



**ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO**

NIVEL DE TOLERANCIA A METALES PESADOS DE BACTERIAS AISLADAS DE  
LA BOCANA DEL RÍO MOCHE, TRUJILLO - PERÚ

**Línea de investigación:**

**Tecnologías para residuos y pasivos ambientales. Biorremediación**

Tesis para optar el Grado Académico de Doctora en Ingeniería Ambiental

**Autora**

Miranda Jara, Angélica Ysabel

**Asesor**

Iannacone Oliver, José Alberto

ORCID: 0000-0003-3699-4732

**Jurado**

Castañeda Pérez, Luz Genara

Zamora Talaverano, Noé Sabino

Ccasani Allende, Julian

**Lima - Perú**

**2025**

# NIVEL DE TOLERANCIA A METALES PESADOS DE BACTERIAS AISLADAS DE LA BOCANA DEL RÍO MOCHE, TRUJILLO – PERÚ

## INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

20%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	2%
2	<a href="http://up-rid.up.ac.pa">up-rid.up.ac.pa</a> Fuente de Internet	2%
3	<a href="http://www.revistas.unitru.edu.pe">www.revistas.unitru.edu.pe</a> Fuente de Internet	2%
4	<a href="http://www.scielo.cl">www.scielo.cl</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://repodigital.unrc.edu.ar">repodigital.unrc.edu.ar</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://es.slideshare.net">es.slideshare.net</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://repositorio.unfv.edu.pe">repositorio.unfv.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%



## ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO

NIVEL DE TOLERANCIA A METALES PESADOS DE BACTERIAS  
AISLADAS DE LA BOCANA DEL RÍO MOCHE, TRUJILLO - PERÚ

Línea de investigación:

Tecnologías para residuos y pasivos ambientales. Biorremediación

Tesis para optar el Grado Académico de Doctora en Ingeniería Ambiental

Autora

Miranda Jara, Angélica Ysabel

Asesor

Iannacone Oliver, José Alberto

ORCID: 0000-0003-3699-4732

Jurado

Castañeda Pérez, Luz Genara

Zamora Talaverano, Noé Sabino

Ccasani Allende, Julian

Lima – Perú

2025

### **DEDICATORIA**

*A mis queridos padres, Alcibíades Helí Miranda Chávez y Hermelinda Josefina Jara Cabrejo, por su amor incondicional, constante apoyo y aliento inquebrantable a lo largo de mi camino académico. Gracias por estar siempre a mi lado y por ser mi fuente de inspiración. Este logro no habría sido posible sin su amor y guía. Con todo mi amor y gratitud.*

*A mis queridos hermanos, Helí Antenor y Carolina Elizabeth, por su presencia en mi vida que es un regalo invaluable que atesoro con todo mi corazón.*

## AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas que colaboraron en este trabajo de investigación:

- Al Dr. Heber Max Robles Castillo, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNT, por permitirme utilizar el Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética, su apoyo ha sido fundamental para el desarrollo de mi trabajo.
- Al Dr. Claudio Quiñones Cerna, docente investigador del laboratorio de investigación de Ciencias biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, por su orientación y conocimientos en el desarrollo experimental que han sido muy trascendente.
- Al Dr. Roberto Carlos Chuquilin Goicochea, docente investigador de la Universidad Privada del Norte, por su invaluable colaboración, su orientación experta y dedicación, por su apoyo y guía a lo largo de este proceso académico, le estoy profundamente agradecida.
- Al Ph. Dr. José Alberto Iannacone Oliver, mi asesor por su apoyo en este camino y su orientación en las oportunidades de mejora de este trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Planteamiento del problema.....	9
1.2. Descripción del problema .....	10
1.3. Formulación del problema .....	13
1.4. Antecedentes .....	13
1.5. Justificación de la investigación .....	18
1.6. Limitaciones de la investigación.....	19
1.7. Objetivos .....	20
1.8. Hipótesis.....	20
II. MARCO TEÓRICO .....	22
2.1. Marco conceptual.....	22
III. MÉTODO.....	28
3.1. Tipo de Investigación.....	28
3.2. Población y muestra .....	28
3.3. Operacionalización de variables .....	29
3.4. Instrumentos.....	30
3.5. Procedimiento .....	30
3.6. Análisis de datos .....	34
IV. RESULTADOS .....	35
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	41
VI. CONCLUSIONES.....	46
VII. RECOMENDACIONES .....	47
VIII. REFERENCIAS .....	48
IX. ANEXOS.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación del punto de muestreo .....	28
<b>Figura 2.</b> Muestras obtenidas del sedimento del río Moche .....	61
<b>Figura 3.</b> Soluciones de sales con metales pesados .....	61
<b>Figura 4.</b> Preparación de medios de cultivo.....	62
<b>Figura 5.</b> Activación de las muestras .....	62
<b>Figura 6.</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tolerancia a metales pesados (mM) de algunos microorganismos acidófilos y neutrófilos .....	23
<b>Tabla 2.</b> Operacionalización de variables .....	29
<b>Tabla 3.</b> Identificación de muestras con las sales de metal pesado añadida .....	31
<b>Tabla 4.</b> Identificación fenotípica de cepas aisladas de la Bocana del río Moche .....	35
<b>Tabla 5.</b> Concentración mínima inhibitoria de bacterias aisladas tolerantes al Pb .....	37
<b>Tabla 6.</b> Datos agrupados en distribución de frecuencia en bacterias aisladas tolerantes al Pb .....	37
<b>Tabla 7.</b> Concentración mínima inhibitoria de bacterias aisladas tolerantes al Ni .....	38
<b>Tabla 8.</b> Datos agrupados en distribución de frecuencia en bacterias aisladas tolerantes al Ni .....	38
<b>Tabla 9.</b> Concentración mínima inhibitoria de bacterias aislados tolerantes al Cr .....	39
<b>Tabla 10.</b> Datos agrupados en distribución de frecuencia en bacterias aisladas tolerantes al Cr .....	39
<b>Tabla 11.</b> Concentración mínima inhibitoria de bacterias aisladas tolerantes al Cd.....	40
<b>Tabla 12.</b> Datos agrupados en distribución de frecuencia en bacterias aisladas tolerantes al Cd.....	40
<b>Tabla 13.</b> Matriz de consistencia.....	64

## RESUMEN

Los metales pesados son contaminantes importantes cuya presencia concomitante en diferentes ecosistemas ha generado preocupación mundial. A nivel celular, los metales pesados forman intermediarios inestables con el material genético y perturban diferentes procesos metabólicos y el plegamiento adecuado de las proteínas. Este estudio se encargó de explorar, aislar, examinar fenotípicamente y caracterizar cepas bacterianas tolerantes a metales pesados en entornos naturales como el río Moche (8,1605 S, 79,034 O), cerca de la ciudad de Trujillo en la región La Libertad, Perú. Se identificaron veinticuatro cepas de bacterias. Las cepas identificadas fueron evaluadas ante metales pesados mediante pruebas de concentración mínima inhibitoria, para determinar su tolerancia a  $Pb^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cr^{+6}$  y  $Cd^{+2}$ . Las bacterias toleraron los cuatro metales a diferentes niveles. La identificación fenotípica mostró un predominio de bacterias con forma bacilo (100%), Gram positivas (83%), aerobias (79%), móviles (71%) y esporuladas (79%). Debido a su nivel de tolerancia, estas cepas podrían utilizarse para biorremediar y recuperar sitios contaminados con los metales pesados evaluados.

*Palabras clave:* bacterias, bioacumulación, concentración mínima inhibitoria, plomo.

## ABSTRACT

Heavy metals are important pollutants whose concomitant presence in different ecosystems has generated global concern. At the cellular level, heavy metals form unstable intermediates with genetic material and disrupt different metabolic processes and proper protein folding. This study aimed to explore, isolate, phenotypically examine and characterize heavy metal-tolerant bacterial strains in natural environments such as the Moche River (8.1605 S, 79.034 W), near the city of Trujillo in the La Libertad region, Peru. Twenty-four bacterial strains were identified. The identified strains were evaluated against heavy metals by minimum inhibitory concentration tests, to determine their tolerance to Pb<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cr<sup>+6</sup> and Cd<sup>+2</sup>. The bacteria tolerated the four metals at different levels. Phenotypic identification showed a predominance of rod-shaped bacteria (100%), Gram-positive (83%), aerobic (79%), mobile (71%) and spore-forming (79%). Due to their tolerance level, these strains could be used to bioremediate and remediate sites contaminated with the heavy metals evaluated.

*Keywords:* bacteria, bioaccumulation, minimum inhibitory concentration, lead, minimum inhibitory concentration.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Planteamiento del problema

La problemática de la contaminación por elementos potencialmente tóxicos como los metales pesados (MP) es un tema de gran relevancia en la actualidad, con impactos significativos en la salud pública y el medio ambiente. La literatura disponible sugiere que las tecnologías convencionales para su tratamiento existentes son costosas y generan desechos peligrosos que requieren eliminación. La remediación de suelos y aguas contaminados con MP mediante el uso de microorganismos es una alternativa prometedora y eficiente. Estos elementos potencialmente tóxicos como el mercurio (Hg), arsénico (As) y plomo (Pb) son contaminantes que afectan la salud humana y el medio ambiente cuando se encuentran en niveles elevados en suelos y aguas (Nanda et al., 2019; Pal et al., 2022; Zhu et al., 2023). La biorremediación utiliza el potencial metabólico de bacterias y de hongos para eliminar, degradar o estabilizar estos contaminantes a través de procesos como sorción, precipitación, lixiviación y volatilización (Zhang et al., 2019; Desoky et al., 2020). Se han aislado microorganismos capaces de resistir altas concentraciones de MP e incorporarlos a sus procesos metabólicos, como la enzima arsenito oxidasa (AOX) que oxida el As (Demircan et al., 2020). La biorremediación mediada por microorganismos y plantas ofrece una alternativa eficiente, económica y ambientalmente amigable para la recuperación de suelos contaminados con MP (Delangiz et al., 2020).

Numerosos estudios han demostrado que algunas bacterias pueden soportar dosis mayores de MP. Se ha demostrado que *Stenotrophomonas maltophilia* puede resistir hasta 150  $\mu\text{M}$  de cadmio (Cd) debido a la unión de cadmio al exopolisacárido que esta produce y el mecanismo de reactividad cruzada entre la producción de exopolisacáridos y sideróforos tolerantes a los metales, que se han relacionado con la quelación de metales (Ramakrishnan et al., 2023). Por otro lado, *Bacillus* LBA119 es altamente resistente al Hg, con una concentración

mínima inhibidora (CMI) de 32 mg/L de Hg, mostrando un alto potencial de biorremediación para suelos contaminados con este elemento (Yao et al., 2023). Los hongos también exhiben una alta capacidad de adsorción y acumulación de MP y pueden utilizarse potencialmente (Kumar & Dwivedi, 2021). Los biomecanismos más importantes implicados en la tolerancia y eliminación de MP varían de una especie a otra (Roy et al., 2024). Una estrategia para obtener microorganismos tolerantes a los MP es la exploración de hábitats microbianos que tienen un nivel elevado de MP, originados tanto de fuentes naturales como antropogénicas (Mohamed & Abo-Amer, 2012). El río Moche, ubicado en la región La Libertad, Perú ha sido contaminado con relaves por años, de las mineras adyacentes a la cabeza de cuenca de este río (Huaranga et al., 2012). Por esta razón, este trabajo está orientado al aislamiento y evaluación del nivel de tolerancia a MP de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, con el objetivo de ofrecer en un futuro, una fuente de microorganismos tolerantes a MP con fines de remediación de agua y suelos.

## **1.2. Descripción del problema**

Un problema actual crítico es la contaminación de los ecosistemas acuáticos por una serie de agentes químicos y biológicos. Entre los que están los MP (Comisión Nacional del Agua [CONAGUA], 2014; Rajaganapathy et al., 2011).

Los principales mecanismos de acción de los MP son: su capacidad de desplazar iones metálicos esenciales, bloquear grupos funcionales, modificar la conformación de enzimas, polinucleótidos, vitaminas y coenzimas (Soto-Benavente et al., 2020)

Entre las sustancias que oxidan o reducen los microbios en su metabolismo, están los metales pesados y sus sales; pueden convertirlos en productos atóxicos o sin efecto deletéreo para el ambiente. Otros microbios bioacumulan los MP o sus sales en su superficie (cápsulas) o en el periplasma o las absorben al interior de su citoplasma, aun manteniendo su viabilidad (Soto-Benavente et al., 2020).

Surge la posibilidad de usarlos para absorber, adsorber, acumular y transformar los MP y sus sales (Lima e Silva et al., 2012).

