

EFFECTOS SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS BACTERIANOS EN SUELOS QUE CONTIENEN CONCENTRACIONES PERMISIBLES DE METALES

Arnaldo José ARMADO-MATUTE^{1*}, Jesús Alberto PÉREZ-GUERRERO¹, Diana DURÁN², Doris REYES³, María Elena MEDINA² y Óscar Enrique VALBUENA-VÍLCHEZ³

¹ Centro de Investigación y Extensión en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM), Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Av. Salvador Allende, Bárbula, Estado Carabobo, Venezuela, C.P. 2005

² Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Avenida Salvador Allende, Bárbula, Estado Carabobo, Venezuela, C.P. 2005

³ Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Bárbula, Estado Carabobo, Venezuela, C.P. 2005

*Autor para correspondencia: armadoa@uc.edu.ve

(Recibido abril 2017; aceptado octubre 2017)

Palabras clave: diversidad bacteriana, carga bacteriana, contaminación con metales, normativas ambientales

RESUMEN

La contaminación de ambientes naturales por metales es básicamente producto de actividades antrópicas, tales como siderurgia, minería, galvanoplastia y Curtiembre es el lugar donde ocurre el proceso de curtido de pieles, no el proceso en sí de pieles y cuero. Como consecuencia, los microorganismos en los ambientes impactados se someten a condiciones estresantes, provocando una disminución de la biomasa y diversidad biológica, particularmente la bacteriana. En este estudio se reportan disminuciones estadísticamente significativas en el contenido de carbono orgánico total (70 %), actividad ureásica (54 %), biomasa bacteriana (47 %) y carga bacteriana (30-80 %) en suelos que contienen metales en niveles considerados permisibles por la legislación venezolana. El cociente respiración basal/biomasa microbiana se incrementó en 58 % respecto al suelo testigo. La diversidad bacteriana se redujo y se lograron aislar sólo 12 morfotipos en placas de agar LB suplementadas con sales de Cr^{3+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Co^{2+} . Cinco de estos morfotipos fueron asignados a los géneros bacterianos *Rothia*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* y *Raoultella*. El pH (9) y la concentración de metales (Cr^{3+} , Cr^{6+} y Ni^{2+}) fueron parámetros determinantes en la reducción de la diversidad y carga bacterianas. Los datos reportados deberían constituir un llamado de alerta a la autoridad ambiental venezolana para revisar y establecer los niveles permisibles de metales en ambientes naturales, de tal manera de que los parámetros bioquímicos y fisiológicos del suelo no se afecten negativamente; adicionalmente, la carga y diversidad microbianas deberían ser incluidas como bioindicadores de salud para suelos.

Key words: bacterial diversity, bacterial load, contamination by metals, environmental normative

ABSTRACT

Contamination of natural environments by metals is basically due to anthropogenic activities such as iron and steel industries, mining, electroplating and tannery. As a

consequence, proliferating microbes in such environments are subjected to stress conditions which induce decreases of the microbial diversity and biomass, particularly the bacterial one. This study reports statistical significant reductions of the total organic carbon content (70 %), urease activity (54 %), microbial biomass (47 %), and bacterial load (3080 %) in soil samples containing permissible levels of metals according to the Venezuelan legislation. Besides, the basal respiration/microbial biomass ratio increased 58 % respect to the witness soil. The bacterial diversity was severally reduced and only 12 bacterial morphotypes were isolated from agar LB plates supplemented with Cr^{3+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , and Co^{2+} salts. Five of these strains were assigned to *Rothia*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* and *Raoultella* bacterial genera. The pH (9) and metal concentrations (Cr^{3+} , Cr^{6+} and Ni^{2+}) were the most important parameters involved in reducing the bacterial diversity and load. The reported data should constitute an alarm call to the Venezuelan environmental authority to revise and set the metal permissible levels in natural environments, in such a way the soil biochemical and physiological parameters are not negatively affected; besides, microbial load and diversity should be included as health bioindicators to soils.

INTRODUCCIÓN

El suelo es uno de ambientes naturales donde proliferan los microorganismos, particularmente las bacterias, que constituyen comunidades extremadamente complejas de elevada diversidad biológica. Las bacterias de una misma especie conforman poblaciones y la interacción de poblaciones de diferentes especies provoca un equilibrio que asegura una relativa constancia de la microbiota (Black 2012).

La interacción de elementos abióticos y la microbiota mantiene las características deseables de los suelos para sustentar labores agrícolas, agropecuarias y muchas otras (Gadd 2010).

Mediante diferentes actividades antrópicas, se descargan usualmente elevadas cantidades de sustancias perjudiciales en los suelos que no pueden ser degradadas o modificadas en tiempos adecuados por la población microbiana, alterando el equilibrio natural de la microbiota. En consecuencia, ocurre una acumulación de dichas sustancias en los suelos, las cuales contaminan el medio ambiente y ejercen efectos negativos sobre las poblaciones microbianas. Esto ocasiona la disminución masiva de muchas poblaciones bacterianas, de las cuales sobrevive un número reducido, o bien elimina una gran proporción de las especies de estas comunidades. Así los suelos contaminados presentan muy baja diversidad biológica y reducida biomasa bacteriana (Smets et al. 2003, Piotrowska-Seget et al. 2005, Silver y Phung 2005, Bozo et al. 2007, Dell'Amico et al. 2008).

Adicionalmente, estas condiciones de estrés provocan cambios fisiológicos en las bacterias que impiden su proliferación (McDougald et al. 1998, Couter 2003, Darcan et al. 2009, Cortez et al. 2013).

Los metales, cuya escoria es generada por actividades siderúrgicas, galvanización, minería, curtiembre de pieles y cueros, entre otras, al ser descargados y superar niveles críticos contaminan los ambientes naturales, fundamentalmente suelos y aguas, modificando la microbiota —incluyendo la bacteriana—, lo cual a posteriori modifica negativamente las características químicas y fisicoquímicas de los ecosistemas (Torsvik y Øvreas 2002).

