróbico, los niveles excesivos de hierro intracelular generan, a través de la reacción de Fenton, radicales hidroxilo altamente reactivos ($\cdot\text{OH}$), que atacan el ADN y las membranas. Por esta razón, muchas bacterias han desarrollado un sistema rigurosamente regulado que mantiene el metal en un rango determinado, permitiendo funciones esenciales pero lo suficientemente bajas como para evitar daños a la célula. Por lo tanto, cuando el nivel de hierro intracelular es alto, la proteína Fur (para "regulador de la captación férrica") reprime el inicio de la transcripción de los genes de captación de hierro (Massé & Arguin, 2005).

El Plomo en este estudio presentó resistencia del 46.3%, siendo uno de los metales no esenciales para los microorganismos vivos, incluso en bajas concentraciones, resulta ser tóxico, teniendo en cuenta esto, las bacterias que resultaron resistentes a este metal, resaltan al resto debido a su capacidad para proliferar en concentraciones que resultan ser perjudiciales para la mayoría de los organismos (Salgado-Bernal et al., 2012). Las bacterias pueden utilizar varias estrategias a través de las cuales resisten altas concentraciones de plomo incluyen mecanismos de salida, secuestro extracelular, biosorción, precipitación, alteración en la morfología celular, producción mejorada de sideróforos y bioacumulación intracelular. Comprender el mecanismo de la resistencia

al plomo en las bacterias es de vital importancia e imperativo para eliminar y recuperar el plomo de los efluentes industriales y los desechos sólidos (*Naik & Dubey, 2013*).

Luna, Senior y Martínez en 1997 en su estudio Comportamiento del Hierro, Cromo, Cadmio y Plomo Total en las Aguas Superficiales del Río Manzanares, Venezuela, Durante los Periodos de Sequía y Lluvia en el Año 1994, nos muestran en el caso del Hierro y plomo una disminución de las concentraciones de los metales en los períodos de sequía, donde en los primeros momentos de la mezcla de las aguas dulces con las aguas marinas se registra una “pérdida” como consecuencia de los cambios físico-químicos que tienen lugar en esta fase. En cambio, para los períodos de lluvia, las concentraciones de estos elementos se incrementaron. Para el Cobre en el estudio realizado por *Martínez y Senior en el 2001* se demostró que en el período de sequía se detectaron los menores niveles de Cu, sin embargo, las mayores concentraciones se registraron durante el período de lluvia.

En el estudio “Evolución microbiana espacio-temporal en paisajes de antibióticos” realizado por *Baym et al., 2016*, muestran que los modelos teóricos evidencian que espacialmente las presiones estructuradas cambian la naturaleza de la selección, en lugar de competir con los vecinos por recursos limitados, un individuo adaptado solo necesita ser el primero con la capacidad de sobrevivir en una nueva región, aunque se desconozca como la evolución está determinada por el potencial de diversificación y las diferencias en las limitaciones adaptativas de las grandes poblaciones en entornos espaciales. En este estudio con antibióticos, donde la placa está distribuida con diferentes concentraciones de los antibióticos, muestra como las bacterias inoculadas agotan los nutrientes y luego se propagan por quimiotaxis a otras regiones, provocando que solo los mutantes más resistentes puedan diseminarse en las secciones que contienen niveles más altos del antibiótico. Este sistema permite la reconstrucción de las historias evolutivas fenotípicas y genotípicas de las bacterias.

Es importante tener en cuenta que las bacterias no solo pueden ser resistentes a los antibióticos, sino también a otros antimicrobianos como es el caso de los metales pesados; *Moraga, Merino y Mondaca en el 2003*, demuestran en sus resultados evidencias de la existencia de una vinculación entre la resistencia a metales pesados y la resistencia a antibióticos, además, que las CMI las cepas estudiadas demostró que los

niveles de resistencia hacia los metales pesados ensayados fueron diferentes para cada cepa sugiriendo la presencia de determinantes genéticos en las células bacterianas que estarían confiriendo esta capacidad de resistencia.

Si bien es cierto, existen diferentes estrategias para remediar matrices contaminadas, se ha demostrado que el uso de sistemas biológicos o sus partes juegan roles sustanciales en la asimilación o transformación de compuestos tóxicos, ya sean orgánicos e inorgánicos incluyendo costos accesibles. El objetivo de la biorremediación es estimular a los microorganismos, para que puedan “destruir” los contaminantes, este proceso depende de varios factores como la magnitud y toxicidad de los contaminantes, así como factores físicos, químicos y biológicos (*Cota et al., 2018*).

10 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

10.1 CONCLUSIONES

Demostrando a través del análisis estadístico Q de Cochran en el programa de SPSS 26.0 que hay una posible resistencia a MP en los manglares de Chame.

Con cobre, solo se presentó dos cepas resistentes en todo el estudio este resultado mostró que las bacterias pueden a ser más susceptibles al este metal.

Con hierro hubo una mayor resistencia, este resultado mostró que las bacterias tienen una posibilidad del 50% de resistir a este metal.

El plomo mostró como resultado que las bacterias tienen una posibilidad del 46% de resistir a este metal.

Para la determinación del CMI se tomó como referencia la CMI de las cepas control, de allí el punto que sobrepasaba ese dato se consideraba resistente, si el punto era menor o igual a la referencia se consideraba susceptible. En la mayoría las cepas de pudo determinar su CMI.

El estudio se dividió en resistencia o susceptibilidad en bacterias Gram negativas y Gram positivas, teniendo así para bacterias Gram negativas un 5% de resistencia en Cu, 41% a Pb y 54% en Fe; para el caso de las bacterias Gram positivas 0% en Cu, 41% en Fe y 59% en Pb.

10.2 RECOMENDACIONES

Para una mejora del procedimiento tomar en cuenta factores externos como la salinidad, las épocas del año en que se realicen el estudio, podría dividirse en tomas de muestra en época lluviosa y época seca.

Se podría ampliar el estudio, con la intención de conocer el comportamiento de las bacterias en otros metales.