Se ha reportado la utilidad biotecnológica de bacterias del género *Bacillus* para la biorremediación (Ahemad, 2019; Guo et al., 2010; Gupta & Diwan, 2017). También resultan útiles bacterias de los géneros *Serratia*, *Enterobacter* y *Staphylococcus* (Li et al., 2022; Liang & Gadd, 2017; Zahoor & Rehman, 2009)

La cuenca del Río Moche, localizada en el departamento de La Libertad, cuyas aguas son utilizadas para diversas actividades entre las cuales resalta la agricultura, ganadería y uso doméstico. Han surgido problemas en la salud de la población que depende directa o indirectamente de este río; por ejemplo, se registra un incremento notorio de la incidencia de las enfermedades diarreicas agudas (EDAs) por la ingesta de alimentos contaminados principalmente por metales pesados; en cuanto al ecosistema, algunas especies acuáticas propias del lugar han ido desapareciendo, sin dejar de lado que la principal actividad económica, la agricultura, se ve afectada. La principal fuente contaminante es la actividad minera, los vertimientos de la población y la actividad industrial (Delgado et al., 2022).

En la Bocana del río Moche dada su estructura y naturaleza existe una alta posibilidad de encontrar una microflora resistente a los MP, que podría jugar un importante rol como promotores de crecimiento vegetal, protegiendo la flora y fauna autóctona de los efectos tóxicos de los metales pesados que lleguen; pero además podrían participar significativamente en su bioacumulación y la reducción de su concentración en este valioso reducto ambiental de alto valor ecológico.

En la región La Libertad, la cuenca del Río Moche que se ubica en la Costa Norte del Perú y pertenece a la vertiente del Pacífico, abarca las provincias de Trujillo, Otuzco, Santiago de Chuco y Julcán; con una extensión de 2 708 km<sup>2</sup> y descarga un volumen medio anual 154.587 millones de metros cúbicos de agua, siendo los meses de febrero a abril período de

avenida; los meses de junio a diciembre corresponden al período de sequía y los meses restantes corresponden al período de transición (González, 2012); se encuentra contaminada por diferentes MP. Geográficamente la cuenca se halla comprendida entre los 7°46' y 8° 15' de Latitud Sur y los 78° 16' y 79° 08', de Longitud Oeste. Debido a la intensa actividad minera que ocurre en el río Moche, por más de 50 años y, especialmente en los últimos 20 años se ha incrementado como resultado de los relaves mineros que son vertidos a los ríos y lagunas (Cerna et al., 2019) está contaminado con principalmente con Hg, Cd, Pb, Cu y As (Rodríguez, 2023). Se han localizado en esta Cuenca 63 puntos de fuentes contaminantes.

La minera Quiruvilca, es la principal empresa dedicada a actividades mineras; sin embargo, a finales del 2017 cerró todas sus operaciones, por lo que ha habido un aumento de la minería informal; ante estas circunstancias, Shorey atraviesa problemas de contaminación, debido a la presencia de aguas ácidas y caída de relaves mineros según “el Diagnóstico hídrico rápido de la cuenca del río Moche como fuente de agua y servicios ecosistémicos hídricos para la EPS SEDALIB S.A.” (Cerna et al., 2019). Ante esta situación, se ha planteado la urgencia de contrarrestar las altas concentraciones de MP en el agua del Río Moche, a través de la incorporación de métodos ecológicos, como lo es la biorremediación microbiana.

Esta contaminación es un problema que sigue afectando la biota de esta importante cuenca del norte peruano. Por eso surge la necesidad de implementar estrategias que permitan la conservación y supervivencia de la extraordinaria diversidad biológica que existe en este recinto ecológico de este reducto ecológico y hábitat de algunas especies importantes de la red trófica de la bocana del Río Moche (Pulido Capurro & Bermúdez Díaz, 2018).

Por tal razón, surge también la posibilidad de aprovechar estas características biológicas que muestra la Bocana del río Moche para diseñar e implementar bioprocesos de biorremediación contando con los cultivos microbianos de una rica plasticidad metabólica que deben morar en este lugar; por lo cual urgen y son necesarias mayores investigaciones.

### **1.3. Formulación del problema**

#### ***1.3.1. Problema general***

¿Cuál será el nivel de tolerancia a MP de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?

#### ***1.3.2. Problemas específicos***

- ¿Cuál será el nivel de tolerancia al Pb de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?
- ¿Cuál será el nivel de tolerancia al Ni de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?
- ¿Cuál será el nivel de tolerancia al Cr de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?
- ¿Cuál será el nivel de tolerancia al Cd de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?

### **1.4. Antecedentes**

#### ***1.4.1. Antecedentes internacionales***

Se ha realizado una revisión bibliográfica centrada en resumir los mecanismos de adaptación bacteriana de diversos MP, y algunas aplicaciones de las bacterias tolerantes a metales en biorremediación. Encontraron que, las células bacterianas pueden absorber más cantidad mediante procesos tanto dependientes como independientes de ATP, y la prodigiosa pared celular bacteriana que juega un papel muy importante en la acumulación de MP. Entre las bacterias, las grampositivas acumulan concentraciones mucho más altas de metales pesados en sus paredes celulares que las bacterias gramnegativas. También informaron del papel de las metalotioneínas bacterianas (MT) en los MP (Nanda et al., 2019).

Una revisión bibliográfica destacó los diferentes mecanismos de resistencia a los metales y promoción del crecimiento vegetal de PGPB resistentes a los metales, así como el reciente desarrollo en la explotación de estas bacterias en la biorremediación de MP en diferentes agroecosistemas. Bajo estrés por metales, los microorganismos del suelo, incluidas las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), han desarrollado muchas estrategias para evadir la toxicidad generada por los diversos MP. Estas BPCV resistentes a los metales, cuando se utilizan como bioinoculantes o biofertilizantes, mejoran significativamente el crecimiento de las plantas en suelos estresados o contaminados con MP (Ahemad, 2019).

El comprender mejor las respuestas de las bacterias de los sedimentos del lecho de los ríos a los MP lo que es clave para considerar el uso de esta comunidad bacteriana como indicador de la contaminación del agua del río por MP. Para ello, es necesaria una evaluación integrada basada en la densidad bacteriana, la actividad y la estructura de la comunidad a través de experimentos de incubación en condiciones bien controladas para obtener hallazgos más relevantes que son difíciles de lograr mediante estudios de campo realizaron experimentos secuenciales de incubación por lotes utilizando suspensiones de sedimentos de tres ríos con captaciones de diferentes coberturas y usos del suelo. Se investigaron los efectos de cuatro metales (Pb, Cr, Cd y Cu) agregándolos por separado en tres niveles de concentración diferentes. Se agregó glucosa una vez al día como fuente de carbono durante toda la incubación que duró 30 días. Los resultados de la PCR-DGGE y el análisis de secuencia del ADNr 16S extraído sugirieron además que había especies bacterianas que tenían una fuerte tolerancia al metal y podían crecer fácilmente para convertirse en nuevas especies dominantes. Se infirió que la existencia de tales especies bacterianas era la razón que conducía a los aumentos observados en la densidad bacteriana durante la incubación con el MP (Du et al., 2018).

Se ha identificado y caracterizado bacterias resistentes a MP (BR-MP) aisladas de suelos afectados por la industria y su impacto deseado como biorremediadores de plantas de espinaca estresadas por metales pesados. Se seleccionaron tres de 135 aislamientos basándose en un alto nivel de resistencia a los MP: *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* DSM 15029 T DSM (MA3), *Paenibacillus jamilae* DSM 13815 T DSM (LA22) y *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 DSM (SN36). Se implementaron experimentos con los tres BR-MP aislados para mejorar los atributos de crecimiento, fisiobioquímica y componentes del sistema de defensa antioxidante de la planta de espinaca expuesta al estrés de  $\text{Cd}^{2+}$  (2 mM),  $\text{Pb}^{2+}$  (2 mM) y un control negativo (Sin estrés por metal pesado). La aplicación de BR-MP promovió la tolerancia al estrés por MP en plantas de espinaca (Desoky et al., 2020).

Se ha investigado sobre la bioacumulación de altas concentraciones de Cd a lo largo del tiempo en un entorno oligotrófico. Estudiaron *Burkholderia cepacia* GYP1, que se aisló de múltiples tierras agrícolas contaminadas con MP, por su mecanismo de bioacumulación de Cd en condiciones oligotróficas. GYP1 poseía una alta capacidad de acumulación de Cd alcanzando 116 mg Cd/g de biomasa (peso seco). La espectroscopía ATR-FTIR, microscopía electrónica, citometría de flujo junto con la fracción subcelular demostraron que la absorción y distribución de Cd varió con la mayor cantidad de Cd de las células GYP1 durante el tiempo de tratamiento de siete días. Un análisis adicional del mecanismo de bioacumulación de Cd por GYP1 basado en la proteómica basada en iTRAQ mostró que el Cd (II) podría desencadenar la regulación positiva de la ATPasa exportadora de  $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ , los sistemas de secreción de proteínas tipo VI y la glutatión-S-transferasa que son relacionado con la respuesta del Cd, que puede contribuir a mantener la homeostasis intracelular del Cd. En resumen, la inmovilización de Cd (II) por *B. cepacia* GYP1 contiene tres pasos: (1) inmovilización rápida de Cd (II) en la superficie celular coordinada con grupos funcionales, (2) transporte de Cd (II) a las células y la acumulación en el citoplasma y (3) la salida de Cd (II) intracelular dependían de la energía

y del Cd (II) extracelular atrapado o adsorbido por el EPS. Este estudio proporcionó la comprensión del proceso de acumulación de cadmio de *B. cepacia* GYP1 en condiciones oligotróficas, lo que sería útil en la biorremediación del ambiente natural contaminado con Cd (Zhang et al., 2019).

Se han detectado cepas tolerantes a MP en suelos contaminados con MP en áreas mineras y determinaron la tolerancia de las cepas a diferentes MP y sus tasas de eliminación mediante experimentos. Aislaron la cepa LBA119 resistente al Hg de muestras de suelo contaminadas con Hg en el condado de Luanchuan, provincia de Henan, China. La cepa fue identificada mediante tinción de Gram, pruebas fisiológicas y bioquímicas y secuencias de ADNr 16S. La cepa LBA119 mostró buena resistencia y tasas de eliminación de metales pesados como  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , Manganeseo ( $Mn^{2+}$ ), Zinc ( $Zn^{2+}$ ) y  $Cd^{2+}$  mediante pruebas de tolerancia en condiciones óptimas de crecimiento. La cepa LBA119 resistente al Hg se aplicó a suelos contaminados con mercurio para determinar la capacidad de la cepa para eliminar el mercurio del suelo en comparación con suelos contaminados con Hg sin biomasa bacteriana. Esta cepa muestra un alto potencial de biorremediación para suelos contaminados con Hg (Yao et al., 2023).

La resistencia a los antibióticos y los MP en microorganismos, se ha vuelto un enfoque sostenible para combatir estos entornos contaminados. Zhu y colaboradores investigaron la comunidad microbiana de muestras de sedimentos marinos después de 255 días de cultivo de enriquecimiento bajo estrés de Cu (II) y lincomicina y ZC255 fue la cepa más resistente obtenida. La secuencia del gen 16S rRNA confirmó que pertenecía al género *Rosellomorea*. La cepa ZC255 fue resistente a 12 tipos de antibióticos y tenía una tolerancia superior a Cobre ( $Cu^{+2}$ ), Pb (II), Níquel ( $Ni^{+2}$ ), Zn (II), Cromo ( $Cr^{+3}$ ) y Cd (II). Además, exhibe una fuerte capacidad de bioeliminación de Cu y lincomicina. La eficiencia de eliminación de  $Cu^{+2}$  y

lincomicina puede alcanzar 651 mg/g de biomasa y 32,5 mg/g de biomasa, respectivamente. La cepa ZC255 fue un aislado prometedor para aplicaciones de biorremediación de la contaminación (Zhu et al., 2023).

#### 1.4.2. Antecedentes nacionales

Se ha investigado los MP más representativos en el Cuenca Alta del río Moche desde 1980 al 2010. La mayor contaminación se registró en el año 1980: hierro Fe (557,5 ppm), Pb (100,4 ppm), Cd (4,55 ppm), Cu (6,9 ppm), Zn (262,9 ppm) y As (9 ppm); mientras las mayores concentraciones en el suelo fue: Fe (83,4 mg/kg); Pb (0,82 mg/kg); Cd (0,012 mg/kg); Cu (1,24 mg/kg); Zn (0,38 mg/kg) y As (0,016 mg/kg) (Huaranga et al., 2012).

En un trabajo, se estudió el grado de tolerancia a MP de bacterias aisladas de suelos con y sin rizosfera, para conocer su potencial para aplicaciones en biorremediación. Las muestras fueron obtenidas de la minera de Santa Rosa de Jangas, Ancash. La tolerancia a MP se calculó usando medio salino suplementado con 1 mM de Pb (II), Cu (II), Ni (II) y Zn (II); y 0,1 mM de plata Ag (I), Cr (VI) y Cd (II). Las cepas bacterianas con mejores índices de tolerancia fueron *Bacillus licheniformis* SSR18 ( $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ ), *Bacillus subtilis* SSR3 ( $\text{Pb}^{+2}$ ), *Serratia sp.* SSR15 ( $\text{Cu}^{+2}$ ), *Serratia sp.* SSR13 ( $\text{Ag}^{+1}$ ) y *Bacillus cereus* SSR01 ( $\text{Cr}^{+6}$ ) (Munoz, 2015).

