

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS ÁREA BIOT. VEG. O TOXICOLOGÍA.

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE  
ADAPTACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS PRESENTES EN  
SUELOS CONTAMINADOS POR ACTIVIDADES MINERAS”**

PRESENTA:

MARIE ELI DE LEÓN BALLI

TUTOR: DR. EN C. FRANCISCO JAVIER AVELAR GONZÁLEZ  
COTUTORA: DRA. MAGDALENA SAMANTA RAMOS GÓMEZ  
ASESORA: ALMA LILIÁN GUERRERO BARRERA

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



**CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL**

**M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**PRESENTE**

Por medio del presente como **TUTOR** designado de la estudiante **MARIE ELI DE LEÓN BALLI** con ID 260594 quien realizó la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS PRESENTES EN SUELOS CONTAMINADOS POR ACTIVIDADES MINERAS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *ella* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a día 16 de junio de 2021.**

**Francisco Javier Avelar González**  
Tutor de Tesis/Trabajo práctico

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

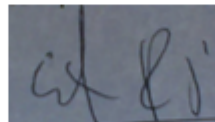
Código: DO-SEE-FO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 17/06/19

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio de la presente como TUTOR designado del estudiante: MARIE ELI DE LEON BALLI con ID 260594 quien realizó la tesis titulada: "IDENTIFICACION DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS PRESENTES EN SUELOS CONTAMINADOS POR ACTIVIDADES MINERAS", un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a 17 de junio de 2021.



Dra. Magdalena Samanta Ramos Gómez  
Tutor de tesis

 Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

---



**CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL**

**M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**PRESENTE**

Por medio del presente como **ASESORA** designada de la estudiante **MARIE ELI DE LEÓN BALLI** con ID 260594 quien realizó la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS PRESENTES EN SUELOS CONTAMINADOS POR ACTIVIDADES MINERAS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *ella* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a día 16 de junio de 2021.

**Alma Lillán Guerrero Barrera**  
Asesor de Tesis/Trabajo práctico

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SES-PO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 17/05/21

NOMBRE: MARIE ELI DE LEÓN BALLI
PROGRAMA: MAESTRA EN CIENCIAS ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA
TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico
ID: 260594

TÍTULO: IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS PRESENTES EN SUELOS CONTAMINADOS POR ACTIVIDADES MINERAS
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Generación de conocimiento científico. Se logró encontrar dos tipos de bacterias con capacidades por formar bacteriana con capacidades de remoción de Plomo en soluciones acuosas.

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NA Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc.)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
NA Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- NA Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
NA El estudiante es el primer autor
NA El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
NA En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
NA Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
NA La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI X
No

FIRMAS

Elaboró:
\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Elsa Marcela Ramírez López
Dra. en C. Elsa Marcela Ramírez López

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Raquel C. Ferrero Alba
Dra. en C. Raquel C. Ferrero Alba

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:
NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Haydée Martínez Rivalcaba
Dra. en C. Haydée Martínez Rivalcaba

Autorizó:
NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

Jorge Martín Alfaro Chávez
M. en C. Jorge Martín Alfaro Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 20/06/19

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme llegar hasta este punto.

A mi familia por siempre estar presente con su apoyo y amor aún en la distancia, sin ustedes no hubiera sido posible culminar esto.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) la beca recibida durante la maestría, así como a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por su soporte y atención brindada.

A mis compañeros y profesores por ayudarme en mi preparación para culminar este posgrado.

A mis tutores el Dr. Francisco Javier Avelar, la Dra. Magdalena Samanta Ramos Gómez, y la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera, por compartir su conocimiento y brindarme las herramientas necesarias para realizar este trabajo.

A las ingenieras, Ing. Laura Yamamoto y Ing. Fabiola Galindo muchas gracias por el apoyo incondicional.

A mis amigos, por hacer más amena mi estancia en esta carrera.

**DEDICATORIA**

A mi madre Florilda De León por todo el esfuerzo que ha realizado para sacarme adelante, por su amor y entrega, a mis tías Yolanda y Rufina De León por su apoyo incondicional, a mi hermano Jesús N. De León y a mis abuelos Eliseo y Luisa, ustedes han sido mi principal motor para salir adelante, con todo mi cariño les dedico este trabajo.



*“Las mejores cosas de la vida están en el otro lado de tu miedo máximo”*

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	6
<b>ABSTRACT</b>	7
<b>INTRODUCCIÓN</b>	8
Problemática ambiental asociada a metales	8
Uso de microorganismos en tratamientos de biorremediación de metales.	9
<b>1. ANTECEDENTES</b>	11
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	13
2.1. EL SUELO	13
2.1.1. Componentes del suelo	14
2.1.2. Parámetros edafológicos que determinan la capacidad del suelo para acumular metales.	16
2.1.3. Contaminación del suelo	19
2.2. METALES	20
2.2.1. Fuentes de exposición a los metales	22
2.2.2. Efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas	23
2.3. BACTERIAS	23
2.3.1. Bacterias Gram Negativas y Gram Positivas	25
2.3.2. Bacterias del suelo	27
2.4. TOLERANCIA Y RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS A LOS METALES PESADOS	28
2.5. INTERACCIONES BACTERIA- METAL	29
2.5.1. Biomineralización	30
2.5.2. Biotransformación	31
2.5.3. Quimiosorción	31
2.5.4. Bioacumulación	31
2.5.5. Biosorción	31
2.6. BIORREMEDIACIÓN	34
2.7. ISOTERMA DE LANGMUIR	35
2.8. REACCIÓN EN CADENA POLIMERASA (PCR)	38
<b>3. METODOLOGÍA</b>	42
3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	42
3.2 IDENTIFICACION DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS DEL SUELO	43
3.2.1 Muestreo del suelo	43



3.2.2	<b>Preparación del suelo muestreado para el análisis.</b>	46
3.2.3	<b>Técnicas utilizadas para la caracterización de parámetros físicos y químicos del suelo.</b>	47
3.3	<b>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</b>	48
3.3.1	<b>Enriquecimiento de microorganismos</b>	48
3.3.2	<b>Aislamiento de bacterias por la técnica de dilución en placa</b>	48
3.3.3.	<b>Caracterización de la morfología microbiológica</b>	49
3.4	<b>ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS EN BACTERIAS</b>	52
3.5	<b>PRUEBA PCR PARA IDENTIFICAR <i>PSEUDOMONAS</i></b>	53
3.5.1	<b>Extracción de ADN</b>	53
3.5.2	<b>Método (PCR)</b>	53
3.6.	<b>PRODUCCIÓN DE BIOMASA</b>	56
3.7.	<b>PRUEBAS DE BIOADSORCIÓN DE Cr (II) Y Pb (II) USANDO BIOMASA BACTERIANA INACTIVA</b>	56
3.8.	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b>	57
3.8.1	<b>Determinar los %de remoción</b>	57
3.8.2.	<b>Construcción de las gráficas de % de remoción de metal en el solvente por tiempo para cada cepa con Cr y Pb.</b>	58
3.8.3.	<b>Linealización de la isoterma de Langmuir</b>	58
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	60
4.1.	<b>RESULTADOS FÍSICOQUÍMICOS DEL SUELO</b>	60
4.1.1.	<b>Identificación de las zonas de muestreo</b>	60
4.1.2.	<b>pH</b>	62
4.1.3.	<b>Conductividad Eléctrica (CE)</b>	63
4.1.4.	<b>Potencial Redox</b>	64
4.1.5.	<b>Materia Orgánica (M.O.)</b>	66
4.2.	<b>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</b>	79
4.3.	<b>ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS EN BACTERIAS</b>	84
4.4.	<b>RESULTADOS PCR</b>	87
4.5.	<b>PRUEBAS DE ADSORCIÓN</b>	88
4.6.	<b>LINEALIZACIÓN POR MODELO DE LANGMUIR Y DETERMINACIÓN DE QMAX</b>	92
4.6.4.	<b>Isoterma de Langmuir para Cromo con biomasa 4G2</b>	94
5.	<b>CONCLUSIONES</b>	95
6.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	97

**INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Comparación de las características de las bacterias Gram positivas vs Gram Negativas	25
Tabla 2. Técnicas utilizadas para las pruebas fisicoquímicas	47
Tabla 3. Sales utilizadas	48
Tabla 4. Reactivos utilizados en el PCR	54
Tabla 5. Porcentajes de composición del Oligo Reverse	54
Tabla 6. Porcentajes de composición del Forward	55
Tabla 7. Coordenadas y Descripción de las áreas de muestreo	60
Tabla 8. Resultados fisicoquímicos de las muestras de suelo	61
Tabla 9. Clasificación de los suelos en función a su acidez	62
Tabla 10. Resultados de la clasificación textural del Suelo.	68
Tabla 11. Valores guía referenciales para concentraciones admisibles de metales en suelos	69
Tabla 12. Medias de las concentraciones de Cadmio en las Muestras de Suelo en PPM.	70
Tabla 13. Medias de las concentraciones de Cobre en las Muestras de Suelo en PPM.	71
Tabla 14. Medias de las concentraciones de Cromo en las Muestras de Suelo en PPM.	72
Tabla 15. Medias de las concentraciones de Hierro en las Muestras de Suelo en PPM.	73
Tabla 16. Medias de las concentraciones de Manganeso en las Muestras de Suelo en PPM.	74
Tabla 17. Medias de las concentraciones de Níquel en las Muestras de Suelo en PPM.	76
Tabla 18. Medias de las concentraciones de Plomo en las Muestras de Suelo en PPM.	77
Tabla 19. Medias de las concentraciones de Zinc en las Muestras de Suelo en PPM.	78
Tabla 20. Resumen de los resultados fisicoquímicos en cada muestra de Suelo.	79
Tabla 21. Resultados de la identificación micro y macro biológica de las cepas.	81
Tabla 22. Resultados de crecimiento de cepas en metal por el método del antibiograma modificado.	84
Tabla 23. Resultados de Concentraciones finales, porcentaje de bioadsorción y afinidad de sorción (q) por tiempo de la biomasa de la cepa 1A en Pb.	89
Tabla 24. Resultados de Concentraciones finales, porcentaje de bioadsorción y afinidad de sorción (q) por tiempo de la biomasa de la cepa 4G2 en Pb.	89
Tabla 25. Resultados de Concentraciones finales, porcentaje de bioadsorción y afinidad de sorción (q) por tiempo de la biomasa de la cepa 1A en Cr.	90

