

# Identification of heavy metal tolerant bacteria isolated from the mouth of the Moche River, Trujillo – Peru

Miranda-Jara, Angélica, Mg.<sup>1</sup> , Iannacone, José, Dr.<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Nacional Federico Villarreal, Perú, [amiranda@unfv.edu.pe](mailto:amiranda@unfv.edu.pe); [joseiannacone@gmail.com](mailto:joseiannacone@gmail.com)

*Abstract— Heavy metals are important contaminants whose concomitant presence in different ecosystems has generated global concern. At the cellular level, heavy metals form unstable intermediates with genetic material and disturb different metabolic processes and the proper folding of proteins. This study was responsible for exploring, isolating, phenotypically examining and characterizing 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. In this study, twenty-four strains of bacteria were identified. The identified strains were evaluated against heavy metals using 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. Due to their level of tolerance, these strains could be used to bioremediate and recover sites contaminated with the heavy metals evaluated.*

*Keywords— Bacteria, bioaccumulation, minimum inhibitory concentration, lead, minimum inhibitory concentration*

**Digital Object Identifier:** (only for full papers, inserted by LEIRD).  
**ISSN, ISBN:** (to be inserted by LEIRD).  
**DO NOT REMOVE**

# Identificación de bacterias tolerantes a metales pesados aisladas de la bocana del río Moche, Trujillo – Perú

Miranda-Jara, Angélica, Mg.<sup>1</sup> , Iannacone, José, Dr.<sup>1b</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Nacional Federico Villarreal, Perú, [amiranda@unfv.edu.pe](mailto:amiranda@unfv.edu.pe); [joseiannacone@gmail.com](mailto:joseiannacone@gmail.com)

**Abstract**— *Los metales pesados son contaminantes importantes cuya presencia concomitante en diferentes ecosistemas ha generado preocupación global. 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 ambientes naturales como el río Moche (8.1605 S, 79.034 W), cerca de la ciudad de Trujillo en la región La Libertad, Perú. En este estudio, se identificaron veinticuatro cepas de bacterias. Las cepas identificadas se evaluaron frente a 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 en diferentes niveles. Debido a su nivel de tolerancia, estas cepas podrían ser utilizadas para biorremediar y recuperar sitios contaminados con los metales pesados evaluados.*

**Palabras clave**— *Bacterias, bioacumulación, concentración mínima inhibitoria, plomo, concentración mínima inhibitoria*

## I. INTRODUCCIÓN

La problemática de la contaminación por elementos potencialmente tóxicos como 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 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 [1–3]. 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 [4,5].

Se han aislado microorganismos capaces de resistir altas concentraciones de MP e incorporarlos a sus procesos

**Digital Object Identifier:** (only for full papers, inserted by LEIRD).  
**ISSN, ISBN:** (to be inserted by LEIRD).  
**DO NOT REMOVE**

metabólicos, como la enzima arsenito oxidasa (AOX) que oxida

el As [6]. La biorremediación mediada por microorganismos y plantas ofrece una alternativa eficiente, económica y ambientalmente amigable para la recuperación de suelos contaminados con MP [7].

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 [8]. Por otro lado, *Bacillus* LBA119 es altamente resistente al mercurio, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 32 mg/L de Hg, mostrando un alto potencial de biorremediación para suelos contaminados con este elemento [9]. Los hongos también exhiben una alta capacidad de adsorción y acumulación de MP y pueden utilizarse potencialmente [10]. Los biomecanismos más importantes implicados en la tolerancia y eliminación de MP varían de una especie a otra [11]. 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 [12]. 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 [13]. 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.

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 [14,15].

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 [16].

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 o absorben al interior de su citoplasma, aun manteniendo su viabilidad [16].

Surge la posibilidad de usarlos para absorber, adsorber, acumular y transformar los MP y sus sales [17].

Se ha reportado la utilidad biotecnológica de bacterias del género *Bacillus* para la biorremediación [18,19]. También resultan útiles bacterias de los géneros *Serratia*, *Enterobacter* y *Staphylococcus* [20,21].

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 [22].

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 [23].

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.

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.

## II. METODOLOGÍA

### A. Obtención de la muestra

Las bacterias localizadas en el sedimento de las áreas altamente contaminadas y accesibles de la Bocana del río Moche (8,1605 S, 79,034 O), Trujillo (Figura 1). La muestra estuvo integrada por 10 muestras de sedimento de las que se lograron aislar 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 logren crecer 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 [24]. 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 [25].



Fig. 1 Mapa de ubicación del punto de toma de muestra.

### B. Diseño experimental

Se desarrolló un diseño exploratorio como se detalla en la Tabla I.