En la región San Martín, diez cepas nativas de *Trichoderma spp.* con tolerancia al Cd, de la rizosfera de árboles de cacao, se evaluaron en condiciones *in vitro*, en cultivo papa dextrosa agar (PDA) contaminado con 25 ppm, 100 ppm y 250 ppm y en cultivo papa dextrosa (PD) contaminado con 5 ppm de Cd. Los resultados mostraron que *Trichoderma spp.* capacidad de remover Cd. Las cepas fueron *T. brevicompactum* M43D (83,1%), *T. harzianum* M1P (67,0%) y *T. spirale* M55SM (65,8%). Las cepas con alta tolerancia fueron *T. harzianum* M1P y *T. koningiopsis* M3B (Cayotopa-Torres et al., 2021).

### **1.5. Justificación de la investigación**

Las sales de los MP son tóxicas; estas se forman y están presentes en los sistemas acuáticos; sin embargo, existe una flora microbiana que tolera estas sales y las pueden oxidar o reducir, transformar o acumularlas, convirtiéndolas en sustancias inocuas o menos dañinas. Para usar esta flora microbiana en los procesos de purificación de ambientes contaminados con sales de MP existe la alta posibilidad de encontrar bacterias con alta tolerancia y, por lo tanto, que puedan sobrevivir en su presencia.

La importancia del presente tema de investigación radica principalmente en que esas bacterias resistentes pueden ser usadas para biorremediar suelos y aguas contaminadas con sales de MP.

La presencia de estas especies microbianas con alta tolerancia a la presencia de MP se podría confirmar en otras áreas o parques naturales protegidos que abundan en nuestro país y así asegurar su uso en procesos de depuración de una gran cantidad de sitios duramente afectados por su alta contaminación por la presencia de sales de MP.

Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con MP como Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Cobalto (Co), Plata (Ag) y Oro (Au) en el ambiente. En el caso particular de los suelos, suelen afectar la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos, mientras que, en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano. La aplicación de métodos de remediación efectivos depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, la solubilidad y especiación de los metales pesados, los procesos de atenuación e inmovilización y la medida en que los MP puedan dispersarse tanto horizontal como verticalmente a medida que migran por el suelo.

El uso intencional de procesos de degradación biológica para eliminar sustancias contaminantes que han sido vertidos con conocimiento o accidentalmente en el ambiente ya

tiene una larga historia de aplicación relativamente exitosa. Se han desarrollado herramientas, técnica y estrategias biológicas muy diversas que han permitido recuperar y obtener suelos y cuerpos de agua nuevamente limpios. Se ha podido demostrar que luego de mezclar *in vitro* sales de metales pesados a diferentes concentraciones incluyendo concentraciones tóxicas con muestras de sedimentos de cuencas y pantanos que sufren alta contaminación con metales pesados es factible demostrar la existencia de diferentes tipos de bacterias con alta tolerancia, resistencia y actividad metabólica en presencia de estos metales (Amabilis-Sosa et al., 2016; Kabir et al., 2024; Yan et al., 2024).

### **1.6. Limitaciones de la investigación**

Entre las limitaciones más ostensibles para el desarrollo de la investigación, se debe mencionar principalmente el relativamente impredecible tiempo que se necesitaría para realizar el aislamiento, reconocimiento y ensayo de la tolerancia a las sales de MP que muestren las bacterias que sean estudiadas a partir de las muestras que se obtengan de la Bocana del río Moche.

Por otro lado, se cuenta con literatura científica muy escasa referida al estudio de especies microbianas tolerantes a sales de MP y sobre procesos de biorremediación que se hayan realizado para el ecosistema motivo de este estudio; lo cual es un indicio de la necesidad de la realización de investigaciones sobre esta problemática.

Es más notoria la falta de estudios de investigación referentes al nivel de tolerancia a los MP de bacterias nativas de la cuenca del río Moche. Si se encontrara un importante número de estudios con respecto a la fauna del lugar más no con respecto a la conservación del suelo o procesos de biorremediación; por lo cual se justifica la realización de investigaciones sobre la factibilidad del desarrollo de bioprocesos de biorremediación aplicables a los sitios contaminados de la cuenca del río Moche.

Las limitaciones con respecto al lugar de la toma de muestra adecuada para la ubicación de las bacterias que tengan el nivel alto de tolerantes a los metales pesados de la cuenca del río Moche, ya que no se puede tener seguridad de aislar bacterias de alta tolerancia y podría ser baja la posibilidad de incrementar su tolerancia durante el tiempo que se ha previsto realizar este estudio.

## **1.7. Objetivos**

### ***1.7.1. Objetivo general***

Determinar el nivel de tolerancia a MP de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.

### ***1.7.2. Objetivos específicos***

- Determinar el nivel de tolerancia al Pb de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.
- Determinar el nivel de tolerancia al Ni de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.
- Determinar el nivel de tolerancia al Cr de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.
- Determinar el nivel de tolerancia al Cd de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.

## **1.8. Hipótesis**

### ***1.8.1. Hipótesis general***

Existe diferencia en el nivel de tolerancia a MP de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.

### ***1.8.2. Hipótesis específicas***

- Existe diferencia en el nivel de tolerancia al Pb de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.

- Existe diferencia en el nivel de tolerancia al Ni de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.
- Existe diferencia en el nivel de tolerancia al Cr de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.
- Existe diferencia en el nivel de tolerancia al Cd de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Marco conceptual

#### 2.1.1. Metales pesados

Los MP son un conjunto de elementos químicos que presentan propiedades metálicas, en el que se incluyen metales de transición, algunos semimetales, lantánidos y actínidos. El criterio más general para su clasificación se basa en la densidad específica, de acuerdo con la cual se incluyen en este grupo elementos con una densidad mayor a  $5 \text{ g/cm}^3$  (Covarrubias & Peña Cabriales, 2017). Actualmente, el término “metal pesado” es utilizado para referirse de una manera amplia a aquellos metales o metaloides con potencial de causar problemas de toxicidad (Alloway, 2013). Las características más importantes que distinguen los MP de otros contaminantes tóxicos son su no biodegradabilidad y su propensión y acumulación en materiales vivos (Orhan & Büyükgüngör, 1993).

#### 2.1.2. Microorganismos con capacidades extremas

Los microorganismos constituyen un grupo de seres vivos de enorme y crucial importancia en la naturaleza. Por mostrar un espectro metabólico muy amplio y variado, llevan a cabo diversas actividades que aseguran la continuidad de la vida en el planeta, la fluidez de los ciclos biogeoquímicos, la integración de los detritos a la red trófica, la remediación de sitios contaminados, entre otros. Asimismo, los capacita para colonizar cualquier ambiente por inhóspito que parezca, de tal forma que su presencia asegura que la energía entra al ecosistema estableciendo un ciclo continuo y constante (Carreño & Hurtado, 2017).

“La mayoría de las comunidades bacterianas, en el enfoque ecológico, sufren perturbaciones intermitentes como escasez de alimento, sequía, congelamiento-descongelamiento, exposición a altas concentraciones salinas y otras alteraciones causadas por las variaciones naturales del entorno o por la actividad humana” (De la Cruz-Leyva et al., 2015).

### 2.1.3. Las bacterias resistentes

Se ha informado que los MP inhiben el crecimiento de las bacterias, como lo indica una extensión del tiempo de generación y la disminución de la tasa de crecimiento (Dua et al., 2002). También se ha demostrado que disminuyen el peso seco de los hongos y la concentración total de proteínas de las células bacterianas (Mohamed & Abo-Amer, 2012; Seo et al., 2007). Sin embargo, diversos autores han demostrado que las bacterias pueden ser resistentes a los MP (Tabla 1), poniendo un abanico de posibilidades sobre el futuro del uso de estas bacterias para la biorremediación.

**Tabla 1**

*Tolerancia a metales pesados (mM) de algunos microorganismos acidófilos y neutrófilos*

Microorganismos	Cu <sup>+2</sup>	As <sup>+3</sup>	Zn <sup>+2</sup>	Cd <sup>+2</sup>	Ni <sup>+2</sup>	Referencia
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	800	N.D.	1071	500	1000	Dopson et al. (2003)
<i>Acidithiobacillus caldus</i> DSM8584*	24	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(Mutch et al., 2010)
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34*	3	4	12	4	13	Monsieurs et al. (2011)
<i>Thiomonas cuprina</i> DSM 5495**	7,9	1,3	150	0,09	170	Schippers (2007)
<i>Thiomonas arsenicoxydans</i>	N.D.	6	N.D.	N.D.	N.D.	Arsène-Ploetze et al. (2010)
<i>Metallosphaera sedula</i> DSM 5348**	16	1,3	150	0,9	N.D.	Manesh et al. (2024)
<i>Escherichia coli</i> K38*	1 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	Franke et al. (2001b)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	1	N.D.	10	10	0,1	Miller et al. (1992)

\* Valor de concentración mínima inhibitoria

\*\* Concentración de metales donde todavía tiene lugar la actividad metabólica

N. D. No detectado

### 2.1.4. Tolerancia microbiana a MP

La exploración de hábitats microbianos que tienen un nivel elevado de MP tiene una implicación importante de tolerancia microbiana a estos metales porque su estado de oxidación depende de su solubilidad y toxicidad. Para las especies bacterianas con fuerte resistencia a los metales pesados y aquellas con resistencia débil pero que pueden recuperarse después de adaptarse a la toxicidad, pueden mantener su crecimiento como dominantes o convertirse en nuevas dominantes (Gillan et al., 2005; Rasmussen & Sørensen, 2001). Además de las diferencias entre las especies bacterianas en su capacidad de tolerancia a los MP, existen diferencias entre su tasa de absorción que es un factor probable que contribuye en parte, si no en su totalidad, a las diferencias observadas en estudios previos (Hattori, 1992; Rasmussen & Sørensen, 2001). Para encontrar nuevas evidencias que demuestren esto, son necesarios experimentos de incubación a relativamente largo plazo en condiciones bien controladas, ya que los estudios de campo son difíciles de diferenciar los impactos de los metales pesados de los de muchas variables ambientales y compuestos orgánicos peligrosos si coexistieran (Du et al., 2018).

#### **2.1.5. Mecanismos de tolerancia microbiana a MP**

Existen seis principales mecanismos de resistencia de los microbios a los MP (Niño-Martínez et al., 2019; Pal et al., 2022) y algunas especies de bacterias han mostrado tener más de un mecanismo de protección simultáneamente. Los mecanismos de resistencia son: exclusión de MP por barrera de permeabilidad, transporte activo del metal fuera de la célula/organismo, secuestro intracelular del MP mediante unión a proteínas, secuestro extracelular, desintoxicación enzimática del metal a una forma menos tóxica y reducción de la sensibilidad al MP de objetivos celulares (Bruins et al., 2000).

### **2.1.5.1. Exclusión de metales por barrera de permeabilidad**

Las alteraciones en la pared celular, membrana o envoltura de un microorganismo son ejemplos de exclusión de MP por barrera de permeabilidad. Este mecanismo es un intento del organismo de proteger los componentes celulares esenciales sensibles a los MP. Un ejemplo destacado es la exclusión de Cu (II) resultante de la producción alterada de la proteína porina del canal de membrana por *E. coli* B (Rouch et al., 1995). Suele ser una mutación de un solo gen, que disminuye la permeabilidad de la membrana a los iones metálicos (Kumar & Dwivedi, 2021; Mohammadian et al., 2021).

### **2.1.5.2. Transporte activo del metal fuera de la célula/organismo**

Los sistemas de transporte activo o eflujo representan la categoría más grande de sistemas de resistencia metálica. Los microorganismos lo utilizan para exportar metales tóxicos desde su citoplasma. Estos mecanismos pueden estar codificados cromosómicamente o plasmídicamente. Los metales no esenciales normalmente ingresan a la célula a través de sistemas normales de transporte de nutrientes, pero se exportan rápidamente. Estos sistemas de eflujo pueden no ser ATPasa o estar unidos a ATPasa y ser altamente específicos para el catión o anión que exportan (Roy et al., 2024).

### **2.1.5.3. Secuestro intracelular del metal mediante unión a proteínas**

El secuestro intracelular es la acumulación de MP dentro del citoplasma para evitar la exposición a componentes celulares esenciales. Los MP comúnmente secuestrados son Cd, Cu y Zn. Existen dos ejemplos de esta forma de resistencia metálica: la producción de metalotioneína y proteínas ricas en cisteína. El sistema de resistencia al MP consta de dos genes; *smtA* y *smtB*. *smtA* codifica una metalotioneína. Este tipo de metalotioneína contiene menos residuos de cisteína que las metalotioneínas animales (Kosakivska et al., 2021; Rosen & Nolan, 2020).