Tabla 26. Resultados de Concentraciones finales, porcentaje de bioadsorción y afinidad de sorción (q) por tiempo de la biomasa de la cepa 4G2 en Cr.	91
--	----

**INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Diferencias entre Gram positivas (a) y Gram Negativas (b).	26
Figura 2. Fases del ciclo PCR.	40
Figura 3. Representación de electroforesis de una reacción	41
Figura 4. Estrategia metodológica	42
Figura 5. Foto de la Mina Real de Asientos	44
Figura 6. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.	45
Figura 7. Tipos de formas de elevación	51
Figura 8. Formas Macroscópicas.	51
Figura 9. Tipos de Formas del Borde.	52
Figura 10. Grafica de barras de los valores de pH por muestra de suelo.	53
Figura 11. Grafica de barras de los valores de Conductividad Eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) por muestra de suelo.	64
Figura 12. Grafica de barras de los valores de Potencial Redox por muestra de suelo.	65
Figura 13. Clasificación de los suelos no volcánicos según el porcentaje de materia orgánica	66
Figura 14. Grafica de barras de los valores de % de Materia Orgánica por muestra de suelo.	67
Figura 15. Triángulo textural del suelo, USDA.	67
Figura 16. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Cd en Suelo.	70
Figura 17. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Cobre en Suelo.	71
Figura 18. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Cromo en Suelo.	72
Figura 19. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Fierro en Suelo	74
Figura 20. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Manganeso en Suelo.	75
Figura 21. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Ní en Suelo.	76
Figura 22. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Pb en Suelo.	77
Figura 23. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Zn en Suelo	78

Figura 24. Ejemplos de las colonias sembradas en cajas con Agar Nutritivo por la técnica de estría cruzada.	80
Figura 25. Gráfico de columnas de los metales en dónde se obtuvo crecimiento	86
Figura 26. Ejemplos de cepas que generaron color rojizo en el área de Plomo.	87
Figura 27. Resultados de PCR. a) Resultados de Electroforesis b) Acomodo de las muestras por carril.	87
Figura 28. Porcentaje de bioadsorción de plomo de la biomasa de las cepas 1A vs 4G2 función del tiempo.	89
Figura 29. Porcentaje de bioadsorción de cromo de la biomasa de las cepas 1A vs 4G2 función del tiempo	91
Figura 30. Linealización de la isoterma de Langmuir para Pb usando la biomasa de la cepa IA	92
Figura 31. Linealización de la isoterma de Langmuir para Pb usando la biomasa de la cepa 4G2	93
Figura 32. Linealización de la isoterma de Langmuir para Cr usando la biomasa de la cepa 1A	94
Figura 33. Linealización de la isoterma de Langmuir para Cromo usando la biomasa de la cepa 4G2 102	94

## RESUMEN

El impacto eco-tóxico que manifiestan los metales a nivel global implica la búsqueda de alternativas de biorremediación eficientes, para esto, en el presente trabajo se buscó dilucidar al menos un mecanismo de interacción bacteria-metal con uso potencial para la remoción de estos contaminantes. Como sitio de muestreo se eligió el municipio de Asientos, Ags., Méx., debido a que es un municipio donde se ha llevado a cabo la minería durante décadas y sus suelos eran candidatos para encontrar bacterias que presentaran mecanismos de interacción con metales. Se tomaron 6 muestras compuestas de suelo a distintas distancias de la fuente de emisión (Mina de Asientos) a cada muestra se le midieron parámetros fisicoquímicos como pH, Conductividad eléctrica, potencial redox, % de materia orgánica, se determinó su textura y la concentración de metales (Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn) con el fin de conocer las características de los suelos donde se desarrollaron las cepas bacterianas. De las muestras se aislaron 23 cepas bacterianas estas se sometieron a pruebas utilizando una técnica modificada de antibiograma, en la que se expuso a las colonias a Cd, As, Cr, Pb y Zn a 500 ppm., en dicha prueba 20 colonias tuvieron crecimiento en As, 15 en Pb, 10 en Cd, 8 en Cr y 4 en Zn. El metal en el que hubo mayor respuesta de crecimiento fue As, seguido de Cd, Pb, Cr y Zn. Se seleccionaron 2 de las cepas que en la prueba crecieron en 4 metales (1A y 4G2) para llevar a cabo estudios de bioadsorción con Pb y Cr, en estas pruebas la biomasa generada con la cepa 1A presentó una  $Q_{max}$  en Pb de 294.117 mg Pb/g. y en Cr 10.615 mg Cr/g, mientras que con la cepa 4G2 se obtuvo en Pb una  $Q_{max}$  de 177.30 mg Pb/g y en Cr una  $Q_{max}$  igual a 21.2 mg Cr/g.

## ABSTRACT

The eco-toxic impact that metals manifest at a global level implies the search for efficient bioremediation alternatives, therefore, in this work we sought to elucidate at least one mechanism of bacteria-metal interaction with potential use for the removal these contaminants. The municipality of Asientos, Ags., Mex. Was chosen as the sampling site, because it is a municipality where mining has been carried out for decades and its soils were candidates to find bacteria that present mechanisms of interaction with metals. 6 soil composite samples were taken at different distances from the emission source (Asientos Mine), each sample was measured physicochemical parameters such as pH, electrical conductivity, redox potential, % organic matter, texture, and concentration of metals (Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) to know the characteristics of the soils where the bacterial strains developed. 23 bacterial colony were isolated from the samples, these were subjected to tests using a modified antibiogram technique, in which the colonies were exposed to Cd, As, Cr, Pb and Zn at 500 ppm., In this test 20 colonies had growth in As, 15 in Pb, 10 in Cd, 8 in Cr and 4 in Zn. The metal in which there was the greatest growth response was As, followed by Cd, Pb, Cr and Zn. Two of the bacterial colony that grew in 4 metals (1A and 4G2) in the test were selected to carry out bioadsorption studies with Pb and Cr, in these tests the biomass generated with strain 1A presented a  $Q_{max}$  in Pb of 294,117 mg Pb / g. and in Cr 10.615 mg Cr / g, while with strain 4G2 a  $Q_{max}$  of 177.30 mg Pb / g was obtained in Pb and in Cr a  $Q_{max}$  equal to 21.2 mg Cr / g.

## INTRODUCCIÓN

### **Problemática ambiental asociada a metales**

El problema ambiental asociado a los metales radica gracias a las acciones antropogénicas como la minería, que han incorporado mayores cantidades de metales a los ecosistemas alterando los ciclos biogeoquímicos normales, provocando que se eleven las concentraciones de estos elementos hasta el grado de ser peligrosos para los organismos vivos, provocando efectos eco-tóxicos que generan grandes riesgos en el ambiente y la salud humana.

El suelo es el principal vertedero de contaminantes químicos, los contaminantes varían en cuanto a composiciones y concentraciones, y llegan a incorporarse a los sistemas como resultado de una variedad de acciones, las cuáles pueden ser; agregaciones intencionales, incorrecta disposición de residuos, derrames accidentales o el uso inadecuado de estos agentes (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

Los metales son elementos inmutables, por lo tanto, no pueden ser creados o degradados. Cuando estos se han incorporado a los ecosistemas pueden transformarse a través de procesos biogeoquímicos y llegan a distribuirse mediante diferentes características físicas y químicas, por ejemplo; material particulado ( $>0.45 \mu\text{m}$ ), coloidal ( $1 \text{ nm}-0.45 \mu\text{m}$ ) y especies disueltas ( $=1 \text{ nm}$ ). La materia coloidal y/o particulada es clave en la coagulación, sedimentación, y en los procesos de adsorción, intervienen en los tiempos de residencia y transporte de los metales trazas desde las columnas acuíferas a los sedimentos y matrices (Yulieth C. Reyes, 2016).

Para comenzar un estudio de contaminación por cualquier agente, es indispensable conocer los procesos que explican la presencia de los contaminantes en el medio o sitio determinado. Existen parámetros fisicoquímicos, que intervienen de manera importante en la movilidad de los metales, como el pH, las condiciones de óxido-reducción del ambiente, la materia orgánica, salinidad, tipo de suelo.

