

**UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS
Y RESISTENCIA A METALES PESADOS POR BACTERIAS
ASOCIADAS A *LEMNA* SPP.**

LAUGENY DÍAZ-BORREGO, JOSÉ DUPONTT, KAROL ESPINA¹, NEIL
RINCÓN¹, MÓNICA GARCÍA Y LORENA ATENCIO¹

*Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, ¹Laboratorio de
Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad
Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526,
Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela
laugenydiazb@hotmail.com, laugeny@yahoo.com*

Resumen. Se aislaron bacterias asociadas a *Lemna* spp. y del agua circundante provenientes del Lago de Maracaibo con la finalidad de evaluar la utilización de sustratos carbonados y resistencia a metales pesados. Se realizaron análisis fisicoquímicos y análisis microbiológicos de las muestras. Las bacterias se cuantificaron, aislaron e identificaron bioquímicamente mediante protocolos convencionales. La utilización de sustratos por las bacterias se realizó en medios selectivos para detectar la producción de exoenzimas y el crecimiento en macromoléculas complejas. La resistencia bacteriana a metales pesados se hizo de acuerdo al método de difusión de discos impregnados con el metal. Se aislaron 30 cepas bacterianas distribuidas en nueve familias, siendo la más numerosa la familia Enterobacteriaceae, indicando contaminación fecal del ecosistema acuático. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia y diversidad de géneros en ambas muestras. Las bacterias fueron capaces de emplear la mayoría de las fuentes carbonadas, especialmente de azúcares simples, almidón, proteínas y lípidos, siendo incapaces de hidrolizar el ADN. El análisis de cluster reveló la formación de ocho grupos funcionales, siendo el más numeroso el número VII con 21 aislamientos, en su mayoría con actividad sacarolítica y proteolítica. Las bacterias presentaron elevada resistencia a metales pesados posiblemente debido a descargas de metales por actividad industrial en el Lago y por la capacidad de la *Lemna* para acumular metales. Es posible que las bacterias utilicen fuentes carbonadas presentes en la planta para mineralizarlas, contribuyendo al reciclaje de nutrientes en el ecosistema acuático. *Recibido: 28 marzo 2006, aceptado: 12 febrero 2007.*

Palabras clave: Bacterias, Enterobacteriaceae, *Lemna* spp., sustratos orgánicos, resistencia, metales pesados, Lago de Maracaibo.

ORGANIC SUBSTRATE UTILIZATION AND HEAVY METAL RESISTANCE
BY BACTERIA ASSOCIATED WITH *LEMNA* SPP.

Abstract. In Lake Maracaibo, bacteria associated with *Lemna* spp. and the surrounding water were isolated to evaluate the use of carbonate substrates as well as resistance to heavy metals. Both physiochemical and microbiological analysis were carried out on the samples. Bacteria were quantified, isolated and identified biochemically by using conventional protocols. Substrate use by bacteria was carried out by selecting media to detect exoenzymatic production and growth in complex macromolecules. Bacterial resistance to heavy metals was determined by the single-disk diffusion method. Thirty strains, in nine families, were isolated, but members of the Enterobacteriaceae were most common, indicating fecal contamination in the aquatic ecosystem. No significant differences in abundance and diversity of genera were detected between bacteria associated with *Lemna* spp. and the surrounding water. Bacteria were able to use most of the carbonate sources, especially simple sugars, starch, proteins and lipids, but unable to hydrolyze DNA. Cluster analysis revealed eight functional groups, but group VII was most common, with 21 isolations, most exhibiting saccharolytic and proteolytic activity. The high resistance to heavy metals presented by the bacteria may be due to discharges of metals from industrial activities in the lake, and the capacity of *Lemna* to accumulate metals. Bacteria may use carbonate sources from the plant to mineralize the organic material, thus contributing to nutrient recycling in the aquatic ecosystem. *Received: 28 March 2006, accepted: 12 February 2007.*

Key words: Bacteria, Enterobacteriaceae, *Lemna* spp., organic substrates, resistance, heavy metals, Lake Maracaibo.

INTRODUCCIÓN

La lenteja de agua (*Lemna* spp.) pertenece a las Lemnaceae, siendo las especies más frecuentes *Lemna minor*, *Lemna gibba* y *Lemna friculca*. Esta planta es procedente de Asia (Gale *et al.* 1989) pero se encuentra ampliamente distribuida en caños y drenajes ubicados en la cuenca del Lago de Maracaibo, Venezuela.

La *Lemna* bajo condiciones controladas es empleada en el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales para la remoción de nutrientes (fósforo y nitrógeno) y como indicador biológico de contaminación, debido a que se ha comprobado que absorben eficientemente nitrógeno, fósforo y metales pesados (Harvey y Fox 1973). Además, es capaz de reducir el crecimiento de fitoplancton (algas) y plantas acuáticas, compitiendo por los

nutrientes disueltos en el agua de desecho y de disminuir el contaje de coliformes en un 75% (Jain *et al.* 1989, Brix 1993, Salt *et al.* 1998, Zayed *et al.* 1998).