#### **2.1.5.4. Secuestro extracelular**

La resistencia a los MP basada en el secuestro extracelular hasta hace poco era exclusiva de bacterias (que secretan exopolisacáridos), sin embargo, se han encontrado varias especies de levaduras y hongos, con este mecanismo. Los hongos secretan oxalato para formar un complejo de oxalato metálico, las levaduras forman complejos insolubles de fosfato de Cd para conferir resistencia, entre otros (Bramhachari & Nagaraju, 2017; Goutam et al., 2021; Priyadarshini et al., 2021).

#### **2.1.5.5. Desintoxicación enzimática del metal a una forma menos tóxica**

Las bacterias pueden reducir un amplio espectro de iones de MP. Se encontraron bacterias reductoras de cromato, molibdato y vanadato aisladas de varios nichos ecológicos. Algunas bacterias pueden utilizar metales y metaloides como donadores o aceptores de electrones para la generación de energía. Los MP en estado oxidado podrían servir como aceptores terminales de electrones durante la respiración anaeróbica de bacterias (Bazzi et al., 2020). La reducción enzimática de iones metálicos también daría como resultado la formación de formas de Hg (Rouch et al., 1995) y Cr (Chen & Hao, 1998) menos tóxicos. El sistema mejor estudiado de desintoxicación de metales mediante reducción enzimática confiere tolerancia al Hg codificado por MER-operón, en el cual los iones de Hg divalentes se reducen a Hg elemental mediante la reductasa intracelular *merA* (Hobman & Crossman, 2015).

#### **2.1.5.6. Reducción de la sensibilidad al metal de objetivos celulares**

Un ejemplo es el glutatión, que puede ofrecer protección a iones metálicos como Ag (I), Cu (I, II), Cd (II) y Hg (II) (Ni'Bhriain et al., 1983). El glutatión puede ofrecer protección contra Cu (II) y Fe (II) al suprimir la formación de radicales libres (Rouch et al., 1995). Existen diferencias en la capacidad de las bacterias Gram negativas y positivas

para tolerar ciertos iones metálicos (Morozzi et al., 1986), como el Cd (II). Una especie de *Pseudomonas* podría tolerar de 5 a 30 veces más Cd (II) (Minz et al., 1996). Por otro lado, los organismos Gram positivos son capaces de unir de 28 a 30 veces más Cu (II) en comparación con *Escherichia coli* (Beveridge, 2005).

### III. MÉTODO

#### 3.1. Tipo de Investigación

La investigación es básica, cuantitativa y descriptiva (Hernández Sampieri et al., 2014).

#### 3.2. Población y muestra

##### 3.2.1. Población

Las bacterias localizadas en el sedimento de las áreas altamente contaminadas y accesibles de la Bocana del río Moche ( $8^{\circ}10'14''$  S  $79^{\circ}00'34''$  O), Trujillo (Figura 1).

**Figura 1**

*Ubicación del punto de muestreo*



##### 3.2.2. Muestra

Estuvo integrada por siete muestras líquidas de sedimentos (tipo lodo), a una profundidad de 20 a 30 cm, en siete puntos diferentes de la rivera a una distancia 2 metros, entre cada punto. La muestra fue recolectada el sábado 11 de febrero del 2023. En estos días recién empezaba a subir el nivel del río, por lo que, fue más fácil obtener las muestras, que

cuando el nivel está al máximo. Esto fue para resguardar la seguridad del personal de muestro. Las muestras fueron depositadas en frascos recolectores estériles de 100 mL, hasta copar el borde del frasco.

La muestra fue obtenida en la Bocana del Río Moche porque la desembocadura del río Moche tiene forma de delta, que se forma en zonas costeras con micromareas y cierto gradiente de pendiente, donde se depositan los sedimentos gruesos paulatinamente sobre los más finos que surcan los ríos, formando depósitos de MP (Wolanski, 2019).

Se aislaron 24 cepas bacterianas escogidos aleatoriamente (cinco por cada una de las siete sales de los MP usadas en la etapa del enriquecimiento) entre las colonias (cultivos nativos) que crecieron en las placas del medio de cultivo selectivo. Este tamaño de muestra fue seleccionado por razones de logística y recursos disponibles para el estudio tal como se describe en los procesos de recolección de datos (Kabir et al., 2024).

### 3.3. Operacionalización de variables

En la **Tabla 2** se puede observar las variables usadas en el estudio y sus indicadores.

**Tabla 2**

*Operacionalización de variables*

<b>Tipo</b>	<b>Variable</b>	<b>Indicadores</b>
Independiente	Concentración de MP	Concentración mínima inhibitoria de Pb
		Concentración mínima inhibitoria de Ni
		Concentración mínima inhibitoria de Cr
		Concentración mínima inhibitoria de Cd
Dependiente	Nivel de tolerancia a MP	Presencia de crecimiento bacteriano a niveles tóxicos de sales de Pb, Ni, Cr y Cd

### **3.4. Instrumentos**

#### **3.4.1. Balanza analítica, estufa y espectrofotómetro**

Usados en el aislamiento e identificación presente en los medios de cultivo con sales de MP.

#### **3.4.2. Planilla en Excel para determinar la concentración mínima inhibitoria**

Se usó una planilla para determinar el índice de tolerancia de los cultivos bacterianos seleccionados a las siguientes sales:  $Pb(NO_3)_2$ ,  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ ,  $K_2Cr_2O_7$  y  $CdCl_2$  (Muñoz et al., 2012).

### **3.5. Procedimiento**

#### **3.5.1. Preparación del cultivo madre de bacterias resistentes a MP**

Se usó la técnica de enriquecimiento de (Văcar et al., 2021):

- Se obtuvo una muestra de la zona más contaminada de la Bocana del río Moche, donde se forma el delta.
- Se tomaron siete muestras líquidas de sedimentos (tipo lodo), a una profundidad de 20 a 30 cm, en siete puntos diferentes de la rivera a una distancia 2 m, entre cada punto. Las muestras fueron depositadas en frascos recolectores estériles de 100 mL, hasta copar el borde del frasco.
- Cada una de las siete muestras se mezcló en un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL, en una proporción de 20 mL de sedimento con 80 mL de una solución salina estéril al 0,85% (p/v).
- Luego estas siete muestras fueron mezcladas en un balón de 1 L, luego repartidas en 7 matraces, para ser incubadas a 30 °C, 90 rpm y 2 h, en una incubadora con agitador marca BIOBASE®.

### 3.5.2. *Enriquecimiento de tolerantes a MP*

**Tabla 3**

*Identificación de muestras con las sales de metal pesado añadida*

<b>Muestra</b>	<b>Sal añadida</b>	<b>Muestra</b>	<b>Sal añadida</b>
M-Pb	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	M-Cr	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
M-Ni	NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	M-Cd	CdCl <sub>2</sub>

De las siete muestras incubadas, se tomaron cuatro muestras y se enriquecieron con cuatro MP, Pb, Ni, Cr y Cd hasta una concentración de 100 mg/L de cada MP utilizando cuatro sales de: Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y CdCl<sub>2</sub>. Estas cuatro muestras enriquecidas con 1MP fueron incubadas por 15 días a temperatura ambiente (21 ± 2 °C).

### 3.5.3. *Aislamiento de bacterias tolerantes a MP*

Se extrajo 50 mL de cada una de estas muestras y se filtró a través de papel de filtro Whatman 1, de porosidad media (Merck, Alemania) en condiciones estériles. Una alícuota de 50 µL de cada suspensión bacteriana se sembró en placa Petri con Agar Luria Bertani (LB) que contenía triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L en agua bidestilada con la sal de su correspondiente MP a una concentración de 100 mg/L y se incubaron a 37 °C durante 7 días. Después del período de incubación, se seleccionaron veinticuatro cepas de colonias diferentes, basándose en la tolerancia al MP y sus características. Los aislados se purificaron en tubos de ensayo inclinados en caldo LB con glicerol al 30% (v/v) y se almacenaron en congelación (-8 °C) hasta su posterior estudio.

### 3.5.4. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)*

El ensayo se realizó siguiente el protocolo propuesto por Yilmaz (2012) modificado:

- Para iniciar este ensayo se preparó cultivo joven, usando caldo LB y dejando incubar a temperatura ambiente durante la noche (12 h) de cada colonia.

- De cada cultivo joven se preparó una solución al 1% (v/v) de 3 mL de medio LB suplementado con el metal respectivo, por separado. Se empezó con una concentración de 1 mM.
- Si el cultivo crecía dentro de un lapso de 24 a 48 h, se incrementaba la dosis a 1,5 mM del metal, hasta alcanzar una concentración donde no había crecimiento. Si, por el contrario, no crecía nada a 1mM, se baja la dosis en similar proporción, hasta detectar crecimiento. Se preparó medios sin MP que sirvieron de control (Hassen et al., 1998).
- La concentración mínima de MP a la que se inhibía el crecimiento bacteriano se consideró la CMI (Hassen et al., 1998).
- Se determinó el crecimiento de estos cultivos bacterianos, por el método de densidad óptica en un espectrofotómetro a 630 nm (Lima e Silva et al., 2012).
- Se comparó la CMI de los cultivos por cada sal de los MP para establecer su grado de tolerancia absoluto y relativo.

### ***3.5.5. Caracterización de cepas aisladas***

Se recogieron las colonias elegidas y se inocularon en Caldo Nutritivo (Merck). Después de crecer a 35 °C durante 18 h, las cepas se sembraron en Agar Nutritivo sin MP para garantizar su pureza y se determinó la tinción Gram.

Las cepas Gram negativas se sembraron en placas de agar MacConkey (Merck) y se inocularon en medio de fermentación y oxidación de glucosa. Algunas cepas no fermentativas con características interesantes, como la tolerancia a altas concentraciones de MP o la producción de pigmentos en presencia de metales, fueron identificadas mediante pruebas convencionales y el sistema de identificación API 20 NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las bacterias fermentativas fueron presuntamente identificadas como miembros de

la familia Enterobacteriaceae mediante las pruebas de reducción de oxidasa y nitrato. Se utilizaron pruebas bioquímicas convencionales, con la ayuda del kit BBL E/NF, para identificar un conjunto de cepas seleccionadas para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Los aislados bacterianos se mantuvieron en placas inclinadas de agar nutritivo a 4 °C para uso diario y se almacenaron en caldo de infusión cerebro corazón (BHI-Merck) con 20 % de glicerol a -70 °C (Lima e Silva et al., 2012).

### **3.5.6. Caracterización fenotípica**

#### **3.5.6.1. Coloración de Gram**

Para determinar el Gram de los cultivos en estudio, se procedió a sembrar cada uno de los cultivos en agar nutritivo a 35°C por 24 h. Luego, de cada uno de los cultivos jóvenes desarrollados se procedió a someterles a la tinción de Gram (Ghafari et al., 2024).

#### **3.5.6.2. Prueba de movilidad**

La movilidad de los cultivos se verificó por microscopía y cultivo. Para la verificación de la movilidad por microscopía, se inoculó cada cultivo en agar nutritivo por 24 h. Luego, se tomó una asada de cada uno de los cultivos jóvenes y se suspendió en una gota de solución salina estéril e incubó durante 1-2 horas, luego se observó al microscopio a 1000x para constatar si se movilizan.

Asimismo, de cada uno de los mismos cultivos jóvenes con la ayuda de un asa bacteriológica se tomó una muestra y se sembró por estocada en el agar de movilidad. A partir de las 24 h de incubación a temperatura ambiente, se verificaba si los cultivos bacterianos solo crecían en la ruta por donde se hizo la siembra (cultivos inmóviles) o el crecimiento se extendía en todo el tubo (cultivos móviles) (Moussa et al., 2021).

#### **3.5.6.3. Determinación del tipo de respiración**

Para determinar el tipo de respiración que tienen los cultivos en estudio, se aplicó un inóculo de cada uno de ellos en tubos de caldo tioglicolato. Estas siembras fueron incubadas

por 24 h a temperatura ambiente. Si un cultivo mostraba solo desarrollo en la superficie del medio se trataba de un cultivo aerobio estricto. Si un cultivo desarrollaba solo en la profundidad del medio se trataba de un cultivo anaerobio estricto. Si un cultivo desarrollaba en el tubo del medio se trata de un cultivo anaerobio facultativo. Pero, si un cultivo desarrollaba solo en la zona superior del medio, pero por debajo de la superficie se trata de un cultivo microaerófilo (Patil et al., 2024).

#### **3.5.6.4. Determinación de la forma, tamaño, esporulación y agrupación**

La forma, tamaño y tipo de agrupación de cada uno los cultivos bacterianos se registraron simultáneamente a la verificación del Gram a nivel microscópico (Ghafari et al., 2024).