Los resultados que los metales llegan a tener sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente en base a que la toxicidad que puedan ocasionar y esta depende de distintos mecanismos moleculares, biodisponibilidad, dosis, tiempos de exposición, parámetros fisicoquímicos del medio en el que se encuentren (Herrera Vargas, 2013).

#### **Uso de microorganismos en tratamientos de biorremediación de metales.**

Los metales juegan un doble papel ya que para algunos organismos estos implican roles importantes en algunas reacciones bioquímicas y son esenciales para su crecimiento y desarrollo. Por otra parte, cuando los metales se presentan en altas concentraciones pueden formar compuestos que ocasionan efectos citotóxicos y letales (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

Los microorganismos del suelo actúan principalmente en la conducción de los ciclos de los nutrientes, pueden regular la dinámica de la materia orgánica del suelo, intervienen en el retención del carbono en el suelo, se involucran en la disponibilidad de los nutrientes para la vegetación, por lo cual son parte fundamental en el mantenimiento de la salud del suelo (Montes, 2016).

Debido al vertido de contaminantes en el suelo, los microorganismos y en este caso, las bacterias, han logrado desarrollar mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales, algunos sistemas microbianos poseen



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

el potencial para utilizarse en procesos biotecnológicos, como la biorremediación ambiental por metales o incluso para la recuperación de metales valiosos, además, estudiar las interacciones microbianas con los metales es de utilidad para comprender relaciones entre los metales tóxicos y los cuerpos superiores de la flora y fauna (Cervantes et al., 2006).

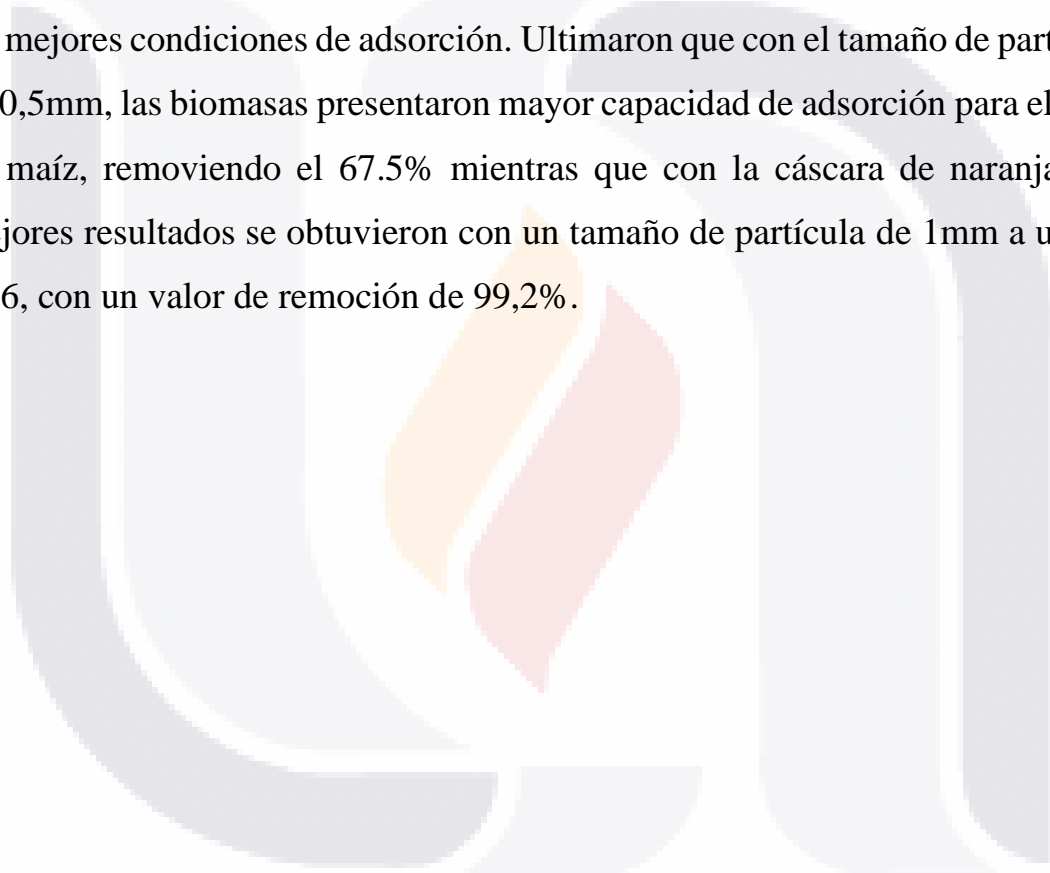
Los microorganismos pueden lograr la movilidad o inmovilidad de los metales en el ambiente a través de cambios en las características físicas y/o químicas de estos agentes. Las estrategias utilizadas en la biorremediación de metales se basan en tres principios: a) Precipitación del contaminante y, por ende, su inmovilización; b) Concentración del metal, y c) Disposición de metales a un ambiente en el que se propicie la reducción de su riesgo potencial. Por lo tanto, la remediación biológica se encamina a emplear organismos que puedan realizar o potenciar los principios mencionados anteriormente (Volke et al., 2005).

Las interacciones entre la bacteria y el metal pueden causar movilización y/o inmovilización de los metales. Abarcan biotransformaciones tales como oxidación o reducción de metales, biosorción por polímeros de la superficie celular, absorción de metales en las células, inducción de precipitación de metales y generación de minerales, o alteración de la especiación de metales causada por cambios redox inducidos microbianamente en el ambiente (Merroun, 2007).

## 1. ANTECEDENTES

Se han realizado distintas investigaciones en la búsqueda de materiales y procesos de bajo costo, eficientes y sin impactos ecológicos para la remoción de Plomo (Pb) y Cromo (Cr). En 2011, Dimas G. utilizó levadura residual de cerveza, levadura de panadería y el alga *Caulerpa sp.*, para evaluar la capacidad de remoción de Pb, Cd, Zn y Cr en donde encontró que el Pb (II) y Cr (III) se adsorbían en mayor proporción que el Cd (II) y Zn (II) y deliberó que el mecanismo que predominó en el proceso de biosorción para las tres biomásas es el intercambio iónico, así mismo en 2012 Maldonado A, Luque C, Urquiza D., evaluaron la remoción de Pb (II), utilizando como biosorbente *Pennisetum clandestinum* en donde se obtuvo una concentración máxima de remoción ( $Q_{max}$ ) de 139,35 mg/g empleando 0,06 g de dosis de biosorbente en una solución de 30 ppm de Pb. En 2015 Gutiérrez Moreno, S.M., utilizando un microscopio electrónico de transmisión, observó que el metal se adhería a la superficie bacteriana, por lo tanto infirió que la remoción ocurrió por bioadsorción, en su estudio encontró que 23 cepas llegaron a resistir hasta 800 ppm de cadmio y 8 cepas lograr resistir hasta 32 000 ppm de plomo, transcurridos 60 min de interacción, la biomasa logró remover a pH 7 el 96 % de plomo. Muñoz A.J., Espínola F., Moya M., Ruiz E. en 2015, trabajaron con *Klebsiella sp.* aislada de una planta de tratamiento de agua residual para estudiar la biosorción de plomo, en donde de acuerdo el modelo de Langmuir los estudios de equilibrio tuvieron una concentración máxima de remoción de 140.19 mg/ g de plomo. En 2016 Sanga Flores, J., aisló cepas provenientes de sedimentos de lixiviados del botadero de Haquira, Cusco, y estudió el proceso de biosorción de plomo utilizando biomasa bacteriana inactiva obtenida de la cepa que tuvo mayor resistencia a este metal selecciono una cepa que tuvo

crecimiento en 875,82 mg/L de plomo, los parámetros optimizados fueron: pH 5, biomasa 1g/L y un tiempo de contacto de 180 minutos y los resultados del plomo residual se obtuvieron mediante absorción atómica. También en 2016, Tejada Tovar C., y colaboradores estudiaron la remoción de plomo en aguas residuales industriales, para esto usaron biomasa residual, cascara de naranja y zuro de maíz, elaboraron un estudio de comparación entre las biomosas utilizadas, variando los tamaños de partícula y el pH, con el fin de determinar las mejores condiciones de adsorción. Ultimaron que con el tamaño de partícula de 0,5mm, las biomosas presentaron mayor capacidad de adsorción para el zuro de maíz, removiendo el 67.5% mientras que con la cáscara de naranja, los mejores resultados se obtuvieron con un tamaño de partícula de 1mm a un pH de 6, con un valor de remoción de 99,2%.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. EL SUELO

El suelo es un sistema que presenta actividad biológica, se compone por material mineral y orgánico, sus funciones son brindar soporte, aportar nutrientes, almacenar agua la cuál es requerida por la vegetación para desarrollarse, interviene de manera fundamental en todos los sistemas ecológicos, de él depende toda la vida del planeta, además opera cómo el filtro de diversos contaminantes. La importancia del suelo radica en que es fundamental en la obtención de alimentos y para mantener la calidad ambiental en las escalas locales, regionales y a nivel global (Montes, 2016).