Estudios han comprobado que plantas de *Lemna* sp. cosechadas diariamente a una densidad promedio de 600 g/m², son capaces de rendir 18 g/m²/día. El peso seco total incluyó 40% de materia soluble (azúcares y aminoácidos), 15% de proteína, 5% de almidón, 5% de ceniza y 35% de polímeros celulósicos entre otros (Harvey y Fox 1973, Hancock y Buddhavarapu 1993). Sin embargo, Gale *et al.* (1989) reportan cerca del 35% de contenido proteico.

Se han evaluado bacterias asociadas a plantas acuáticas que actúan como simbioses para la fijación de nitrógeno atmosférico, el cual es utilizado como nutriente. Algunas bacterias epífitas pueden tener efectos negativos en el crecimiento de las macrófitas y causar envejecimiento de las hojas. Otras sin embargo, producen factores de crecimiento que son usados por *Lemna* sp., confiriendo beneficio de manera análoga a lo que se encuentra en las comunidades planctónicas (Hancock y Buddhavarapu 1993).

A inicios del año 2004 se dio un crecimiento excesivo de *Lemna* sp. en aguas del Lago de Maracaibo, Venezuela, conduciendo a una mayor eutroficación del sistema. Las causas del fenómeno probablemente sean las actividades desarrolladas dentro de la cuenca, relacionadas con aportes puntuales (ciudades) y no puntuales (actividades agrícolas) de nutrientes que actúan como fertilizantes en el crecimiento de la planta una vez que llegan al Lago, procedentes de los humedales y cuerpos de agua costeros (Soto *et al.* 2004).

Otro problema de contaminación en el Lago es atribuido a la emisión de metales pesados por la industria petroquímica. Es conocido que estos metales tienen efectos nocivos en los sistemas biológicos, aunque existen algunos microorganismos para los que ejercen un efecto selectivo creando resistencia, permitiendo así la remoción de metales tóxicos del ambiente (Cervantes *et al.* 1991, Atlas y Bartha 2002).

Debido a la alarmante diseminación de la *Lemna* en las aguas del Lago, muchos investigadores se han interesado en conocer su biología y ecología. Es por ello que resulta de gran importancia estudiar las bacterias asociadas a ésta, debido a que en este tipo de interacción, las plantas proporcionan materia orgánica disuelta que es utilizada por las bacterias para remineralizarla hasta

nutrientes aprovechables por ésta (Atlas y Bartha 2002), garantizándose de esta forma el flujo de nutrientes en el ecosistema acuático. El objetivo de este trabajo es evaluar la utilización de sustratos orgánicos y la resistencia a metales pesados de bacterias asociadas a *Lemna* spp. presente en el Lago de Maracaibo, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

TOMA DE LAS MUESTRAS

Se realizaron dos muestreos durante el período de lluvias (octubre y noviembre de 2004). Los sitios muestreados correspondieron a tres puntos de la zona litoral del Lago de Maracaibo, Venezuela. Estas zonas fueron: Isla Dorada, Parque La Marina y Santa Rosa de Agua (Fig. 1).

En cada estación se tomaron dos muestras de *Lemna* spp. fresca y dos del agua circundante. Se colectaron ~ 500 g de la planta con ayuda de una espátula desinfectada con alcohol, se colocaron asépticamente en bolsas con cierre hermético rotuladas y se trasladaron en refrigeración al laboratorio. Las muestras de agua se colectaron en botellas estériles con capacidad de 500 mL y se trasladaron en refrigeración al laboratorio.

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

Para conocer las condiciones ambientales donde se desarrollan las bacterias, se realizaron determinaciones *in situ* de temperatura, pH, salinidad, conductividad, turbidez y oxígeno disuelto de las muestras de agua con un HydroLab (Water Quality Checker, Modelo U-10, Marca Hoshiba).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Para cuantificación del número total de bacterias heterotróficas aeróbicas presentes en las muestras de la planta y en el agua, se empleó el método de dilución en placas (Madigan *et al.* 2004), que consistió en homogenizar 25 g de muestra de la planta ó diluir 25 mL de muestra de agua en 225 mL de solución salina al 0,85% y hacer diluciones seriadas de las muestras plaqueando 0,1 mL de cada dilución en placas de agar nutritivo, que se incubaron en aerobiosis por 24-48 h a 37 °C. Los resultados se expresaron en UFC/g de *Lemna* spp. o en UFC/mL de agua.