### **3.6. Análisis de datos**

#### **3.6.1. Análisis descriptivo**

- Se preparó el banco de datos donde se registró el CMI de cada cultivo bacteriano y el MP correspondiente.
- La clasificación de las bacterias por su valor de CMI se realizó, agrupando las observaciones, por conjunto de intervalos contiguos que no se traslapen de modo que cada valor en el conjunto de observaciones pueda colocarse en uno, y sólo uno de los intervalos (Wayne, 2007). Estos intervalos se conocen en general como intervalos de clase. Esto permitió establecer, a partir del CMI, el grado de tolerancia relativo para cada MP evaluado.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Identificación fenotípica de bacterias aisladas

En primer lugar, se identificaron 24 cepas tolerantes a metales pesados distribuidas de la siguiente manera: 9 tolerantes al Pb, 5 tolerantes al Ni, 5 tolerantes al Cr, 5 tolerantes al Cd. La Tabla 4 en este estudio se observó un predominio de bacterias con forma bacilo (100%), Gram positivas (83%), aerobias (79%), móviles (71%) y esporuladas (79%).

Todas las bacterias tolerantes al Pb fueron bacilos, Gram positivas, aerobias y esporuladas. De las cinco bacterias tolerantes al Ni, tres son bacilos, Gram negativas, aerobias, móviles y no esporuladas; una es inmóvil y otra es Gram positiva y esporulada. De las cinco bacterias tolerantes al Cr, cuatro son bacilos, Gram positivas, anaerobio facultativas, móviles y esporuladas; y solo una es aerobia. En cuanto a las cinco bacterias tolerantes al Cd, cuatro son bacilos, Gram positivas, aerobias, móviles y esporuladas; y solo una es anaerobia obligada.

**Tabla 4**

*Identificación fenotípica de cepas aisladas de la Bocana del río Moche*

Nº	Cepas	Forma	Gram	Respiración	Grupo	Endosporas
1	Pb1	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
2	Pb2	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
3	Pb3	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
4	Pb4	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
5	Pb5	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
6	Pb6b	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
7	Pb 6h	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
8	Pb7	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
9	Pb8	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
10	Ni1	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí

11	Ni2	Bacilo	Negativo	Aerobio	Móvil	No
12	Ni3	Bacilo	Negativo	Aerobio	Móvil	No
13	Ni4	Bacilo	Negativo	Aerobio	Móvil	No
14	Ni5	Bacilo	Negativo	Aerobio	Inmóvil	No
15	Cr1	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
16	Cr4	Bacilo	Positivo	Anaerobio facultativo	Móvil	Sí
17	Cr5	Bacilo	Positivo	Anaerobio facultativo	Móvil	Sí
18	Cr6h	Bacilo	Positivo	Anaerobio facultativo	Móvil	Sí
19	Cr6b	Bacilo	Positivo	Anaerobio facultativo	Móvil	Sí
20	Cd1	Bacilo	Positivo	Anaerobio obligado	Móvil	Sí, ovalada
21	Cd2	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
22	Cd3	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
23	Cd4	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí
24	Cd5	Bacilo	Positivo	Aerobio	Móvil	Sí

#### 4.2. Nivel de tolerancia al Pb de bacterias aisladas

La muestra de la bocana del río Moche presentó bacterias resistentes al Pb con diferentes niveles de tolerancia, desde una tolerancia al Pb baja hasta una altamente significativa (Tabla 5). El 25% de las bacterias mostraron una tolerancia baja, el 37,5% mostró una tolerancia alta y el 37,5% mostró una tolerancia altamente significativa (Tabla 6).

**Tabla 5***Concentración mínima inhibitoria de bacterias aisladas tolerantes al Pb*

N°	Cepas	Concentración Mínima Inhibitoria	
		(mM)	Nivel de tolerancia
1	Pb 1	0,33	Baja
2	Pb 6h	0,80	Baja
3	Pb 4	1,50	Alta
4	Pb 6b	1,50	Alta
5	Pb 7	1,50	Alta
6	Pb 2	2,50	Altamente significativa
7	Pb 3	2,00	Altamente significativa
8	Pb 5	2,50	Altamente significativa
9	Pb 8	2,50	Altamente significativa

**Tabla 6***Datos agrupados en distribución de frecuencia en bacterias aisladas tolerantes al Pb*

N	Intervalos	MC	FA	FAA	FR	FRA	Tolerancia
1	[0,33; 0,87>	0,60	2	2	22,2%	22%	Baja
2	[0,87; 1,42>	1,14	0	2	0%	22%	Moderada
3	[1,42; 1,96>	1,69	3	5	33,3%	56%	Alta
4	[1,96; 2,50]	2,23	4	9	44,4%	100%	Altamente significativa

MC: media de clase, FA: frecuencia absoluta, FAA: frecuencia absoluta acumulada, FR: frecuencia relativa,

FRA: frecuencia relativa acumulada.

### 4.3. Nivel de tolerancia al Ni de bacterias aisladas

La muestra de la bocana del río Moche contuvo bacterias resistentes al Ni con diferentes niveles de tolerancia al Ni, desde una tolerancia baja hasta alta (Tabla 7). El 80% de las bacterias mostró una tolerancia baja, el 20% mostró una tolerancia alta (Tabla 8).

**Tabla 7**

*Concentración mínima inhibitoria de bacterias aisladas tolerantes al Ni*

N°	Cepas	Concentración Mínima Inhibitoria	Nivel de tolerancia
		(mM)	
1	Ni5	3,00	Baja
2	Ni1	3,60	Moderada
3	Ni2	3,60	Moderada
4	Ni4	3,60	Moderada
5	Ni3	6,00	Alta

**Tabla 8**

*Datos agrupados en distribución de frecuencia en bacterias aisladas tolerantes al Ni*

N	Intervalos	MC	FA	FAA	FR	FRA	Tolerancia
1	[3,00; 4,00>	3,50	4	4	80%	80%	Baja
2	[4,00; 5,00>	4,50	0	4	0%	80%	Moderada
3	[5,00; 6,00]	5,50	1	5	20%	100%	Alta

MC: media de clase, FA: frecuencia absoluta, FAA: frecuencia absoluta acumulada, FR: frecuencia relativa, FRA: frecuencia relativa acumulada.

### 4.4. Nivel de tolerancia al Cr de bacterias aisladas

La muestra de la bocana del río Moche mostró bacterias resistentes al Cr con diferentes niveles de tolerancia, desde una tolerancia al Cr baja hasta alta (Tabla 9), lo que indica, que hay bacterias que se pueden aprovechar para biorremediar Cr. Un 60% de las bacterias mostró una tolerancia baja al Cr y el 40% mostró una tolerancia alta al Cr (Tabla 10).

**Tabla 9***Concentración mínima inhibitoria de bacterias aislados tolerantes al Cr*

N°	Cepas	Concentración Mínima Inhibitoria	Nivel de tolerancia
		(mM)	
1	Cr1	0,50	Baja
2	Cr6h	0,67	Baja
3	Cr6b	1,00	Baja
4	Cr4	2,50	Alta
5	Cr5	3,00	Alta

**Tabla 10***Datos agrupados en distribución de frecuencia en bacterias aisladas tolerantes al Cr*

N	Intervalos	MC	FA	FAA	FR	FRA	Tolerancia
1	[0,50; 1,33>	0,92	3	3	60%	60%	Baja
2	[1,33; 2,17>	1,75	0	3	0%	60%	Moderada
3	[2,17; 3,00]	2,58	2	5	40%	100%	Alta

MC: media de clase, FA: frecuencia absoluta, FAA: frecuencia absoluta acumulada, FR: frecuencia relativa, FRA: frecuencia relativa acumulada.

#### 4.5. Nivel de tolerancia al Cd de bacterias aisladas

Las bacterias resistentes al Cd encontrados en la muestra de la bocana del río Moche mostraron con diferentes niveles de tolerancia, desde una tolerancia baja hasta alta al Cd (Tabla 11). El 60% de las bacterias mostró una tolerancia baja, el 20% mostró una tolerancia moderada y el 20% mostró una tolerancia alta (Tabla 12).

**Tabla 11***Concentración mínima inhibitoria de bacterias aisladas tolerantes al Cd*

N°	Cepas	Concentración Mínima Inhibitoria	Nivel de tolerancia
		(mM)	
1	Cd4	0,50	Baja
2	Cd1	0,67	Baja
3	Cd3	1,00	Baja
4	Cd2	1,50	Moderada
5	Cd5	2,50	Alta

**Tabla 12***Datos agrupados en distribución de frecuencia en bacterias aisladas tolerantes al Cd*

N	Intervalos	MC	FA	FAA	FR	FRA	Tolerancia
1	[0,50; 1,17>	0,83	3	3	60%	60%	Baja
2	[1,17; 1,83>	1,50	1	4	20%	80%	Moderada
3	[1,83; 2,50]	2,17	1	5	20%	100%	Alta

MC: media de clase, FA: frecuencia absoluta, FAA: frecuencia absoluta acumulada, FR: frecuencia relativa,

FRA: frecuencia relativa acumulada.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La CMI es crucial para determinar la susceptibilidad o resistencia de una cepa bacteriana a un antibiótico, y se puede aprovechar para determinar la tolerancia de las bacterias a los MP (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). La CMI se interpreta en función de la sensibilidad o resistencia del microorganismo al MP. Un valor de CMI alto indica que más cantidad de la sustancia es necesaria para inhibir el crecimiento, lo que sugiere que el agente es menos efectivo, o en su defecto el microorganismo es resistente o tolerante a la sustancia evaluada (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021).

### 5.1. Identificación fenotípica de bacterias aisladas

La identificación fenotípica de las cepas aisladas en la Bocana del río Moche (Tabla 4), concuerdan con (Mishra & Bharagava, 2016) que caracterizaron a las cepas con mayor tolerancia al Cr como bacterias Gram positivas. Analizando los grupos bacterianos aislados en las mayores concentraciones de Pb, las Gram positivas fueron predominantemente esporulados, mientras que las Gram negativas estuvieron representadas exclusivamente por microorganismos aerobios, la mayoría tolerantes al Ni (Tabla 4). Diferentes autores han demostrado que las bacterias Gram negativas tienden a ser más tolerantes a los MP que las Gram positivas (Duxbury, 1986; Duxbury & Bicknell, 1983; Hughes & Poole, 1989).

### 5.2. Nivel de tolerancia al Pb de bacterias aisladas

Las bacterias tolerantes al Pb son una clase de organismos que pueden sobrevivir y crecer en presencia de concentraciones significativas de este MP. Entre estos, se han encontrado *Pseudomonas* spp. (Bedoya Vélez et al., 2019) que pueden tolerar concentraciones relativamente altas de Pb, como 0,53 mM, una cantidad inferior a hallado en este estudio de 1,50 mM en alta tolerancia y 2,50 mM en altamente significativa tolerancia (Tabla 5). Se observa que, incluso una baja concentración de Pb puede causar efectos negativos sobre los

microorganismos debido a la adsorción y enriquecimiento de metales pesados por la alimentación residual. Como es bien sabido, los MP como el  $Pb^{2+}$  y el  $Cd^{2+}$  podrían inhibir el crecimiento microbiano (Abdel-Rahim et al., 2025). Por otro lado, las bacterias que mostraron una alta tolerancia (2,5 mM), fue menor al *Pediococcus pentosaceus* (8,69 mM) (Abdel-Rahim et al., 2025) y a *Pediococcus dextrinicus* y *Pediococcus acidilactici* (> 4,82 ppm) (Bhakta et al., 2023). Los *Pediococcus sp* son bacilos y Gram positivos (Wade et al., 2019), lo que coincide con la identificación fenotípica (Tabla 4), pero no son esporulados. Del mismo modo, la *Pseudomona sp* es bacilo, Gram negativo, aerobio y no esporulado (Alvarado-Campo et al., 2023), características no identificadas en la Tabla 4.