Una comparación con la resistencia de estas cepas con antibióticos, ya que muchos estudios demuestran que hay una fuerte interacción entre estos antimicrobianos.

Realizar la identificación de las bacterias para reconocer y conservar aquellas que muestren una mejor resistencia.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, V., & Lodeiros, C. (2004). Metales pesados en la almeja *Tivela mactroides* Born, 1778 (Bivalvia: Veneridae) en localidades costeras con diferentes grados de contaminación en Venezuela. *Ciencias Marinas*, 30(2 A), 323–333. <https://doi.org/10.7773/cm.v30i2.183>
- Agbeshie, A. A., Adjei, R., Anokye, J., & Banunle, A. (2020). Municipal Waste Dumpsite: Impact on soil properties and heavy metal concentrations, Sunyani, Ghana. *Scientific African*, e00390. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00390>
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2004). Resumen de Salud Pública. Cobre. *Departamento de Salud y Servicios Humanos de Los EE.UU.*, 8. https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs132.html
- Aguado, G. A., Moreno, B., Jiménez, B., Preciado, E., & García, R. (2012). *IMPACT OF THE MICROBIAL SIDEROPHORES AND PHYTOSIDEROPHORES ON THE IRON ASSIMILATION BY PLANTS: A SYNTHESIS a) b)*. 35(1), 9–21.

- Alfonso, L. (2011). *Intoxicación aguda por hierro*.
- Algorta, G., Amarin, B., Arbiza, J., Barrios, P., Betancor, L., Calvelo, E., Chabalgoity, A., Campione, J., Codeiro, N., Chiparelli, H., del Monte, A., Flores, K., Gadea, M. del P., Grotiuz, G., Ingold, E., Le Pera, V., Macedo, M., Mateos, S., Mattera, A., ... Vola, M. (2008). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*.
- ANAM, & ARAP. (2013). *Manglares De Panamá: Importancia, Mejores Prácticas Y Regulaciones Vigentes*.
- Araúz, D., García, A. L., Rodríguez, F., & Zárata, M. (2013). *Nivel de Contaminación y Distribución Espacial de Metales Pesados en Sedimentos Superficiales de Bahía Damas, Isla Coiba*. 9, 14–23. <http://ridda2.utp.ac.pa/handle/123456789/1817>
- Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R. (2008). *Métodos generales de conservación de microorganismos* *Métodos generales de conservación de microorganismos* Dirección del Correo Electrónico : cpn@cnic.edu.cu.
- Argudín, M. A., Hoefler, A., & Butaye, P. (2019). Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Research in Veterinary Science*, 122(December 2017), 132–147. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.007>
- Artega, J., Farfan, G., & Pinto, L. (2015). Importancia de las tinciones gram para la identificación de la Escherichia coli. *Scielo Analytics*, 34(12).
- Azcona, M., Ramírez, R., & Vicente, G. (2015). *Efectos tóxicos del plomo*. 6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49863-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49863-6)
- Bar-On, Y. M., & Milo, R. (2019). The Biomass Composition of the Oceans: A Blueprint of Our Blue Planet. *Cell*, 179(7), 1451–1454. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.018>
- Barbier, E. B. (2017). Marine ecosystem services. *Current Biology*, 27(11), R507–R510. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.020>
- Baym, M., Lieberman, T., Kelsic, E., Chait, R., Gross, R., Yelin, D., & Kishony, R. (2016). *Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes* (Vol. 353, Issue 6304). <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>

- Becerra, J. (2016). Mercado Internacional del Hierro y el acero. *Comisión Chilena Del Cobre*, 21.
- Beltrán, M. E., & Gómez, A. M. (2016). *BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS CADMIO (Cd), CROMO (Cr) Y MERCURIO (Hg) MECANISMOS BIOQUÍMICOS E INGENIERÍA GENÉTICA : UNA REVISIÓN*. Vol 12, No(Cd), 172–197. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- Berdiales, J., & Chavarría, J. (2009). *INFORME DEL COMPONENTE DE MANGLAR REGIÓN DE PANAMÁ OESTE*. 3.
- Booth, J. M., Fusi, M., Marasco, R., Mboho, T., & Daffonchio, D. (2019). Fiddler crab bioturbation determines consistent changes in bacterial communities across contrasting environmental conditions. *Scientific Reports*, 9(1), 3749. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40315-0>
- Bulow, E., & Ferdinand, T. (2013). *El efecto de la basura en la dinámica de los ecosistemas de manglar : un análisis comparativo*.
- Burger, M., Pose, D., Alvarez, C., De Ben, S., Dol, I., Feola, G., González, H., Gristo, P., Laborde, A., Mañay, N., Renfrew, D., Ruocco, G., Salvarrey, A., Siscar, E., Tomasina, F., & Touyá, E. (2010). Plomo Salud y Ambiente. *Index.Php*, 248.
- Cañizares, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131–143.
- Cao, D., Chen, W., Xiang, Y., Mi, Q., Liu, H., Feng, P. Y., Shen, H., Zhang, C., Wang, Y., & Wang, D. (2021). The efficiencies of inorganic mercury bio-methylation by aerobic bacteria under different oxygen concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111538. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111538>
- Carter, H. H., & Corominas, J. (1962). Breve Diccionario Etimológico de la Lengua Castellana. In *Hispania* (Vol. 45, Issue 3, p. 580). <https://doi.org/10.2307/337432>
- CDC-OMS. (2009). Manual para las pruebas de identificación y susceptibilidad antimicrobiana. *Medicina y Laboratorio*, 15(11–12).
- Ceccon, D. M., Faoro, H., Lana, P. da C., de Souza, E. M., & Pedrosa, F. de O. (2019).