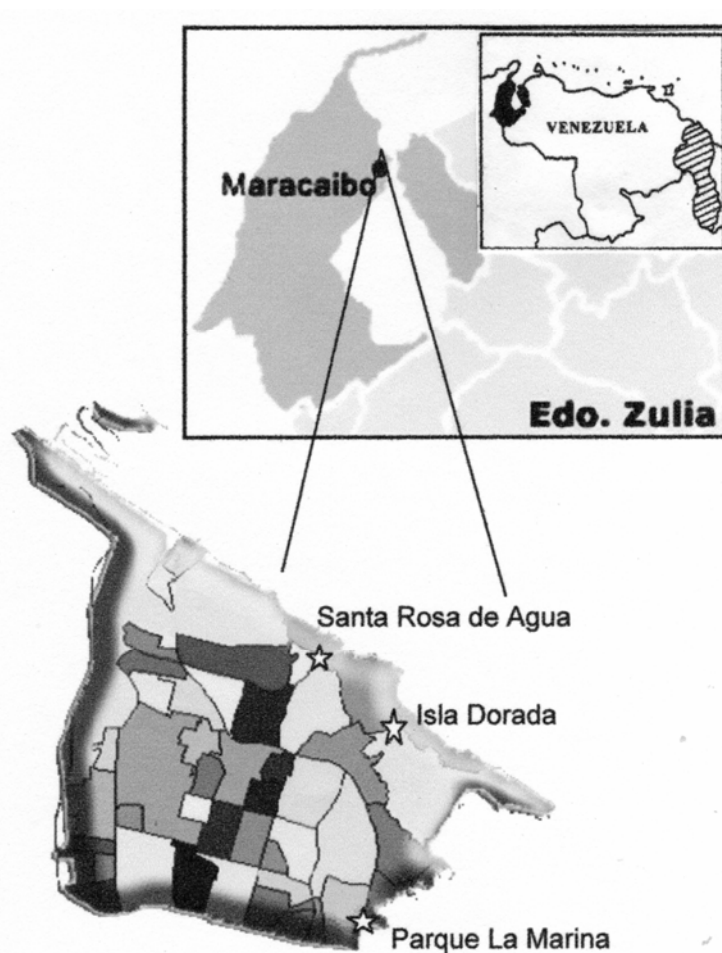


Figura 1. Ubicación del área de estudio, en la zona litoral del Lago de Maracaibo, parroquia Coquivacoa, estado Zulia, Venezuela.

Se seleccionó el 10% de las colonias desarrolladas en placas de agar nutritivo, distintas morfológicamente una de otra. Una vez aisladas, a estas colonias se les realizó una caracterización macro y micromorfológica y luego se sembraron en tubos de agar conservación (muestra stock) y en tubos de caldo nutritivo para posterior identificación, los cuales se incubaron a 30° C por 24 h. La identificación de las cepas bacterianas se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales reportadas en la literatura (Murray *et al.* 1999, MacFaddin 2000).

UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS POR LAS BACTERIAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE EXOENZIMAS

La actividad proteolítica se evaluó por la siembra de las cepas aisladas en gelatina nutritiva (MacFaddin 2000). La actividad sacarolítica en azúcares simples se realizó en agar base rojo de fenol con los siguientes azúcares al 1%: glucosa, galactosa, inositol, xilosa, dulcitol, manitol y arabinosa (monosacáridos), lactosa, manosa, sacarosa, trehalosa y celobiosa (disacáridos) y rafinosa (trisacárido). La actividad sacarolítica en azúcares complejos celulosa y pectina, y la actividad lignolítica (lignina) se evaluó según lo propuesto por Hankin y Anagnostakis (1975), mientras que la actividad amilolítica se evaluó por la siembra de las bacterias en agar nutriente con almidón al 0,2% (MacFaddin 2000). La actividad lipolítica se realizó según Sierra (1957) con aceite de maíz como fuente de lípidos; y la actividad desoxirribonucleasa se evaluó por la siembra de las cepas aisladas en agar ADN (MacFaddin 2000).

RESISTENCIA BACTERIANA A METALES PESADOS

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los metales pesados para cada aislamiento bacteriano se determinó según Fredrickson *et al.* (1988) utilizando placas de agar tripticasa de soya (TSA) y discos de papel de filtro estériles impregnados con 10 μ L de los metales: Hg^{+2} ($HgCl_2$), Cd^{+2} ($CdCl_2$), Ni^{+2} ($NiCl_2$), Zn^{+2} ($ZnCl_2$) y Cr^{+6} (K_2CrO_4) a 500, 750, 1.000, 1.500 y 2.000 ppm del metal. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h y la CMI se estableció como la concentración del metal requerida para producir una zona de inhibición de 10 mm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se empleó el programa Statistica ver 4.3, se comprobaron los supuestos de normalidad de la población con el test de rangos de Wilk-Shapiro, y de homogeneidad de varianzas por el test de Hartley. Se aplicó la prueba de *t* de student, para comparación de dos medias con un nivel de significancia del 95% y se hizo un análisis de cluster para agrupar cepas bacterianas en cuanto a su capacidad de degradación de sustratos orgánicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

El pH del agua permaneció neutro (7,0), la temperatura osciló entre 29 y 30°C, la salinidad entre 0,22 y 0,60 UPS, la conductividad entre 4,5 y 10,6 mS/cm, la turbidez fue variable entre 38 y 81 UNT y el oxígeno disuelto entre 0,15 y 0,3 mg/L (Tabla 1), favoreciendo el crecimiento de bacterias neutrófilas, mesófilas, no halófilas y anaerobias facultativas (Atlas y Bartha 2002, Madigan *et al.* 2004). Estos parámetros fueron similares a los obtenidos por Rincón *et al.* (2004) en la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, excepto por la salinidad (4,0 a 4,5 UPS) y el oxígeno disuelto (4,98 a 5,89 mg/L) que fueron mayores hacia esta zona.

Tabla 1. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua, de la zona litoral del Lago de Maracaibo.

