

COMPARACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD POR METALES PESADOS SOBRE BACTERIAS HETERÓTROFAS DE DOS SITIOS CONTRASTADOS DEL LAGO DE MARACAIBO (VENEZUELA)

COMPARISON OF HEAVY METAL ECOTOXICITY ON HETEROTROPHIC BACTERIA FROM TWO CONTRASTED SITES AT THE LAKE MARACAIBO (VENEZUELA)

Fernando Luis CASTRO ECHAVEZ^{1*}, Julio César MARÍN LEAL²

¹ Centro de Investigaciones, Universidad de la Guajira, Km 5 vía Maicao, Colombia.

² Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (Disa), Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, CP 526, Maracaibo 4011-A, Venezuela.

* Autor correspondiente. E-mail: fcastro@uniguajira.edu.co

Historia del artículo

Recibido: Mayo 12, 2017

Evaluado: Julio 4, 2017

Aceptado: Julio 18, 2017

Disponible: Agosto 28, 2017

Resumen

La contaminación del sistema estuarino lago de Maracaibo (Venezuela) representa un problema ambiental de vieja data que lo ha convertido en un ambiente hipereutrófico afectado por distintas fuentes contaminantes, lo cual ejerce una fuerte presión de selección sobre los organismos que allí habitan. En el presente trabajo se comparó la ecotoxicidad por metales pesados (Cr^{+3} , Cr^{+6} , Cd^{+2} , Ni^{+2} y Pb^{+2}) sobre bacterias heterótrofas de dos sitios contrastados del lago de Maracaibo, 1) Vereda del Lago y 2) Puerto Concha, mediante la estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración de inhibición para el 50 % de la población de ensayo (CL_{50}). Para ello, se usó el método de difusión en discos de papel, midiendo el halo de inhibición del crecimiento después de 24 h. Las estimaciones de CL_{50} se realizaron por análisis Probit. Las cepas bacterianas aisladas de aguas superficiales mostraron alta resistencia a los metales pesados ensayados, con valores de CMI y CL_{50} elevados (hasta >5000 mg/L), como posible resultado de las condiciones imperantes en el ecosistema. De manera general, el Cr^{+6} fue el metal más tóxico, con mayor efecto de Cr^{+3} y Pb^{+2} en el Sitio 1 ($p < 0,05$). El efecto de los metales sobre el crecimiento bacteriano fue: $\text{Cr}^{+6} > \text{Cd}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Cr}^{+3} > \text{Pb}^{+2}$. Debido a los altos niveles de resistencia y posible sobrestimación de la tolerancia en los ensayos, las bacterias no fungen como un grupo microbiano potencial para ser usadas como bioindicadores en programas de monitoreo ambiental para este ecosistema.

Palabras clave: bacterias pelágicas, concentración mínima inhibitoria, eutroficación, índice ecotoxicológico, resistencia bacteriana.

Abstract

Pollution of the Maracaibo Lake (Venezuela) estuarine system represents a long-standing environmental problem that has turned it into a hypereutrophic environment affected by different sources of pollution, which exerts strong selection pressure on the organisms living there. This paper compares heavy metal (Cr^{+3} , Cr^{+6} , Cd^{+2} , Ni^{+2} and Pb^{+2}) ecotoxicity on heterotrophic bacteria from two sites at the Maracaibo Lake: 1) Vereda del Lago and 2) Puerto Concha, estimating minimum inhibitory concentration (MIC) and inhibition concentration for 50% of the studied population (LC_{50}). For this purpose, the disk-diffusion agar method was used, measuring the halo of growth inhibition after 24 h. LC_{50} estimates were made by Probit analysis. Bacterial strains isolated from surface water showed high resistance to the heavy metals tested, with elevated MIC and LC_{50} values (up to >5000 mg/L), possibly due to prevailing ecosystem conditions. Generally, Cr^{+6} was the most toxic metal and Cr^{+3} and Pb^{+2} had a higher effect on Site 1 ($p < 0.05$). The effect of metals on bacterial growth was $\text{Cr}^{+6} > \text{Cd}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Cr}^{+3} > \text{Pb}^{+2}$. Because of the high resistance levels and a possible overestimation of tolerance in the assays, bacteria do not function as a potential microbial group to be used as bioindicators in monitoring environmental programs for this ecosystem.

Keywords: bacterial resistance; ecotoxicological index; eutrophication; minimal inhibitory concentration; pelagic bacteria.

INTRODUCCIÓN |

La contaminación ambiental por metales pesados se ha extendido en todo el mundo junto con el progreso industrial. Este provoca que gran cantidad de elementos tales como cromo (Cr), cadmio (Cd), níquel (Ni) y plomo (Pb) se abran camino hacia las grandes masas de agua a través de ríos, aguas residuales, escorrentías superficiales, percolación del suelo, deposición atmosférica y sistemas de drenajes, entre otros (Mohiuddin et al., 2010; Beyer et al., 2014; Bjerregaard et al., 2015; Limcharoensuk et al., 2015). Los residuos procedentes de la minería, las industrias de refinación de metales, las centrales eléctricas, las plantas de incineración de residuos y las operaciones de producción y transporte de petróleo, así como los depósitos de aguas residuales, suelen contener niveles sustancialmente elevados de Pb, Cr y Cd, lo cual representa una seria amenaza para la biota debido a su alta toxicidad. El Ni, por su parte, es un elemento esencial para el crecimiento microbiano, pero a altas concentraciones resulta tóxico. Este metal se genera en operaciones de minería y fundición de metales (Díaz-Borrego et al., 2007; Marrero-Coto et al., 2010; Naik y Dubey, 2013; Beyer et al., 2014; Frankel et al., 2016; Oyetibo et al., 2017).

La presencia de metales pesados en el medio ejerce una fuerte presión de selección sobre los organismos que lo habitan, de modo que puede modificar la flora microbiana autóctona del ecosistema (Cervantes y Vaca, 1990; Montuelle et al., 1994). Si la descarga del contaminante es de carácter permanente, como sucede habitualmente con estos elementos, se produce una selección de aquellos genotipos que pueden sobrellevar dicho estrés (Silver y Walderharg, 1992). La relación contaminante-microorganismo origina una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el contaminante (Anisimova et al., 1993; Montuelle et al., 1994; Marrero-Coto et al., 2010; Poirier et al., 2013; Gillan, 2016).