En el suelo existen microorganismos vivos como: bacterias, hongos, protozoarios, nematodos, ácaros y colémbolos, además se encuentra la macrofauna, representada por lombrices y termitas. Los microorganismos del suelo interactúan con la vegetación y biota y de esta manera forman un complejo de sistemas de actividad biológica, por tal motivo son parte fundamental en el mantenimiento de la salud del suelo (Montes, 2016).

La descomposición de la roca madre que se encuentra exteriorizada en la superficie de la corteza terrestre es el comienzo de la formación del suelo, comenzando en el rompimiento físico y químico ocasionado por las condiciones atmosféricas. Si bien el suelo se encuentra en constante formación, este proceso es muy lento. Se estima que para que se forme 1 cm de suelo en la capa superficial se requieren de 100 a 400 años de procesos edafológicos, por lo cual se considera que el suelo es un recurso que no puede renovarse en la escala de tiempo humana (Lozano-Rivas, 2018).

### **2.1.1. Componentes del suelo**

Todo lo que compone al suelo se puede agrupar en 4 elementos básicos; Minerales, agua, aire y materia orgánica. (Rosa, 2008).

#### **2.1.1.1. Elementos minerales**

Aunque los elementos minerales aparentan constituir todo el suelo, solo representan aproximadamente la mitad de este. Los elementos minerales tienen diferente tamaño y suelen ser clasificados, de mayor a menor, como arena, limo o arcilla. La composición mineral del suelo está condicionada y a su vez condiciona los organismos presentes, esta determina sus propiedades físicas (Rosa, 2008).

#### **2.1.1.2. El agua**

Este elemento representa normalmente una cuarta parte de la composición del suelo, pero las cantidades de agua varían gradualmente en suelos ya que se originan en función de la estación del año y del tipo de suelo. Cuando un suelo contiene poca agua el suelo está desecado, y con mucha agua un suelo está saturado (Rosa D. 2008).

#### **2.1.1.3. Aire**

Cuando los suelos se encuentran bien agregados, el aire puede representar otro cuarto del volumen, conteniendo oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y carbono en forma gaseosa. Entre más grande sea el espacio poroso del suelo, más grande será su capacidad para retener agua y aire que beneficia a la flora y fauna. Las cantidades de agua y aire en suelo están estrechamente relacionadas a la porosidad del suelo (Rosa D. 2008).

#### ***2.1.1.4. La materia orgánica***

La materia orgánica está compuesta mayoritariamente por residuos vegetales los cuales, al ser incorporados al suelo, mediante procesos biológicos y transformaciones bioquímicas los compuestos orgánicos se descomponen y de esta manera las moléculas de los organismos que mueren se transforman en moléculas simples e inorgánicas. La conformación de los residuos vegetales es principalmente compuestos complejos de carbono que contienen diferentes proporciones de oxígeno, hidrogeno, nitrógeno, azufre y fosforo los cuales son la base de los azucres simples y aminoácidos. A la descomposición de la materia muerta se le denomina humus (sustancias húmicas complejas como: ácido húmico, huminas y ácidos fúlvicos) este es capaz de afectar las propiedades de los suelos, ya que interviene en la agregación del suelo, las capacidades de intercambio, aporta nutrientes como nitrógeno y fosforo a través de su descomposición, además condiciona la estructura del suelo ya que sin humus los suelos con alto contenido de limo y arcilla se compactarían, el humos es el material con carbono más ampliamente distribuido en el suelo y tiene la capacidad de interactuar con iones metálicos, hidratos, minerales, óxidos y sustancias orgánicas. La materia orgánica contiene sustancias como: proteínas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, almidones y polisacáridos. Gran cantidad de los componentes de la materia orgánica pueden formar complejos que ayudan a disolver, movilizar y transportar los metales y distintas sustancias orgánicas por el suelo (Montes, 2016).

## **2.1.2. Parámetros edafológicos que determinan la capacidad del suelo para acumular metales.**

### **2.1.2.1. *pH***

El pH afecta directa e indirectamente la retención del metal en el suelo, la adsorción de cationes metálicos es mayor cuando incrementa el pH, en suelos con un pH menor a 5 es más probable encontrar metal en la solución del suelo, por lo que en suelos con pH alcalinos los metales tienen mayor movilidad. Pero la retención del metal en el suelo no es siempre proporcional al valor de pH, esto depende del tipo de metal (Mitchell, 2016).

En su mayoría, los metales tienen mayor disponibilidad a pH ácido debido a que son menos fuertemente adsorbidos, excepto As, Se, Mo y Cr, que son más móviles a un pH alcalino (Galán Huertos & Romero Baena, 2008).

### **2.1.2.2. *Potencial redox***

El contenido de agua, la actividad biológica y el pH son factores que condicionan el potencial redox del suelo, la disminución del potencial redox (condiciones reductoras) implica la disolución de los óxidos de Fe y Mn, lo cual implica que se movilicen sustancias adsorbidas sobre los óxidos. Cuando el potencial redox aumenta (condiciones oxidantes) la movilización de los metales aumenta, disolviendo los sulfuros metálicos y materia orgánica. El potencial redox al igual que la salinidad y el pH son variables inducidas por la descomposición de la materia orgánica (Perez-González, 2005).

La formación y solubilidad de minerales de Fe, Al y S dependen del pH y el potencial redox. La disolución de Fe y S es intervenida por reacciones redox del Fe catalizadas mediante la oxidación microbiana de compuestos de carbón.

La generación de energía que realizan las reacciones redox, es incrementada gracias al rompimiento de las moléculas orgánicas y el fuerte flujo de electrones, lo cual es utilizado por parte de las bacterias reductoras de S y Fe para formar sulfuros de hierro estables en medios anegados con potenciales negativos de redox que van de 0 a -220 mV (Ramos-Gómez, 2012).

Normalmente el potencial redox es regulado por los contenidos de humedad en el suelo. Cuando los ambientes son anaerobios reducidos, los metales se precipitan gracias a la presencia de iones ferrosos y carbonatos, mientras que cuando las condiciones son oxidantes, los metales se vuelven más solubles (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2007).

#### **2.1.2.3. *Materia Orgánica***

La materia orgánica se involucra estrictamente con las propiedades fisicoquímicas del suelo, contribuye al crecimiento vegetal, debido a que proporciona elementos esenciales como nitrógeno, fósforo y azufre, es fuente de energía para los microorganismos, regula la disponibilidad de muchos cationes metálicos. La presencia de funciones ácidas en varias de las moléculas que la componen favorece la regulación del pH. La materia orgánica puede reaccionar con los metales formando complejos de cambio o quelatos de tal manera que los metales se desplazan con mayor facilidad por el suelo, la materia puede fijar tanto un metal al grado de que este deja de estar disponible para las plantas. Dependiendo del tipo de vegetación del suelo y la estación del año será el tipo de materia orgánica presente (Ramos-Gómez, 2012).

#### **2.1.2.4. *Salinidad***



La alta salinidad es capaz de solubilizar los metales tóxicos, logrando que se altere la moderación del intercambio iónico, aumentando la complejación soluble y esto a su vez deriva en la reducción de la actividad microbiana (Pérez-González, 2005)

#### **2.1.2.5. *Textura de suelo***

A la composición granulométrica del suelo se le denomina textura de suelo, cada tipo de textura es una determinada composición cuantitativa de arena, arcilla y limo. El tipo de textura establece parámetros que definen la capacidad del suelo de retener agua y aire, así como la respuesta y comportamiento hacia los contaminantes. Un suelo arenoso tiene menor capacidad de fijación por lo que es más fácil que los metales pasen al subsuelo y puedan llegar a mantos freáticos, en cambio un suelo arcilloso tiende a adsorber los metales y dejarlos retenidos. Se considera un suelo arenoso cuando el contenido de arcilla es menor al 10%, francos cuando la arcilla oscila en un 10 a 30% y arcilloso cuando el porcentaje de arcilla es mayor a 30% (Ramos-Gómez, 2012).

Los tamaños de partícula influyen sobre la retención de cationes, debido a que una textura fina implica una disminución del tamaño de partícula, un aumento de la superficie reactiva y por tanto un aumento de la capacidad de intercambio catiónico, al aumentar la carga de la superficie (Pérez-González, 2005).

#### **2.1.2.6. *Nitrógeno y Fosforo***

Uno de los componentes esenciales de las estructuras vivas es el Nitrógeno, este se encuentra en formas orgánicas o inorgánicas con estados de oxidación diferentes. A través de la actividad microbiana, las formas no reactivas como el nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>), pueden ser asimiladas, en cambio las plantas

requieren de compuestos con mayor disponibilidad química como es el caso del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y el mientras que los animales requieren formas complejas como los aminoácidos y los ácidos nucleicos. El nitrógeno tiene influencia en la descomposición de la MO del suelo debido a que afecta a la composición y las actividades de la comunidad microbiana, así como a la acidez y salinidad del suelo.

El fósforo es uno de los principales macronutrientes para todos los organismos vivos, este forma parte de las moléculas biológicas como el ADN y el ARN, y se usa para transportar energía celular mediante el trifosfato de adenosina (ATP) (Rodríguez Eugenio, Natalia; McLaughlin & Pennock, 2019).