Zona de muestreo	PH	Temperatura (°C)	Salinidad (UPS)	Conductividad (mS/cm)	Turbidez (UNT)	Oxígeno disuelto (mg/L)
Isla Dorada	7,00	29,00	0,60	11,00	38,00	0,30
Parque La Marina	7,00	30,00	0,22	4,50	81,00	0,15
Santa Rosa de Agua	7,00	29,00	0,59	10,60	45,00	0,16

Se obtuvo un recuento bacteriano en las muestras de la planta acuática de $4,85 \times 10^6$ a $1,4 \times 10^7$ UFC/g y en las muestras de agua de $6,6$ a $7,1 \times 10^5$ UFC/mL, sin diferencias significativas ($t = -1,7693$; $P > 0,05$).

Se aislaron 30 cepas bacterianas de las cuales 16 (53,33%) provinieron de muestras de la planta acuática y 14 (46,66%) de muestras de agua. Se aislaron miembros de las Enterobacteriaceae 13 (43,33%), Bacillaceae 7 (23,33%), Vibrionaceae 3 (10%), Aeromonadaceae 2 (6,66%) y de las Staphylococcaceae, Xanthomonadaceae, Alcaligenaceae, Pseudomonadaceae y Corynebacteriaceae 1(3,33%). Las Staphylococcaceae, Bacillaceae y Corynebacteriaceae fueron reportadas por Rincón *et al.* (2004) en muestras de *Lemna* spp. colectadas hacia la Costa Oriental del Lago de Maracaibo.

En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de géneros bacterianos aislados de muestras de agua y de *Lemna* spp. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia y diversidad de géneros aislados de ambas muestras ($t = -0,010$; $P > 0,05$), ya que para las muestras de agua se obtuvieron nueve géneros y para las de *Lemna* spp. diez géneros bacterianos diferentes.

Tabla 2. Porcentaje de géneros bacterianos en muestras de agua y asociados a *Lemna* spp., en la zona litoral del Lago de Maracaibo.

Género	Muestras de Agua (%)	Muestras de <i>Lemna</i> spp. (%)
<i>Bacillus</i>	14,28	31,25
<i>Proteus</i> *	21,42	6,25
<i>Enterobacter</i> *	14,28	12,50
<i>Citrobacter</i> *	14,28	6,25
<i>Vibrio</i>	7,14	12,50
<i>Aeromonas</i>	7,14	6,25
<i>Alcaligenes</i>	7,14	0
<i>Xanthomonas</i>	7,14	0
<i>Corynebacterium</i>	7,14	0
<i>Staphylococcus</i>	0	6,25
<i>Pseudomonas</i>	0	6,25
<i>Kluyvera</i> *	0	6,25
<i>Budvicia</i> *	0	6,25

*Enterobacterias.

Puede apreciarse un alto porcentaje de Enterobacterias en ambas muestras (49,98% en agua y 37,5% en *Lemna* sp.), lo que indica un alto grado de contaminación fecal en las aguas del Lago de Maracaibo. Es conocida la capacidad que posee la *Lemna* para la remoción de coliformes (enterobacterias) (Brix 1993) en el tratamiento de aguas residuales.

Los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Staphylococcus* y *Bacillus* se han reportado por otros autores para muestras de agua y sedimento del Lago de Maracaibo (Trompiz 2000, Dupontt *et al.* 2001, Sulbarán *et al.* 2004, Espina *et al.* 2005), pero no hay reportes previos que confirmen la presencia de *Kluyvera*, *Alcaligenes*, *Xanthomonas*, *Budvicia*, *Citrobacter* y *Enterobacter*, los cuales se aislaron en este trabajo. Los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus* también se aislaron a partir de muestras de *Lemna* spp. de la Costa Oriental del Lago de Maracaibo por Rincón *et al.* (2004).

UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS POR LAS CEPAS BACTERIANAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE EXOENZIMAS

En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de bacterias que utilizan los diversos sustratos orgánicos. Los mayores porcentajes se obtuvieron para la actividad sacarolítica de azúcares simples en más de un 50% de aislamientos para glucosa, galactosa, rafinosa, sacarosa e inositol, mientras que menos del 50% de las cepas degradaron xilosa, manosa, lactosa, manitol, trehalosa, arabinosa y celobiosa. De los azúcares complejos el almidón fue el mayormente empleado (53,33%), seguido por celulosa (43,33%) y pectina (3,33%). La lignina fue degradada por el 23,33% de los aislamientos.

Tabla 3. Porcentaje de bacterias que utilizan sustratos orgánicos.