En este trabajo se determinan parámetros bioquímicos (contenido de materia orgánica total, actividad ureásica, respiración basal y biomasa microbiana) y biológicos (carga y diversidad bacteriana) en muestras de suelos con bajas concentraciones de metales, consideradas permisibles según las normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos de la legislación venezolana vigente (Decreto 2635, Gaceta Oficial 1998)

Adicionalmente, se identifican a nivel de género algunas de las cepas bacterianas aisladas del suelo impactado, se determina la resistencia y las concentraciones mínimas inhibitorias para níquel y cromo trivalente y hexavalente.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se pretende dar una voz de alerta a los entes encargados de generar normativas ambientales en Venezuela, de tal manera que se puedan proponer cambios adecuados que eviten la modificación de la microbiota del suelo en cuanto a su diversidad y cantidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras de suelo

Las muestras de suelo impactado con metales se colectaron en terrenos pertenecientes a una empresa dedicada a la actividad metalúrgica, ubicada en Tinaquillo, Estado Cojedes, Venezuela (9° 55' 26.958" N, 68° 17' 4.405" O), la cual suspendió su actividad productiva en 2002. Se realizaron dos muestreos en la parcela de terreno donde se descargaba la escoria metálica, la cual no fue sometida a remediación: el primero en época de sequía (enero) y otro en época de lluvia (mayo).

Para tal efecto se seleccionó una parcela de terreno de 36 000 m² (240 × 150 m) adyacente a la planta de producción, en la cual se desechaba la escoria y residuos minerales provenientes del proceso de fabricación. La parcela se dividió en tres sectores de 12 000 m² (80 × 150 m): el sector 1 ubicado en la zona más cercana a la planta, desde 0 hasta 80 m; el sector 2 desde 80 hasta 160 m, y el sector 3 desde 160 hasta 240 m. Cada sector se dividió en tres subsectores de 4 000 m² (50 × 80 m).

Por cada subsección se recolectaron 10 muestras simples en un área de 10 cm² y 20 cm de profundidad, en bolsas plásticas estériles. Las muestras simples se mezclaron formando muestras compuestas. El traslado al laboratorio se realizó en cavas refrigeradas a 4 °C.

Las muestras se homogeneizaron y molieron; posteriormente se dividieron en dos porciones: una para las determinaciones biológicas y otra para las determinaciones de carbono orgánico total. La primera porción, sin secar, se tamizó en una malla (2 mm²) y se almacenó en nevera en recipientes cerrados herméticamente. La otra porción se secó al aire por 72 h, luego se tamizó y se almacenó a temperatura ambiente en recipientes cerrados herméticamente.

A la par se colectaron 10 muestras simples en regiones del terreno donde no se depositaba material proveniente de la actividad productiva (muestra testigo), procesándose de acuerdo con lo anteriormente descrito. En total se dispuso de nueve muestras compuestas de suelo contaminado y una muestra testigo (por cada muestreo).

Medios para el aislamiento y cultivo de cepas bacterianas autóctonas

- Caldo nutritivo Luria Bertani (CLB): 10 g de triptona, 5 g extracto de lavadura y 10 g de NaCl por cada litro de medio de cultivo, ajustando el pH a 7.5 con NaOH.
- Agar Luria Bertani (ALB): 10 g de triptona, 5 g extracto de lavadura y 5 g de NaCl, 12 g de agar-agar

por cada litro de medio de cultivo, ajustando el pH a 7.5 con NaOH.

- Agar restrictivo (AR): ALB al cual se le adicionaron 30 ppm de Fe (537 μM), 20 ppm de Pb (96 μM), 20 ppm de Zn (305 μM), 2.5 ppm de Cr³⁺ y Cr⁶⁺ (48 μM), 2 ppm de Ni (34 μM) y 1 ppm de Co (17 μM). Se ajustó a pH 9.0 con NaOH y se esterilizó por 20 min a 15 psi de presión.

Los metales se añadieron a los medios restrictivos de cultivo como sales de calidad pro análisis: (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, Pb(NO₃)₂, ZnSO₄, CrCl₃·6H₂O, K₂Cr₂O₇, NiSO₄·6H₂O y Co(NO₃)₂·6H₂O.

Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas autóctonas

Alicuotas de las muestras compuestas de suelo (5 g), recolectadas en la estación lluviosa (mayo), se dispersaron en 50 mL de CLB. Cada sistema se incubó a 33 °C con agitación constante (140 rpm). Después de 24 h de incubación, los cultivos se filtraron en condiciones de esterilidad para eliminar partículas de suelo. De los filtrados se retiraron alicuotas para preparar diluciones seriadas, mismas que se sembraron a volúmenes de 100 μL sobre AR y se incubaron a 33 °C durante 48 h.

Las colonias aisladas con morfologías diferentes con base en su contorno, elevación, margen, tamaño y color, se recolectaron e inocularon en cuñas de AR y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior identificación y uso.

Análisis bioquímico de muestras de suelo

Las muestras de suelo se procesaron y sometieron a determinaciones de porcentaje de carbono orgánico total (COT), respiración basal (RB), actividad ureásica (AU), biomasa microbiana (BM) y carga bacteriana (CB). De cada muestra se efectuaron tres réplicas, efectuándose 27 ensayos de muestras contaminadas y tres de la muestra testigo.

Contenido de carbono orgánico total (COT)

Se empleó el método de Wallinga et al. (1992), para lo cual se pesaron 0.5 g de suelo y se sometieron a oxidación vía húmeda con K₂CrO₄ y H₂SO₄ concentrado; tras 24 h en reposo se centrifugaron a 3000 rpm y el sobrenadante se analizó mediante espectrofotometría a 660 nm. La cuantificación se realizó por medio de una curva de calibración con sacarosa (0.1-0.4 mg C/mL), analizándose 1 mL del sobrenadante obtenido (25 mL). El contenido se expresó en g C/100 g de suelo seco.