El monitoreo de metales pesados en el ambiente permite establecer rutas de exposición hacia humanos (Alama et al., 2002), debido a que estos pueden bioacumularse y movilizarse a través de la cadena trófica (Páez y Frías, 2001). Por lo tanto, dada la toxicidad de muchos de aquellos y a que las determinaciones fisicoquímicas no resultan suficientes para valorar sus efectos potenciales sobre la vida acuática, se hace necesario conocer su efecto sobre las comunidades biológicas (APHA et al., 2005; Beyer et al., 2014; Bjerregaard et al., 2015). En ese sentido, los ensayos de ecotoxicidad son una herramienta potente para el reconocimiento de organismos indicadores de los impactos potenciales de contaminantes en ecosistemas acuáticos (Naik y Dubey, 2013; Poirier et al., 2013; Beyer et al., 2014; Bjerregaard et al., 2015).

El uso de bacterias acuáticas como bioindicadores de metales pesados en ambientes acuáticos está determinado por su capacidad de supervivencia en condiciones diversas y extremas (Zakaria et al., 2004; Sun et al., 2012; Poirier et al., 2013; De Vicente et al., 2017). La tolerancia bacteriana hacia

metales pesados tóxicos puede deberse a dos factores (Volesky, 1990): i) la capacidad para resistir la presencia de alta concentración de metales en el citoplasma intracelular —es decir, bioacumulación—, ii) la precipitación/quelación del metal en la matriz exterior de la célula —es decir bioadsorción, que impide al metal llegar a los componentes intracelulares sensibles—. Los mecanismos de captación intracelular son metabólicamente mediados y se aplican solo a bacterias vivas, mientras que los extracelulares, o mecanismos de unión no específica, se producen con células muertas o moléculas de su descomposición (Zakaria et al., 2004; Marrero-Coto et al., 2010; Naik y Dubey, 2013; Beyer et al., 2014; Limcharoensuk et al., 2015).

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en comparar la ecotoxicidad por metales pesados (Cr^{+3} , Cr^{+6} , Cd^{+2} , Ni^{+2} y Pb^{+2}) sobre bacterias heterótrofas de dos sitios contrastados del lago de Maracaibo (Venezuela) mediante la estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración de inhibición para el 50 % de la población de ensayo (CL_{50}). El presente constituye el primer reporte de CL_{50} para bacterias aisladas del lago de Maracaibo.

MATERIALES Y MÉTODOS |

Área y sitios de estudio

El sistema Lago de Maracaibo se encuentra ubicado en el Noroeste de Venezuela y abarca todo el estado Zulia, parte de los estados Falcón, Trujillo, Lara y Mérida y parte de la República de Colombia, entre los $70^{\circ}30'$ y los $73^{\circ}24'$ de longitud W y entre los $8^{\circ}22'$ y los $11^{\circ}51'$ de latitud Norte. Está conformado por el golfo de Venezuela, la bahía El Tablazo, el estrecho de Maracaibo, el lago propiamente dicho y los ríos tributarios. Esta cuenca hidrográfica tiene una extensión de $89\,756\text{ km}^2$, $12\,013\text{ km}^2$ correspondientes al lago de Maracaibo propiamente dicho. Este último presenta una profundidad media de 20 m y una máxima de 34 m, una longitud de 152 km, de los cuales 40 km pertenecen al estrecho de Maracaibo, un ancho promedio de 78 km y una temperatura que exhibe muy pocas variaciones, cuyo valor medio es de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Parra-Pardi, 1979; Herman, 1997; Gardner et al., 1998; Rodríguez, 2000; Ávila et al., 2010).

El lago está emplazado en una depresión sedimentaria casi completamente rodeada de montañas de alturas y características fisiográficas variables. Abarca por el Sur y el Sureste los flancos de la cordillera de los Andes; por el Oeste y el Noroeste, la sierra de Perijá, y por el Este las estribaciones de la serranía de Coro (Herrera, 2004). El lago es un estuario parcialmente mezclado y naturalmente eutrófico. Sin embargo, el estado actual de hipertrofia es causado principalmente por las descargas descontroladas de aguas residuales, tratadas y no tratadas, desechos industriales, fuentes fluviales y agrícolas, así como por la contaminación atmosférica (Rivas et al., 2000; Rodríguez, 2000; Ledo et al., 2004; Ávila et al., 2010; Marín-Leal et al., 2017).

Esta cuenca tiene las mayores reservas de petróleo de América del Sur y una de las más grandes del mundo, con una cantidad total de 33 000 millones de barriles extraídos entre 1914 y 1995, la mayoría de los cuales proceden del fondo del lago (Rodríguez, 2000). Asimismo, se ha reportado el fenómeno de bioacumulación de metales pesados en la cadena trófica de este cuerpo de agua (Colina y Romero, 1992; Hermoso y Márquez, 2005; Rojas, 2012; Marín-Leal *et al.* 2017) como resultado del ingreso de estos elementos desde diferentes fuentes naturales y antropogénicas.

Para el presente estudio se seleccionaron dos sitios contrastados en el Lago de Maracaibo por su ubicación, actividades asociadas, área de influencia y accesibilidad (Fig. 1).



Figura 1. Ubicación de los sitios de estudio en el sistema lago de Maracaibo (Venezuela).

Sitio 1

Vereda del Lago de la ciudad de Maracaibo, al Norte del estrecho de Maracaibo, a los $10^{\circ}39'29,69''$ latitud N y $71^{\circ}35'22,02''$ longitud W. Esta zona recibe la descarga constante de aguas residuales domésticas e industriales (tenerías, mataderos, petróleo y gas, metalmecánicas, etc.), tratadas y no tratadas, de grandes ciudades como Maracaibo, Puertos de Altigracia, Santa Rita, Cabimas, entre otras, y sirve como ruta marítima para los buques que ingresan al lago a través del canal de navegación para abastecerse de petróleo. Además, por esta última razón el lago es dragado constantemente para garantizar las profundidades requeridas

por los barcos tanqueros (Herman, 1997; De Bautista *et al.*, 1999). En esta misma área se encuentra ubicado el Complejo Petroquímico El Tablazo, que alberga plantas de gas licuado, olefinas, cloro-soda, urea, amoniaco, vinilos, PVC, electricidad y otras empresas mixtas.