Actividad Funcional	Porcentaje de Bacterias (%)
Proteolítica	46,66
Lipolítica	23,33
glucosa	93,33
galactosa	86,66
rafinosa	80,00
sacarosa	66,66
inositol	53,33
xilosa	46,66
manosa	43,33
lactosa	40,00
manitol	33,33
dulcitol	33,33
trehalosa	30,00
celobiosa	20,00
arabinosa	20,00
sacarolítica: azúcares complejos	
almidón	53,33
celulosa	43,33
pectina	3,33
Actividad lignolítica	23,33
Actividad desoxirribonucleasa	0,00

Los azúcares simples y aminoácidos se encuentran en la *Lemna* en un 40% (Gale *et al.* 1989). En este sentido, los monosacáridos fueron los más frecuentemente utilizados por las bacterias posiblemente por su estructura

química sencilla. A pesar de que la rafinosa es un trisacárido, éste fue usado por un porcentaje de bacterias mayor (80%) que los correspondientes a los disacáridos y algunos monosacáridos (Tabla 3). Esto puede deberse a que su estructura química consiste de moléculas de glucosa, galactosa y fructosa, siendo los dos primeros monosacáridos degradados por un alto número de bacterias (93,33% y 86,66% respectivamente).

De los polisacáridos, el almidón fue el mayormente degradado (53,33%) similarmente a lo reportado por Sulbarán *et al.* (2004). El almidón es el principal polisacárido de reserva de las plantas, representando un 5% del peso seco de la *Lemna*. Está formado por varias unidades de glucosa unidas por enlaces α -1-4 y α -1-6 glicosídicos, y los microorganismos lo hidrolizan mediante la enzima amilasa para obtener glucosa e incorporarla al metabolismo celular (Rawn 1989).

La celulosa fue el segundo polisacárido mayormente utilizado por las bacterias, y está presente en la pared celular vegetal, formado por moléculas de glucosa unidas por enlaces β -1,4 glicosídicos que son más difíciles de romper que los correspondientes al almidón (Rawn 1989). En la *Lemna* se ha reportado un 35% de peso seco de celulosa, que puede ser hidrolizada por los microorganismos mediante la celulasa que rompe estos enlaces y liberan moléculas de glucosa (Gale *et al.* 1989). Se obtuvo un porcentaje de bacterias celulolíticas (43,33%) similar a lo obtenido por Sulbarán *et al.* (2004).

La pectina es un polisacárido formado por variedad de compuestos, como residuos de ácido-D-galacturónico y arabinogalactano, xilosa, fucosa, ácido glucorónico y ácido desoxioctiónico (KDO) entre otros, unidos por enlaces 1-4, glicosídicos. La pectinasa, es la enzima capaz de hidrolizarla y está presente en hongos y en algunas bacterias (Rawn 1989). Se obtuvo un único aislamiento (3,33%) capaz de crecer en presencia de este polisacárido, debido a la complejidad de su estructura química y a restricciones enzimáticas de las bacterias. Este resultado fue diferente a lo obtenido por Sulbarán *et al.* (2004) quienes reportan un 54,54% de cepas degradadoras, provenientes de otra zona del Lago de Maracaibo (Costa Oriental), donde probablemente existan otros aportes de pectina presentes en la materia orgánica suspendida.

La lignina es una macromolécula que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropiónicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico), conformando un complejo aromático (no carbohidrato), degradado por algunos microorganismos por la enzima ligninasa. La pectina y la lignina están presentes en la pared celular vegetal, en la corteza de los árboles y en los frutos y son los más

difícilmente degradados por los microorganismos (Rawn 1989). Esto explica el menor porcentaje de bacterias degradadoras de estas macromoléculas, en comparación con el almidón y la celulosa.

La actividad proteolítica fue realizada por el 46,66% de los aislamientos bacterianos. El estudio realizado por Soto *et al.* (2004) señala que muestras de la planta acuática tomada de la zona litoral del Lago de Maracaibo poseen un 30,34% de proteína, que pudieran ser utilizadas por bacterias proteolíticas asociadas a la *Lemna* spp.

La actividad lipolítica fue realizada por el 23,33% de las bacterias, por lo que se presume que en la planta estén presentes grasas y aceites, aunque no se encontraron reportes sobre la composición de lípidos en la planta.

La actividad desoxirribonucleasa confiere propiedad patogénica a las bacterias (MacFaddin 2000), pero no fue detectada en este trabajo. Sulbarán *et al.* (2004) encontraron un 45,45% de bacterias Gram positivas con esta actividad, en otra zona del Lago.

En el análisis de agrupamiento a un 80% de similitud, se realizó con las 30 cepas bacterianas, dada la similitud encontrada en la abundancia y diversidad de géneros en ambas muestras (Fig. 2).

En el cluster se conformaron ocho grupos funcionales con predominio de las actividades sacarolíticas y proteolíticas, posiblemente debido a la mayor solubilidad de estos sustratos y a su estructura química más accesible al ataque enzimático (Atlas y Bartha 2002). A continuación se describen cada uno de los grupos formados:

Grupo funcional I: representado por dos aislamientos (6,66%), las cepas *Budvicia* sp. PML7 y *Aeromonas* sp. PMA5 (provenientes de muestras de *Lemna* spp. y de agua, respectivamente) que tienen en común la utilización de azúcares simples glucosa, xilosa, inositol, galactosa, manitol, lactosa y el polisacárido complejo lignina.

Grupo funcional II: representado por la cepa *Bacillus* sp. IDL2 (3,33%) que posee actividad proteolítica y sacarolítica en glucosa, dulcitol, galactosa, manitol, dulcitol, manosa, trehalosa, celobiosa, rafinosa y almidón.