- Metataxonomic and metagenomic analysis of mangrove microbiomes reveals community patterns driven by salinity and pH gradients in Paranaguá Bay, Brazil. *Science of the Total Environment*, 694, 133609. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133609>
- Cervantes, C., Espino-Saldaña, A. E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I. L., Rivera-Cano, M. E., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J. F., Rodríguez-Zavala, J. S., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Microbial interactions with heavy metals. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 203–210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578093>
- Cervera, S. (2011). Prácticas de MICROBIOLOGÍA. In *Universidad de La Roja* (Vol. 2, Issue 479). <https://doi.org/10.1192/bjp.111.479.1009-a>
- Corominas, J. (1987). *Breve Diccionario Etimológico de la Lengua Castellana* (p. 627).
- Cota, K., Nuñez, J., Delgado, M., & Martínez, A. (2018). Biorremediación: Actualidad De Conceptos Y Aplicaciones. *Biocencia*, 21(1), 37–44. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v21i1.811>
- Coyle, M., Cavalieri, S. J., Rankin, I. D., Harbeck, R. J., & Sautter, R. L. (2006). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.
- De Erice, E., & González, A. (2012). *Biología La ciencia de la vida*.
- De la Cruz-Landero, N., Alderete Chávez, A., & Laffón Leal, S. (2013). Acumulación de metales pesados en sedimentos del ecosistema manglar en laguna de Términos, Campeche, Mexico. *Foresta Veracruzana*, 15(1), 25–30. <http://www.redalyc.org/pdf/497/49728291003.pdf>
- Dufrense, C. (1998). *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*.
- Elmorsi, R. R., Abou-El-Sherbini, K. S., Abdel-Hafiz Mostafa, G., & Hamed, M. A. (2019). Distribution of essential heavy metals in the aquatic ecosystem of Lake Manzala, Egypt. *Heliyon*, 5(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02276>
- Elwin, A., Bukoski, J. J., Jintana, V., Robinson, E. J. Z., & Clark, J. M. (2019). Preservation and recovery of mangrove ecosystem carbon stocks in abandoned

shrimp ponds. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54893-6>

Feoktistova, L., Yulia, V., & Feoktistova, C. (2018). Metabolism of copper. Its consequences for human health. *Medisur*, 16(4), 579–587.

Fernández, J., Ruíz, P., Fernández, T., Díez, B., Trefault, N., Andrade, S., & De la Iglesia, R. (2020). Detection of sentinel bacteria in mangrove sediments contaminated with heavy metals. *Marine Pollution Bulletin*, 150(April 2019), 110701. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110701>

Ferré, N., Schuhmacher, M., Llobet, J., & Domingo, J. (2007). Metales pesados y salud: Diseño de un software para evaluar los riesgos de la exposición ambiental a través del agua, suelos y aire. *Mapfre Seguridad*, 27(108), 50–58. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2508799%0Ahttps://www.mapfre.com/ccm/content/documentos/fundacion/prev-ma/revista-seguridad/n108-programa-hra-metales-pesados.pdf>

Fishery Country Profile Food and Agriculture Organization of the United. (2007).

Food and Agriculture Organization. (1994). *forest Mangr ve forest management guidelines managemtnt guidelines.*

Friess, D. A. (2016). Mangrove forests. *Current Biology*, 26(16), R746–R748. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.004>

Gaceta Oficial. (2009). http://www.ghbook.ir/index.php?name=هم‌دومین‌مقالات‌مجموعه&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13629&page=108&hkhashk=03C706812F&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
و تولیدیون رسانه سراسری اندیشی

Gaxiola, J. . M. (2011). Una revisión sobre los manglares: características, problemáticas y su marco jurídico. Importancia de los manglares, el daño de los efectos antropogénicos y su marco jurídico: caso sistema laguna de Topolobampo. *Ra Ximhai*, 7(3), 355–369.

Han, H., Cai, H., Wang, X., Hu, X., Chen, Z., & Yao, L. (2020). Heavy metal-

- immobilizing bacteria increase the biomass and reduce the Cd and Pb uptake by pakchoi (*Brassica chinensis* L.) in heavy metal-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *195*, 110375. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110375>
- Han, Y., Tang, Z., Sun, J., Xing, X., Zhang, M., & Cheng, J. (2019). Heavy metals in soil contaminated through e-waste processing activities in a recycling area: Implications for risk management. *Process Safety and Environmental Protection*, *125*, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.03.020>
- Hernández, D. (2008). *Bioadsorción de metales pesados mediante el uso de biomasa bacteriana aislada de jales mineros*.
- IBM Corp. Publicado en 2019. IBM SPSS Statistics para Windows, versión 26.0. Armonk, Nueva York: IBM Corp
- Instituto Europeo de Cobre. 2018. *El cobre en la historia*. <https://copperalliance.es/cobre/historia-cobre/>.
- Iturbe, R. (2010). ¿Qué es la biorremediación? *Ciencia de Boletó*, *11*, 64–75. http://www.dgdc.unam.mx/assets/cienciaboletó/cb_11.pdf
- Iyer, R., Damania, A., & Iken, B. (2017). Whole genome sequencing of *Microbacterium* sp. AISO3 from polluted San Jacinto River sediment reveals high bacterial mobility, metabolic versatility and heavy metal resistance. *Genomics Data*, *14*(July), 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.07.009>
- Jaramillo, J. D., Sanchez, L. E. Ll., & Amaris, H. V. (2006). Estructura cristalina del cobre, propiedades macroscópicas mecánicas y de procesamiento. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, *16*(2), 9. <http://www.redalyc.org/pdf/911/91116210.pdf>
- Juárez, F., Villatoro, J., & López, E. (2002). *Apuntes de Estadística Inferencial*.
- Kang, C. H., & So, J. S. (2016). Heavy metal and antibiotic resistance of ureolytic bacteria and their immobilization of heavy metals. *Ecological Engineering*, *97*, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.016>
- Kappes, T., Domínguez, M., Bello, H., Mella, S., Riedel, G., & González-Rocha, G.