Sitio 2

Puerto Concha, al Sur del Lago de Maracaibo, a los $9^{\circ}5'31,90''$ latitud N y $71^{\circ}42'23,81''$ longitud W. Esta zona recibe los impactos de las áreas de drenaje de los principales ríos tributarios del sistema: Catatumbo, Santa Ana, Escalante, Bravo, Birimbay, Chama, entre otros, que aportan desechos principalmente de la industria agrícola, pecuaria y minera, así como domésticos (Ledo *et al.*, 2004; Hermoso y Márquez, 2005; Rivas *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2009). Esta zona también recibe los efectos de una fuerte actividad petrolera en el vecino país de Colombia, como resultado del sabotaje de los oleoductos por parte de la actividad guerrillera, que afecta principalmente al río Catatumbo, el cual aporta aproximadamente el 70 % del agua dulce del sistema del lago de Maracaibo (Parra-Pardi, 1979; Ledo *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2000).

Muestreo y análisis de muestras

En cada sitio de estudio se realizaron tres muestreos independientes de agua y sedimento superficiales durante 2016. En cada ocasión se recolectaba una muestra de agua de aproximadamente 500 mL en botellas plásticas de PVC y una de sedimento de 250 g (draga Ekman) en bolsas plásticas con cierre hermético. Adicionalmente, se recolectaban alícuotas de agua superficial en botellas de 250 mL de vidrio con tapa de baquelita y estériles para el aislamiento de bacterias heterótrofas. Estas muestras eran transportadas inmediatamente al laboratorio, bajo refrigeración, para iniciar los análisis fisicoquímicos y microbiológicos correspondientes, manteniéndose congeladas (-10°C) en sus envases cuando era necesario.

En el agua superficial de cada sitio se analizaron *in situ*: temperatura, pH, oxígeno disuelto, potencial redox, conductividad eléctrica, salinidad y sólidos disueltos totales (SDT), usando una sonda multiparamétrica Orion modelo 5 Star Plus, mientras que en el laboratorio se cuantificaron alcalinidad total y dureza total de acuerdo con los métodos estandarizados (APHA *et al.*, 2005).

En las muestras de agua y sedimento se analizaron los contenidos totales de Cr, Cd, Ni y Pb por la técnica de espectrometría de absorción atómica (equipo Perkin-Elmer modelo 3100) con horno de grafito (equipo Perkin-Elmer modelo AS60), previa digestión ácida en un horno de microondas Milestone modelo Ethos 1. En las digestiones se usaron 50 mL de muestra de agua y 5 mL de HNO_3 concentrado (Riedel-de Haën, Alemania). Para los sedimentos se añadieron 5 g de muestra liofilizada (liofilizador Labconco modelo Freezone 6) y 5 mL de mezcla HCl-HNO_3 (4:1).

La metodología de análisis de metales pesados se validó mediante un estudio de recuperación sobre los siguientes materiales estándares de referencia certificados: sedimento estuarino 1646a del NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) y elementos traza en agua natural 1640a del NIST. Los porcentajes de recuperación se encontraron dentro del rango normalmente aceptado (100 ± 5 %), lo que indica la buena exactitud del método de análisis. Por otra parte, la precisión expresada como desviación estándar relativa se ubicó por debajo de 5 %, lo que muestra un grado de variabilidad aceptable en las repeticiones de los análisis (Rubinson y Rubinson, 2000).

Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas

Las muestras de agua destinadas al aislamiento de bacterias fueron sembradas en agar nutriente (Hi-Media Laboratories, India) mediante diluciones seriadas desde 10^{-2} hasta 10^{-9} (Reynolds, 2002; Rincón et al., 2007), empleando solución salina peptonada al 0,85 % previamente esterilizada. Las placas de Petri fueron llevadas a incubación bajo condiciones aerobias a 37 ± 2 °C durante 24-48 h. Con un contador Darfield (Québec, Canadá) se contaron las placas que presentaban un número de colonias entre 30 y 300 para expresar las unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (UFC/mL) (Rivera-Cruz et al., 2002; Madigan et al., 2004). De las colonias crecidas se seleccionó un 10 % de acuerdo a las diferencias de forma, tamaño y aspecto para realizar aislamientos por rayado en placas con agar nutriente y obtener cultivos puros (Rincón et al., 2007).

Las cepas puras se codificaron y mantuvieron en caldo nutritivo (Hi-Media Laboratories, India), previa verificación con tinción de Gram, para entonces iniciar la identificación taxonómica mediante protocolos que incluyeron: descripción morfológica de las colonias (borde, espesor y forma) (Reynolds, 2002), tinciones diferenciales (tinción de Gram, tinción de esporas, tinción de cápsulas) y pruebas bioquímicas convencionales con cepas control (Holt et al., 1994; Murray et al., 1999; MacFaddin, 2004).

Ensayos ecotoxicológicos con bacterias heterótrofas

Las pruebas de ecotoxicidad bacteriana por metales pesados se desarrollaron por el test de difusión en discos de papel sobre agar Muller Hinton (AMH, Merck, Alemania) para determinar la CMI y la CL_{50} (Fredrickson et al., 1988; Vásquez et al., 2005; Díaz-Borrego et al., 2007; Rathnayake et al., 2013). Inicialmente, las cepas fueron activadas en caldo nutriente por incubación a 37 ± 2 °C durante 48 ± 2 h, para obtener una turbidez estandarizada de 0,5 unidades McFarland en el inóculo inicial de los ensayos (Martínez et al., 2010). Las placas de Petri (92 mm de diámetro) con AMH se inocularon por rayado con hisopos de algodón sobre toda la superficie en los ejes X, Y, Z y los bordes del agar para asegurar la distribución uniforme del inóculo y obtener un crecimiento confluyente o en césped, distribuido homogéneamente. Los discos de papel de filtro estériles (6 mm de diámetro), similares a los que se

utilizan para los antibiogramas, fueron impregnados con 10 μ L de la solución del metal a la concentración correspondiente, se colocaron sobre la biopelícula bacteriana de las placas de AMH, presionando levemente para asegurar su contacto pleno, y se incubaron a 37 ± 2 °C durante 24 ± 2 h.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, colocando un máximo de tres discos por placa, incluidos discos sin soluciones de metales como control. Luego del periodo de incubación se midieron los halos de inhibición de crecimiento alrededor de los discos de papel usando un vernier. La CMI es la que produce un halo de inhibición de 10 mm (Fredrickson et al., 1988; Díaz-Borrego et al., 2007). Para los cálculos de CL_{50} se asumió el área de la placa como la población total y el halo de inhibición como la población afectada (calculando el área correspondiente al 50 % de la población total) para el tiempo de exposición de 24 h.