### **2.1.3. Contaminación del suelo**

La biodiversidad del suelo es rígidamente afectada cuando está contaminado ya que se reduce la MO que contiene y su capacidad para fungir como filtro, de esta manera contamina el agua subterránea y la almacenada en el suelo, provocando un desequilibrio de sus nutrientes. Entre los contaminantes más comunes del suelo, se encuentran los metales, también los contaminantes orgánicos persistentes y los contaminantes emergentes, cómo lo son los productos destinados al cuidado personal y los fármacos (Rodríguez Eugenio, Natalia; McLaughlin & Pennock, 2019).

En la actualidad una tercera parte de los suelos se encuentran moderadamente o muy degradados por la erosión, las pérdidas de carbono orgánico, salinización, compactación, acidificación y la contaminación química, el suelo que actual es todo el que hay disponible. El desgaste que actualmente está sufriendo el suelo amenaza la capacidad de satisfacer las necesidades básicas de las generaciones futuras (FAO, 2018).

Para el estudio de la contaminación del suelo es necesario tomar en cuenta factores involucrados al mismo, como lo son: a) la susceptibilidad, es decir el grado de sensibilidad de un tipo de suelo para un determinado agente contaminante, b) la carga crítica, la cual indica la máxima cantidad de una sustancia que el suelo puede recibir sin que aparezcan efectos adversos. Así mismo es ineludible considerar características del contaminante que condicionan su efecto final en el suelo: a) biodisponibilidad, la cual es la capacidad para ser absorbido por los seres vivos, b) solubilidad, es decir si puede ser retenido o acomplejado, degradado o eliminado, c) movilidad, es la posibilidad de que este se extienda a lo largo del suelo o a otros sistemas conexos al suelo, si un agente actúa en un gran volumen de suelo, aunque sus efectos no sean tan adversos, la influencia final sería muy considerable, d) la persistencia, la cual significa cuanto puede un agente permanecer en el suelo sin ser neutralizado o degradado (Ramos-Gómez, 2012).

## **2.2. METALES**

Las principales características de los metales es que son dúctiles, lustrosos y maleables, tienden a perder electrones, convirtiéndose en partículas con carga positiva y a conducir el calor y/o la electricidad. Los metales a temperatura ambiente tienen un estado sólido a excepción del mercurio. Los iones metálicos han sido clasificados de acuerdo con una escala de dureza, definida por la fuerza de la unión con  $F^-$  y  $I^-$ , y que a su vez está relacionada con su comportamiento como ácidos de Lewis (aceptores de pares de electrones), es así cómo los metales se agruparon en tres categorías: duros, intermedios y suaves (Bautista-Hernandez, 2008)

La especiación, el destino del metal en el ambiente, las acciones bioquímicas del metal, así como la participación de los metales y metaloides como nutrientes o como agentes tóxicos esta mediada por la estructura electrónica del metal. Incluso a concentraciones bajas, los metales y metaloides son elementos tóxicos, ejemplos de estos incluyen; Pb, As, Hg, Cd, Zn, Ag, Cu, Fe, Cr, Ni, Pd y Pt. La mayoría de ellos son carcinógenos potenciales y son conocidos varios riesgos adversos para la salud debido a la exposición crónica. Debido a que no son degradables y tienden a bioacumularse, deben establecerse métodos adecuados para su eliminación eficiente del medio ambiente (Yadav & Shukla, 2017). Los metales pueden desempeñar un doble papel en la homeostasis de los organismos, los metales esenciales son indispensables para la vida mientras que otros pueden llegar a ser tóxicos, aunque a dosis altas todos llegan a ser perjudiciales para las células (Jaramillo-Juarez, 2006).

(Bautista-Hernandez, 2008) Menciona que los metales pueden presentar distintos mecanismos toxicológicos, debido a la inhibición de funciones enzimáticas, a que pueden desplazar los metales esenciales de sus sitios de unión a las moléculas biológicas, pueden romper las estructuras de los ácidos nucleicos, lo cual afecta la actividad biológica, la morfología celular y el crecimiento. También señala que, a nivel microbiológico, los efectos que cada metal puede presentar varían de microorganismo a microorganismo, los aspectos que intervienen en los efectos que pueden presentarse son el tipo de metal, su especiación y su concentración. Las concentraciones altas pueden activar mecanismos fuertes de resistencia que acrecientan la tolerancia a estos compuestos.

En particular, los elementos metálicos, en condiciones naturales pueden movilizarse de dos maneras (Bautista- Hernández, 2008):

1) Movilidad hipogénica en el ambiente primario, ocurre cuando los elementos se distribuyen mediante la cristalización del magma y la disposición en la que se encuentren en la formación de la roca.

2) Movilidad supergénica o secundaria de los elementos, se presenta cuando existen diferencias entre los elementos metálicos, en su estado y distribución intrínsecamente en los suelos y se origina bajo condiciones naturales. Estas diferencias se determinan por la naturaleza reactiva del metal, así como las condiciones biogeoquímicas del medio.

### **2.2.1. Fuentes de exposición a los metales**

Actualmente se ha incrementado el uso de los metales, en actividades industriales, agrícolas, e incluso en la medicina. Existen muchas actividades que involucran el manejo de los metales como: la minería, cromadoras, fundidoras, metalurgia, producción de pigmentos, entre otras, estas actividades han contribuido a que los seres humanos estemos más expuestos a los metales pesados (Jaramillo-Juarez, 2006)

Debido a la alta persistencia de los metales, al incorporarse al suelo estos pueden utilizar distintas vías: a) Se pueden quedar retenidos en el suelo al ser disueltos en la fase acuosa del suelo o fijados por procesos de adsorción, acomplejación y/o precipitación, b) ser absorbidos por plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas, c) volatilizarse a la atmosfera, d) movilizarse a aguas subterráneas o superficiales

La exposición a metales se ha identificado en el agua, el suelo, el aire y los alimentos y generalmente, el contacto de los metales con el hombre ocurre a dosis bajas y durante tiempos largos, generando una intoxicación crónica pero también pueden presentarse casos de intoxicación aguda debido a exposiciones

de concentraciones mayores en menor tiempo (horas o días). Debido a la semejanza entre los metales esenciales y los contaminantes metálicos, las células pueden atrapar estos agentes tóxicos e incorporarlos a su interior o en las membranas, desencadenando repercusiones en el funcionamiento de mecanismos fisiológicos y/o bioquímicos, incluso daños mortales (Jaramillo-Juárez *et al.*, 2000).

### **2.2.2. Efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas**

Los efectos de los metales son variados, repercuten en el ambiente, en la economía y en la salud pública. Estos pueden lograr el desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloquear sus grupos funcionales. 2) Pueden alterar la constitución de las biomoléculas, especialmente las enzimas y polinucleótidos. 3) Ocasionalmente que se rompa la integridad de las biomoléculas. 4) Llegan a modificar otros agentes biológicamente activos (Cañizares-Villanueva, 2000):

Los metales pueden ser detectados sin modificaciones (estado natural), o enlazados en varios complejos con sales, son considerados los contaminantes inorgánicos de más importancia en el ambiente, esto es gracias a su movilidad en ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida. Aunque se encontrarán presentes en cantidades bajas, no dejan de representar un riesgo debido a su capacidad de biomagnificación (Cañizares-Villanueva, 2000).

### **2.3. BACTERIAS**

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas, los cuales han sido encontrados en casi todos los sitios del planeta Tierra. Son fundamentales en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cualquier ecosistema. Algunas especies se presentan en condiciones verdaderamente extremas de temperatura y presión. Estos microorganismos pueden tener distinta morfología, por ejemplos pueden ser esféricas, espirales o alargadas (National Human Genome Research Institute, S.f).

La reproducción de las bacterias es mediante división simple (fisión binaria). Estas poseen información genética, sistemas biosintéticos y de elaboración de energía fundamentales para el crecimiento y reproducción. La célula bacteriana típica contiene las siguientes estructuras (M. Pérez, 2006):

ADN (material genético) en un cromosoma único que no se encuentra envuelto por membrana nuclear, característica que hace la principal diferencia con la célula eucariota, la cual si tiene siempre membrana nuclear. Posee también membrana, ribosomas, citoplasma además de pared bacteriana, estructura que por su composición bioquímica se puede decir que es propia de las bacterias, ya que las células vegetales tienen una pared celular, pero conformada por celulosa. Existen bacterias que carecen de pared celular como las micoplasmas.

Las estructuras bacterianas se dividen en estructuras variables y permanentes.

**Estructuras permanentes:** membrana celular, ribosomas, material genético

**Estructuras variables:** pared celular, flagelo, fimbrias o pilis, cápsula y esporas

Se dice que la estructura es variable cuando estas llegan a existir en algunas bacterias, pero no en todas, aun tratándose de un mismo grupo bacteriano o una misma cepa bacteriana pueden presentarse o no y esto depende de las condiciones bajo las que se desarrollen (M. Pérez, 2006).