### 5.3. Nivel de tolerancia al Ni de bacterias aisladas

El Ni disuelto en concentraciones superiores a 0,017 mM es perjudicial para las bacterias metanogénicas; sin embargo, muchas especies hidrolíticas de bacterias son inhibidas a niveles de Ni disuelto superiores a 0,2 mM. Estas bacterias tolerantes al Ni se caracterizan por acumular ácidos grasos de mayor peso molecular, varios de los cuales se derivan exclusivamente de la fermentación de aminoácidos (Kashyap et al., 2022). Estos organismos se encontraron en digestor anaeróbico de lodos (Ashley et al., 1982), lo que coincide con los hallazgos de este trabajo, pues la muestra fue de sedimento de 20 a 30 cm de profundidad. El nivel de tolerancia de este trabajo (entre 3,0 y 6,0 mM) (Tabla 6) fue superior al de un estudio donde probaron niveles de remoción con soluciones sintéticas de 0,5 mM de Ni (II) (Aslam et al., 2020); sin embargo, muy inferior a otros estudios donde usaron sedimentos de la rivera de ríos de Estados Unidos, y se identificaron *Streptomyces aureofaciens* NR-3 y *Kitasatospora cistarginea* NR-4, ambos aislados expresaron tolerancia al Ni de 42,6 mM a pH 6 y 8,5 mM a pH 7 (Van Nostrand et al., 2007). En otro estudio cuatro cepas de *Pseudomonas putida* Biovar B, toleraron concentraciones de Ni de hasta 13,2 mM en el medio de cultivo (Rodríguez et al., 2008) y en otro trabajo cepas de *Bacillus safensis* toleraron 10,22 mM y *Bacillus cereus* 17,1

mM de Ni (Kashyap et al., 2022). Como se puede observar, las cepas aisladas en este trabajo no podrían ser similares a las anteriormente citadas, sin embargo, este hecho no descarta su futuro uso en biorremediación, como el caso de *diplococos* y *Pseudomonas* que tienen una capacidad intrínseca para absorber Ni de una solución monometal (Deng et al., 2003) así mismo, la bacteria *Brevibacillus brevis* inoculada en suelo cultivado con trébol y micorrizas disminuye la toxicidad del Ni (VIVAS et al., 2006). En este trabajo se identificó una cepa tolerante al Ni, de tipo bacilo, Gram positivo, aerobia y esporulada (Tabla 4), características propias del *Bacillus cereus* y *Bacillus safensis* (Kashyap et al., 2022), y cuatro cepas Gram negativo, aerobias y no esporuladas (Tabla 4), características particulares de la especie *Burkholderia sp.*(Carpen & Giese, 2022).

#### **5.4. Nivel de tolerancia al Cr de bacterias aisladas**

La tolerancia al Cr de las bacterias de este estudio estuvo en el rango de 0,5 a 3,0 mM (Tabla 8), muy similar a la tolerancia de bacterias del género *Bacillus* identificadas como *B. anthracis* y *B. cereus* mediante secuenciación de ADNr 16S (0 a 9,6 mM), a pH alcalino (pH 9) (Fatima & Ahmed, 2018). Otros autores demostraron que en ambientes alcalinos aumenta la tolerancia a MP (Alpaslan et al., 2017; Anuar & Chan, 2017). Estas cepas aisladas en la investigación pueden ser usadas para contrarrestar los efectos negativos del cromo (Cr) y otros MP en plantas que crecen en áreas contaminadas a través de ciertos mecanismos (Ahmed, 2018; Mohapatra et al., 2017). Se ha encontrado que, las bacterias con tolerancia alta al Cr, puede ser usado para rizorremediación, un enfoque prometedor que se basa en interacciones triangulares entre microbios, plantas y contaminantes, donde los exudados químicos liberados en la región rizosférica por las raíces de las plantas ayudan a estimular la actividad bacteriana para mejorar las propiedades químicas y físicas del suelo (Francisco et al., 2018). Estas rizobacterias productoras de auxinas tolerantes al cromo ayudan al aumento en el crecimiento y el rendimiento de las plantas al reducir la toxicidad del Cr en áreas contaminadas con este MP

(Feng et al., 2016; Mohapatra et al., 2017). Las bacterias tolerantes al cromo identificadas en este trabajo, su mayoría fueron bacilos, Gram positivo, anaerobias facultativas y esporuladas (Tabla 4), características similares a *Pseudomonas sp.* (Flores Pantoja et al., 2022).

### 5.5. Nivel de tolerancia al Cd de bacterias aisladas

Las bacterias identificadas tuvieron un nivel de tolerancia de 0,67 a 2,50 mM (Tabla 11). Este rango fue superior al mostrado por *Stenotrophomonas maltophilia* del suelo de la rizosfera que es un actor clave en la disminución de la absorción de Cd (4 mM) y promotor del crecimiento del arroz (Zhou et al., 2020), pero fue inferior al *Enterobacter aerogenes* MCC 3092 (hasta 26,7 mM) del suelo de la rizosfera de arroz contaminado con Cd, que reduce la absorción de Cd en el arroz al mitigar el estrés oxidativo y de etileno en plántulas de arroz que enfrentan altos niveles de Cd (Pramanik et al., 2018). Sin embargo, los mecanismos específicos por los cuales estos microorganismos fijan Cd a nivel celular en los agroecosistemas aún no están claros (Yan et al., 2024). Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (RPCP) son un grupo de microorganismos que prosperan en el suelo que rodea las raíces de las plantas y mejoran el crecimiento de las plantas a través de diversas interacciones, incluidas relaciones antagónicas o sinérgicas (He et al., 2020). Gran parte de las cepas aisladas tolerantes al Cd, en este trabajo, fueron bacilos, Gram positivo, aerobios y esporuladas (Tabla 4), características identificadas en cepas de *Bacillus sp.* (Sahile et al., 2021).

La investigación realizada en condiciones *in vitro* ha reflejado el potencial inherente de los microorganismos aislados como herramienta de investigación sostenible para restaurar con éxito los lugares contaminados con metales pesados. Los hallazgos de diversos autores revelaron que la asociación microbiana en diferentes condiciones desafiantes es un enfoque beneficioso para la remediación de metales (Abdel-Rahim et al., 2025; Ahmad et al., 2018; Aslam et al., 2020; Yan et al., 2024). Por lo tanto, la exploración de nuevas especies de microorganismos tolerantes a metales pesados de diferentes ubicaciones geográficas, y la

identificación de genes que confieren tolerancia de contaminantes metálicos avanzarían aún más en la intervención de microorganismos tolerantes para la restauración ecológica sostenible.

Finalmente, el presente estudio reveló que las bacterias aisladas mostraron una alta tolerancia a los metales pesados, y que en un futuro se debe estudiar los efectos de las variables (pH, temperatura y concentración de metal pesado) en la remoción del metal pesado, usando un diseño de optimización con metodología de superficie respuesta, en un biorreactor a nivel de laboratorio y luego a escala, para producir a mayor cantidad de inóculo que será empleado en la biorremediación de metales pesados con estas bacterias.

## VI. CONCLUSIONES

- Se determinó el nivel de tolerancia al Pb en nueve cepas bacterianas aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, en su mayoría bacilos, Gram positivas, aerobias, esporuladas. El 22,2% de las bacterias mostraron una tolerancia baja, el 33,3% mostró una tolerancia alta y el 44,4% mostró una tolerancia altamente significativa al Pb.

- Se determinó el nivel de tolerancia al Ni en cinco cepas bacterianas aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, en su mayoría bacilos, Gram negativas, aerobias, no esporuladas. El 80% de las bacterias mostró una tolerancia baja, el 20% mostró una tolerancia alta al Ni.

- Se determinó el nivel de tolerancia al Cr de cinco cepas bacterianas aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, en su mayoría bacilos, Gram positivas, anaerobias facultativas, esporuladas. Un 60% de las bacterias mostró una tolerancia baja al Cr y el 40% mostró una tolerancia alta al Cr.

- Se determinó el nivel alto de tolerancia al Cd de cinco cepas bacterianas aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, en su mayoría bacilos, Gram positivas, aerobias, esporuladas. El 60% de las bacterias mostró una tolerancia baja, el 20% mostró una tolerancia moderada y el 20% mostró una tolerancia alta al Cd.

## VII.RECOMENDACIONES

- Los lugares contaminados con MP se convierten en acumuladores de bacterias resistentes a estos y, debido a la alta diversidad y densidad de las comunidades de microbios, sirven como "puntos calientes" para la transferencia horizontal, la recombinación y la propagación de genes de resistencia a los metales pesados, por lo que se recomienda seguir con la identificación genotípica con técnicas para detectar la similitud de las secuencias de nucleótidos del gen 16S rRNA.

- Se recomienda explorar los efectos de diferentes factores ambientales sobre la biorremoción de  $Pb^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cr^{+6}$ ,  $Cd^{+2}$  y la interacción de estos, con el fin de proporcionar materiales microbianos para la remediación de suelos contaminados con estos MP.

- Se recomienda estudiar los microorganismos identificados para rizorremediación, puesto que es un enfoque promisorio para reducir la toxicidad de MP en suelos contaminados, permitiendo el aprovechamiento del terreno para la agricultura.

### VIII. REFERENCIAS

- Abdel-Rahim, M. M., Shahin, S. A., Mansour, A. T., Alsaqfi, A. S., Elshafey, A. E., Omar, A. A., El-Sharkawy, H. A., Mohamed, R. A., & Elhetawy, A. I. G. (2025). The effect of aqueous application of probiotics on growth, heavy metal accumulation, blood biochemistry, and histological alterations of *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture International*, 33(3), 222. <https://doi.org/10.1007/s10499-025-01900-5>
- Ahemad, M. (2019). Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 1365–1377. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.020>
- Ahmad, M., Ahmad, I., Hilger, T. H., Nadeem, S. M., Akhtar, M. F., Jamil, M., Hussain, A., & Zahir, Z. A. (2018). Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. *PeerJ*, 6, e5122. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5122>
- Ahmed, A. (2018). Micro-remediation of chromium contaminated soils. *PeerJ*, 6, e6076.
- Alloway, B. (2013). *Heavy Metals in Soils*. Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7>
- Alpaslan, E., Geilich, B. M., Yazici, H., & Webster, T. J. (2017). pH-controlled cerium oxide nanoparticle inhibition of both gram-positive and gram-negative bacteria growth. *Scientific Reports*, 7(1), 45859. <https://doi.org/10.1038/srep45859>
- Alvarado-Campo, K. L., Quintero, M., Cuadrado-Cano, B., Montoya-Giraldo, M., Otero-Tejada, E. L., Blandón, L., Sánchez, O., Zuleta-Correa, A., & Gómez-León, J. (2023). Heavy Metal Tolerance of Microorganisms Isolated from Coastal Marine Sediments and Their Lead Removal Potential. *Microorganisms*, 11(11), 2708. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112708>
- Amabilis-Sosa, L., Siebe, C., Moeller-chávez, G., & Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. (2016). Remoción de mercurio por *Phragmites australis* empleada como barrera biológica en humedades artificiales inoculados con cepas tolerantes a metales pesados. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 32(1), 47–53. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v32n1/0188-4999-rica-32-01-00047.pdf>
- Anuar, N. M., & Chan, C. M. (2017). Reuse of dredged marine soils as landfill liner: effect of pH on *Escherichia coli* growth. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 271(1), 012071. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/271/1/012071>

- Arsène-Ploetze, F., Koechler, S., Marchal, M., Coppée, J.-Y., Chandler, M., Bonnefoy, V., Brochier-Armanet, C., Barakat, M., Barbe, V., & Battaglia-Brunet, F. (2010). Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome. *PLoS Genetics*, *6*(2), e1000859. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000859>
- Ashley, N., Davies, M., & Hurst, T. J. (1982). The effect of increased nickel ion concentrations on microbial populations in the anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, *16*(6), 963–971. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90030-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90030-6)
- Aslam, F., Yasmin, A., & Sohail, S. (2020). Bioaccumulation of lead, chromium, and nickel by bacteria from three different genera isolated from industrial effluent. *International Microbiology*, *23*(2), 253–261. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00098-w>
- Bazzi, W., Abou Fayad, A. G., Nasser, A., Haraoui, L.-P., Dewachi, O., Abou-Sitta, G., Nguyen, V.-K., Abara, A., Karah, N., & Landecker, H. (2020). Heavy metal toxicity in armed conflicts potentiates AMR in *A. baumannii* by selecting for antibiotic and heavy metal co-resistance mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 68. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00068>
- Bedoya Vélez, J. M., Castaño, G., & Ochoa Agudelo, S. (2019). Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales del Valle de Aburrá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *21*(1), 135–143. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.65146>
- Beveridge, T. J. (2005). Bacterial cell wall structure and implications for interactions with metal ions and minerals. *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences*, *6*(1), 7–10. <https://doi.org/10.14494/jnrs2000.6.7>
- Bhakta, J. N., Bhattacharya, S., Lahiri, S., & Panigrahi, A. K. (2023). Probiotic Characterization of Arsenic-resistant Lactic Acid Bacteria for Possible Application as Arsenic Bioremediation Tool in Fish for Safe Fish Food Production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *15*(4), 889–902. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09921-9>
- Bramhachari, P. V., & Nagaraju, G. P. (2017). Extracellular polysaccharide production by bacteria as a mechanism of toxic heavy metal biosorption and biosequestration in the marine environment. *Marine Pollution and Microbial Remediation*, 67–85. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-1044-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-10-1044-6_5)
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *45*(3), 198–207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>