Para estimar la CMI se prepararon de 5 a 10 concentraciones diferentes de Cr^{+3} , Cr^{+6} , Cd^{+2} , Ni^{+2} y Pb^{+2} en el rango de 50 a 5000 mg/L, dependiendo de los resultados que se iban obteniendo a partir de las sales de $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ (Riedel-de Haën, Alemania), $K_2Cr_2O_7$ (Merck, Alemania), $CdCl_2$ (Merck, Alemania), Ni_2SO_4 (Merck, Alemania) y $Pb(NO_3)_2$ (Merck, Alemania), respectivamente. A partir de estos resultados se prepararon las concentraciones necesarias para la estimación de CL_{50} .

Análisis estadísticos de datos

Los cálculos de CL_{50} para cada cepa bacteriana se realizaron por análisis Probit usando el programa PriProbit versión 1.63 para obtener la concentración de metal que inhibe el crecimiento del 50 % de la población del ensayo.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el programa IBM SPSS Statistics versión 20, para determinar las diferencias significativas de CMI, CL_{50} , parámetros fisicoquímicos y contenidos de metales entre los sitios de estudio. Adicionalmente, se estableció un estudio de correlación de Pearson para conocer la correspondencia entre las diferentes variables en cada sitio de muestreo. En la serie de datos se comprobó tanto la homogeneidad de las varianzas (test de Levene) como la distribución normal de los residuos (test de Shapiro-Wilk), requiriéndose la transformación Log_{10} para cumplir con los supuestos estadísticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN |

Características fisicoquímicas de agua y sedimento superficiales

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica y el contenido de metales pesados en agua y sedimento de los dos sitios estudiados en el Lago de Maracaibo. Estos valores son consistentes con los reportados en estudios anteriores para este mismo ecosistema (Parra-Pardi, 1979; Gardner et al., 1998; Rodríguez, 2000; Rincón et al., 2007; Marín et al., 2014; Marín-Leal et al., 2017). En cuanto a las concentraciones de los metales pesados

los datos son comparables a los encontrados por Ávila et al. (2010) en sedimentos del lago, con 16,76-177,62 mg Ni/kg y 3,98-98-28 mg Cr/kg, y por Rojas (2012) en agua, con 6,738-8,156 µg Cr/L, mientras que los de Pb y Cd son mayores a los observados por estos autores, posiblemente debido a fuentes puntuales de vertido o a características locales de los sitios muestreados.

Tabla 1. Características físicoquímicas y contenidos de metales pesados (media aritmética ± desviación estándar, n=3) en muestras de agua y sedimento superficiales del lago de Maracaibo.

Parámetro	Sitio 1		Sitio 2	
	Agua	Sedimento	Agua	Sedimento
Temperatura (°C)	29,7±1,2	-	30,8±0,8	-
pH	8,08±0,33	-	8,38±0,17	-
Oxígeno disuelto (mg/L)	3,82±0,48	-	4,01±0,49	-
Potencial redox (mV)	-61,74±14,01	-	-80,22±3,49	-
Salinidad (UPS)	4,23±0,42	-	3,31±0,14	-
Conductividad eléctrica (mS/cm)*	7,64±0,07	-	6,05±0,18	-
Sólidos disueltos totales (mg/L)*	3745,1±35,0	-	2900,9±50,4	-
Alcalinidad total (mg CaCO ₃ /L)	47,5±12,9	-	41,7±5,8	-
Dureza total (mg CaCO ₃ /L)*	786,3±105,1	-	546,3±41,5	-
Cr**	9,751±2,647	18,56±4,92	11,608±8,922	19,34±6,30
Cd**	9,967±0,032	18,03±0,29	9,632±0,026	18,03±0,53
Ni**	21,245±5,798	23,40±6,43	19,286±7,245	23,79±4,54
Pb**	27,926±11,805	38,98±12,78	22,295±7,242	43,33±10,18

*: se observaron diferencias significativas entre sitios (p<0,05).

**µg/L para agua y mg/kg para sedimento, -: no analizado.

Las diferencias contrastantes entre los dos sitios de muestreo seleccionados para este estudio fueron particularmente notorias con relación a los parámetros (Tabla 1): conductividad eléctrica, sólidos disueltos totales y dureza total (p<0,05). Los contenidos de metales en agua y sedimento no fueron significativamente diferentes entre los sitios (p>0,05). Quedan así en evidencia las abundantes y diferentes fuentes de contaminación por estos elementos en la cuenca del lago de Maracaibo.

Bacterias heterótrofas presentes en los sitios de estudio

En las muestras de agua del lago de Maracaibo se obtuvieron recuentos de bacterias heterótrofas entre 5,2x10⁴ y 8,3x10⁶ UFC/mL. No se observaron diferencias significativas en las densidades bacterianas entre los sitios de muestreo (p>0,05). Del total de colonias crecidas inicialmente en agar nutriente se lograron aislar e identificar 20 cepas bacterianas, 10 en cada sitio de estudio, las cuales se agruparon en 8 familias y 13 géneros. La familia más numerosa fue Enterobacteriaceae con 6 géneros (46,15 %), observándose un 50 % de abundancia para el Sitio 1 y 60 % para el Sitio 2, lo que confirma la continuidad del proceso de contaminación fecal señalado para

este estuario en muchas investigaciones previas (Rivas et al., 2005; Díaz-Borrego et al., 2007; Rincón et al., 2007; Bracho et al., 2009; Marín et al., 2014). Las otras familias representadas fueron: Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Alcaligenaceae, Aeromonadaceae, Xanthomodaceae, Halomonadaceae y Moraxellaceae (Tabla 2). La segunda familia más numerosa fue Moraxellaceae (20 %), particularmente en el Sitio 2 (2 especies).

Tabla 2. Distribución porcentual (%) de géneros bacterianos aislados de muestras de agua superficial de los dos sitios de estudio en el lago de Maracaibo (Venezuela).

Familia	Género	Sitio 1	Sitio 2
Enterobacteriaceae	<i>Salmonella</i>	0	10
	<i>Enterobacter</i>	0	20
	<i>Proteus</i>	10	0
	<i>Citrobacter</i>	20	10
	<i>Escherichia</i>	10	10
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	10	0
	<i>Bacillus</i>	10	0
Alcaligenaceae	<i>Bordetella</i>	0	10
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	10	0
Xanthomodaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	0	10
Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	10	0
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	10	20

Todas las cepas bacterianas estuvieron conformadas por bacilos Gram – (Tabla 2), a excepción de los géneros *Bacillus* (bacilo Gram +), *Bordetella* (cocobacilo Gram –) y *Acinetobacter* (cocobacilo Gram –), de acuerdo a lo reportado en trabajos sobre resistencia bacteriana por Akhavan et al. (2015) y Moraga et al. (2003), para muestras de aguas residuales industriales (Irán) y de la bahía de Iquique (Chile), respectivamente.