### 2.3.1. Bacterias Gram Negativas y Gram Positivas

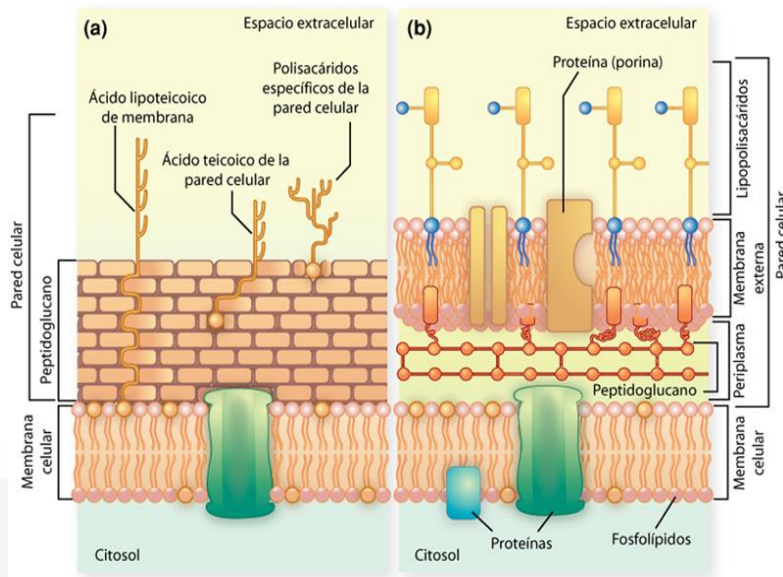
La pared celular es lo que diferencia a las bacterias Gram negativas de las Gram positivas, un proceso muy importante en microbiología para identificar el tipo de pared es la tinción de Gram, gracias a esta tinción, las bacterias gram negativas se muestran de color rosa y las gram positivas de color morado. Las bacterias Gram negativas tienen una pared celular mucho más compleja que las Gram positivas, en la pared celular se presentan capas de peptidoglucanos que le ocasionan la porosidad, rigidez y lo amorfo, la consistencia y forma de la pared es debida principalmente a la presencia de estas capas. Las cantidades y composición exacta de estos componentes es distinta entre los grupos bacterianos (Madigan, 2003).

**Tabla 1 Comparación de las características de las bacterias Gram positivas vs Gram Negativas**

Fuente: (Gerard J. Tortora, 2007) Introducción a la microbiología

Gram positivas	Gram negativas
Pared celular gruesa compuesta por varias capas de peptidoglucano	Compuesta por una o pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa compuesta por
Ácidos teicoicos que generan carga negativa (por grupos fosfato asociados) los cuales se unen a iones positivos y regulan su movimiento al interior o exterior de la célula.	La membrana externa dificulta el paso de algunos xenobioticos y tiene una intensa carga negativa
Menor susceptibilidad a la lisis.	Mayor susceptibilidad a la lisis





**Figura 1. Diferencias entre Gram positivas (a) y Gram Negativas (b).** Fuente: (Gerard J. Tortora, 2007) Introducción a la microbiología.

### 2.3.1.1. *Bacterias Gram negativas*

En las bacterias Gram negativas, la membrana externa es capaz de unir distintos iones metálicos, los cationes se encargan de estabilizar la estructura molecular de la membrana, además la unión a iones metálicos ocasiona la reducción de las cargas repulsivas entre los constituyentes aniónicos de moléculas de lipopolisacáridos y proteínas adyacentes. Los grupos fosforilo de los lipopolisacáridos constituyen la membrana externa de estas bacterias, las cuales en primera instancia se unen a iones, además ciertos grupos carboxilo también están disponibles para interactuar con metales. Sin embargo, es el peptidoglucano el que se une fuertemente a los iones metálicos por los grupos carboxilo, esto ocurre también con las bacterias Gram positivas pero en menor proporción (Suárez & Reyes, 2002).

### 2.3.1.2. *Bacterias Gram Positivas*

En este tipo de bacterias, el peptidoglucano constituye sólo el 10% del peptidoglucano, además del peptidoglucano estas poseen una capa adicional en

su pared, la cual está compuesta de lipopolisacáridos. Dicha capa se conforma por una segunda capa lipídica que no solamente se integra por fosfolípidos como la membrana citoplasmática, sino que además contiene polisacáridos y proteínas. Los lípidos y polisacáridos están estrechamente unidos en la capa externa formando estructuras lipopolisacáridicas específicas. Es por esto que frecuentemente esta capa externa se denomine frecuentemente capa lipopolisacárida (Suárez & Reyes, 2002)

La pared de estas bacterias es rígida y porosa, se integra por cadenas lineales del disacárido N-acetilglucosamina-b-1,4-N- ácido acetilmurámico. El peptidoglicano está unido covalentemente a ácidos teicoicos y teicurónicos, los cuales contribuyen a las propiedades aniónicas de la pared. La proporción de estos dos es dependiente de las condiciones bajo las que se desarrolle la bacteria, especialmente depende de las fuentes de fosfatos, ha sido probada la capacidad de atrapar los metales de estos ácidos, pero su función fisiológica es suministrar magnesio a la membrana plasmática. El tamaño de la pared celular de estas bacterias es de 50 a 150 nm de ancho y fundamentalmente posee de 40 a 90% de peptidoglicano (Bautista-Hernandez, 2008).

Varias investigaciones han estudiado las distintas interacciones que realiza la pared Gram positiva (el género *Bacillus* en particular) con iones metálicos y los sitios responsables de la unión de metales son posiblemente los sitios carboxilos dentro del peptidoglicano y los grupos fosforilos de polímeros secundarios como los ácidos teicoicos y teicurónicos (Bautista-Hernandez, 2008).

### **2.3.2. Bacterias del suelo**

En el suelo las bacterias superan en tipos y número a todos los demás organismos, en el suelo se pueden encontrar en colonias, estos microorganismos son capaces de producir esporas y otras formas de resistencia que les permite sobrevivir en condiciones no favorables. Existen bacterias autótrofas y heterótrofas, aerobias y anaerobias, obligadas y facultativas. Las bacterias normalmente dominan en las funciones en el suelo a los hongos, algas, y actinomicetos, ellas son las únicas responsables de varios procesos del suelo, por ejemplo la oxidación del nitrógeno y azufre orgánico y la fijación simbiótica y no simbiótica del nitrógeno (Casanova-Olivo, 1991).

La MO y las raíces de las plantas conforman básicamente el sustrato del que dependen las bacterias. La enorme diversidad de bacterias que existen en el suelo constituye un eslabón de suma importancia en la cadena trófica. El crecimiento de las bacterias se basa en estímulos e inhibiciones que dependen de la alimentación. Los generalistas crecen de manera lenta y los especialistas de forma rápida y ambos pueden convivir (Casanova-Olivo, 1991).

#### **2.4. TOLERANCIA Y RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS A LOS METALES PESADOS**

Las bacterias se encuentran expuestas a diversos tipos de metales y metaloides en el ambiente, gracias a esto ocurren diversos mecanismos de interacción específicos que van de acuerdo con el metal y al tipo de especie de microorganismos. En algunos casos, estos mecanismos pueden favorecer o perjudicar al organismo, ya que la naturaleza de las interacciones metal-bacteria es variada y compleja; dependen de varios factores como el metabolismo del organismo, las características de los metales, y de la estructura de la pared celular (Gadd, 1992).

Existen bacterias tolerantes y bacterias resistentes a metales, las bacterias que pueden ser resistentes poseen mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia de metales, en cambio los tolerantes son indiferentes a la ausencia o presencia del elemento. Investigaciones sobre la resistencia bacteriana a metales, sugieren que puede deberse a mecanismos de detoxificación y producción de agentes quelantes que logran unirse a metales, ocasionando que se reduzca la toxicidad de estos (Jimenez, 2017).

Las bacterias emplean estrategias para protegerse contra metales, llevan a cabo la restricción de la entrada del metal a la célula ya sea porque reducen la toma del metal o mediante transportadores ubicados en la membrana que realizan un eflujo activo o extrusión, mayoritariamente los sistemas de resistencia se basan en el eflujo activo de iones tóxicos. Cuando una célula se enfrenta a un metal en altas concentraciones pero esta cuenta con un sistema que acumula este tipo de metal, el cation del metal es transportado hacia el citoplasma a pesar de su elevada concentración gracias a transportadores inespecíficos que son constitutivos de la célula y ocasionan que esta entrada no pueda cerrarse, esta puerta abierta es la razón principal del por qué los iones metálicos suelen ser tóxicos para ciertas células y cuando este gen codificante de este sistema transportador rápido e inespecífico se muta, pueden obtenerse células tolerantes a metales (Gerbino, 2013).

## **2.5. INTERACCIONES BACTERIA- METAL**

Existen diferentes formas de efectuar la unión metal-bacteria, estas pueden realizarse tanto de manera química como de manera física, esto será dependiente de la complejidad y la especie del metal. Los mecanismos que se

llevan a cabo en el proceso de biosorción de metales puede tener lugar a la vez más de uno. Los mecanismos en que los iones metálicos se unen a las bacterias no son muy distintos, siendo los más significativos los que están relacionados las capacidades de unión de iones metálicos debido a los grupos funcionales que se encuentran expuestos en la superficie bacteriana, y al área disponible para la interacción (Del Carpio Jiménez, 2017).