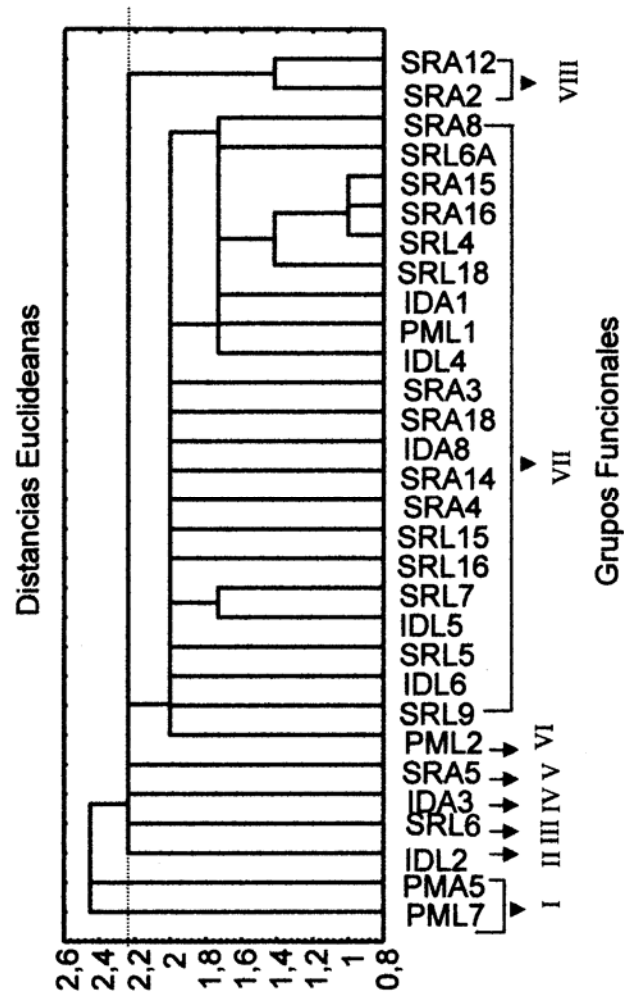


Figura 2. Análisis de agrupamiento en función de la utilización de sustratos orgánicos por las bacterias.

Grupo funcional III: Conformado por la cepa *Bacillus* sp. SRL6 (3,33%) con exclusiva actividad sacarolítica en glucosa, manitol, xilosa, sacarosa, rafinosa y celobiosa.

Grupo funcional IV: Conformado por la cepa *Citrobacter* sp. IDA3 (3,33%) con actividad sacarolítica en glucosa, galactosa, manitol, arabinosa, manosa, lactosa, trehalosa, almidón y celulosa.

Grupo funcional V: Representado por la cepa *Vibrio* sp. SRA5 (3,33%) que presenta actividad lipolítica y degradación de azúcares simples y complejos: xilosa, galactosa, rafinosa, almidón, celulosa y lignina.

Grupo funcional VI: Representado por la cepa *Enterobacter* sp. PML2 (3,33%) con actividad sacarolítica exclusiva hacia glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, inositol, sacarosa, lactosa, rafinosa, celobiosa, celulosa y lignina.

Grupo funcional VII: Conformado por 21 aislamientos (70%), cepas *Enterobacter* sp. SRL9, *Kluyvera* sp. IDL6, *Vibrio* sp. SRL5, *Pseudomonas* sp. IDL5, *Aeromonas* sp. SRL7, *Staphylococcus* sp. SRL16, *Bacillus* sp. SRL15, *Proteus* sp. SRA4, *Alcaligenes* sp. SRA14, *Proteus* sp. IDA8, *Citrobacter* sp. SRA18, *Xanthomonas* sp. SRA3, *Vibrio* sp. IDL4, *Bacillus* sp. PML1, *Enterobacter* sp. IDA1, *Citrobacter* sp. SRL18, *Proteus* sp. SRL4, *Bacillus* sp. SRL16, *Bacillus* sp. SRA15, *Bacillus* sp. SRL6A y *Bacillus* sp. SRA8, con actividad proteolítica en 11 aislamientos y actividad sacarolítica en azúcares simples en todos los aislamientos, siendo los más utilizados glucosa y rafinosa (21 aislamientos).

Grupo funcional VIII: Representado por las cepas *Enterobacter* sp. SRA2 y *Corynebacterium* sp. SRA12, ambas provenientes de muestras de agua, las cuales presentaron actividad proteolítica y sacarolítica en glucosa, galactosa, manitol, xilosa, lactosa, trehalosa, celobiosa y rafinosa. La cepa SRA12 fue la única en degradar pectina.

A pesar de que no se demostró si las bacterias están aportando un rol en la mineralización de materia orgánica, la habilidad para utilizar diversas fuentes carbonadas presentes en la planta, permite presumir que efectivamente tienen la capacidad para degradarlas e incorporarlas a su metabolismo celular.