De los 13 géneros identificados (Tabla 2), ocho han sido reportados previamente por otros autores para muestras de agua y sedimento del lago de Maracaibo: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter* y *Bacillus* (Dupont et al., 2001; Díaz-Borrego et al., 2007; Rincón et al., 2007; Bracho et al., 2009). No obstante, no se encontraron reportes sobre la presencia de *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Bordetella*, *Stenotrophomona* y *Halomonas*, que se aislaron por primera vez en este trabajo.

Resistencia bacteriana a metales pesados

Las CMI para las cepas bacterianas heterótrofas aisladas de agua superficial del lago de Maracaibo fueron particularmente elevadas: 3750 y >5000 mg Cr⁺³/L, 200 y >5000 mg Cr⁺⁶/L, 75 y >5000 mg Cd⁺²/L, 2500 y >5000 mg Ni⁺²/L y >5000 mg Pb⁺²/L para todas las cepas (Tabla 3). De manera general, las bacterias fueron más sensibles a la presencia de Cr⁺⁶ y más tolerantes a Pb⁺², sin diferencias significativas entre los sitios de estudio (p>0,05).

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de metales pesados sobre el crecimiento de bacterias heterótrofas del lago de Maracaibo.

Sitio	Género	Metal (mg/L)				
		Cr+3	Cr+6	Cd+2	Ni+2	Pb+2
1	<i>Pantoea</i>	>5000	2500	5000	>5000	>5000
	<i>Escherichia</i>	>5000	315	2500	>5000	>5000
	<i>Pseudomonas</i>	>5000	2000	>5000	>5000	>5000
	<i>Citrobacter</i> LM4	>5000	4500	>5000	>5000	>5000
	<i>Bacillus</i>	5000	200	315	2500	>5000
	<i>Proteus</i>	>5000	750	2500	>5000	>5000
	<i>Citrobacter</i>	>5000	500	2500	>5000	>5000
	<i>Aeromona</i>	>5000	500	2000	>5000	>5000
	<i>Acinetobacter</i> NO1	3750	550	2500	5000	>5000
	<i>Halomonas</i>	>5000	>5000	2000	>5000	>5000
2	<i>Salmonella</i>	>5000	250	>5000	>5000	>5000
	<i>Bordetella</i>	>5000	500	>5000	>5000	>5000
	<i>Enterobacter</i> LM3	>5000	500	2500	>5000	>5000
	<i>Citrobacter</i> LM4	>5000	500	2500	>5000	>5000
	<i>Escherichia</i>	>5000	250	>5000	>5000	>5000
	<i>Stenotrophomona</i>	>5000	1000	2500	>5000	>5000
	<i>Acinetobacter</i> LM10	>5000	2000	75	>5000	>5000
	<i>Enterobacter</i> LM13	>5000	2000	1000	>5000	>5000
	<i>Acinetobacter</i> LM14	>5000	1000	5000	>5000	>5000
	<i>Pantoea</i>	>5000	2000	1000	>5000	>5000

La resistencia a los metales pesados estudiados fue <5000 mg/L en el 34 % de los casos, mientras que solamente el 6 % estuvo por debajo de 500 mg/L. *Bacillus* sp. fue el género más sensible a estos metales (Tabla 3). En la literatura se han reportado amplios rangos de tolerancia para cepas bacterianas aisladas de diversos ecosistemas, como los presentados en la Tabla 4. En el caso de la bahía de Iquique (Chile), una vez considerados efluentes y muestras de suelos, entre otros, se han obtenido valores de CMI altos como respuesta de las bacterias a la descarga continua de metales en el ambiente, al igual que en el presente estudio.

Se obtuvieron correlaciones significativas entre los valores de CMI de las cepas bacterianas y las concentraciones de metales, tanto en agua como en sedimento de cada sitio

de muestreo (considerando r teórico=0,632, $n=10$ y $p<0,05$), lo que sugiere que la descarga continua de estos elementos en el sistema ha generado impactos sobre estas poblaciones microbianas, tales como el desarrollo de mecanismos de tolerancia y resistencia (Anisimova et al., 1993; Montuelle et al., 1994; Marrero-Coto et al., 2010; Poirier et al., 2013; Gillan, 2016).

La aparición de cepas bacterianas resistentes a metales pesados en el Lago de Maracaibo está condicionada por las actividades de la industria petroquímica y otras que operan a sus alrededores, así como por los frecuentes derrames petroleros (Gardner et al., 1998). La acumulación gradual de cationes metálicos tanto en sitios antropogénicos como en ecosistemas naturales ha conducido al desarrollo de la homeostasis de metales pesados. Este fenómeno se debe a un proceso de adaptación espontánea al medio desarrollando o adquiriendo sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de las elevadas concentraciones de iones metálicos en la célula (Marrero-Coto et al., 2010). Los mecanismos moleculares de resistencia bacteriana a metales pesados son diversos: captura de iones, transformaciones enzimáticas, expulsión de iones nocivos, excreción de sustancias poliméricas extracelulares, entre otros (Marrero-Coto et al., 2010; Naik y Dubey, 2013; Poirier et al., 2013; Gillan, 2016).

El test de difusión en discos de papel aplicado en el presente trabajo ha sido ampliamente usado para estimar los efectos de metales pesados sobre cepas bacterianas aisladas en diversos ecosistemas (Fredrickson et al., 1988; Vásquez et al., 2005; Dupontt et al., 2001; Moraga et al., 2003; Díaz-Borrego et al., 2007; Akhavan et al., 2015). No obstante, se ha encontrado que es posible obtener una sobrestimación de las concentraciones de tolerancia a los metales, como resultado de la formación de complejos o quelación de estos con los constituyentes orgánicos del medio de cultivo y la falta de estabilidad de los complejos metal-orgánicos (Rathnayake et al., 2013). Esto pudiera haberse presentado durante los ensayos de laboratorio.

Tabla 4. Comparación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de las bacterias heterótrofas aisladas de dos sitios del lago de Maracaibo con las reportadas para otros ambientes.