TABLA I  
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Indicadores
Concentración de sales de MP	Concentración mínima inhibitoria de Pb usando una sal de plomo ( $Pb(NO_3)_2$ )
	Concentración mínima inhibitoria de Ni usando una sal de níquel ( $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ )
	Concentración mínima inhibitoria de Cr usando una sal de cromo ( $K_2Cr_2O_7$ )
	Concentración mínima inhibitoria de Cd usando una sal de cadmio ( $CdCl_2$ )
Nivel de tolerancia a MP	Presencia de crecimiento bacteriano a niveles tóxicos de sales de Pb, Ni, Cr y Cd

### C. Método de la concentración mínima inhibitoria

Se usó 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  $CdCl_2$  [26].

### D. Preparación del cultivo madre de bacterias resistentes a MP

Se usó la técnica de enriquecimiento de Castro y colaboradores [27]:

- 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 metros, entre cada

punto. Las muestras fueron depositadas en frascos recolectores estériles de 100 mL, gasta 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 horas, en una incubadora con agitador marca BIOBASE.

#### E. Enriquecimiento de tolerantes a MP

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 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 1 MP fueron incubadas por 15 días a temperatura ambiente (21 ± 2 °C).

#### F. 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 (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 periodo de incubación, se seleccionaron veinticinco 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 almacenó en congelación (-8 °C) hasta su posterior estudio.

#### G. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

El ensayo se realizó siguiente el protocolo propuesto por Yilmaz [28]:

- Para iniciar este ensayo se preparó cultivo joven, usando caldo LB y dejando incubar a temperatura ambiente durante la noche (12 horas) 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 metales pesados que sirvieron de control [29].

- La concentración mínima de MP a la que se inhibía el crecimiento bacteriano se consideró concentración mínima inhibitoria (CMI) [29].

- Se determinó el crecimiento de estos cultivos bacterianos, por el método de densidad óptica en un espectrofotómetro a 630 nm [17].

- Se comparó la MIC de los cultivos por cada sal de los MP para establecer su grado de tolerancia absoluto y relativo.

#### G. Caracterización de cepas aisladas

Se recogieron las colonias elegidas y se inocularon en Nutrient Broth (Merck). Después de crecer a 35 °C durante 18 h, las cepas se sembraron en Agar Nutritivo sin metal para garantizar su pureza y se determinó el estado de 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 metales 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 [17].

#### H. Análisis estadístico

Se preparó el banco de datos donde se registró el CMI de cada cultivo bacteriano y el MP correspondiente. Se comparó la CMI de los cultivos por cada sal de los metales pesados para establecer su grado de tolerancia absoluto y relativo. Para tal fin se usó el programa MS Excel.

### III. RESULTADOS

TABLA II  
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE BACTERIAS AISLADAS TOLERANTES AL PLOMO

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	Moderada
4	Pb 6b	1,50	Moderada
5	Pb 7	1,50	Moderada
6	Pb 2	2,50	Alta
7	Pb 3	2,00	Alta
8	Pb 5	2,50	Alta
9	Pb 8	2,50	Alta

En primer lugar, se identificaron 24 cepas tolerantes a metales pesados distribuidas de la siguiente manera: 9 tolerantes al plomo, 5 tolerantes al níquel, 5 tolerantes al cromo, 5 tolerantes al cadmio.

La muestra de la bocana del río Moche mostró bacterias resistentes al Pb con diferentes niveles de tolerancia, en la Tabla II se observa que hubo desde una baja tolerancia hasta alta tolerancia al Pb, lo que indica, que hay bacterias que se pueden aprovechar para biorremediar Pb. El 22% de las bacterias mostró una baja tolerancia, el 33% mostró una tolerancia moderada y el 44% mostró una tolerancia alta (Fig. 2).

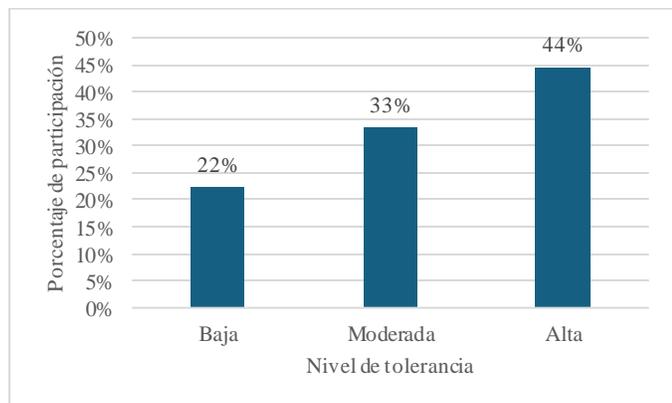


Fig. 2 Porcentaje de participación por nivel de tolerancia al Pb

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.* [30] que pueden tolerar concentraciones relativamente altas de Pb, como 0,53 ppm, y han sido aislados de aguas residuales contaminadas con Pb. Sin embargo, se ha observado más tolerancia en hongos como *Fusarium spp.* [31] y *Aspergillus spp.* [32] que han demostrado tolerancia a Pb y Cd, y *Saccharomyces cerevisiae* [33], levadura que mostró tolerancia a la presencia de Cd, Pb y Cr.