RESISTENCIA BACTERIANA A METALES PESADOS

La aparición de cepas bacterianas resistentes a metales pesados en el Lago de Maracaibo está condicionada a las actividades de la industria petroquímica que opera a sus alrededores y a los frecuentes derrames petroleros (Gardner *et al.* 1998). Como se observa en la Tabla 4, todas las cepas bacterianas presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) a más de 2.000 ppm de níquel y zinc, los cuales en concentraciones traza son empleados por las bacterias para sus actividades metabólicas (Madigan *et al.* 2004), pero las altas concentraciones empleadas en el trabajo permiten clasificarlos como “metales pesados” (Cervantes *et al.* 1991). Estos resultados son comparables a los re-

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas bacterianas a los metales pesados (%).

Metal pesado	CMI < 500 ppm	CMI 750 ppm	CMI 1.000 ppm	CMI 1.500 ppm	CMI > 2.000 ppm
Hg ⁺²	60	20	10	0	10
Cd ⁺²	3,33	0	0	13,33	83,33
Cr ⁺⁶	3,33	0	6,66	43,33	50
Ni ⁺²	0	0	0	0	100
Zn ⁺²	0	0	0	0	100

portados por Espina *et al.* (2005) quienes obtuvieron CMI de más de 2.000 ppm, para ambos metales, en bacterias aisladas de ambientes contaminados con petróleo en el municipio Cabimas, estado Zulia.

Para el mercurio se obtuvo menor resistencia bacteriana, puesto que un 60% de las cepas presentaron una CMI menor a 500 ppm y sólo un 10% de más de 2.000 ppm. Para el cadmio y el cromo, se observó mayor resistencia, sólo un 3,33% de las cepas tuvieron una CMI de 500 ppm, para ambos metales, mientras que el 83,33% y 50% de las cepas, respectivamente, tuvieron una CMI de más de 2.000 ppm. Las CMI de estos metales, fueron mayores a las reportadas por Dupont *et al.* (2001) en bacterias aisladas de sedimento contaminado con petróleo de la región zuliana, y por otros autores a nivel internacional (Cervantes *et al.* 1991, Fredrickson *et al.* 1991, Remacle *et al.* 1992), pero fueron similares a las obtenidas por Espina *et al.* (2005) en la región zuliana.

La mayor susceptibilidad de las cepas bacterianas hacia el mercurio se debe a su alto efecto tóxico en los sistemas biológicos, en comparación con el resto de los metales pesados ensayados, con diferentes mecanismos de acción y de resistencia bacteriana (Cervantes *et al.* 1991).

Los mecanismos de resistencia bacteriana a los metales pesados son variados y están dados frecuentemente por elementos genéticos móviles (plásmidos o transposones) (Cervantes *et al.* 1991, Bhattacharya *et al.* 2000, Atlas y Bartha 2002), por lo que es posible que en las bacterias aisladas se susciten fenómenos de transferencia de genes de resistencia. Esto se apoyaría por el hecho de que la *Lemna* es capaz de acumular metales pesados (Harvey y Fox 1973, Jain *et al.* 1989, Dirilgen e Inel 1994), lo que pudiera inducir la expresión de la resistencia a metales en bacterias asociadas a ésta.

CONCLUSIONES

Los géneros bacterianos encontrados en la *Lemna* fueron similares en abundancia y diversidad a los encontrados en el agua circundante, siendo la familia Enterobacteriaceae la de mayor número de géneros, lo que sugiere contaminación fecal de las aguas del Lago de Maracaibo, donde habita la planta acuática. Las bacterias aisladas utilizaron diferentes fuentes carbonadas que están representadas en la composición química de la *Lemna*, contribuyendo a la mineralización de la materia orgánica. La elevada resistencia bacteriana a los metales pesados podría estar condicionada a una respuesta adaptativa frente a la presión de selección ejercida por los metales que son incorporados al cuerpo de agua y a la *Lemna*, producto de la actividad industrial que opera alrededor del Lago de Maracaibo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) proyecto N° 292-05 por el apoyo logístico prestado para el desarrollo de esta investigación. A José Zambrano, Penélope Melo, Arminda Sulbarán y Erika Urribarrí por su ayuda en el procesamiento de las muestras.

LITERATURA CITADA

- ATLAS, R. Y R. BARTHA. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental (4 ed.). Editorial Pearson Educación, S. A., Madrid, 677 pp.
- BHATTACHARYA, M. S., S. ROY, D. BISWAS Y R. KUMAR. 2000. Effect of Mg⁽²⁺⁾ ion in protein secretion by magnesium-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio parahaemolyticus* from the coastal water of Haldia port. FEMS Microbiology Letters 185(2): 151–156.
- BRIX, H. 1993. Wastewater treatment in constructed wetlands: System design, removal processes, and treatment performance. Pp. 23–44, en G. A. Moshiri (ed.), Constructed wetlands for water quality improvement. CRC Press Inc./Lewis Publishers, Miami, FL, 220 pp.
- CERVANTES, C., J. CHÁVEZ Y S. VACA. 1991. Mecanismos de resistencia bacteriana a metales pesados. Revista Latinoamericana de Microbiología 33: 61-70.
- DIRILGEN, N. Y Y. INEL. 1994. Effects of zinc and copper on growth and metal accumulation in duckweed, *Lemna minor*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53: 442–449.