Bacteria	Sitio	Metal	CMI (mg/L)	Referencia
<i>Bacillus</i> sp., <i>Proteus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Lago de Maracaibo, zona litoral	Ni ⁺²	>2000	Díaz-Borrego et al., 2007
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp.	Bahía de Iquique (Chile)	Pb ⁺²	>3200	Moraga et al., 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Brevibacillus choshinensis</i>	Efluente industria textilera (India)	Cd ⁺²	>3300	Durve et al., 2012
<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp.	Aguas residuales industriales (Irán)	Cr ⁺⁶	>1000	Akhavan et al., 2015
<i>Streptomyces mirabilis</i> (actinobacteria)	Suelo de una mina de uranio (Alemania)	Ni ⁺²	>5800	Schmidt et al., 2009
Cepas MP1, MP2 y MP3	Suelo de un campus universitario (India)	Pb ⁺²	>4000	Krishna et al., 2012
<i>Klebsiella</i> sp.	Aguas residuales industriales (Irán)	Cd ⁺²	>2400	Akhavan et al., 2015
Todos los géneros	Lago de Maracaibo, sitios 1 y 2	Pb ⁺²	>5000	Este trabajo
<i>Enterobacter</i> sp.	Lago de Maracaibo, Sitio 2	Cr ⁺⁶	2000	Este trabajo
Todos los géneros	Lago de Maracaibo, Sitio 2	Ni ⁺²	>5000	Este trabajo
<i>Citrobacter</i> sp.	Lago de Maracaibo, Sitio 1	Cd ⁺²	2500	Este trabajo

Ecotoxicidad bacteriana por metales pesados

Los valores de CL_{50} para las diferentes cepas bacterianas aisladas de los dos sitios del lago de Maracaibo estuvieron entre $2,51 \times 10^6$ y $1,04 \times 10^{10}$ mg Cr^{+3} /L; $8,32 \times 10^4$ y $7,37 \times 10^6$ mg Cr^{+6} /L; $3,9 \times 10^5$ y $1,13 \times 10^8$ mg Cd^{+2} /L; $7,05 \times 10^5$ y $6,81 \times 10^8$ mg Ni^{+2} /L y entre $2,67 \times 10^6$ y $1,93 \times 10^{12}$ mg Pb^{+2} /L. Tales valores son extremadamente elevados debido tanto al desarrollo de procesos de adaptabilidad como a la posible sobrestimación asociada al método de ensayo utilizado, de acuerdo a lo expuesto por Rathnayake et al. (2013). Sin embargo, aportan información concreta acerca del grado de tolerancia que exhiben las bacterias heterótrofas del lago de Maracaibo a los metales pesados, como resultado de la exposición prolongada y continua a través de las distintas vías de ingreso, tanto naturales como antropogénicas. Dicha tolerancia motiva el desarrollo del proceso de bioacumulación en las redes tróficas señalado para este ecosistema (Colina y Romero, 1992; Hermoso y Márquez, 2005; Rojas, 2012; Marín-Leal et al., 2017).

En la Fig. 2 se presentan los valores generales de ecotoxicidad para las bacterias aisladas en los dos sitios de estudio como el inverso de la CL_{50} , para facilitar la interpretación del efecto de los metales pesados como valores elevados de $1/CL_{50}$ (De Vicente et al., 2017). Se observa con claridad un efecto mayor de Cr^{+3} y Pb^{+2} en el Sitio 1 ($p < 0,05$), como posible consecuencia de la variabilidad espacial en cuanto al aporte de las fuentes de metales pesados en la cuenca del Lago de Maracaibo y su efecto sobre las poblaciones microbianas locales.

Las cepas bacterianas obtenidas del Lago de Maracaibo mostraron patrones de multiresistencia a metales pesados, los cuales ocurren cuando los genes que especifican los fenotipos resistentes están localizados en elementos genéticos específicos —como plásmidos, transposones o integrones—, de acuerdo a lo sugerido por Chapman (2003). Se observaron correlaciones significativas entre los valores de CL_{50} de las cepas bacterianas y las concentraciones de metales en agua y sedimento de cada sitio de muestreo (considerando r teórico=0,632, $n=10$ y $p < 0,05$). De manera general, el metal más tóxico fue Cr^{+6} , con el siguiente patrón de efecto sobre la población: $Cr^{+6} > Cd^{+2} > Ni^{+2} > Cr^{+3} > Pb^{+2}$.

El efecto genotóxico de los metales pesados en bacterias resulta de la generación de estrés oxidativo a nivel celular, como producto de la reacción del oxígeno molecular con complejos metálicos generados a partir del glutatión. Dichos metales también tienden a unirse a grupos sulfhidrilo, lo que origina la inhibición de la actividad de enzimas sensibles y puede interrumpir ciertas funciones celulares suplantando a los iones fisiológicos comunes, como por ejemplo Cd^{+2} por Zn^{+2} y Ni^{+2} por Fe^{+2} (Marrero-Coto et al., 2010; Bjerregaard et al., 2015).

Finalmente, queda por evaluar el efecto a largo plazo de las descargas de metales en la cuenca del Lago de Maracaibo sobre las poblaciones autóctonas de microorganismos, toda

vez que las especies resistentes aparecidas pueden competir por la supervivencia y perpetuidad en este complejo estuario tropical. La dificultad de interpretación de los datos de CL_{50} para bacterias, aunada al alto grado de resistencia de estas, inviabiliza su utilización como posibles bioindicadores para el caso del Lago de Maracaibo, por lo que se recomienda estudiar otros grupos alternos de microorganismos.

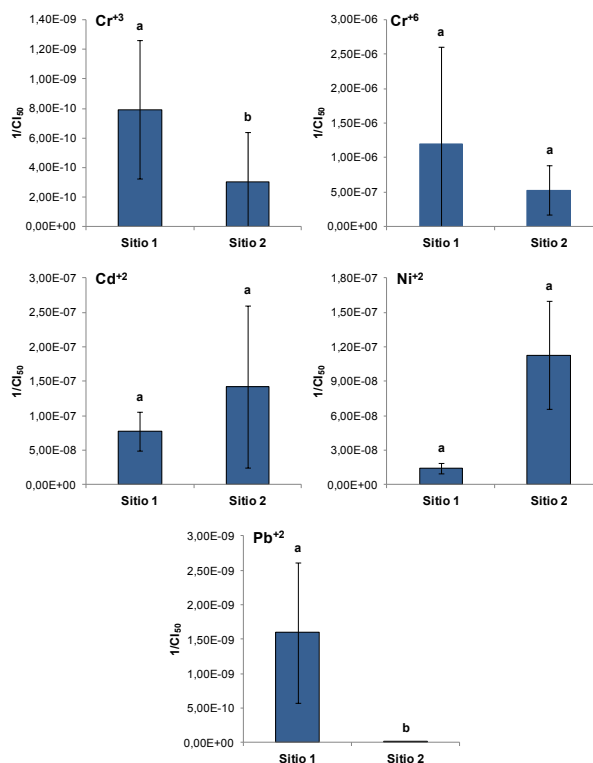


Figura 2. Niveles generales de ecotoxicidad ($1/CL_{50}$) de metales pesados sobre bacterias heterótrofas de dos sitios contrastantes del lago de Maracaibo. Las barras verticales indican la media aritmética \pm desviación estándar para $n=10$. Letras diferentes para un mismo metal indican diferencias significativas entre los valores ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

Las cepas bacterianas aisladas de los dos sitios de estudio mostraron alta resistencia a los metales pesados ensayados, resultante posiblemente de su exposición a las crecientes condiciones de contaminación de este ecosistema. La cepa de *Bacillus sp.* fue el género más sensible a la presencia de los metales.