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 tienen cierto efecto tóxico sobre los microorganismos. Jaafar informó que el Pb<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup> podrían inhibir el crecimiento microbiano [34]. Por otro lado, las bacterias que mostraron una alta tolerancia (2,5 mmol/L o 518 ppm), fue menor al *Pediococcus pentosaceus* (1800 ppm) [34] y a *Pediococcus dextrinicus* y *Pediococcus acidilactici* (> 1000 ppm) [35]. Esto se puede atribuir a la alta concentración de Pb en el medio ambiente, es decir en el sedimento de la Bocana, lo que hizo que las bacterias fueran más resistentes al Pb.

El Ni disuelto en concentraciones superiores a 1 ppm es perjudicial para las bacterias metanogénicas; sin embargo, muchas especies hidrolíticas de bacterias son inhibidas a niveles de Ni disuelto superiores a 12 ppm.

TABLA III  
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE BACTERIAS AISLADAS TOLERANTES AL NÍQUEL

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

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. Estos organismos se encontraron en digestor anaeróbico de lodos [36], lo que coincide con los hallazgos de este trabajo, pues la muestra fue de sedimento de 20 a 30 centímetros de profundidad. La muestra de la bocana del río Moche mostró bacterias resistentes al Ni con diferentes niveles de tolerancia, en la Tabla III se observa que hubo desde una tolerancia altamente significativa hasta tolerancia altamente significativa al níquel, lo que indica, que hay microorganismos que se pueden aprovechar para biorremediar níquel. El 80% de las bacterias mostró una tolerancia altamente significativa, el 20% mostró una tolerancia extremadamente significativa (Fig. 3).

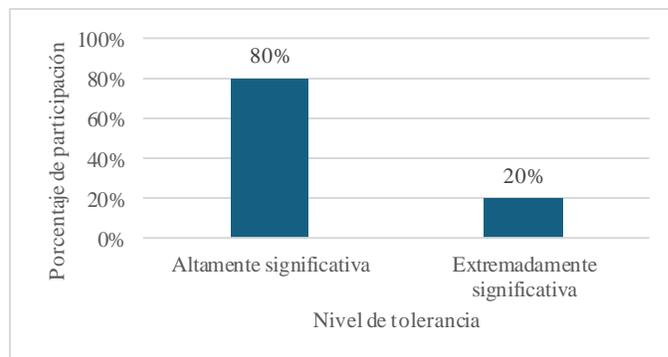


Fig. 3 Porcentaje de participación por nivel de tolerancia al Ni

Microorganismos como la bacteria *Brevibacillus brevis* y el hongo *Glomus mosseae* mejoran el beneficio de las micorrizas en la absorción de nutrientes y en la disminución de la toxicidad del Ni, al ser inoculados en el suelo cultivado con trébol [37]. Estudios bacterianos mostraron que la biomasa bacteriana viva de especies de bacilos grampositivos, Diplococos y *Pseudomonas* tiene el potencial de eliminar el Ni de una solución de un solo metal, demostrando una capacidad intrínseca para absorber Ni de las soluciones [38].

La muestra de la bocana del río Moche mostró bacterias resistentes al Cr con diferentes niveles de tolerancia, en la Tabla 6 se observa que hubo desde una baja tolerancia hasta una

tolerancia significativamente alta al Cr lo que indica, que hay bacterias que se pueden aprovechar para biorremediar Cr. El 33% de las bacterias mostró una tolerancia baja, el 17% mostró una tolerancia moderada, el 33% mostró una tolerancia alta y 17% una tolerancia significativamente alta (Fig. 4).

TABLA IV  
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE BACTERIAS AISLADAS TOLERANTES AL CROMO

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

Las bacterias con tolerancia alta al Cr, puede ser usado para rizorremediación, que es un enfoque prometedor que utiliza estos microbios beneficiosos para reducir la toxicidad de Cr en suelos contaminados. 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 [39]. 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 [40].