- DUPONTT, J., L. DÍAZ, L. ATENCIO Y A. PÉREZ. 2001. Susceptibilidad a Hg^{+2} y Cd^{+2} en cepas bacterianas biodegradadoras de antraceno aisladas de la playa "Caimare Chico", estado Zulia. Bol. Centro Invest. Biol 35(3): 242–258.
- ESPINA, K., P. MELO, M. GARCÍA, N. RINCÓN Y L. DÍAZ. 2005. Resistencia a iones metálicos y degradación de hidrocarburos de bacterias aisladas de ambientes contaminados con petróleo, municipio Cabimas, estado Zulia. Resúmenes, LV Convención Anual de AsoVAC, 20 al 25 de noviembre, Caracas, Venezuela, p. 161.
- FREDRICKSON, J. K., R. J. HICKS, S. W. LI Y F. J. BROCKMAN. 1988. Plasmid incidence in bacteria from deep subsurface sediments. Applied and Environmental Microbiology 54(12): 2916–2923.
- FREDRICKSON, J. K., F. J. BROCKMAN, D. J. WORKMAN, S. W. LI Y T. O. SEVENS. 1991. Isolation and characterization of a subsurface bacterium capable of growth on toluene, naphthalene, and other aromatic compounds. Applied and Environmental Microbiology 57(3): 796–803.
- GALE, J., D. T. SMERNOFF, B. A. MACLER Y R. D. MACELROY. 1989. Carbon balance and productivity of *Lemna gibba*, a candidate plant for CELSS." Advances in Space Research 9(8):43–52.
- GARDNER, W., J. CAVALETTO, H. BOOTSMA, P. LAVRENTYV Y F. TRONCONE. 1998. nitrogen cycling rates and light effects in tropical Lake Maracaibo Venezuela. Limnology and Oceanography 43(8): 1815–1825.
- HANCOCK, S. J. Y L. BUDDHAVARAPU. 1993. Control of algae using duckweed (*Lemna*) systems. Pp. 324-334, en G. A. Moshiri (ed.), Constructed wetlands for water quality improvement. CRC Press Inc./Lewis Publishers, Miami, FL, 556 pp.
- HANKIN, L. Y S. L. ANAGNOSTAKIS. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67: 597–607.
- HARVEY, R. M. Y J. L. FOX. 1973. Nutrient removal using *Lemna minor*. Journal Water Pollution Control Federation 45: 1928–1938.
- JAIN, S. K., P. VASUDEVAN Y N. K. JHA. 1989. Removal of some heavy metals from polluted water by aquatic plants: Studies on duckweed and water velvet. Biological Wastes 28: 115–126.
- MADIGAN, M. T, J. M. MARTINKO Y J. PARKER. 2004. Biología de los microorganismos (10 ed.). Editorial Prentice Hall Inc., México, 1011 pp.
- MACFADDIN, J. F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria (3 ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 912 pp.
- MURRAY P., E. BARON, M. PFALLER, F. TENOVER Y R. YOLKEN. 1999. Manual of clinical microbiology (6 ed.). ASM Press, Washington D. C., 1773 pp.
- RAWN, D. J. 1989. Bioquímica, Vol 1. Interamericana Mc Graw-Hill, Madrid, España, 210 pp.
- REMACLE, K., I. MUGURUZA Y M. FRANSOLET. 1992. Cadmiun removal by a strain of *Alcaligenes denitrificans* isolated from a metal-polluted pond. Water Research 26(7): 923–926.
- RINCÓN, N., A. SULBARÁN, P. MELO, K. ESPINA, J. DUPONTT Y L. DIAZ. 2004. Caracterización e identificación de bacterias asociadas a *Lemna* sp. Resúmenes,

- X Jornadas de Investigación Científica, 26 al 29 de octubre de 2004, Maracaibo, Venezuela, p. 66.
- SALT, D. E., R. D. SMITH Y I. RASKIN. 1998. Phytoremediation. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 643–648.
- SIERRA, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek 23: 15–22.
- SOTO, N., L. SHUHAIBAR, J. PARRA, A. FERRER, A. SEMPRUM Y J. E. RINCÓN. 2004. Caracterización de poblaciones de *Lemna obscura* (Austin) Daubs en el Lago de Maracaibo. Resúmenes, X Jornadas de Investigación Científica, 26 al 29 de octubre de 2004, Maracaibo, Venezuela, p. 61.
- SULBARÁN, A., N. RINCÓN, P. MELO, K. ESPINA, J. DUPONTT Y L. DÍAZ. 2004. Actividades funcionales de bacterias asociadas a *Lemna* sp. Resúmenes, X Jornadas de Investigación Científica, 26 al 29 de octubre de 2004, Maracaibo, Venezuela, p. 66.
- TROMPIZ, J. 2000. Identificación de diferentes especies de *Vibrio* en muestras de agua y ostras en el Gran Eneal, Municipio Páez. Resúmenes, VII Congreso Venezolano de Microbiología “Elsa la Corte Anselmi”, 05 al 08 de Noviembre, Maracaibo, Venezuela, p. 106.
- ZAYED, A., S. GOWTHAMAN Y N. Terry. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. Journal Environmental Quality 27: 71–77.