- (2012). actividad de cobre sobre bacilos gramnegativos multi-resistentes aislados en hospitales Chilenos. *Revista Chilena de Infectología*, 29(6), 622–627. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000700006>
- Katz, M. (2011). Minerales de hierro. *Materiales y Materias Primas*, 46. <http://www.inet.edu.ar/wp-content/uploads/2012/11/minerales-de-hierro.pdf>
- Kinuthia, G. K., Ngure, V., Beti, D., Lugalia, R., & Wangila, A. (2020). *Levels of heavy metals in wastewater and soil samples from open drainage channels in Nairobi , Kenya : community health implication*. 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65359-5>
- Kulkarni, R., Deobagkar, D., & Zinjarde, S. (2018). Metals in mangrove ecosystems and associated biota: A global perspective. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153(January), 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.021>
- Larsson, M., Nosrati, A., Kaur, S., Wagner, J., Baus, U., & Nydén, M. (2018). Copper removal from acid mine drainage-polluted water using glutaraldehyde-polyethyleneimine modified diatomaceous earth particles. *Heliyon*, 4(2), e00520. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00520>
- Lenntech.2012. *Propiedades químicas del Cobre - Efectos del Cobre sobre la salud - Efectos ambientales del Cobre*. <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/cu.htm#ixzz6Y8EPuOgM>
- Liébana Ureña, J. (2002). Microbiología Oral. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Londoño Franco, L. F., Londoño Muñoz, P. T., & Muñoz Garcia, F. G. (2016). Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)145-153)
- López, L. E., Hernández, M., Colín, C. A., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. 3. www.medigraphic.org.mx

- Luna, I. L., Senior, W., & Martínez, G. (1997). Comportamiento del hierro, cromo, cadmio y plomo total en las aguas superficiales del río Manzanares, Venezuela, durante los periodos de sequía y lluvia en el año 19941. *Caribbean Journal of Science*, 33(1–2), 105–111. <https://doi.org/10.31219/osf.io/kmjta>
- Ma, J., Ullah, S., Niu, A., Liao, Z., Qin, Q., Xu, S., & Lin, C. (2021). Heavy metal pollution increases CH₄ and decreases CO₂ emissions due to soil microbial changes in a mangrove wetland: Microcosm experiment and field examination. *Chemosphere*, 269(xxxx), 128735. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128735>
- Macreadie, P., Anton, A., Raven, J., Beaumont, N., Connolly, R., Friess, D. A., Kelleway, J., Kennedy, H., Kuwae, T., Lavery, P., Lovelock, C., Smale, D., Apostolaki, E., Atwood, T., Baldock, J., Bianchi, T., Chmura, G., Eyre, B., Fourqurean, J., ... Duarte, C. (2019). The future of Blue Carbon science. *Nature Communications*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11693-w>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2014). *Brock. Biología de los microorganismos*.
- MAE, & FAO. (2014). Árboles Y Arbustos De Los Manglares Del Ecuador. MAE (Ministerio Del Ambiente Del Ecuador); FAO (Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura, IT)., 48. <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/55818.pdf>
- Marrero, K., & Fando, R. (2009). Sistemas de homeostasis del cobre en las bacterias Gram negativas Escherichia coli y Vibrio cholerae. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40(3).
- Martínez, G., & Senior, W. (2001). Especiación de metales pesados (Cd, Zn, Cu y Cr) en el material en suspensión de la pluma del río Manzanares, Venezuela. *Interciencia*, 26(2), 53–61. <https://doi.org/10.31219/osf.io/7ctte>
- Massé, E., & Arguin, M. (2005). Ironing out the problem: New mechanisms of iron homeostasis. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 30, Issue 8, pp. 462–468). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.06.005>

- Mineria, C. general de. (2013). Perfil de mercado del hierro/ acero. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Moffit, A. (2012). Tomo 3: La industria del hierro y el acero. *Enciclopedia De Salud Y Seguridad En El Trabajo*, 19.
- Monge, O., Valenzuela, J., Acedo, E., Certucha, M., & Almendáriz, F. (2008). BIOSORCIÓN DE COBRE EN SISTEMA POR LOTE Y CONTINUO CON BACTERIAS AEROBIAS INMOVILIZADAS EN ZEOLITA NATURAL (CLINOPTILOLITA). In *Rev. Int. Contam. Ambient* (Vol. 24, Issue 3).
- Moraga, R., Merino, C., & Mondaca, M. A. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas*, 31(1), 91–95. <https://doi.org/10.4067/s0717-71782003000100010>
- Muñoz, L., Olivera, P., Santillán, M., & Tamariz, C. (2019). Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista Peruana de Biología*, 26(1), 109–118. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15914>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). Microbiología Medica. In *Microbiologia Medica*.
- Mwandira, W., Nakashima, K., Kawasaki, S., Arabelo, A., Banda, K., Nyambe, I., Chirwa, M., Ito, M., Sato, T., Igarashi, T., Nakata, H., Nakayama, S., & Ishizuka, M. (2020). Biosorption of Pb (II) and Zn (II) from aqueous solution by *Oceanobacillus profundus* isolated from an abandoned mine. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78187-4>
- Naik, M. M., & Dubey, S. K. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 98, pp. 1–7). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.039>
- National Institute of Health. (2019). Datos sobre el hierro. *Nih*, 1–3. <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Iron-DatosEnEspañol.pdf>
- Navarro, J. (1996). *Educación Matemática*. 154.