Respiración basal (RB)

Se siguió el método descrito por Anderson (1982), colocando 30 g de suelo en recipientes cerrados con un vial plástico con 15 mL de NaOH 0.1 M, para capturar el CO₂ generado en oscuridad y a temperatura ambiente. El CO₂ se determinó por titulación con HCl 0.1 M, previa precipitación con BaCl₂ 0.05 M. La tasa respiratoria se expresó en mg CO₂/kg de suelo × h calculados mediante la **ecuación 1**.

$$\text{CO}_2 \text{ (mg/kg suelo} \times \text{h)} = \frac{(a - b) \times C_{\text{HCl}} \times FC}{ms \times t} \quad (1)$$

Donde *a* es el volumen de HCl gastado en el blanco (mL); *b* es el volumen de HCl gastado en la muestra (mL); *C_{HCl}* es la concentración exacta de HCl (mol/L); *FC* incluye los factores de conversión estequiométricos y de unidades (mg × g × L/ kg × mL × mol); *ms* es la masa de suelo seco (g), y *t* el tiempo (h).

Actividad ureásica (AU)

Se empleó el método de Kandeler y Gerber (1988), para lo cual se procesó 1 g de suelo con 0.5 mL de urea y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Luego se adicionaron 10.0 mL de una solución de KCl-HCl, se agitaron todas las muestras por 30 min y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min.

Una alícuota de 1 mL (de un total de 11 mL) se sometió a la determinación de amonio mediante reacción con una solución de salicilato/hidróxido y 2 mL de medio de oxidación, determinándose la absorbancia a 600 nm. Se construyó una curva de calibración con contenido de 5-25 µg de N (amonio). La actividad se expresó en µg N/g × h.

Biomasa microbiana (BM)

Se siguió el método de Anderson y Domsch (1978), se procesaron 30 g de suelo en presencia de 120 g de glucosa y un vial con NaOH 0.1 M. Después de 6 h de incubación en oscuridad, el CO₂ producido se tituló con HCl 0.1 M según lo establecido para la determinación de la respiración basal.

La BM se expresó en mg C/100 g con la relación $Y = 40.04 X + 0.37$, donde *Y* es la BM y *X* la respiración basal (mL CO₂/100 g). Para la conversión de la tasa respiratoria (mg CO₂) a mL de CO₂ se empleó el siguiente factor de conversión: 0.4908 mg C – CO₂ = 1.7995 mg CO₂ = 1 mL CO₂ a 25 °C.

Carga bacteriana (CB)

En 9 mL de NaCl 0.8 % (p/v) se suspendió 1 g de suelo, preparando diluciones seriadas (10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴), de las cuales se sembraron por profundidad alícuotas de 0.1 mL en ALB suplementado con un 1 g/L

de antimicótico (fluconazol®, Genven). Las placas se incubaron durante 24 h a 33 °C y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC/g) en un contador de colonias. Para estas determinaciones se tomaron muestras en las estaciones de lluvia (mayo) y sequía (enero).

Identificación de los morfotipos bacterianos

Para la identificación de los morfotipos bacterianos, las colonias aisladas de las muestras de suelo tomadas durante la estación lluviosa se sembraron en AR y se incubaron a 33 °C durante 24 h a pH 9.0. Su pureza se evaluó al resembrarlas en el mismo medio y verificar la homogeneidad de sus características morfológicas.

La incubación se realizó a temperatura de 33 °C y pH 9.0, porque estos valores fueron los que se determinaron en el medio ambiente y suelo donde se recolectaron las muestras.

Las pruebas de identificación realizadas fueron las siguientes: determinación de forma, tinción de Gram, esporas, prueba de oxidación/fermentación (O/F) de glucosa, lactosa, catalasa, motilidad, ácido sulfhídrico, indol, citrato, gas, nitratos, ureasa, lisina, almidón, rojo de metilo, agar con hierro de Kligler (KIA), prueba Voges-Proskauer, crecimiento en agar MacConkey, agar cetrimida, agar *Salmonella-Shigella* (SS) y agar manitol salado.

Los procedimientos se detallan en Forbes et al. (2004) y Win et al. (2008). Las cepas se conservaron en cuñas de AR, a 4 °C y se resembraron cada 60 días.

Determinación de la sensibilidad a metales en las cepas bacterianas

La sensibilidad de las cepas bacterianas, asignadas a géneros, se determinó por el método de difusión en placas AR (Abskharon et al. 2008), a pH 7.5 durante 18 h a 33 °C, aplicándose 20 µL de las soluciones de metal 100 µM por disco.

Los metales ensayados fueron Co²⁺, Ni²⁺, Cr³⁺, Cr⁶⁺ y Na⁺ (este último incluido como control). Para preparar las placas AR, cada inóculo bacteriano se ajustó a una densidad óptica (DO) de 0.5 en la escala McFarland (Forbes et al. 2004). El diámetro de los halos de inhibición se determinó con una regla milimetrada.

Efectos de la concentración de metales y pH sobre el crecimiento bacteriano. Diseño experimental factorial 3³

Tres porciones de 200 mL de CLB se ajustaron a pH 6.0, 7.5 y 9.0; cada porción se dividió en tres

volúmenes iguales, agregándose a cada uno la cantidad apropiada del metal para alcanzar concentraciones finales de 0.0, 5.0 y 10.0 mM. Los metales ensayados fueron Ni²⁺, Cr³⁺ y Cr⁶⁺. De esta manera, para cada metal se incubaron nueve sistemas, alcanzándose un total de 27 incubaciones.

A cada sistema se le adicionaron 100 µL de la cepa bacteriana y se incubaron en reposo a 33 °C durante siete días. Finalmente, se determinó la absorbancia a 540 nm, la cual se corrigió mediante el respectivo sistema blanco (medio sin inóculo bacteriano).

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y se presentaron como gráficas de superficie de respuesta, relacionando la concentración del metal y el pH del medio con la variación de la densidad óptica (DO) del sistema (capacidad de duplicación de la población bacteriana).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados correspondientes a los parámetros bioquímicos de las muestras de suelo impactado y testigo se detallan en el **cuadro I**.

El contenido de COT presentó valores muy bajos en los tres sectores impactados con metales, con un valor promedio de 0.436 g C/100 g de suelo seco (0.158 a 0.883 g C/100 g). Al compararlo con el valor de la muestra testigo (1.420 g C/100 g) se estableció una reducción de 70 % ($[1 - 0.436/1.420] \times 100$).

La AU también fue menor en los tres sectores estudiados, mostrando un valor promedio de 4.902 µg N/g x h (3.081 a 6.032 µg N/g x h), mientras que el testigo se ubicó en 10.508 µg N/g x h; el descenso alcanzó 54 % ($[1 - 4.902/10.508] \times 100$).