La tolerancia al Cr de las bacterias de este estudio estuvo en el rango de 0,5 a 3,0 mM (26 a 156 ppm), muy similar a la tolerancia de bacterias aisladas identificadas como *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. cereus* mediante secuenciación de ADN<sub>r</sub> 16S (0 a 500 ppm), de naturaleza alcalina (pH óptimo 9) [41]. Otros trabajados también han informado tasas de crecimiento similares en ambientes alcalinos [42–44]. En otro estudio usando sedimentos de la rivera de ríos de Estados Unidos, se identificaron *S. aureofaciens* NR-3 y *K. cistarginea* NR-4, ambos aislados expresaron tolerancia al Ni de manera constitutiva.

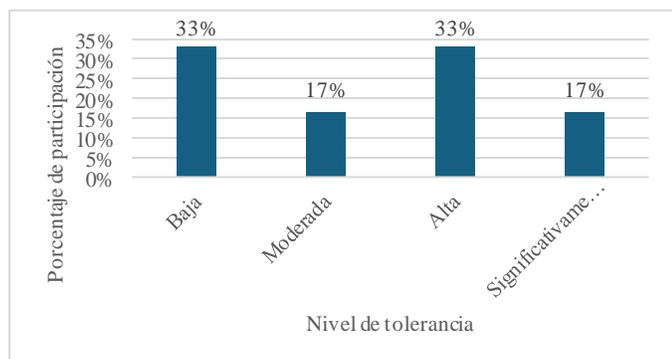


Fig. 4 Porcentaje de participación por nivel de tolerancia al Cr

Además, ambos pudieron crecer en concentraciones más altas de Ni a pH 6 en comparación con pH 7 (Ni 42,6 y 8,5 mM a pH 6 y 7, respectivamente) [45].

En otro estudio se identificaron cuatro cepas de *Pseudomonas putida* Biovar B, que toleraron concentraciones de Ni de hasta 13,2 mM en el medio de cultivo [46]. En este trabajo se observó una tolerancia al Ni entre 3 y 6 mM (entre 176,07 y 352,14 ppm), muy por debajo de *Pseudomonas putida* Biovar B (13,2 mM) [46], *S. aureofaciens* NR-3 y *K. cistarginea* NR-4 (42,6 mM) [45], *Bacillus safensis* (600 ppm) y *Bacillus cereus* (1003,5 ppm) [47]. Sin embargo, en un estudio con colonias bacterianas tolerantes al Ni en el que se probaron niveles de remoción con soluciones sintéticas de 30 ppm de Ni (II) [48], muy por debajo del nivel de tolerancia de este trabajo (entre 176,07 y 352,14 ppm).

TABLA V  
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE BACTERIAS AISLADAS TOLERANTES AL CADMIO

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

Las bacterias resistentes al Cd encontrados en la muestra de la bocana del río Moche mostraron con diferentes niveles de tolerancia, en la Tabla V se observa que hubo desde una baja tolerancia hasta una tolerancia alta al cadmio. El 40% de las bacterias mostró una tolerancia baja, el 40% mostró una tolerancia moderada y el 20% mostró una tolerancia alta (Fig. 5).

Utilizar microorganismos para abordar la contaminación del suelo con Cd y reducir la absorción de Cd en cultivos como el arroz es fundamental para garantizar la salud humana y promover la ciencia ambiental. 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 [49].

Las bacterias identificadas tuvieron un nivel de tolerancia de 0,67 a 2,50 mM (75,3 a 281 ppm). Este rango fue superior al mostrado en *Stenotrophomonas maltophilia* del suelo de la rizosfera que es un actor clave en la reducción de la absorción de Cd (4 mM) y la promoción del crecimiento del arroz [50], pero inferior al *Enterobacter aerogenes* MCC 3092 (hasta 3000 ppm) del suelo de la rizosfera de arroz contaminado con MP, que redujo la absorción de Cd en el arroz al mitigar el estrés oxidativo y el estrés de etileno en plántulas de arroz que enfrentan altos niveles de Cd [51]. Sin embargo, los

mecanismos específicos por los cuales estos microorganismos fijan Cd a nivel celular en los agroecosistemas aún no están claros [52].

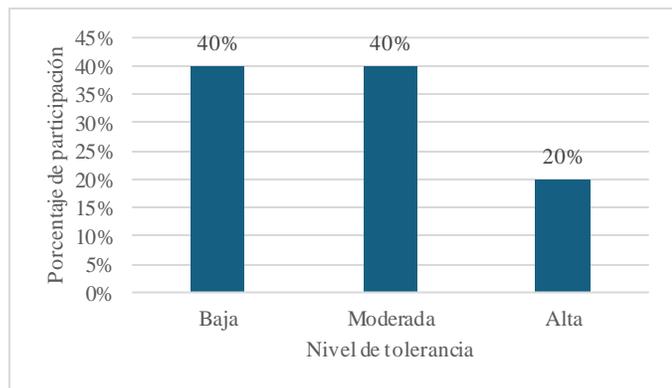


Fig. 5 Porcentaje de participación por nivel de tolerancia al Cd

La Tabla VI en este estudio se observó un predominio de bacterias Gram positivas entre las cepas tolerantes al Pb. Estos resultados concuerdan con los de Basu et al. [53] que caracterizaron las cepas con mayor tolerancia al cromo como bacterias Gram positivas. Analizando los grupos bacterianos aislados en las mayores concentraciones de Pb, las Gram positivas fueron predominantemente esporuladas, mientras que las Gram negativas estuvieron representadas exclusivamente por microorganismos aerobios, la mayoría tolerantes al Ni (Tabla 2).