Se observaron diferencias intersitios y patrones de multiresistencia a los metales pesados, cuyo efecto fue: $Cr^{+6} > Cd^{+2} > Ni^{+2} > Cr^{+3} > Pb^{+2}$, con mayor relevancia de Cr^{+3} y Pb^{+2} en el Sitio 1 ($p < 0,05$), favorecido probablemente por diferencias puntuales en cuando al aporte de las fuentes antropogénicas de metales.

Debido a los altos niveles de resistencia encontrados y a la dificultad de interpretación de los resultados de inhibición, las

bacterias no fungen como un grupo microbiano de potencial uso como bioindicador en programas de monitoreo ambiental para este ecosistema.

Los valores de CL_{50} presentados pueden haber sido sobrestimados por factores asociados a la técnica de ensayo empleada, por lo que se recomienda interpretar los cuidadosamente.

AGRADECIMIENTOS |

Este trabajo fue co-financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (Condes) de la Universidad del Zulia (Venezuela) y la Universidad de la Guajira (Colombia). Se agradece a la M. Sc. Cristina Rose Paredes Luengo por su participación durante la identificación taxonómica de las cepas bacterianas.

Conflicto de intereses: el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

REFERENCIAS |

- Akhavan S, Sharifian S, Zolfaghari M, Khallily D y Rashedi H. 2015. Study on heavy metal resistant fecal coliforms isolated from industrial, urban wastewater in Arak, Iran. *Environmental Research*, 9(4):1217-1224.
- Alama M, Tanakab A, Allinsona G, Laurensona L, Stagnittic F y Snowa E. 2002. A comparison of trace element concentrations in cultured and wild carp (*Cyprinus carpio*) of Lake Kasumigaura. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(3):348-354.
- Anisimova L, Siunova T y Boronin A. 1993. Resistance to metals gram negative bacteria isolated from sewage and soils of industrial regions. *Microbiology* 62(5):505-508.
- APHA, AWWA y WEF. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th Edition, American Public Health Association Editorial, Washington, 1427 p.
- Ávila H, Gutiérrez E, Ledo H, Araújo M y Sánquiz M. 2010. Heavy metals distribution in superficial sediments of Maracaibo Lake (Venezuela). *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad de Zulia*, 33(2):122-129.
- Beyer J, Petersen K, Song Y, Ruus A, Grung M, Bakke T y Tollefsen KE. 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. *Marine Environmental Research*, 96:81-91.
- Bjerregaard P, Andersen CBI y Andersen O. 2015. Ecotoxicology of metals: Sources, transport, and effects on the ecosystem. p. 425-459. En: Nordberg G, Fowler B y Nordberg M (Eds.). *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier Science, Amsterdam, 612 p.
- Bracho M, Montiel M y Botero L. 2009. Virus entéricos, bacterias enteropatógenas y organismos indicadores de contaminación en camarones y en el agua y el sedimento de sus bancos naturales de producción. *Ciencia*, 17(1):14-24.
- Cervantes C y Vaca S. 1990. Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos. *Ciencia y Desarrollo*, 17(102):86-96.
- Chapman J. 2003. Disinfectant resistance mechanisms cross resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51:271-276.
- Colina M y Romero R. 1992. Mercury determination by cold vapor atomic absorption spectrometry in several biological indicators from Lake Maracaibo, Venezuela. *Analyst*, 117:645-647.
- De Bautista S, Bernard M, Romero M, Troncone F, Segovia S y Paredes J. 1999. Impacto ambiental de las descargas de mercurio en el canal de navegación del lago de Maracaibo. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad de Zulia*, 22(1):42-50.
- De Vicente A, Olea F, Codina J, Arrebola E, Cazorla F y Pérez-García A. 2017. Resistencia bacteriana a metales y toxicidad como biomarcadores de la restauración de los suelos contaminados. *Ciencia y restauración del río Guadamar (España)*. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales>, consulta febrero de 2017.
- Díaz-Borrego L, Dupont J, Espina K, Rincón N, García M y Atencio L. 2007. Utilización de sustratos orgánicos y resistencia a metales pesados por bacterias asociadas a *Lemna spp.* *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41(1):27-43.
- Dupont J, Díaz L, Atencio L y Pérez A. 2001. Susceptibilidad a Hg^{2+} y Cd^{2+} en cepas bacterianas biodegradadoras de antraceno aisladas de la playa "Caimare Chico", estado Zulia. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 35(3):242-258.
- Durve A, Naphade S, Bhot M, Varghese J y Chandra N. 2012. Characterisation of metal and xenobiotic resistance in bacteria isolated from textile effluent. *Advances in Applied Science Research*, 3(5):2801-2806.
- Frankel ML, Demeter MA, Lemire JA y Turner RJ. 2016. Evaluating the metal tolerance capacity of microbial communities isolated from Alberta oil sands process water. *PLOS ONE*, 11(2):1-15.
- Fredrickson JK, Hicks RJ, Li SW y Brockman F J. 1988. Plasmid incidence in bacteria from deep subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(12):2916-2923.
- Gardner W, Cavaletto J, Bootsma H, Lavrentyev P, Troncone F. 1998. Nitrogen cycling rates and light effects in tropical Lake Maracaibo, Venezuela. *Limnology and Oceanography*, 43(8):1814-1825.
- Gillan D. 2016. Metal resistance systems in cultivated bacteria: Are they found in complex communities? *Current Opinion in Biotechnology*, 38:123-130.
- Herman S. 1997. Proceso de salinización en el lago de Maracaibo. *Iclam-Corpozulia, Maracaibo*, 109 p.
- Hermoso D y Márquez M. 2005. Evaluación de las concentraciones de metales pesados en tejidos de peces del río Catatumbo y sus afluentes. Trabajo especial de grado, Universidad Rafael Urdaneta, Maracaibo. 116 p.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT y Williams ST. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Novena ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 606 p.
- Krishna MP, Varghese R y Hatha M. 2012. Heavy metal tolerance patterns of total heterotrophic bacteria isolated from the soils of Mahatma Gandhi University campus, Kottayam, Kerala. *Indian Journal of Innovations and Developments*, 1(3):145-148.
- Ledo H, Rivas Z, Gutiérrez J, Gutiérrez E, Ojeda J y Ávila H. 2004. Baseline of Ca, Mg, Fe, Mn and Al concentrations in Catatumbo river surficial sediments. *Water, Air, and Soil Pollution*, 155:117-135.
- Limchaoensuk T, Sooksawat N, Sumarnrote A, Awutpet T, Kruatrachue M y Pokethitiyook P. 2015. Bioaccumulation and biosorption of Cd^{2+} and Zn^{2+} by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122:322-330.
- MacFaddin J. 2004. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Tercera ed., Editorial Panamericana, Madrid, 850 p.
- Madigan M, Martinko J y Parker J. 2004. *Brock Biología de los microorganismos*. Novena ed., Prentice Hall, Madrid, 986 p.
- Marín J, Behling E, Chirino J, Medina K y Pirela MG. 2014. Calidad sanitaria de aguas recreacionales en el estrecho del lago de Maracaibo. *Impacto Científico*, 9(1):26-42.
- Marín-Leal JC, Carrasquero-Ferrer SJ, Pire-Sierra MC y Behling de Calmón EH. 2017. Dynamic of priority pollutants and wastewater adequacy in the Lake Maracaibo basin (Venezuela). Chapter 29 (p. 457-479). Araújo CVM y Shinn C (Eds.). *Ecotoxicology in Latin America*. Nova Science Publishers Inc., Nueva York, 508 p.
- Marrero-Coto J, Díaz-Valdivia A y Coto-Pérez O. 2010. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 41(1):67-78.
- Martínez A, Cruz M, Veranes O, Carball M, Salgado I, Olivares S, Lima L y Rodríguez D. 2010. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almedares. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 41:1-10.
- Mohiuddin K, Zakir H, Otomo K, Sharmin S y Shikazono N. 2010. Geochemical distribution of trace metal pollutants in water and sediments of downstream of an urban river. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7(1):17-28.
- Montuelle B, Latour X, Volat B y Gounet A. 1994. Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53:753-758.
- Moraga R, Merino C y Mondaca MA. 2003. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigación Marina Valparaíso*, 31(1):91-95.
- Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F y Tenover R. 1999. *Manual of clinical microbiology*. Sexta ed., ASM Press, Washington, D. C., 1773 p.