La RB presentó promedios de 8.226 y 9.910 mg CO₂/kg x h para las muestras impactadas y testigo, respectivamente, con una disminución del 17 % ($[1 - 8.23/9.81] \times 100$), la cual no es estadísticamente significativa.

La BM mostró un promedio en las muestras impactadas de 12.087 mg C/100 g (0.333 a 28.481 mg C/100 g), y en el testigo de 22.789 mg C/100 g; la disminución se calculó en 47 % ($[1 - 12.087/22.789] \times 100$).

En conjunto estos resultados indicaron, de acuerdo con el análisis de varianza, disminuciones estadísticamente significativas para COT, AU y BM, y no significativas para RB. El COT y la AU son parámetros relacionados con los ciclos biogeoquímicos del C y N, elementos fundamentales para los procesos vitales en seres vivos.

La reducción en el COT implica carencia de moléculas orgánicas en el suelo impactado y la disminución de la AU indica una baja producción de N reducido (amonio). Ambos compuestos son utilizados por la microbiota como fuentes energéticas y moléculas precursoras para la síntesis de biomoléculas necesarias para la conformación de estructuras celulares, enzimas, coenzimas y funciones celulares típicas.

La reducción en la BM, que no puede incrementarse por falta de nutrientes, parece corroborar esta

CUADRO I. VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN MUESTRAS DE SUELO IMPACTADOS Y NO IMPACTADOS CON METALES

	Sector				
	1*	2*	3*	X	Control
COT (g C/100 g)	0.31 (± 0.08) [0.23-0.42]	0.40 (± 0.36) [0.16-0.88]	0.60 (± 0.29) [0.31-0.98]	0.44 —	1.42 (± 0.01) [1.41-1.44]
AU (µg N/g x h)	4.33 (± 1.25) [3.08-5.52]	6.03 (± 3.40) [1.51-9.01]	4.34 (± 1.36) [3.28-6.41]	4.90 —	10.57 (± 0.34) [10.20-10.86]
RB (mg CO ₂ /kg x h)	9.34 (± 0.81) [8.43-10.48]	8.03 (± 1.27) [6.29-8.97]	7.31 (± 0.61) [6.54-8.07]	8.23 —	9.91 (± 0.02) [9.90-9.93]
BM (mg C/100 g)	13.04 (± 5.25) [2.86-18.39]	9.75 (± 8.15) [0.33-22.84]	13.48 (± 7.05) [6.14-28.48]	12.09 —	22.79 (± 5.68) [17.09-28.46]

Se presentan los valores promedios (con su desviación estándar) obtenidos para los sectores 1, 2 y 3 del terreno impactado con metales y el suelo testigo, así como los valores máximos y mínimos de cada análisis

*Promedio de nueve determinaciones, COT: contenido de carbono orgánico, AU: actividad ureásica, RB: respiración basal, BM: biomasa microbiana, X: promedio de los tres sectores.

situación. Aunque la RB no sufrió una afectación significativa, debe considerarse que al disminuir la BM en un 47 % en las muestras impactadas con metales, la actividad respiratoria de la microbiota debería incrementarse.

En efecto, el cociente RB/BM en estas muestras fue de 0.68 (8.226/12.087) y en el testigo de 0.43 (9.910/22.789), lo cual indica que la actividad respiratoria de la biomasa en muestras que contenían metales a concentraciones permisibles fue 1.58 (0.68/0.43) veces mayor respecto al sistema testigo, lo cual demuestra la presencia de una condición de estrés microbiano.

Adicionalmente, los cocientes COT/BM en muestras impactadas y testigo fueron de 0.036 (0.436/12.087) y 0.062 (1.420/22.789), respectivamente, lo cual indica que la microbiota en el testigo dispone de 1.7 veces (0.062/0.036) más material carbonado que las muestras impactadas. Esta situación confirma la disminución del COT en las muestras que contienen metales y una RB aparentemente normal en ambas muestras.

En la literatura se ha reportado el establecimiento de situaciones que alteran las poblaciones bacterianas en suelos contaminados por metales y produce estrés oxidativo (Fontanetti et al. 2011, Lemire et al. 2013, Sulmon et al. 2015). Dicho estrés implica un incremento en la síntesis de enzimas antioxidantes (óxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, glutatión peroxidasas), proteínas queladoras de metales, metalotioninas, (Bozo et al. 2007, Sulmon et al. 2015) y sideróforos (Lemire et al. 2013).

Tales estrategias de emergencia requieren de fuentes energéticas para reponer el estado homeostático

de la célula (Sulmon et al. 2015). En consecuencia, la energía proviene de la oxidación de moléculas carbonadas presentes en el hábitat donde proliferan los organismos, en este caso particular del suelo.

Los resultados correspondientes a la CB se muestran en el **cuadro II**. Se observó, para las muestras de ambas estaciones (lluviosa y de sequía) un incremento de la densidad bacteriana (UFC/g) a medida que el sector analizado se aleja de la planta de producción. Este incremento, podría indicar una menor concentración de metales en zonas más retiradas del punto de impacto de la actividad metalúrgica. Una situación similar se reportó al detectarse disminuciones en las concentraciones de Zn, Al, Pb y Cd, en líquenes, conforme las muestras se alejaban de una carretera por donde se transportaba el mineral proveniente de una mina (Holt y Miller 2010).

Para la estación lluviosa los valores de CB se incrementaron desde 1.22×10^5 hasta 9.94×10^5 UFC/g en las secciones 1 y 3, respectivamente. El testigo mostró valores de 39.8×10^5 UFC/g. El promedio en las secciones impactadas fue de 6.65×10^5 UFC/g que, al compararse con el testigo, indicaron un 83% de disminución de la carga bacteriana.

En el caso de la estación seca, el promedio de CB en las secciones impactadas fue de 1.73×10^5 UFC/g, con una variación de 0.63 a 4.08×10^5 UFC/g, en tanto que el valor del testigo fue de 2.51×10^5 UFC/g y la disminución se calculó en 30 %.