- Oca, E. G. (2005). *de hierro y zinc del patógeno animal Pasteurella multocida* Departament de Genètica i Microbiologia Caracterización de los sistemas de captación de hierro y zinc del patógeno animal *Pasteurella multocida*.
- Olgún, E., Hernández, E., & Sánchez, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 23(3), 139–154. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975%2899%2900477-4>
- Organización Mundial de la Salud. 2019. *Intoxicación por plomo y salud*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>
- Pérez, A., Barraza, Z., & Matínez, D. (2015). IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS RESISTENTES A. 26(2), 267–276.
- Pinzón, L., & Sotelo, H. (2016). *COMPORTAMIENTO DE METALES PESADOS ENTRE LOS LODOS BENTÓNICOS Y LA CORRIENTE DE AGUA DEL RIO BOGOTÁ*. 1–13.
- Poma, P. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *Anales de La Facultad de Medicina*, 69(2).
- Rahman, Z., & Singh, V. P. (2018). Assessment of heavy metal contamination and Hg-resistant bacteria in surface water from different regions of Delhi, India. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 25, Issue 8). King Saud University. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.018>
- REGLAMENTO (CE) N o 1881/2006 DE LA COMISIÓN, 2006 5 (2006). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf
- Robles, M., & Sabath, E. (2014). Breve historia de la intoxicación por plomo: De la cultura Egipcia al Renacimiento. *Revista de Investigacion Clinica*, 66(1), 88–91.
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). *Hans Christian Gram y su tinción Hans Christian Gram and His Staining*.
- Romero, J., Lopez, L., & Olea, C. (2016). *Efecto Biocida del Cobre Frente a Escherichia coli y Staphylococcus aureus*. 1–70.

- Salgado-Bernal, I., Carballo-Valdés, M. E., Martínez-Sardiñas, A., Cruz-Arias, M., & Durán-Domínguez-De-Bazúa, M. D. C. (2012). Interacción de aislados bacterianos rizosféricos con metales de importancia ambiental. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 3(3), 83–95.
- Sánchez, S., Volga, I., & Roulet, M. (2005). *Distribución de bacterias sulfato reductoras y metilmercurio en los sedimentos de las lagunas de inundación del río Beni, Amazonia Boliviana*. 109.
- Sany, B. T., Salleh, A., Sulaiman, A. H., Mehdinia, A., & Monazami, G. H. (2011). Geochemical Assessment of Heavy Metals Concentration in Surface Sediment of West. *International Journal of Environmental, Chemical, Ecological, Geological and Geophysical Engineering*, 5(8), 77–81.
- Scharlau, M. (2012). *Scharlau Microbiology - . 1972*, 9–12.
- Scharlau, M. (2013). *Scharlau Microbiology -Ficha de Datos Técnicos*.
- Sinha, A. K., & Parli, B. V. (2020). Siderophore production by bacteria isolated from mangrove sediments: A microcosm study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 524(July 2019), 151290. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151290>
- Solomon, E., Berg, L., & Martin, D. (2013). *Biología*.
- Soto, M., Calderón, D., Flores, E., Solís, S., & Dávalos, C. (2016). *Potencial de remoción de plomo mediante bacterias aisladas del sedimento de laguna San Juan, Ascensión, Chihuahua: Vol. X*.
- Spalding, M., Blasco, F., & Field, C. (1997). *World mangrove atlas*. 178.
- Standard Methods of Analysis of Water and Wastewater de la APHA- AWWA- WPCF, última edición, metodológicas.
- Starr, C., Taggart, R., Evers, C., & Starr, L. (2008). *Biología La unidad y la diversidad de la vida*. In *Innovación Educativa*.
- Stierman, B., Hauptman, M., & Woolf, A. D. (2020). Severe lead poisoning requiring hospitalization: A case report. *Current Problems in Pediatric and Adolescent*

- Health Care*, 50(2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2020.100757>
- Tejada, C., Villabona, Á., & Garcés, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *TecnoLógicas*, 18(34), 109. <https://doi.org/10.22430/22565337.209>
- Toxqui, L., De Piero, A., Courtois, V., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., & Vaquero, M. P. (2010). Deficiencia y sobrecarga de hierro; implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*, 25(3), 350–365. <https://doi.org/10.3305/nh.2010.25.3.4583>
- UNESCO. (2010). Los residuos electrónicos: Un desafío para la Sociedad del Conocimiento en América Latina y el Caribe. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Urrego C., L. E. (2018). Cananguchales y manglares: humedales forestales de las zonas bajas tropicales, tan semejantes como contrastantes. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 42(162), 80. <https://doi.org/10.18257/racefyn.553>
- Valencia, C. (n.d.). *QUÍMICA DEL HIERRO Y MANGANESO EN EL AGUA, MÉTODOS DE REMOCIÓN*. <https://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/siklus/article/view/298%0Ahttp://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2015.10.005%0Ahttp://www.biomedcentral.com/1471-2458/12/58%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&P>
- Valeria Prado, J., Roberto Vidal, A., & Claudia Durán, T. (2012). Application of copper bactericidal properties in medical practice. *Revista Medica de Chile*, 140(10), 1325–1332. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872012001000014>
- van Dam, J. W., Trenfield, M. A., Streten, C., Harford, A. J., Parry, D., & van Dam, R. A. (2018). Assessing chronic toxicity of aluminium, gallium and molybdenum in tropical marine waters using a novel bioassay for larvae of the hermit crab *Coenobita variabilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 165, 349–356. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.09.025>

- Vázquez, R. (2014). *Biología 1* (Grupo Edir).
- Vargas, T., & Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), 2594–2598.
- Vázquez, C., Martín, A., de Silóniz, M., & Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *REDUCA (Biología)*, 3(5), 15–38.
- Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology and Innovation*, 14, 100369. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>
- Vullo, D. (2003). MICROORGANISMOS Y METALES PESADOS: UNA INTERACCIÓN EN BENEFICIO DEL MEDIO AMBIENTE. *Química Viva*, 2(3), 93–104.
- Wang, F., Guan, Q., Tian, J., Lin, J., Yang, Y., Yang, L., & Pan, N. (2020). Contamination characteristics, source apportionment, and health risk assessment of heavy metals in agricultural soil in the Hexi Corridor. *Catena*, 191(March), 104573. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104573>
- Wu, S., Li, R., Xie, S., & Shi, C. (2019). Depth-related change of sulfate-reducing bacteria community in mangrove sediments: The influence of heavy metal contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 140(October 2018), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.042>
- Wu, W., Qu, S., Nel, W., & Ji, J. (2020). The impact of natural weathering and mining on heavy metal accumulation in the karst areas of the Pearl River Basin, China. *Science of the Total Environment*, 734, 139480. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139480>
- Wu, Z., Gao, G., & Wang, Y. (2019). Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of soil properties , heavy metals , and PBDEs on microbial community of e-waste contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180(February), 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.027>
- Xi, B., Yu, H., Li, Y., Dang, Q., Tan, W., Wang, Y., & Cui, D. (2021). Insights into the

effects of heavy metal pressure driven by long-term treated wastewater irrigation on bacterial communities and nitrogen-transforming genes along vertical soil profiles. *Journal of Hazardous Materials*, 403(May 2020), 123853. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123853>

Yanez-Arancibia, A., Day, J. W., Twilley, R. R., & Day, R. H. (2014). Mangrove swamps: sentinel ecosystem in front of the climatic change, Gulf of Mexico. *Madera y Bosques*, 20(especial), 39–75.