Los resultados obtenidos en este estudio, relativos a Ag y Hg, están de acuerdo con otros estudios que han demostrado que las bacterias Gram negativas tienden a ser más tolerantes a los metales pesados que las Gram positivas [54–56].

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es un parámetro fundamental en microbiología que define el nivel más bajo de una sustancia antimicrobiana (como antibiótico, antifúngico o bacteriostático, en este caso un MP) que impide el crecimiento visible de un microorganismo en un medio de cultivo. Esta concentración es crucial para determinar la resistencia o sensibilidad de un microorganismo a un tratamiento antimicrobiano, y se puede aprovechar para determinar la tolerancia de los microorganismos a los MP [57,58]. La CMI se interpreta en función de la sensibilidad o resistencia del microorganismo a la sustancia antimicrobiana. 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 [58].

Muchos informes sugieren que las actividades microbianas pueden contrarrestar los efectos negativos del cromo (Cr) y otros MP en plantas que crecen en áreas contaminadas a través de ciertos mecanismos [59,60]. Estos microorganismos producen fitohormonas y estimulan el crecimiento de las plantas en estos suelos contaminados. Por lo tanto, estas interacciones entre plantas y bacterias son muy útiles para los

macro y micro socios, es decir, las plantas verdes y las bacterias asociadas a las plantas [60].

TABLA VI  
IDENTIFICACIÓN DE CEPAS AISLADAS DE LA BOCANA DEL RÍO MOCHE

Nº	Cepas	Forma	Gram	Respiración	Grupo	Endosporas
1	Pb1	Bacilo	Positivo			
2	Pb2	Bacilo	Positivo			
3	Pb3	Bacilo	Positivo			
4	Pb4	Bacilo	Positivo			
5	Pb5	Bacilo	Positivo			
6	Pb6b	Bacilo	Positivo			Sí
7	Pb 6h	Bacilo	Positivo		Móvil	
8	Pb7	Bacilo	Positivo	Aerobio		
9	Pb8	Bacilo	Positivo			
10	Ni1	Bacilo	Positivo			
11	Ni2	Bacilo	Negativo			
12	Ni3	Bacilo	Negativo			
13	Ni4	Bacilo	Negativo			No
14	Ni5	Bacilo	Negativo		Inmóvil	
15	Cr1	Bacilo	Positivo			
16	Cr4	Bacilo	Positivo			
17	Cr5	Bacilo	Positivo	Anaerobio facultativo		
18	Cr6h	Bacilo	Positivo			
19	Cr6b	Bacilo	Positivo			
20	Cd1	Bacilo	Positivo	Anaerobio obligado	Móvil	Sí
21	Cd2	Bacilo	Positivo			
22	Cd3	Bacilo	Positivo			
23	Cd4	Bacilo	Positivo	Aerobio		
24	Cd5	Bacilo	Positivo			

Finalmente, 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 [42,48,52]. 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 avanzará aún más en la intervención de microorganismos tolerantes para la restauración ecológica sostenible.

#### IV. CONCLUSIONES

Se determinó el nivel de tolerancia a sales de plomo de 9 cepas bacterianas y una cepa de hongo aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, la misma que varió de 0,33 mM a 2,50 mM; de las cuales 2 cepas de bacterias tuvieron una tolerancia baja, 3 cepas bacterianas tuvieron una tolerancia moderada y 4 cepas bacterianas mostraron una alta tolerancia. El nivel de tolerancia a sales de níquel de 5 cepas bacterianas aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, las que mostraron una concentración mínima inhibitoria de 3,60 mM a

6,00 mM; de las cuales 4 cepas de bacterianas ostentaron una tolerancia altamente significativa, 1 cepa bacteriana presentó una tolerancia extremadamente significativa. El nivel de tolerancia a sales de cromo de 6 cepas bacterianas aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, las que mostraron una concentración mínima inhibitoria de 0,50 mM a 3,00 mM; de las cuales 2 cepas mostraron una tolerancia baja, 1 cepa presentó una tolerancia moderada, 2 cepas mostraron una tolerancia alta y 1 cepa ostentó una tolerancia significativamente alta. El nivel de tolerancia a sales de cadmio de 5 cepas bacterianas aisladas de la Bocana del río Moche, Trujillo – Perú, las que mostraron una concentración mínima inhibitoria de 0,67 mM a 2,50 mM; de las cuales 2 cepas mostraron una tolerancia baja, 2 cepas mostraron una tolerancia moderada y 1 cepa ostentó una tolerancia alta. 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.