Los resultados de la CB en ambas estaciones se correlacionan bien con la disminución referida de la BM en los sectores impactados. La diferencia en los valores de las muestras testigo se debe a la disponibilidad de agua, la cual es fundamental para la

CUADRO II. VARIACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA CON LA ÉPOCA DEL AÑO EN MUESTRAS DE SUELO IMPACTADOS Y NO IMPACTADOS CON METALES

Época del año	Carga bacteriana (UFC/ g suelo) $\times 10^{-5}$				
	Sector				
	1*	2*	3*	X	Testigo
Lluviosa	1.22 (± 1.67) [0.32-3.16]	8.81 (± 9.67) [2.51-19.95]	9.94 (± 5.93) [3.98-15.84]	6.65 —	39.8 —
Sequía	0.63 (± 0.82) [0.16-1.58]	0.48 (± 0.16) [0.31-0.63]	4.08 (± 1.30) [3.16-5.01]	1.73 —	2.51 —

Se presentan los valores promedios obtenidos (con su desviación estándar) para los sectores 1, 2 y 3 del terreno impactado con metales y el suelo testigo, así como los valores máximos y mínimos de la carga bacteriana en ambas épocas del año

*Promedio de nueve determinaciones, UFC: unidades formadoras de colonias, X: promedio de los sectores 1, 2 y 3

proliferación bacteriana. En general, la CB en la estación lluviosa siempre fue mayor en todos los sectores al compararse con los valores de la estación seca.

Si bien en la estación lluviosa se obtuvieron los valores más altos de CB, es contrastante que la mayor reducción en este parámetro se detectó en esta época. Esto puede deberse a una mayor disponibilidad de los metales para la población bacteriana, debida a la solubilización inducida por los niveles de agua relativamente altos presentes en el terreno, lo cual está restringido en terrenos más secos.

Como era de esperarse, hubo variabilidad en la morfología macroscópica de las colonias bacterianas aisladas de las muestras de suelo contaminado y cultivadas en AR, las cuales se diferenciaron con base en su forma, elevación, borde, tamaño y color (resultados no mostrados). Sin embargo, luego de una minuciosa observación sólo se lograron detectar 12 morfotipos bacterianos diferentes, que se denominaron cepas MT1 a la MT12.

Es notorio el bajo nivel de diversidad biológica en las muestras de suelo, lo cual ha sido reportado por otros investigadores (Smets et al. 2003, Bozo et al. 2007).

Aunque se ha reportado que sólo 0.1 a 1 % de la población microbiana puede detectarse en muestras ambientales mediante técnicas clásicas de cultivo in vitro (Malik et al. 2008), actualmente se efectúan intentos para mejorar estos porcentajes de detección (Tanaka 2014). No obstante, se ha sugerido que la carga bacteriana podría superar el billón de organismos por gramo de suelo pertenecientes a más de mil diferentes especies (Torsvik y Øvreas 2002).

Como es sabido, en la actualidad existen técnicas moleculares (mediante la identificación del gen AR-Nr16S) y bioquímicas (perfil de ácidos grasos metil esterificados, entre otras) que permiten evaluar la diversidad de microorganismos cultivables y no cultivables de una manera más exhaustiva (Malik et al. 2008). Sin embargo, este trabajo sólo pretende mostrar los cambios en la diversidad de las bacterias cultivables, asociados con la presencia de metales en concentraciones que se estiman permisibles según la legislación venezolana.

Con base en la capacidad proliferativa de las 12 cepas aisladas, y por consideraciones logísticas, sólo cinco de ellas se sometieron a los protocolos de identificación a nivel de género: las cepas MT1, MT4, MT5, MT6 y MT11. En el **cuadro III** se indican los resultados de las pruebas bioquímicas, observaciones al microscopio de luz y su identificación taxonómica. Se asignaron las denominaciones MT1 al género *Rhotia*, MT4 a *Vibrio*, MT5 a *Klebsiella*, MT6 a *Acinetobacter* y MT11 a *Raoultella*.

La identificación de los géneros bacterianos se efectuó luego del análisis de las 23 pruebas (bioquímicas, fisiológicas y morfológicas) realizadas y tomando como referencia publicaciones especializadas en la identificación bacteriana (Forbes et al. 2004, Win et al. 2008). Es claro que no se indican especies, pero la asignación de géneros es totalmente válida.

Las cinco cepas bacterianas caracterizadas fueron sometidas a análisis de sensibilidad en medios AR con contenido de metales mediante la técnica de difusión en placa (Abskharon et al. 2008). Un halo de inhibición menor a 20 mm se consideró como capacidad de resistencia al metal (Schmidt y Schlegel 1989).

Todas las cepas fueron sensibles a cobalto (halos de inhibición superiores a 20 mm) y el sodio no ejerció efectos negativos sobre ellas (se incluyó como testigo de la prueba). Todas las cepas mostraron resistencia al Ni^{2+} , Cr^{3+} y Cr^{6+} ; al respecto, el níquel y el cromo, junto con el cobre y cadmio, son los metales más comúnmente reportados como contaminantes del medio ambiente (Alboghobeish et al. 2014).

La inspección de los halos de inhibición indicó variabilidad en la resistencia a los metales (**Cuadro IV**), siendo los correspondientes a la cepa MT6 los de menor diámetro (iguales o menores a 15 mm), lo que indicó la más alta capacidad de resistencia en *Acinetobacter* sp. Consecuentemente, para la ejecución del diseño experimental factorial 3^3 se empleó *Acinetobacter*. Los datos obtenidos se presentan como gráficas de superficies de respuesta a Ni^{2+} , Cr^{3+} y Cr^{6+} en la **figura 1**.

La disminución de la densidad óptica (DO)—medida de proliferación de la población bacteriana—es evidente al incrementar la concentración del metal, alcanzándose los niveles más bajos y con poca variabilidad en concentraciones superiores a 5.0 mM. Resultados similares se obtuvieron al variar el pH del medio de 9.0 a 6.0.

Al comparar las variaciones de la DO detectadas con la variación de la concentración del metal y la de pH, se puede concluir que la concentración de metal es el factor preponderante en la capacidad proliferativa de la cepa bacteriana, ya que las mayores variaciones en la DO se obtuvieron al variar la concentración del metal.