- Carpen, H. L., & Giese, E. C. (2022). Enhancement of nickel laterite ore bioleaching by *Burkholderia* sp. using a factorial design. *Applied Water Science*, 12(8), 181.
- Carreño, C., & Hurtado, A. (2017). *Manual de prácticas de microbiología ambiental* (Universidad Católica Sedes Sapientiae, Ed.). Universidad Católica Sedes Sapientiae. <https://hdl.handle.net/20.500.14095/327>
- Cayotopa-Torres, J., Arévalo-López, L., Pichis-García, R., Olivera-Cayotopa, D., Rimachi-Valle, M., & Márquez-Dávila, K. (2021). Nuevos agentes de biorremediación de cadmio: Especies de *Trichoderma* nativas de la rizósfera de árboles de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 155–160. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.017>
- Cerna, C., Espinoza, F., & Chunga, G. (2019). Contaminación del río Moche y su impacto en la abiota y las enfermedades. *Agroindustrial Science*, 9(1), 19–27. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2019.01.03>
- Chen, J. M., & Hao, O. J. (1998). Microbial Chromium (VI) Reduction. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(3), 219–251. <https://doi.org/10.1080/10643389891254214>
- CONAGUA. (2014). Estadísticas del agua en México. In *Informe*. (p. 164). Comisión Nacional del Agua. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=+Estadísticas+del+agua+en+México.+Informe&publication\\_year=2014&pages=164](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=+Estadísticas+del+agua+en+México.+Informe&publication_year=2014&pages=164)
- Covarrubias, S. A., & Peña Cabriales, J. J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(0), 7–21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>
- De la Cruz-Leyva, M. C., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A. I., González-de la Cruz, J. U., & Rojas-Herrera, R. A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4). <https://ri.ujat.mx/handle/20.500.12107/1128>
- Delangiz, N., Varjovi, M. B., Lajayer, B. A., & Ghorbanpour, M. (2020). Beneficial microorganisms in the remediation of heavy metals. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 417–423). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00034-1>
- Delgado, A., Martínez, F., Villanueva, J., Torres, A., & Andrade-Arenas, L. (2022). Model based on Grey Systems to Assess Water Quality from Mines in Operation and

- Environmental Liabilities. *International Journal of Engineering Trends and Technology*, 70(9), 346–353. <https://doi.org/10.14445/22315381/IJETT-V70I9P234>
- Demircan, N., Cucun, G., & Uzilday, B. (2020). Mitochondrial alternative oxidase (AOX1a) is required for the mitigation of arsenic-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Reports*, 14(2), 235–245. <https://doi.org/10.1007/s11816-020-00595-9>
- Deng, X., Li, Q. B., Lu, Y. H., Sun, D. H., Huang, Y. L., & Chen, X. R. (2003). Bioaccumulation of nickel from aqueous solutions by genetically engineered *Escherichia coli*. *Water Research*, 37(10), 2505–2511. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00027-7)
- Desoky, E.-S. M., Merwad, A.-R. M., Semida, W. M., Ibrahim, S. A., El-Saadony, M. T., & Rady, M. M. (2020). Heavy metals-resistant bacteria (HM-RB): Potential bioremediators of heavy metals-stressed *Spinacia oleracea* plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198, 110685. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110685>
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P. R., & Bond, P. L. (2003). Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*, 149(8), 1959–1970. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.26296-0>
- Du, H., Harata, N., & Li, F. (2018). Responses of riverbed sediment bacteria to heavy metals: Integrated evaluation based on bacterial density, activity and community structure under well-controlled sequencing batch incubation conditions. *Water Research*, 130, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.070>
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2–3), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1024-6>
- Duxbury, T. (1986). Microbes and heavy metals: an ecological overview. *Microbiological Sciences*, 3(11), 330–333.
- Duxbury, T., & Bicknell, B. (1983). Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 15(3), 243–250. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(83\)90066-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(83)90066-4)
- Fatima, H.-, & Ahmed, A. (2018). Micro-remediation of chromium contaminated soils. *PeerJ*, 6, e6076. <https://doi.org/10.7717/peerj.6076>
- Feng, H., Wang, G., Wu, G., Jin, W., Wu, H., & Chu, P. K. (2016). Plasma and ion-beam modification of metallic biomaterials for improved anti-bacterial properties. *Surface and Coatings Technology*, 306, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.05.059>

- Flores Pantoja, L. E., Briseño Silva, E., Loeza Lara, P. D., & Jiménez Mejía, R. (2022). Actividad antifúngica y características de promoción de crecimiento vegetal de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp. degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelo contaminado. *Acta Biológica Colombiana*, 27(3). <https://doi.org/10.15446/abc.v27n3.92758>
- Francisco, R., Branco, R., Schwab, S., Baldani, J. I., & Morais, P. V. (2018). Impact of plant-associated bacteria biosensors on plant growth in the presence of hexavalent chromium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2389-0>
- Franke, S., Grass, G., & Nies, D. H. (2001). The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology*, 147(4), 965–972. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-965>
- Ghafari, S., Alavi, S. M., & Khaghani, S. (2024). Potentially pathogenic culturable bacteria in hemodialysis waters. *BMC Microbiology*, 24(1), 276. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03430-1>
- Gillan, D. C., Danis, B., Pernet, P., Joly, G., & Dubois, P. (2005). Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 679–690. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.679-690.2005>
- Goutam, J., Sharma, J., Singh, R., & Sharma, D. (2021). Fungal-mediated bioremediation of heavy metal-polluted environment. *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment: Volume 2*, 51–76. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9_3)
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., Chen, J., & He, Y. (2010). Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technology*, 101(22), 8599–8605. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.085>
- Gupta, P., & Diwan, B. (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., & Boudabous, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64(1), 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00161-2)
- Hattori, H. (1992). Influence of heavy metals on soil microbial activities. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38(1), 93–100. <https://doi.org/10.1080/00380768.1992.10416956>

- He, X., Xu, M., Wei, Q., Tang, M., Guan, L., Lou, L., Xu, X., Hu, Z., Chen, Y., Shen, Z., & Xia, Y. (2020). Promotion of growth and phytoextraction of cadmium and lead in *Solanum nigrum* L. mediated by plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111333>
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, M. del P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6th ed.). McGraw-Hill Interamericana.
- Hobman, J. L., & Crossman, L. C. (2015). Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 64(5), 471–497. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023036-0>
- Huaranga, F., Méndez, E., Quilcat, V., & Huaranga, F. (2012). Contaminación por metales pesados en la cuenca del río Moche, 1980–2010, La Libertad–Perú. *Scientia Agropecuaria*, 3(3), 235–247. <https://www.redalyc.org/pdf/3576/357633703005.pdf>
- Hughes, M. N., & Poole, R. K. (1989). Metal toxicity. *Metals and Microorganisms*. New York: Chapman and Hall, 252–302.
- Kabir, M. M., Maleha, S. M., Hossain, M. S., Sultana, N., Islam, R., Islam, S., Ahmed, F., Bahadur, N. M., Choudhury, T. R., & Didar-ul-Alam, M. (2024). Molecular characterization and human health risk assessment of multi-drug and heavy metals tolerant bacteria from urban river water. *Desalination and Water Treatment*, 317, 100298. <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100298>
- Kashyap, S., Chandra, R., Kumar, B., & Verma, P. (2022). Biosorption efficiency of nickel by various endophytic bacterial strains for removal of nickel from electroplating industry effluents: an operational study. *Ecotoxicology*, 31(4), 565–580. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02445-y>
- Kosakivska, I. V., Babenko, L. M., Romanenko, K. O., Korotka, I. Y., & Potters, G. (2021). Molecular mechanisms of plant adaptive responses to heavy metals stress. *Cell Biology International*, 45(2), 258–272. <https://doi.org/10.1002/cbin.11503>
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Kumar, V., & Dwivedi, S. K. (2021). Mycoremediation of heavy metals: processes, mechanisms, and affecting factors. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(9), 10375–10412. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11491-8>
- Li, Y., Guo, L., Haggblom, M. M., Yang, R., Li, M., Sun, X., Chen, Z., Li, F., Su, X., & Yan, G. (2022). *Serratia* spp. are responsible for nitrogen fixation fueled by As (III) oxidation,

- a novel biogeochemical process identified in mine tailings. *Environmental Science & Technology*, 56(3), 2033–2043. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06857>
- Liang, X., & Gadd, G. M. (2017). Metal and metalloid biorecovery using fungi. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1199–1205. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12767>
- Lima e Silva, A. A. de, Carvalho, M. A., de Souza, S. A. L., Dias, P. M. T., Silva Filho, R. G. da, Saramago, C. S., Bento, C. A., & Hofer, E. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1620–1631. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400047>
- Manesh, M. J. H., Bing, R. G., Willard, D. J., & Kelly, R. M. (2024). Complete genome sequence for the thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* (DSM: 5348). *Microbiology Resource Announcements*, e01228-23. <https://doi.org/10.1128/mra.01228-23>
- Miller, K. W., Risanico, S. S., & Bruno Risatti, J. (1992). Differential tolerance of *Sulfolobus* strains to transition metals. *FEMS Microbiology Letters*, 93(1), 69–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05042.x>
- Minz, D., Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1996). Cadmium binding by bacteria: screening and characterization of new isolates and mutants. *FEMS Microbiology Letters*, 135(2–3), 191–194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb07988.x>
- Mishra, S., & Bharagava, R. N. (2016). Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(1), 1–32. <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1096883>
- Mohamed, R. M., & Abo-Amer, A. E. (2012). Isolation and characterization of heavy-metal resistant microbes from roadside soil and phylloplane. *Journal of Basic Microbiology*, 52(1), 53–65. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100133>
- Mohammadian, S., Krok, B., Fritzsche, A., Bianco, C., Tosco, T., Cagigal, E., Mata, B., Gonzalez, V., Diez-Ortiz, M., & Ramos, V. (2021). Field-scale demonstration of in situ immobilization of heavy metals by injecting iron oxide nanoparticle adsorption barriers in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*, 237, 103741. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2020.103741>
- Mohapatra, R. K., Parhi, P. K., Thatoi, H., & Panda, C. R. (2017). Bioreduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium indicum* strain MW1 isolated from marine water of Paradip Port, Odisha, India. *Chemistry and Ecology*, 33(2), 114–130. <https://doi.org/10.1080/02757540.2016.1275586>

- Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, P. J., Janssen, A., Coninx, I., Mergeay, M., & Leys, N. (2011). Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *Biometals*, *24*, 1133–1151. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9473-y>
- Morozzi, G., Cenci, G., Scardazza, F., & Pitzurra, M. (1986). Cadmium uptake by growing cells of gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbios*, *48*(194), 27–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3796301>
- Moussa, J., Abboud, E., & Tokajian, S. (2021). The dissemination of antimicrobial resistance determinants in surface water sources in Lebanon. *FEMS Microbiology Ecology*, *97*(9), fiab113. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab113>
- Muñoz, A. J., Ruiz, E., Abriouel, H., Gálvez, A., Ezzouhri, L., Lairini, K., & Espínola, F. (2012). Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chemical Engineering Journal*, *210*, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.007>
- Munoz, W. (2015). *Caracterización molecular de hongos y bacterias cultivables tolerantes a metales pesados de suelos de rizósfera del pasivo ambiental minero Santa Rosa de Jangas, Ancash-Perú, enero-junio 2014* [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Santiago Antunez de Mayolo.
- Mutch, L. A., Watling, H. R., & Watkin, E. L. J. (2010). Microbial population dynamics of inoculated low-grade chalcopyrite bioleaching columns. *Hydrometallurgy*, *104*(3–4), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.022>
- Nanda, M., Kumar, V., & Sharma, D. K. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to ‘clean-up’ heavy metal contaminants from water. *Aquatic Toxicology*, *212*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.011>
- Ni’Bhriain, N. N., Silver, S., & Foster, T. J. (1983). Tn5 insertion mutations in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R100. *Journal of Bacteriology*, *155*(2), 690–703. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.690-703.1983>
- Niño-Martínez, N., Salas Orozco, M. F., Martínez-Castañón, G.-A., Torres Méndez, F., & Ruiz, F. (2019). Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(11), 2808. <https://doi.org/10.3390/ijms20112808>