#### REFERENCIAS

- [1] M. Nanda, V. Kumar, D.K. Sharma, 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 (2019) 1–10.
- [2] A. Pal, S. Bhattacharjee, J. Saha, M. Sarkar, P. Mandal, Bacterial survival strategies and responses under heavy metal stress: A comprehensive overview, *Crit Rev Microbiol* 48 (2022) 327–355.
- [3] H.-S. Zhu, X. Liang, J.-C. Liu, H.-Y. Zhong, Y.-H. Yang, W.-P. Guan, Z.-J. Du, M.-Q. Ye, Antibiotic and Heavy Metal Co-Resistant Strain Isolated from Enrichment Culture of Marine Sediments, with Potential for Environmental Bioremediation Applications, *Antibiotics* 12 (2023) 1379.
- [4] E.-S.M. Desoky, A.-R.M. Merwad, W.M. Semida, S.A. Ibrahim, M.T. El-Saadony, M.M. Rady, Heavy metals-resistant bacteria (HM-RB): Potential bioremediators of heavy metals-stressed *Spinacia oleracea* plant, *Ecotoxicol Environ Saf* 198 (2020) 110685.
- [5] J. Zhang, Q. Li, Y. Zeng, J. Zhang, G. Lu, Z. Dang, C. Guo, Bioaccumulation and distribution of cadmium by *Burkholderia cepacia* GYP1 under oligotrophic condition and mechanism analysis at proteome level, *Ecotoxicol Environ Saf* 176 (2019) 162–169.
- [6] N. Demircan, G. Cucun, B. Uzilday, Mitochondrial alternative oxidase (AOX1a) is required for the mitigation of arsenic-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Biotechnol Rep* 14 (2020) 235–245.
- [7] N. Delangiz, M.B. Varjovi, B.A. Lajayer, M. Ghorbanpour, Beneficial microorganisms in the remediation of heavy metals, in: *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, Elsevier, 2020; pp. 417–423.
- [8] S. Ramakrishnan, T. Muruganraj, R. Majumdar, S. Sugumar, Study of Cadmium Metal Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*, *Indian J Microbiol* 63 (2023) 91–99.
- [9] H. Yao, H. Wang, J. Ji, A. Tan, Y. Song, Z. Chen, Isolation and identification of mercury-tolerant bacteria LBA119 from molybdenum-lead mining soils and their removal of Hg<sup>2+</sup>, *Toxics* 11 (2023) 261.
- [10] V. Kumar, S.K. Dwivedi, Mycoremediation of heavy metals: processes, mechanisms, and affecting factors, *Environmental Science and Pollution Research* 28 (2021) 10375–10412.
- [11] R. Roy, S. Samanta, S. Pandit, T. Naaz, S. Banerjee, J.M. Rawat, K.K. Chaubey, R.P. Saha, An overview of bacteria-mediated heavy metal bioremediation strategies, *Appl Biochem Biotechnol* 196 (2024) 1712–1751.
- [12] R.M. Mohamed, A.E. Abo-Amer, Isolation and characterization of heavy-metal resistant microbes from roadside soil and phylloplane, *J Basic Microbiol* 52 (2012) 53–65.
- [13] F. Huaranga, E. Méndez, V. Quilcat, F. Huaranga, Contaminación por metales pesados en la cuenca del río Moche, 1980–2010, *La Libertad-Perú, Scientia Agropecuaria* 3 (2012) 235–247.
- [14] V. Rajaganapathy, F. Xavier, D. Sreekumar, P.K. Mandal, Heavy metal contamination in soil, water and fodder and their presence in livestock and products: A review, *Journal of Environmental Science and Technology* 4 (2011) 234–249. <https://doi.org/10.3923/jest.2011.234.249>.
- [15] CONAGUA, Estadísticas del agua en México, Informe. (2014) 164. [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).
- [16] M. Soto-Benavente, L. Rodríguez-Achata, M. Olivera, V. Arostegui Sanchez, C. Colina Nano, J. Garate Quispe, Riesgos para la salud por metales pesados en productos agrícolas cultivados en áreas abandonadas por la minería aurífera en la Amazonía peruana, *Scientia Agropecuaria* 11 (2020) 49–59.
- [17] A.A. de Lima e Silva, M.A. Carvalho, S.A.L. de Souza, P.M.T. Dias, R.G. da Silva Filho, C.S. Saramago, C.A. Bento, E. Hofer, Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage, *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (2012) 1620–1631.
- [18] M. Ahemad, Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects, *Arabian Journal of Chemistry* 12 (2019) 1365–1377. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.020>.
- [19] P. Gupta, B. Diwan, Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies, *Biotechnology Reports* 13 (2017) 58–71.