Yin, K., Wang, Q., Lv, M., & Chen, L. (2018). Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, October. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>

Zeng, Y., Bi, C., Jia, J., Deng, L., & Chen, Z. (2020). Impact of intensive land use on heavy metal concentrations and ecological risks in an urbanized river network of Shanghai. *Ecological Indicators*, 116(September 2019), 106501. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106501>

12 ANEXOS

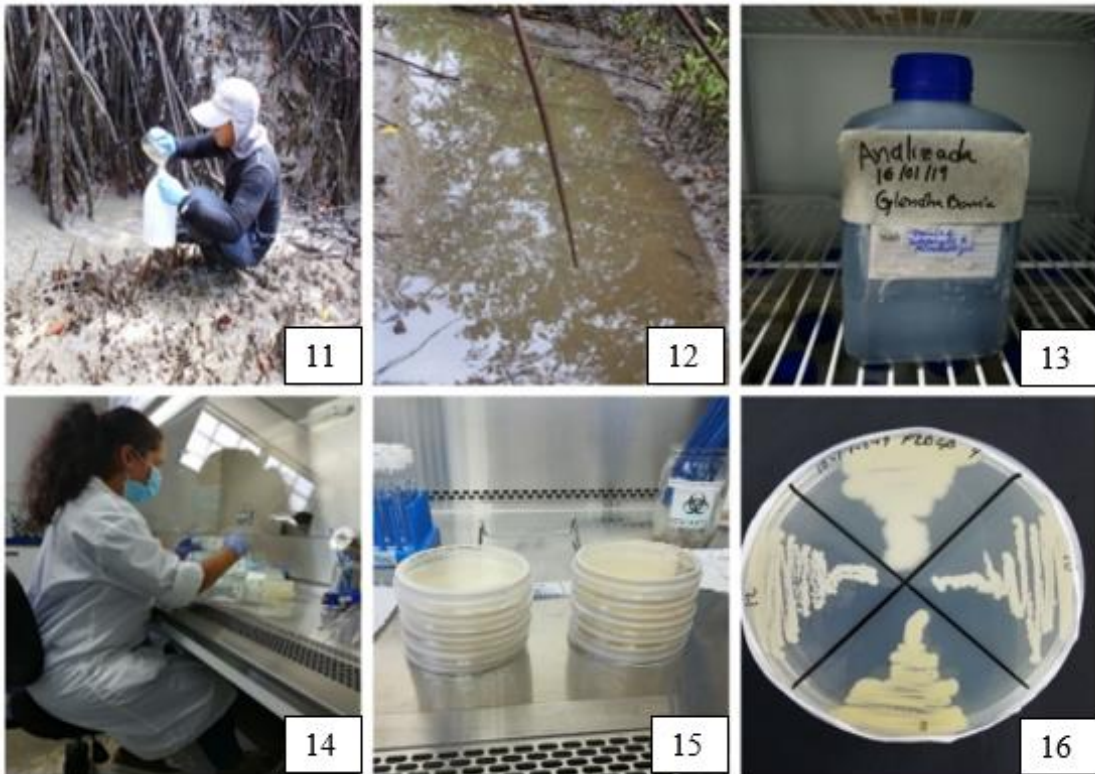


Fig. 11: Recolección de las muestras en los manglares de Chame.

Fig. 12. Una de las quebradas donde se recolectó una de las muestras.

Fig. 13. Botella de un litro que contenía la muestra ya marcada como analizada.

Fig. 14. Trabajo del primer aislamiento de las muestras.

Fig. 15. Placas Petri listas con el primer aislamiento realizado por la técnica de esparcido.

Fig. 16. Segundo aislamiento por la técnica de estriado simple donde en una misma placa podía colocar diferentes cepas.



Fig. 17: Trabajo de la preservación de las cepas luego de su purificación.

Fig. 18. Tubos Eppendorf con las cepas preservadas y sus réplicas debidamente codificadas.

Fig. 19. Almacenaje de cepas guardadas en cajas para ser enviados a refrigeración.

Fig. 20. Preparación de los metales en matraz aforado, en este caso el Cu.

Fig. 21. Desarrollo de los cálculos para la preparación de los metales junto y la preparación de las microplacas.