- Naik MM y Dubey SK. 2013. Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98:1-7.
- Oyetibo GO, Chien MF, Ikeda-Ohtsubo W, Suzuki H, Obayori OS, Adebusey SA, Ilori MO, Amund OO y Endo G. 2017. Biodegradation of crude oil and phenanthrene by heavy metal resistant *Bacillus subtilis* isolated from a multi-polluted industrial wastewater creek. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 120:143-151.
- Páez F y Frías M. 2008. Bioacumulación, distribución y efectos de los metales pesados en los peneidos (p. 244-270). Páez F (Ed.). *Camaronicultura y medio ambiente*. Universidad de Texas, Austin, 545 p.
- Parra-Pardi G. 1979. Estudio integral sobre la contaminación del lago de Maracaibo y sus afluentes. Parte II: evaluación del proceso de eutroficación. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables, Caracas, 222 p.
- Poirier I, Hammann P, Kuhn L y Bertranda M. 2013. Strategies developed by the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to resist metals: A proteome analysis. *Aquatic Toxicology*, 128-129:215-232.
- Rathnayake IVN, Megharaj M, Krishnamurti GSR, Bolan NS y Naidu R. 2013. Heavy metal toxicity to bacteria – Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity? *Chemosphere*, 90:1195-1200.
- Reynolds J. 2002. Laboratory procedures manual. Richland College, Dallas, 87 p.
- Rincón N, Dupont J y Díaz-Borrego L. 2007. Bacterias y protozoarios ciliados de muestras de agua de la costa oriental del lago de Maracaibo. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41(3):309-322.
- Rivas Z, Ledo H, Gutiérrez J y Gutiérrez E. 2000. Nitrogen and phosphorus levels in sediments from tropical Catatumbo river (Venezuela). *Water, Air, and Soil Pollution*, 117:27-37.
- Rivas Z, Márquez R, Troncone F, Sánchez J, Colina M y Hernández P. 2005. Contribución de principales ríos tributarios a la contaminación y eutrofización del lago de Maracaibo. *Ciencia*, 13(1):68-77.
- Rivas Z, Sánchez J, Troncone F, Márquez R, Ledo H, Colina M y Gutiérrez E. 2009. Nitrógeno y fósforo totales de los ríos tributarios al sistema lago de Maracaibo, Venezuela. *Interciencia*, 34(5):308-314.
- Rivera-Cruz M, Ferrera-Cerrato RV, Volke H, Rodríguez V y Fernández L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra*, 20:423-434.
- Rodríguez G. 2000. El sistema de Maracaibo, biología y ambiente. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IvIC), Caracas, 241 p.
- Rojas J. 2012. *Polymesoda solida* como bioindicador de metales pesados en el sistema del lago de Maracaibo. Tesis de doctorado, Universidad del Zulia, Maracaibo, 250 p.
- Rubinson JF y Rubinson KA. 2000. *Química analítica contemporánea*. Prentice Hall, México, D. F., 644 p.
- Schmidt A, Haferburg G, Schmidt A, Lischke U, Merten D, Ghergel F, Büchel G y Kothe E. 2009. Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area. *Chemie der Erde*, 69:35-44.
- Silver S y Walderharg M. 1992. Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, 56(1):195-228.
- Sun MY, Dafforn K, Brown MV y Johnston EL. 2012. Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Marine Pollution Bulletin*, 64 (5):1029-1038.
- Vásquez R, Bastardo A y Mundarain I. 2005. Ensayo de toxicidad aguda Cl_{50} -96h con acetato de cadmio y parámetros hematológicos en el híbrido cultivado *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus*. *Zootecnia Tropical*, 23(3):247-257.
- Volesky B. 1990. *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, Boca Raton, 408 p.
- Zakaria ZA, Jaapar J y Ahmad WA. 2004. Bacteria as bioindicators for metal contamination (p. 131-135). Phang y Brown (Eds.). *Biomonitoring in tropical coastal ecosystems*. University of Malaysia Maritime Research Centre, Skudai, 328 p.