- [20] A. Zahoor, A. Rehman, Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater, *Journal of Environmental Sciences* 21 (2009) 814–820.
- [21] X. Liang, G.M. Gadd, Metal and metalloid biorecovery using fungi, *Microb Biotechnol* 10 (2017) 1199–1205.
- [22] A. Delgado, F. Martinez, J. Villanueva, A. Torres, L. Andrade-Arenas, Model based on Grey Systems to Assess Water Quality from Mines in Operation and Environmental Liabilities, *International Journal of Engineering Trends and Technology* 70 (2022) 346–353. <https://doi.org/10.14445/22315381/IJETT-V70I9P234>.
- [23] V.M. Pulido Capurro, L. Bermúdez Díaz, Estado actual de la conservación de los hábitats de los Pantanos de Villa, Lima, Perú, *Arnaldoa* 25 (2018) 679–702. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25219>.
- [24] M.M. Kabir, S.M. Maleha, M.S. Hossain, N. Sultana, R. Islam, S. Islam, F. Ahmed, N.M. Bahadur, T.R. Choudhury, M. Didar-ul-Alam, Molecular characterization and human health risk assessment of multi-drug and heavy metals tolerant bacteria from urban river water, *Desalination Water Treat* 317 (2024) 100298.
- [25] E. Wolanski, Estuarine ecohydrology modeling: what works and within what limits?, in: *Coasts and Estuaries*, Elsevier, 2019; pp. 503–521.
- [26] A.J. Muñoz, E. Ruiz, H. Abriouel, A. Gálvez, L. Ezzouhri, K. Lairini, F. Espínola, Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption, *Chemical Engineering Journal* 210 (2012) 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.007>.
- [27] E. Castro, M. Moya, K. Lairini, Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco, *Afr J Microbiol Res* 3 (2009) 35–48.
- [28] M.T. Yilmaz, Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains, *Turk J Med Sci* 42 (2012) 1423–1429.
- [29] A. Hassen, N. Saidi, M. Cherif, A. Boudabous, Resistance of environmental bacteria to heavy metals, *Bioresour Technol* 64 (1998) 7–15.
- [30] J.M. Bedoya Vélez, G. Castaño, S. Ochoa Agudelo, Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales del Valle de Aburrá, *Rev Colomb Biotechnol* 21 (2019) 135–143.
- [31] W. Munoz, 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, 2015.
- [32] A.G. Villalba-Villalba, L.H. Chan-Chan, A. Maldonado-Arce, Toxic metal tolerance of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus nidulans* isolated from tailings, *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente* 28 (2022) 189–205.
- [33] R. Bhardwaj, A. Gupta, J.K. Garg, Impact of heavy metals on inhibitory concentration of *Escherichia coli*—a case study of river Yamuna system, Delhi, India, *Environ Monit Assess* 190 (2018) 674.
- [34] R. Jaafar, Bioremediation of lead and cadmium and the strive role of *Pediococcus pentosaceus* probiotic, *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 34 (2020) 51–57.
- [35] J.N. Bhakta, K. Ohnishi, Y. Muneke, K. Iwasaki, Isolation and probiotic characterization of arsenic-resistant lactic acid bacteria for uptaking arsenic, *International Journal of Bioengineering and Life Sciences* 4 (2010) 831–838.
- [36] N. Ashley, M. Davies, T.J. Hurst, The effect of increased nickel ion concentrations on microbial populations in the anaerobic digestion of sewage sludge, *Water Res* 16 (1982) 963–971.
- [37] A. Vivas, B. Biró, T. Németh, J.M. Barea, R. Azcón, Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil, *Soil Biol Biochem* 38 (2006) 2694–2704.
- [38] S.K. Beebi, M. Lakshmi, V. Sridevi, K.M. Elizabeth, K.V.K. Chaitanya, Bioconcentration of nickel ions from single metal aqueous solutions by bacteria, *Indian Journal of Environmental Protection* 27 (2007) 75.
- [39] R. Francisco, R. Branco, S. Schwab, J.I. Baldani, P. V Morais, Impact of plant-associated bacteria biosensors on plant growth in the presence of hexavalent chromium, *World J Microbiol Biotechnol* 34 (2018) 1–12.