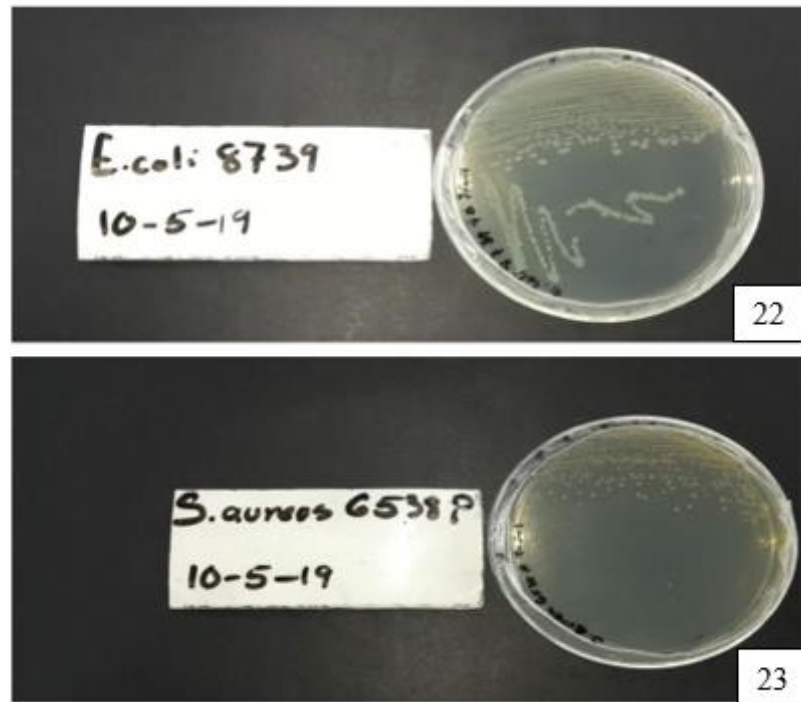


Fig. 22: Cepas control verificada ATCC 8739 siendo *Escherichia coli*.

Fig. 23. Cepa control verificada ATCC 6538 siendo *Staphylococcus aureus*.

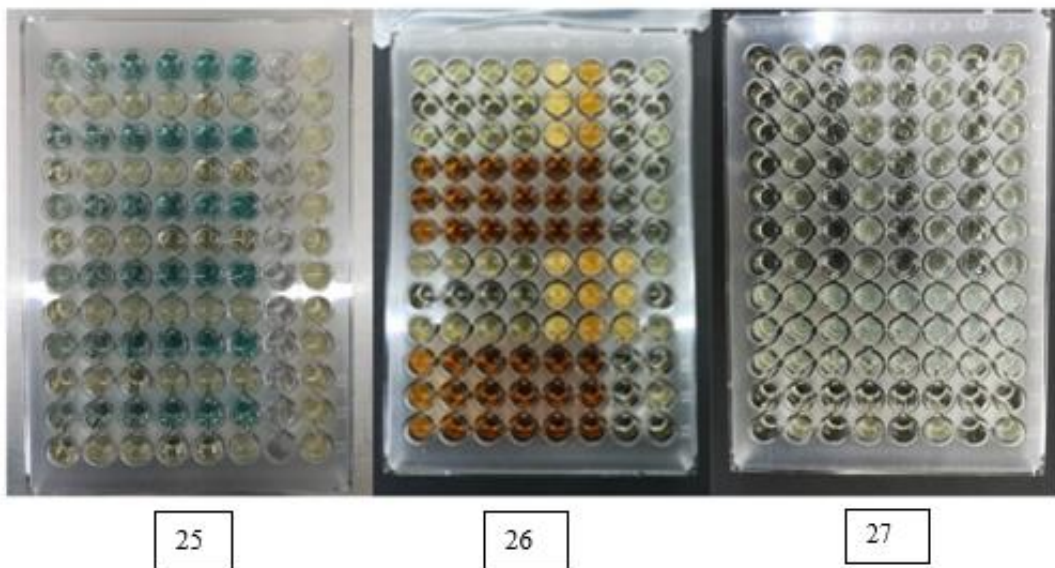


Fig. 24: Metales preparados y conservados en frascos estériles, tenemos el Cu, Fe y Pb.

Fig. 25. Prueba realizada en microplacas para Cu en cepas control *E. coli* y *S. aureus*.

Fig. 26. Prueba realizada en microplacas para Fe en cepas control *E. coli* y *S. aureus*.

Fig. 27. Prueba realizada en microplacas para Pb en cepas control *E. coli* y *S. aureus*.



Fig. 28: Resultado de las cepas en Cu mostrando resistencia en la CMI superior a las cepas control.

Fig. 29. Resultado de las cepas en Fe mostrando resistencia en la CMI superior a las cepas control.

Fig. 30. Resultado de las cepas en Pb mostrando resistencia en la CMI superior a las cepas control, en este caso realizando siembra en placa para verificar crecimiento ya que el Pb junto con el medio en distintas concentraciones formaba una turbidez provocando una difícil visualización del resultado.

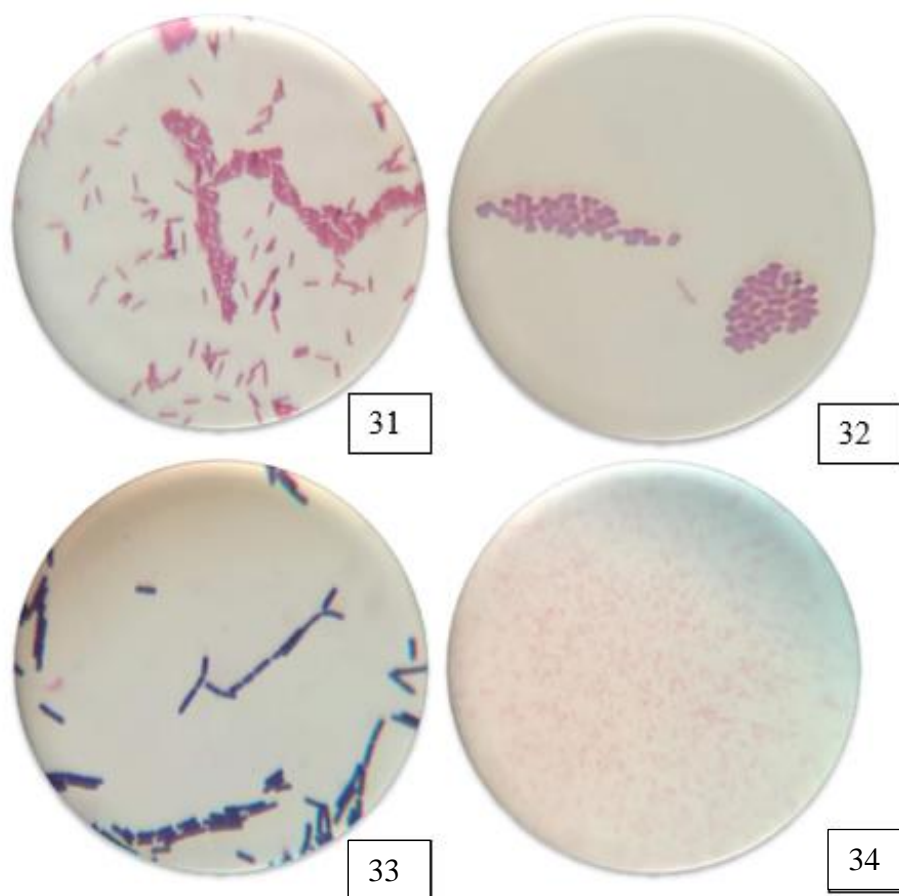


Fig. 31: Tinción de Gram – cepa P2A6 Bacilo no esporulado resistente a Fe.