- Orhan, Y., & Büyükgüngör, H. (1993). The Removal of Heavy Metals by Using Agricultural Wastes. *Water Science and Technology*, 28(2), 247–255. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0114>
- Pal, A., Bhattacharjee, S., Saha, J., Sarkar, M., & Mandal, P. (2022). Bacterial survival strategies and responses under heavy metal stress: A comprehensive overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 48(3), 327–355. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1970512>
- Patil, S. K., Islam, T., Tveit, A., Hodson, A., & Øvreås, L. (2024). Targeting methanotrophs and isolation of a novel psychrophilic *Methylobacter* species from a terrestrial Arctic alkaline methane seep in Lagoon Pingo, Central Spitsbergen (78° N). *Antonie van Leeuwenhoek*, 117(1), 60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10482-024-01953-1>
- Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., & Maiti, T. K. (2018). Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092. *Journal of Hazardous Materials*, 351, 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.03.009>
- Priyadarshini, E., Priyadarshini, S. S., Cousins, B. G., & Pradhan, N. (2021). Metal-Fungus interaction: Review on cellular processes underlying heavy metal detoxification and synthesis of metal nanoparticles. *Chemosphere*, 274, 129976. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129976>
- Pulido Capurro, V. M., & Bermúdez Díaz, L. (2018). Estado actual de la conservación de los hábitats de los Pantanos de Villa, Lima, Perú. *Arnaldoa*, 25(2), 679–702. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25219>
- Rajaganapathy, V., Xavier, F., Sreekumar, D., & Mandal, P. K. (2011). Heavy metal contamination in soil, water and fodder and their presence in livestock and products: A review. In *Journal of Environmental Science and Technology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 234–249). <https://doi.org/10.3923/jest.2011.234.249>
- Ramakrishnan, S., Muruganraj, T., Majumdar, R., & Sugumar, S. (2023). Study of Cadmium Metal Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Indian Journal of Microbiology*, 63(1), 91–99. <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01066-9>
- Rasmussen, L. D., & Sørensen, S. J. (2001). Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00820.x>

- Rodríguez, C. (2023). *Influencia de las medidas correctivas de relaves mineros para reducir el impacto negativo en la cuenca del río Moche, La Libertad 2020* [Tesis de pregrado, Universidad Privada del Norte]. <https://repositorio.upn.edu.pe/handle/11537/35070>
- Rodríguez, H., Vessely, S., Shah, S., & Glick, B. R. (2008). Effect of a nickel-tolerant ACC deaminase-producing *Pseudomonas* strain on growth of nontransformed and transgenic canola plants. *Current Microbiology*, *57*, 170–174. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9181-1>
- Rosen, T., & Nolan, E. M. (2020). Metal Sequestration and Antimicrobial Activity of Human Calprotectin Are pH-Dependent. *Biochemistry*, *59*(26), 2468–2478. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00359>
- Rouch, D. A., Lee, B. T. O., & Morby, A. P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology*, *14*(2), 132–141. <https://doi.org/10.1007/BF01569895>
- Roy, R., Samanta, S., Pandit, S., Naaz, T., Banerjee, S., Rawat, J. M., Chaubey, K. K., & Saha, R. P. (2024). An Overview of Bacteria-Mediated Heavy Metal Bioremediation Strategies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *196*(3), 1712–1751. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04614-7>
- Sahile, A. A., Khan, M. A., Hamayun, M., Imran, M., Kang, S.-M., & Lee, I.-J. (2021). Novel *Bacillus cereus* Strain, ALT1, Enhance Growth and Strengthens the Antioxidant System of Soybean under Cadmium Stress. *Agronomy*, *11*(2), 404. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020404>
- Schippers, A. (2007). Microorganisms Involved in Bioleaching and Nucleic Acid-Based Molecular Methods for Their Identification and Quantification. In *Microbial Processing of Metal Sulfides* (pp. 3–33). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7_1)
- Seo, J., Jeon, J., Kim, S.-D., Kang, S., Han, J., & Hur, H.-G. (2007). Fungal biodegradation of carbofuran and carbofuran phenol by the fungus *Mucor ramannianus*: identification of metabolites. *Water Science and Technology*, *55*(1–2), 163–167. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.051>
- Soto-Benavente, M., Rodríguez-Achata, L., Olivera, M., Arostegui, V., Colina, C., & Garate, J. (2020). Health risks due to the presence of heavy metals in agricultural products cultivated in areas abandoned by gold mining in the Peruvian Amazon. *Scientia Agropecuaria*, *11*(1), 49–59. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.01.06>

- Văcar, C. L., Covaci, E., Chakraborty, S., Li, B., Weindorf, D. C., Frențiu, T., Pârvu, M., & Podar, D. (2021). Heavy Metal-Resistant Filamentous Fungi as Potential Mercury Bioremediators. *Journal of Fungi*, 7(5), 386. <https://doi.org/10.3390/jof7050386>
- Van Nostrand, J. D., Khijniak, T. V., Gentry, T. J., Novak, M. T., Sowder, A. G., Zhou, J. Z., Bertsch, P. M., & Morris, P. J. (2007). Isolation and Characterization of Four Gram-Positive Nickel-Tolerant Microorganisms from Contaminated Sediments. *Microbial Ecology*, 53(4), 670–682. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9160-7>
- Vivas, A., Biro, B., Nemeth, T., Barea, J., & Azcon, R. (2006). Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2694–2704. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.04.020>
- Wade, M. E., Strickland, M. T., Osborne, J. P., & Edwards, C. G. (2019). Role of *Pediococcus* in winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 25(1), 7–24. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12366>
- Wayne, D. (2007). *Bioestadística, base para el análisis de las Ciencias de la Salud*. LIMUSA.
- Wolanski, E. (2019). Estuarine Ecohydrology Modeling: What Works and Within What Limits? In *Coasts and Estuaries* (pp. 503–521). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814003-1.00029-0>
- Yan, Z., Li, Y., Peng, S., Wei, L., Zhang, B., Deng, X., Zhong, M., & Cheng, X. (2024). Cadmium biosorption and mechanism investigation using two cadmium-tolerant microorganisms isolated from rhizosphere soil of rice. *Journal of Hazardous Materials*, 470, 134134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134134>
- Yao, H., Wang, H., Ji, J., Tan, A., Song, Y., & Chen, Z. (2023). Isolation and Identification of Mercury-Tolerant Bacteria LBA119 from Molybdenum-Lead Mining Soils and Their Removal of Hg<sup>2+</sup>. *Toxics*, 11(3), 261. <https://doi.org/10.3390/toxics11030261>
- YILMAZ, M. T. (2012). Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(8), 1423–1429. <https://doi.org/10.3906/sag-1205-83>
- Zahoor, A., & Rehman, A. (2009). Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environmental Sciences*, 21(6), 814–820. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62346-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62346-3)
- Zhang, J., Li, Q., Zeng, Y., Zhang, J., Lu, G., Dang, Z., & Guo, C. (2019). Bioaccumulation and distribution of cadmium by *Burkholderia cepacia* GYP1 under oligotrophic condition

and mechanism analysis at proteome level. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.091>

Zhou, J., Li, P., Meng, D., Gu, Y., Zheng, Z., Yin, H., Zhou, Q., & Li, J. (2020). Isolation, characterization and inoculation of Cd tolerant rice endophytes and their impacts on rice under Cd contaminated environment. *Environmental Pollution*, 260, 113990. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113990>

Zhu, H.-S., Liang, X., Liu, J.-C., Zhong, H.-Y., Yang, Y.-H., Guan, W.-P., Du, Z.-J., & Ye, M.-Q. (2023). Antibiotic and Heavy Metal Co-Resistant Strain Isolated from Enrichment Culture of Marine Sediments, with Potential for Environmental Bioremediation Applications. *Antibiotics*, 12(9), 1379. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091379>

## **IX. ANEXOS**

## ANEXO A

### Testimonio fotográfico

**Figura 2**

*Muestras obtenidas del sedimento del río Moche*



**Figura 3**

*Soluciones de sales con metales pesados*



**Figura 4**

*Preparación de medios de cultivo*

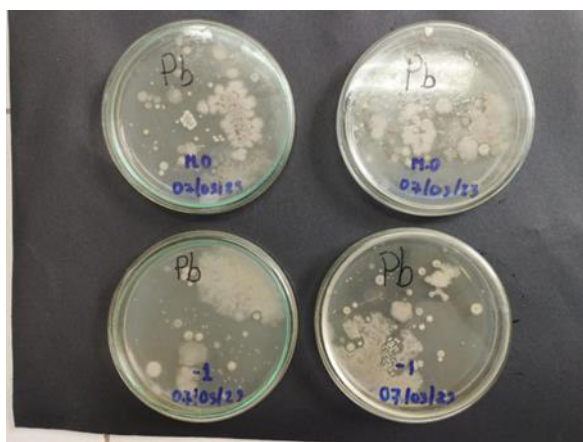
**Figura 5**

*Activación de las muestras*

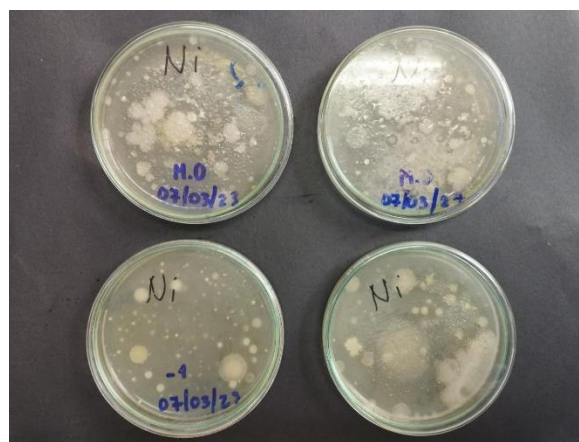


**Figura 6**

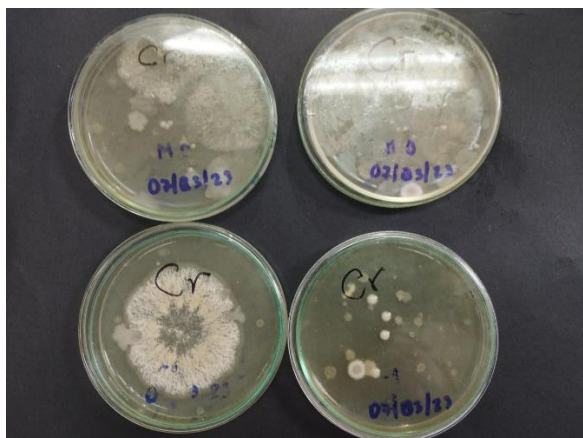
*Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)*



a) Plomo



b) Níquel



c) Cromo



d) Cadmio

## ANEXO B

Tabla 13

Matriz de consistencia

Título: “Nivel de tolerancia a metales pesados de bacterias aisladas de la bocana del río Moche, Trujillo – Perú”

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES
<b>Problema general</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>Hipótesis general</b>	
¿Cuál será el nivel de tolerancia a MP de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?	Determinar el nivel de tolerancia a MP de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	Existe diferencia en el nivel de tolerancia a MP de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	
<b>Problemas Específicos</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Hipótesis Específicos</b>	
• ¿Cuál será el nivel de tolerancia al Pb de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?	- Determinar el nivel de tolerancia al Pb de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	- Existe diferencia en el nivel de tolerancia al Pb de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	<b>Independiente</b> Concentración de metales pesados <b>Dependiente</b> Nivel de tolerancia a metales pesados
• ¿Cuál será el nivel de tolerancia al Ni de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?	- Determinar el nivel de tolerancia al Ni de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	- Existe diferencia en el nivel de tolerancia al Ni de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	
• ¿Cuál será el nivel de tolerancia al Cr de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?	- Determinar el nivel de tolerancia al Cr de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	- Existe diferencia en el nivel de tolerancia al Cr de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	
• ¿Cuál será el nivel de tolerancia al Cd de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo - Perú?	- Determinar el nivel de tolerancia al Cd de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	- Existe diferencia en el nivel de tolerancia al Cd de bacterias aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú.	

## ANEXO C

### Medios de cultivo

#### Agar nutritivo Sigma

- Extracto de carne 5 g/L
- Extracto de levadura 2 g/L
- Peptona 5 g/L
- NaCl 5g/L
- Agar 15 g/L
- pH 7,2

#### Caldo tioglicolato Merck

Este medio de cultivo es usado para determinar el nivel de respiración que posee un cultivo bacteriano.

- Tripteína 15 g/L
- Extracto de levadura 5 g/L
- Glucosa 5 g/L
- NaCl 2,5 g/L
- L-cisteína 0,5 g/L
- Tioglicolato de sodio 0,5 g/L
- Resazurina 0,001 g/L
- Agar 0,75 g/L
- pH final:  $7,1 \pm 0,2$

#### Agar sangre

Es una combinación de un Agar base (agar nutritivo) con el agregado del 5% de sangre ovina, también puede usarse sangre humana. El Agar Sangre aporta muchos factores de

enriquecimiento, es un medio de aislamiento especialmente diseñado para facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes, contiene una mezcla de peptonas particularmente adaptada al cultivo. La presencia de sangre permite la determinación de la hemólisis, criterio básico en la orientación hacia la identificación bacteriana.

- Infusión de músculo del corazón 10 g/L
- Peptona 10 g/L
- NaCl 5 g/L
- Agua 1 L
- pH 7,3

#### **Agar movilidad**

ES un medio que tiene la misma composición del agar nutritivo, pero con solo la mitad de agar (7,5 g/L).

#### **Agar Luria Bertani (LB)**

Este medio se usó para aislar los cultivos potencialmente tolerantes a las sales de los metales pesados, asimismo para determinar el CMI de los metales pesados para cada uno de los cultivos estudiados.

- Triptona 10 g / L
- Extracto de levadura 5 g / L
- NaCl 5 g / L
- Agar 15 g/L