Los mecanismos utilizados por las bacterias para enfrentar la presencia de metales pueden categorizarse en 3 categorías: 1) Las que se relacionan a la tolerancia del organismo, es decir que no requieren estrés metálico. 2) Mecanismos específicos inducidos por la presencia metálica, 3) Los activados por estrés metálico (Mecanismos Generales). De manera más específica, las interacciones bacteria-metal se clasifican como: Biadsorción, Bioacumulación, Sistemas de Expulsión, Quelación, Metilación, Influencias indirectas Oxido/Reducción, Influencias directas. Es complicada la clasificación de las interacciones bacteria-metal porque en la mayoría de los casos se relacionan entre si (Bautista- Hernández, 2008).

Del Carpio-Jiménez (2013) señala que los principales mecanismos de interacción bacteria-metal son los siguientes:

### **2.5.1. Biomineralización**

Los microorganismos pueden precipitar metales como hidróxidos o carbonatos debió a un mecanismo codificado de plásmidos. Dicho mecanismo se origina gracias al funcionamiento de una bomba que logra excretas el metal presente en el citoplasma hacia el exterior de la célula. Esto ocasiona que en la superficie celular se produzca alcalinidad y consecuentemente se precipite el metal

Mediante la formación de sulfuros o fosfatos, también se puede realizar la precipitación metálica como consecuencia de alguna acción enzimática celular.

### **2.5.2. Biotransformación**

En este proceso ocurre un cambio de tipo químico en el metal, por ejemplo, en el estado de metilación u oxidación, ocurre esta transformación mediada por actividad biológica la cuál es llevada a cabo por enzimas microbianas que pueden dar como resultado compuestos volátiles o bien poco solubles.

### **2.5.3. Quimiosorción**

En este mecanismo, los microorganismos forman inicialmente un depósito que funge como núcleo de cristalización, y permite el depósito del metal, promoviendo y acelerando el mecanismo de mineralización de este.

### **2.5.4. Bioacumulación**

En este proceso la primera etapa es la adsorción la cuál ocurre de manera rápida. La acumulación se realiza de manera más lenta y dependerá en gran medida del metabolismo celular que implica sistemas de transporte de membrana con los cuales se internaliza el metal en la célula, este procedimiento utiliza energía celular, dicho consumo de energía se genera mediante del sistema  $H^+$  - ATPasa. Ya que el metal es incorporado al citoplasma, éste es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos, conocidas como metalotioneínas.

### **2.5.5. Biosorción**

Con este mecanismo se realiza la inmovilización del metal para posteriormente concentrar metales en soluciones acuosas. La superficie celular contiene alto contenido de grupos funcionales que interactúan con los metales con los que

entren en contacto estos grupos funcionales forman parte de los elementos estructurales de la pared celular y/o contenidos extracelulares, estos grupos actúan como bioabsorbentes que incorporan los metales a las estructuras. Los microorganismos que logran llevar a cabo estos mecanismos pueden retener los metales en periodos cortos al encontrarse en soluciones acuosas con contenidos metálicos. Las retenciones metálicas se deben a las interacciones fisicoquímicas con los ligandos de la superficie celular, la retención la realizan grupos que conforman las paredes celulares, como los grupos amino, carboxilo, hidroxilo, sulfhídrico y fosfato.

Además, existen polímeros extracelulares constituidos principalmente por polisacáridos y proteínas, dichos polímeros forman parte de la cápsula celular que tiene función de adherir las bacterias a distintas superficies y de atrapar los iones metálicos.

#### ***2.5.1.1. Técnica de biosorción de metales***

Esta técnica se basa en utilizar las peculiaridades de las biomasas o de organismos vivos para adsorber metales de forma comercial. Debido a la afinidad que existe entre los grupos funcionales de la superficie bacteriana, los cuales contienen las moléculas hidroxiladas y carboxiladas que logran la adsorber y precipitar el metal. El proceso de biosorción es no metabólico pasivo donde se unen diferentes químicos sobre la biomasa.

La biosorción implica una fase líquida que contiene las especies que serán adsorbidas, es decir, el uso de una fase sólida conocida como sorbente en contacto con el solvente. Cuando se presentan condiciones idóneas, el sorbato es atraído hacia el sólido y enlazado por distintos mecanismos, esto continúa hasta que el equilibrio se establece. La calidad del sorbente se representa por la

capacidad de este para retener el sorbato, también puede ser posible recuperar la biomasa y el sorbato, utilizando reactivos químicos y secundariamente procedimientos de regeneración.

### **2.5.1.2. *Mecanismos de biosorción***

Los mecanismos de unión a los metales pueden ocurrir tanto de manera física como química, el metal puede ser capturado por la pared celular mediante diferentes formas, esto depende de la complejidad que presente y la especie metálica a biosorber. Los mecanismos a través de los cuales se pueden llevar a cabo los procesos de biosorción de metales, son difíciles de explicar puesto que llegan a tener lugar simultáneamente más de uno.

Entre estos tipos de mecanismos destacan los siguientes:

#### *a) Microprecipitación*

Esta ocurre cuando la solubilidad de los metales alcanza su máximo valor, es llevada a cabo en condiciones locales como la superficie del biosorbente o su interior. Estas condiciones pueden crearse al modificar las condiciones fisicoquímicas, como aumentando o disminuyendo el pH. El mecanismo de microprecipitación además puede ocurrir mediante la formación de complejos que se producen al estar en contacto el metal a la superficie celular, ocurriendo posteriormente una hidrolización y siguiendo con una precipitación en forma de especie hidrolizada en la pared celular. El metal microprecipitado quedará situado sobre la superficie de la biomasa.

#### *b) Complejación*

Esto se da después de ocurrida la interacción del metal y los centros activos de la célula, ocasionando el inicio de un proceso de formación de complejos en la



pared celular, aquí el metal puede unirse a los centros activos mediante ligaduras simples o por quelación.

*c) Adsorción física*

En la adsorción física ocurren uniones de los iones a la superficie bacteriana la cual puede llevarse a cabo a través de fenómenos químicos (específicos) como las reacciones de complejación y quelación o mediante fenómenos físicos (no específicos) como la atracción electrostática. Además, en este tipo de mecanismo se incluyen los fenómenos relacionados con la presencia de las fuerzas de Van der Waals.

*d) Intercambio iónico*

Se ha demostrado que este sistema es el que predomina en la biodsorción metálica utilizando algas. En el intercambio iónico un ión de la disolución toma el lugar de otro ión del mismo signo que se encuentre unido a la superficie, este fenómeno es una reacción química reversible. Los polisacáridos son la constituyen la estructura básica de las paredes celulares de la biomasa en general, a través de estudios a las propiedades de intercambio iónico de los polisacáridos naturales se ha establecido que los iones metálicos divalentes tienen la propiedad de intercambiarse con ciertos iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ , y  $\text{K}$ ).

## **2.6. BIORREMEDIACIÓN**

Cuando se utilizad microorganismos o enzimas producidas por estos organismos para transformar o degradar contaminantes tóxicos que afecten en los ecosistemas, se le conoce cómo biorremediación (EPA, 2012).

La biorremediación se ha utilizado como una herramienta enfocada a contener, reducir, transformar o eliminar contaminantes utilizando microorganismos. Aplicaciones históricas del uso de la biorremediación datan a 1891 en Sussex, Inglaterra, con la apertura de la primera planta de tratamiento de agua residuales. A mediados del siglo XX, se comenzaron a implementar tratamientos más sofisticados, para lo cual se incluyeron los lechos bacterianos, los fangos activos y las fermentaciones anaerobias. Actualmente en múltiples investigaciones se ha evidenciado el empleo exitoso de cepas de bacterias y hongos en el tratamiento de matrices contaminadas con metales. Tradicionalmente en los procesos de descontaminación se ha recurrido principalmente a procesos físicos y químicos a pesar de los beneficios que presenta el uso de microorganismos, entre los procesos fisicoquímicos que se emplean para la remoción de metales destacan la oxidación, precipitación química, filtración, tratamiento electroquímico, evaporación, intercambio iónico y osmosis inversa. Sin embargo, estos procesos no han resultado del todo eficientes debido a que muchos sitios a tratar contienen contaminantes que no son removidos por los procesos anteriores, lo que ha inducido a la generación de investigaciones y proyectos que buscan desarrollar estrategias más económicas y de mayor eficacia para eliminar la contaminación ocasionada por metales (Herrera Vargas, 2013).

## **2.7. ISOTERMA DE LANGMUIR**

En 1918, Langmuir formuló este modelo que supone que las moléculas son adsorbidas sobre la superficie del sorbato hasta formar una monocapa completa, es decir hasta llegar a la saturación en donde la adsorción cesa, además este modelo supone que las superficies son homogéneas. Con este modelo se pueden obtener las constantes necesarias para definir los equilibrios

químicos entre el metal y la biomasa, siendo el único modelo que permite la obtención de estos resultados. Este modelo se basa en los siguientes supuestos (Rivas, Carlos F et al., 2014):

- Antes del contacto con el adsorbato, en la superficie todos sus centros activos se encuentran libres.
- Cualquier centro activo contiene la misma capacidad de adsorción y no existe variación por la presencia de otros adsorbatos en centros vecinos.
- A un único centro activo se une cada adsorbato.
- La adsorción es limitada a una sola capa.