El análisis de varianza indicó que la concentración de metal y el pH, más la interacción de ambos parámetros, tuvieron una influencia significativa en el crecimiento bacteriano, al establecer un valor de p crítico < 0.05 . Esto se corroboró mediante un diagrama de Pareto en que los parámetros ya

CUADRO III. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y MORFOLÓGICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS

Característica	MT1	MT4	MT5	MT6	MT11
Género	<i>Rothia</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Raoultella</i>
Forma	CB	B	B	B	B
Gram	+	-	-	-	-
Esporas	-	-	-	-	-
Glucosa (O/F)	O/F	F ^d	F	O/F	F
Lactosa	-	-	+	+	-
Catalasa	+	+	+	+	+
Motilidad	-	+	-	-	-
Ácido sulfhídrico	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	-	+
Gas	+	-	-	-	-
KIA	K/A	K/K	K/A	K/A	K/A
Nitratos	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-
Lisina	-	+	-	-	+
Almidón	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer	+	-	-	-	+
Agar Mac Conkey	+	+	+	+	+
Agar cetrimida	+	-	-	-	+
Agar SS	+	+	-	-	-
Agar manitol salado	-	-	-	-	-

^dRespuesta débil

+: reacción positiva, -: reacción negativa, B: bacilo, CB: cocobacilo, O: oxidación, F: fermentación, A: respuesta ácida, K: respuesta alcalina, KIA: agar con hierro de Kligler

CUADRO IV. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DIVERSOS METALES (100 µM) EN CEPAS AISLADAS DE SUELOS CONTAMINADOS

Cepa bacteriana	Diámetro del halo de inhibición (mm)				
	Co ⁺²	Ni ⁺²	Cr ⁺³	Cr ⁺⁶	Na ⁺
<i>Rothia</i> sp.	28.0	0.0	13.0	15.0	0.0
<i>Vibrio</i> sp.	26.0	0.0	14.0	10.5	0.0
<i>Klebsiella</i> sp.	25.0	12.0	14.0	13.0	0.0
<i>Acinetobacter</i> sp.	25.0	0.0	13.0	10.5	0.0
<i>Raoultella</i> sp.	26.0	10.0	14.5	15.0	0.0

mencionados presentaron valores críticos de $p > 2.0$ (datos no mostrados).

Es importante señalar que a pH superiores a 6-7 la disponibilidad del Cr³⁺ y Ni²⁺ disminuye considerablemente debido a la formación de sus respectivos hidróxidos insolubles, lo que reduce la concentración activa de estos metales en las condiciones experimentales usadas en las determinaciones.

Una limitación de nuestros datos es que no se han tomado en consideración aspectos físicos y químicos

del suelo que podrían influir en la biodisponibilidad de los metales, tales como capacidad intercambiadora de cationes, aniones quelantes de metales y fuerza iónica del suelo (Lemire et al. 2013).

Adicionalmente, las gráficas de superficie de respuesta (**Fig. 1**) pueden sugerir que las concentraciones mínimas de los metales ensayados a las que se inhibió la capacidad de duplicación de los cultivos bacterianos (variación de absorbancia cero) estarían ubicadas en el intervalo de 5-7 mM. Datos de otros laboratorios reportan valores de concentraciones mínimas inhibitorias de 3-5 mM Ni (Bhadra et al. 2006) y 3-4 mM Cr (Essahale et al. 2012) para diferentes cepas de *Acinetobacter*. Valores de 2.7, 3.4, 13.6 y 54.5 mM para Ni y 1.9, 3.8 y 7.7 mM para Cr han sido reportados para diferentes cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes* (Moraga et al. 2003).

Respecto de los cinco géneros bacterianos identificados en este estudio, otros autores han reportado previamente resistencia a metales y la dependencia de ésta a la presencia de plásmidos para *Vibrio* (Zhang et

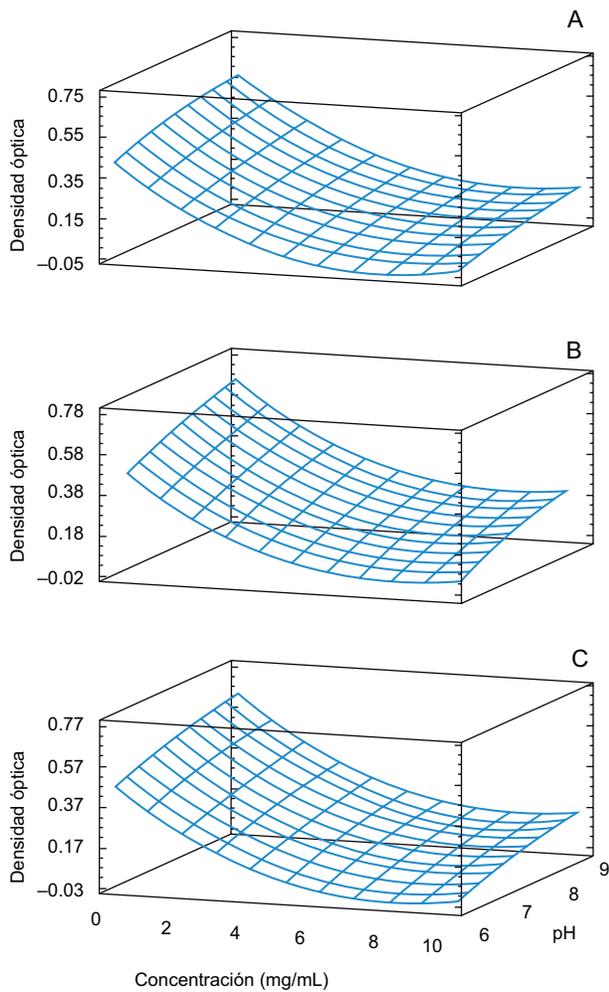


Fig. 1. Superficie de respuesta para el crecimiento bacteriano en función del pH y la concentración de: (a) Ni^{+2} , (b) Cr^{+3} y (c) Cr^{+6}

al. 2012), *Klebsiella* (Matasaje et al. 2011), *Acinetobacter* (Essahale et al. 2012) y *Raoultella* (Sun et al. 2015). No obstante, la dualidad resistencia a metales/plásmido no siempre se cumple. En un caso reportado para Pb la resistencia al metal fue asignada a genes cromosomales, aun determinándose resistencia a otros metales en plásmidos contenidos en la misma cepa bacteriana (Aktan et al. 2013).