Fig. 32. Tinción de Gram – cepa P1E2 Coco no esporulado resistente a Fe y Pb.

Fig. 33. Tinción de Gram + Cepa P2B5 Bacilo no esporulado resistente a Fe y Pb.

Fig. 34. Tinción de Gram – cepa P2A10 Coco no esporulado resistente a Fe.

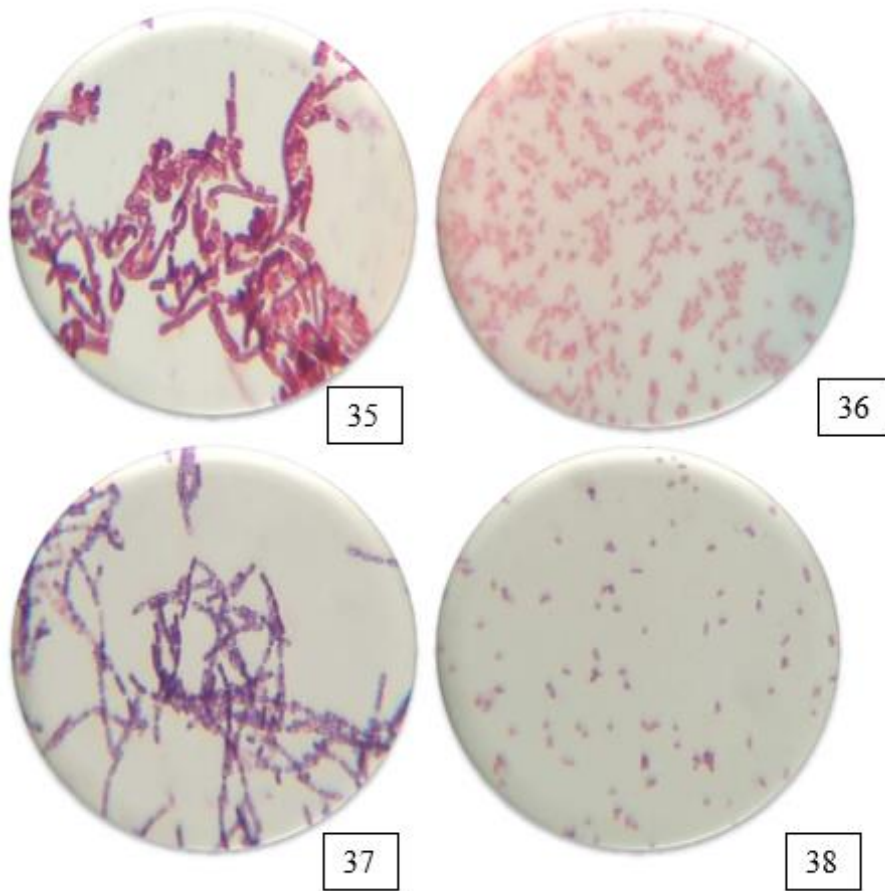


Fig.35: Tinción de Gram – cepa P3D2 Bacilo esporulado resistente a Fe y Pb.

Fig. 36. Tinción de Gram – cepa P1C3 Coco no esporulado resistente a Fe y Pb.

Fig.37. Tinción de Gram + cepa P2B19 Bacilo esporulado resistente a Pb.

Fig.38. Tinción de Gram + cepa P1C2 Coco no esporulado resistente a Pb.

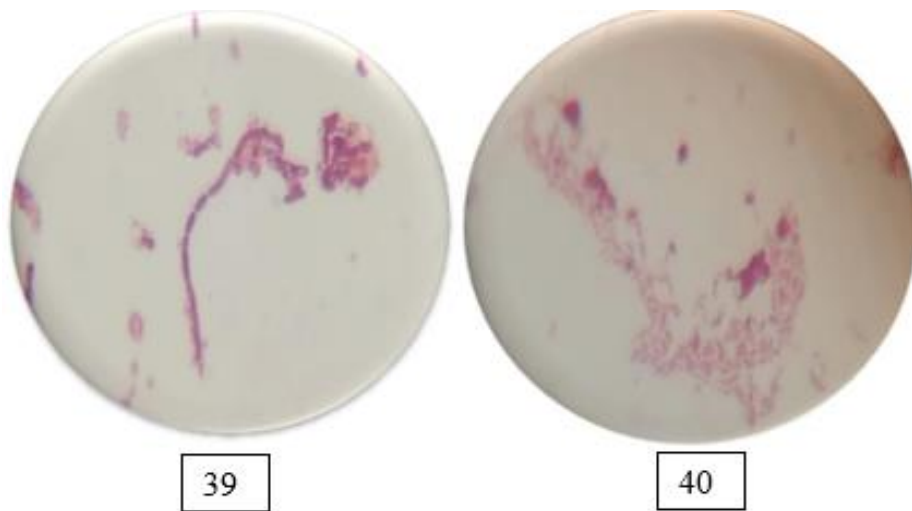


Fig.39: Tinción de Gram – cepa P1B4 Bacilo esporulado resistente a Cu.

Fig.40. Tinción Gram – cepa P1E5 Bacilo no esporulado resistente a Cu. Únicas dos cepas resistentes a Cu.