- [40] H. Feng, G. Wang, G. Wu, W. Jin, H. Wu, P.K. Chu, Plasma and ion-beam modification of metallic biomaterials for improved anti-bacterial properties, *Surf Coat Technol* 306 (2016) 140–146.
- [41] A. Ahmed, Micro-remediation of chromium contaminated soils, *PeerJ* 6 (2018) e6076.
- [42] M. Ahmad, I. Ahmad, T.H. Hilger, S.M. Nadeem, M.F. Akhtar, M. Jamil, A. Hussain, Z.A. Zahir, Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions, *PeerJ* 6 (2018) e5122.
- [43] E. Alpaslan, B.M. Geilich, H. Yazici, T.J. Webster, pH-controlled cerium oxide nanoparticle inhibition of both gram-positive and gram-negative bacteria growth, *Sci Rep* 7 (2017) 45859.
- [44] N.M. Anuar, C.M. Chan, Reuse of dredged marine soils as landfill liner: effect of pH on *Escherichia coli* growth, in: *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* IOP Publishing, 2017: p. 012071.
- [45] J.D. Van Nostrand, T. V Khijniak, T.J. Gentry, M.T. Novak, A.G. Sowder, J.Z. Zhou, P.M. Bertsch, P.J. Morris, Isolation and characterization of four Gram-positive nickel-tolerant microorganisms from contaminated sediments, *Microb Ecol* 53 (2007) 670–682.
- [46] H. Rodriguez, S. Vessely, S. Shah, B.R. Glick, Effect of a nickel-tolerant ACC deaminase-producing *Pseudomonas* strain on growth of nontransformed and transgenic canola plants, *Curr Microbiol* 57 (2008) 170–174.
- [47] S. Kashyap, R. Chandra, B. Kumar, P. Verma, Biosorption efficiency of nickel by various endophytic bacterial strains for removal of nickel from electroplating industry effluents: an operational study, *Ecotoxicology* 31 (2022) 565–580.
- [48] S. Goel, P. Kaur, Biosorption Efficacy of Isolated Bacterial Strain for Nickel Removal from Synthetic Solution, *Poll Res* 39 (2020) 1038–1041.
- [49] X. He, M. Xu, Q. Wei, M. Tang, L. Guan, L. Lou, X. Xu, Z. Hu, Y. Chen, Z. Shen, Promotion of growth and phytoextraction of cadmium and lead in *Solanum nigrum* L. mediated by plant-growth-promoting rhizobacteria, *Ecotoxicol Environ Saf* 205 (2020) 111333.
- [50] J. Zhou, P. Li, D. Meng, Y. Gu, Z. Zheng, H. Yin, Q. Zhou, J. Li, Isolation, characterization and inoculation of Cd tolerant rice endophytes and their impacts on rice under Cd contaminated environment, *Environmental Pollution* 260 (2020) 113990.
- [51] K. Pramanik, S. Mitra, A. Sarkar, T.K. Maiti, Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092, *J Hazard Mater* 351 (2018) 317–329.
- [52] Z. Yan, Y. Li, S. Peng, L. Wei, B. Zhang, X. Deng, M. Zhong, X. Cheng, Cadmium biosorption and mechanism investigation using two cadmium-tolerant microorganisms isolated from rhizosphere soil of rice, *J Hazard Mater* 470 (2024) 134134.
- [53] A. Basu, S.S. Panda, N.K. Dhal, Potential Microbial Diversity in Chromium Mining Areas: A, *Bull Env Pharmacol Life Sci* 4 (2015) 158–169.
- [54] T. Duxbury, Microbes and heavy metals: an ecological overview, *Microbiol Sci* 3 (1986) 330–333.
- [55] T. Duxbury, B. Bicknell, Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils, *Soil Biol Biochem* 15 (1983) 243–250.
- [56] M.N. Hughes, R.K. Poole, Metal toxicity, Metals and Microorganisms. New York: Chapman and Hall (1989) 252–302.
- [57] V.H. Edwards, The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics, *Biotechnol Bioeng* 12 (1970) 679–712.
- [58] B. Kowalska-Krochmal, R. Dudek-Wicher, The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance, *Pathogens* 10 (2021) 165.
- [59] M. Jayaprakashvel, C.D. Bharathi, R. Muthezhilan, A.J. Hussain, Horizontal transfer of heavy metal resistance plasmid from a brackish water bacterium *Pseudomonas* sp. AMET1221 to *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *International Journal of Pure & Applied Biosciences* 5 (2017) 1199–1206.
- [60] R.K. Mohapatra, P.K. Parhi, H. Thatoi, C.R. Panda, Bioreduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium indicum* strain MW1 isolated from marine water of Paradip Port, Odisha, India, *Chemistry and Ecology* 33 (2017) 114–130.