Es importante señalar la baja diversidad bacteriana detectada en el suelo analizado. De acuerdo con los artículos 49 y 50 del decreto 2635 de la legislación venezolana, que establece valores permisibles para residuos sólidos empleando prácticas de confinamiento en suelos, los niveles máximos de cromo total son de 500 mg/kg, en tanto que para lixiviados se establecen 5 mg/L para Cr^{+6} y Ni^{+2} (anexo D de

dicho decreto), equivalentes a 96 y 85 μM , respectivamente (Gaceta Oficial 1998).

Evaluaciones realizadas por nuestro grupo han determinado que los niveles disponibles de estos dos metales en el suelo estudiado ($[\text{Cr}^{+6}] = 1.73 \text{ mg/kg}$, $[\text{Ni}^{+2}] = 1.25 \text{ mg/kg}$) no superan los niveles establecidos por la normativa ambiental, lo cual indicaría que los suelos no están contaminados (Sánchez 2012). No obstante, la evaluación de los parámetros bioquímicos determinados en este estudio (COT, AU y BM) arrojó valores estadística y significativamente disminuidos, al compararse con los obtenidos en el área control. Adicionalmente, la biodiversidad y carga bacterianas estuvieron seriamente disminuidas.

Es relevante mencionar que se ha reportado en la literatura que bajas concentraciones, consideradas no perjudiciales, de sustancias tóxicas pueden ejercer efectos estimuladores beneficiosos en organismos de diferentes taxa, desde bacterias a plantas y metazoos (Costantini et al. 2010, Sulmon et al. 2015), fenómeno denominado hormesis.

De hecho, las cepas bacterianas aisladas constituyen una subpoblación aclimatada a bajas concentraciones de metales, aunque la mayor parte de la microbiota se redujo drásticamente en términos de especies y carga bacteriana. Debido a esta situación, los efectos de tales concentraciones de metales y cambios en la microbiota sobre la capacidad de dichos suelos para sustentar labores agropecuarias —es decir, sobre la salud del suelo— resultan impredecibles.

En concordancia con estos resultados, la macrobiota vegetal en la parcela impactada es casi inexistente, si se le compara con la parcela testigo, y el aspecto general de la tierra (color, textura, granulosis) también muestra diferencias.

Parece pertinente que los niveles permisibles de metales en suelos deberían evaluarse nuevamente, ya que la evidencia experimental presentada en este trabajo es indicativa de que, aun con niveles de metales “relativamente bajos”, las propiedades biológicas y bioquímicas del suelo se alteraron negativamente. Por tanto, la biodiversidad y biomasa bacterianas deberían considerarse e incluirse en la legislación como bioindicadores de contaminación en suelos. Esto redundará en una mejor calidad de vida para la sociedad y en el aseguramiento de la sustentabilidad de los ambientes naturales.

Estudios de esta naturaleza constituyen voces de alerta que deberían tomar en cuenta los entes oficiales encargados de garantizar las condiciones físicas, químicas, bioquímicas y biológicas de los ecosistemas.

CONCLUSIONES

Los parámetros bioquímicos (porcentaje de COT, AU y BM) no disminuyeron estadísticamente y la RB no se afectó estadísticamente. Sin embargo, el cociente RB/BM fue elevado respecto al suelo testigo, lo cual indica empobrecimiento del material orgánico en el suelo impactado con metales y como resultado afectación de la salud del suelo.

La diversidad y carga bacterianas medidos en los suelos fueron bajos, con valores de pH 9.0 y concentraciones de metales consideradas como permisibles por la legislación venezolana vigente.

Se aislaron únicamente 12 morfotipos diferentes y se asignaron cinco de ellos a los géneros *Rhotia*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* y *Raoultella*. La carga bacteriana disminuyó en 80 y 30 % en las estaciones lluviosa y de sequía, respectivamente, al compararse con el suelo testigo.

Estos datos experimentales permiten aseverar que bajas concentraciones de metales, aun consideradas permisibles, alteran negativamente la calidad de los suelos.

REFERENCIAS

- Abskharon R.N.N., Hassan S.H.A., Gad El-Rab S.M.F. y Shoreit A.A.M. (2008). Heavy metal resistance of *E. coli* isolated from wastewater sites in Assiut City, Egypt. *Environ. Contam. Toxicol.* 81 (3), 309-315. DOI: 10.1007/s00128-008-9494-6
- Aktan Y., Tan S. y Icen B. (2013). Characterization of lead resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multimetal and antibiotic resistance. *Environ. Minit. Assess.* 185 (6), 5285-5293. DOI: 10.1007/s10661-012-2945-x
- Alboghobeish H., Tahmourespour A. y Doudi M. (2014). The study of nickel resistant bacteria (NiRB) isolated from wastewaters polluted with different industrial sources. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 12, 44. DOI: 10.1186/2052-336X-12-44
- Anderson J.P. y Domsch K.H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.* 10 (3), 215-221. DOI: 10.1016/0038-0717(78)90099-8
- Anderson J.P. (1982). Soil respiration. En: *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.* 2a ed. Soil Science Society of America, núm. 9, Winsconsin, EUA, pp 831-871.
- Bhadra B., Nanda A.K. y Chakraborty R. (2006). Inducible nickel resistance in a river isolate of India phylogenetically ascertained as a novel strain of *Acinetobacter junii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (3), 225-232. DOI: 10.1007/s11274-005-9026-z
- Black J.G. (2012). *Microbiology. Principles and explotations.* 8a ed. Jhon Wiley and Sons, Arlington, Virginia, EUA, 975 pp.
- Bozo L., Fernández M., López M., Reyes R. y Suárez P. (2007). Biomarcadores de contaminación química en comunidades bacterianas. *Interciencia* 32 (1), 8-13. DOI: 0378-1844/07/01/008-06
- Cortez J., Ruiz Y., Medina L. y Valbuena O. (2013). Efecto de medios de cultivo preparados con agua de mar sobre indicadores sanitarios en aguas marinas de balnearios en Chichiriviche, estado Falcón, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 33 (2), 122-128.
- Costantini D., Metcalfe N.B. y Monaghan P. (2010). Ecological processes in a hormetic framework. *Ecol. Lett.* 13 (11), 1435-1447. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2010.01531.X
- Couter A. (2003). Plasmid DNA supercoiling and survival in long-term cultures of *Escherichia coli*: Role of NaCl. *J. Bacteriol.* 185 (1), 5324-5327. DOI: 10.1128/JB.185.17.5324-5327.2003
- Darcan C., Ozkanga R., Idil O. y Fint K.P. (2009). Viable but non-culturable state of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in seawater. *Pol. J. Microbiol.* 58 (4), 307-317.
- Dell'Amico E., Mazzochi M., Cavalca L., Allievi L. y Andreoni V. (2008). Assessment of bacterial community structure in a long-term cooper-polluted ex-vineyard soil. *Microbial. Res.* 163 (6), 671-683. DOI: 10.1016/j.micres.2006.09.003
- Essahale A., Malki M., Marin I. y Moumami M. (2012). Hexavalent chromium reduction and accumulation by *Acinetobacter* AB1 isolated from Fez Tanneries in Morocco. *Indian J. Microbiol.* 52 (1), 48-53. DOI: 10.1007/s12088-011-0187-1
- Fontanetti C.S., Nogarol L.R., Souza R.B., Pérez D.G. y Maziviero G.T. (2011). Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. En: *Soil contamination* (Pascucci S., Ed.). InTech Rijeka, Croacia, pp. 143-168. DOI: 10.5772/25042
- Forbes B.A., Sahm D.F. y Weissfeld A.S. (2004). *Bailey y Scott. Diagnóstico microbiológico.* 11a ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1136 pp.
- Gaceta Oficial (1998). Decreto 2635. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. Reforma parcial del Decreto 2289. República Bolivariana de Venezuela. Gaceta Oficial Extraordinaria núm. 5245, 3 de agosto.
- Gadd G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156 (3), 609-643. DOI: 10.1099/mic.0.037143-0

- Holt E.A. y Miller S.W. (2010). Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. *Nature Educational Knowledge* 3 (10), 8.
- Kandeler E. y Gerber H. (1988) Short-term assay of urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fert. Soils* 6 (1), 68-72.
DOI: 10.1007/BF00257924
- Lemire J., Harrison J. y Turner R. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (6), 371-384.
DOI: 10.1038/nrmicro3028
- Malik S., Beer M., Meghara M. y Naidu R. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ. Int.* 34 (2), 265-276.
DOI: 10.1016/j.envint.2007.09.001
- Matasaje L.F., Boyd D.A., Willey B.M., Prayitno N., Kreiswirth N., Gelosia A., Poutanen S.M., Low D.E., Jenkins S.G., Katz K. y Mulvey M.R. (2011). Plasmid comparison and molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC from New York city and Toronto. *J. Antimicrob. Chemoth.* 66 (6), 1273-1277.
DOI: 10.1093/jac/dkr092
- McDougald D., Weichart D., Rice S., Gerets J. y Kjelleberg S. (1998). Nonculturability: Adaptation or debilitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25 (1), 1-9.
DOI: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00455.x
- Moraga R., Merino C. y Mondaca M.A. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investig. Mar.* 31 (1), 91-95.
DOI: 10.4067/S0717-71782003000100010
- Piotrowska-Seget Z., Cycon M. y Kozdrój J. (2005). Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl. Soil Ecol.* 28 (3), 237-246.
DOI: 10.1016/j.apsoil.2004.08.001
- Sánchez C. (2012). Evaluación toxicológica de suelos impactados por la actividad metalúrgica en Tinaquillo-Edo. Cojedes. Tesis de Licenciatura. Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela, 106 pp.
- Schmidt T. y Schlegel H.G. (1989). Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 5 (5), 315-328.
DOI: 10.1111/j.1574-6968.1989.tb03386.x
- Silver S. y Phung L.T. (2005). A bacteria view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32 (11-12), 578-605.
DOI: 10.1007/s10295-005-0019-6
- Smets B.F., Morrow J.B. y Arango-Pinedo C. (2003). Plasmid introduction in metal-stressed subsurface-derived microcosms: plasmid fate and community response. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7), 4087-4097.
DOI: 10.1128/AEM.69.7.4087-4097.2003
- Sulmon C., Baaren J., Cabello-Hurtado F., Gouesbet G., Hennion F., Mony C., Renault D., Bormans M., El Amrani A., Wiegand C. y Gérard C. (2015). Abiotic stressors and stress responses: What commonalities appear between species across biological organization levels? *Environ. Pollut.* 1987, 66-77.
DOI: 10.1016/j.envpol.2015.03.013
- Sun F., Yin Z., Feng J., Qiu Y., Zhan D., Lou W., Yang H., Yang W., Wang J., Chen W., Xia P. y Zhou D. (2015). Production of plasmid-encoding NDM-1 in *Vibrio*. High incidence of plasmids in marine *Vibrio* species. *Front. Microbiol.* 6, 458. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00458
- Tanaka T. (2014). A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (24), 7659-7666.
DOI: 10.1128/AEM.02741-14
- Torsvik V. y Øvreas L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (3), 240-245.
DOI: 10.1016/S1369-5274(02)00324-7
- Wallinga I., Kithome M., Novozamsky I., Houba V.J.G. y Van der Lee J.J. (1992). Spectrophotometric determination of organic carbon in soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 23 (16-16), 1935-1944.
DOI: 10.1080/00103629209368715
- Win W.C., Allen S.D., Janda W.M., Koneman E.W., Procop G.W., Schreckenberger P.C. y Woods G.L. (2008). *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. 6a ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1475 pp.
- Zhang K., Pan L., Zhao Z. y Gu J.D. (2012). High incidence of plasmids in marine *Vibrio* species isolate from Mai Nature Reserve of Hong Kong. *Ecotoxicology* 21 (6), 1661-1666.
DOI: 10.1007/s10646-012-0939-7