El modelo de Langmuir es representado por la siguiente manera:

$$q_e = \frac{q_{\max} C_e}{K + C_e} \quad \text{ó} \quad q_e = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e} \quad \text{Ecuación [1]}$$

Siendo:

**q<sub>e</sub>**: capacidad de adsorción de la biomasa en el equilibrio (mg ó mmol metal/g de biomasa).

**q<sub>max</sub>**: capacidad máxima de recuperación metálica por parte de la biomasa (mg ó mmol metal/g de biomasa).

**C<sub>e</sub>**: concentración metálica en el equilibrio (mg ó mmol metal/L).

**K**: constante de Langmuir, es equivalente a la inversa de la constante de equilibrio b (mg ó mmol metal/L). Su valor equivale a la concentración de

metal a la cual el valor de  $q_e$  es exactamente la mitad que el de la  $q_{max}$ . Mide la afinidad entre el metal y la biomasa, de forma inversamente proporcional.

Esta ecuación puede linealizarse de esta manera para facilitar su representación gráfica:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_{max}} + \frac{K}{q_{max}}$$

Simbolizando  $\frac{C_e}{q_e}$  frente a  $C_e$ , a partir de la pendiente de la recta obtenida se conocería el valor de la  $q_{max}$  y a partir de la ordenada en el origen se obtendría el de la  $K$ .

A su vez, la capacidad de adsorción  $q_e$  se determina en los experimentos de bioadsorción de la forma siguiente:

$$q_e = \frac{V(C_0 - C_e)}{B}$$

Siendo:

**V:** volumen de disolución (L).

**C<sub>0</sub>:** concentración metálica inicial (mg ó mmol metal/L).

**B:** concentración de biomasa (g biomasa/L).

La relación isoterma Langmuir es de una forma hiperbólica:

$$q = q_{max} \frac{bC_{eq}}{1+bC_{eq}}$$

La relación puede ser linearizada graficando

$$(C_{eq}/q) \text{ vs } C_{eq},$$

La linearización Scatchard de Langmouir es:

$$(q/C_{eq}) = bq_{max} - bq$$

Donde:

**Q:** la capacidad del adsorbente (mg/g) a una determinada concentración en equilibrio

**C<sub>eq</sub>:** concentración final o en equilibrio

**q max:** la máxima capacidad del adsorbente (mg/g)

**b:** coeficiente relacionado a la afinidad entre el sorbente y el sorbato (l/mg).

Entonces el procedimiento para obtener el valor de los parámetros es la linealización  $C_{eq}/q$  vs  $C_{eq}$ . La ecuación de regresión lineal tendrá una ordenada al origen  $x$  y una pendiente  $y$ , los parámetros se dan por las siguientes ecuaciones: (Chiou., 2002).

$$y = 1/q_{max} ,$$

$$q_{max} = 1/y$$

$$x = 1/q_{max} * b ,$$

$$b = (1/x)/ q_{max}$$

## 2.8. REACCIÓN EN CADENA POLIMERASA (PCR)

Esta técnica es utilizada para realizar muchas copias de una región particular de ADN. Su objetivo es producir suficiente ADN de una región blanco para poder analizarlo.

En esta prueba se requiere de una enzima llamada ADN polimerasa la cual crea las cadenas nuevas de ADN a través del uso de cadenas existentes como moldes. La enzima normalmente utilizada para este metodo es la Taq polimerasa, ya que posee estabilidad térmica y la hace ideal para el PCR, debido

a que método utiliza altas temperaturas repetidamente para desnaturalizar el molde de ADN o separar sus cadenas.

Cómo otras ADN polimerasas, la Taq polimerasa sólo es capaz de hacer ADN en presencia de un cebador, el cebador es una corta secuencia de nucleótidos encargada de suministrar el punto de partida para iniciar la síntesis del ADN. En la reacción de PCR, los cebadores determinan la región de ADN que será copiada o amplificada.

Para cada reacción de PCR son necesarios dos cebadores los cuales están diseñados para flanquear el blanco, los cebadores son segmentos cortos de ADN de cadena sencilla, en general poseen 20 nucleotidos de longitud, estos agregan secuencias que hacen que se unan a cadenas opuestas del molde de ADN en los extremos de la región a copiar, esta unión ocurre mediante complementariedad de bases. En la unión de los cebadores al molde, la polimerasa los extiende y así la región que se encuentra entre ellos se copia.

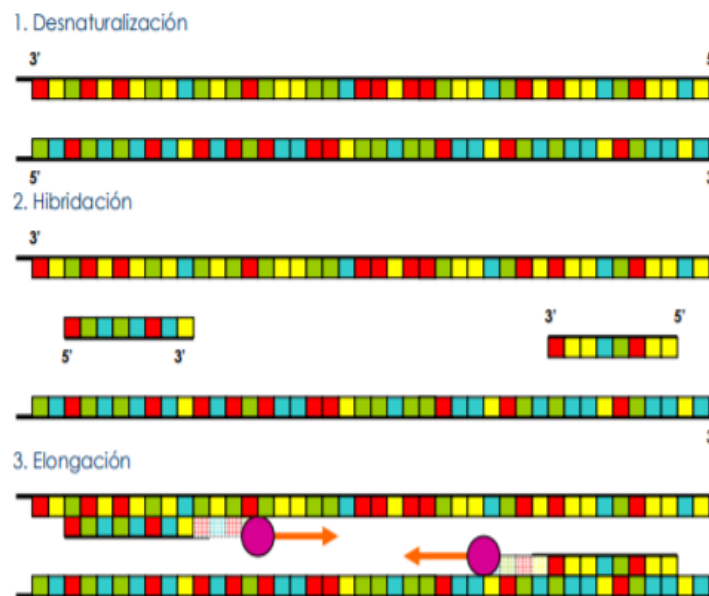
Para una reacción PCR son necesarios los siguientes ingredientes: Taq polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos (bloques básicos del ADN) Dichos ingredientes se colocan en un tubo con los cofactores necesarios para la enzima, entonces son sometidos a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN.

Los pasos básicos son:

- a) *Desnaturalización (96 °C): Aquí la reacción se calienta para inducir a la separación o desnaturalización de las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.*

- b) *Templado (55- 65°C): En este paso ocurre un enfriamiento que permite que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.*
- c) *Extensión (72 ° C): Aquí se vuelve a elevar la temperatura para lograr que la Taq. Polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.*

Dicho es repetido 25- 35 veces en una reacción de PCR típica, que generalmente tarda de 2 a 4 horas, el tiempo depende de la longitud de la región de ADN que se copia. Si la reacción es eficiente, se producen miles de millones de copias a partir de una o unas cuantas copias de la región blanco (Ver Imagen 2. Resultado de un ciclo)(Pérez, 2011).

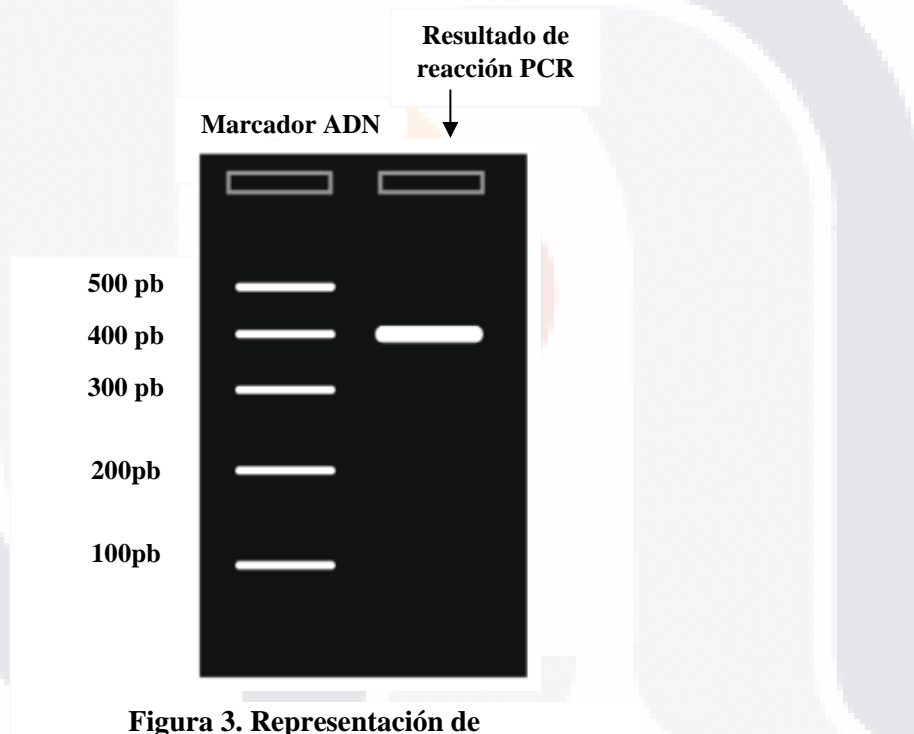


**Figura 2. Fases del ciclo PCR.** Fuente: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), ETSIAMN, Universidad Plitecnica de Valencia. (S.F.).

Mediante la electroforesis en gel se hacen visibles los resultados de la reacción PCR. En esta técnica se utiliza una corriente eléctrica para impulsar los

fragmentos de ADN mediante una matriz en gel, los fragmentos se separan por tamaños. Se debe incluir un estándar o marcador de peso molecular para lograr determinar el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR.

Entonces todos los fragmentos de ADN que posean la misma longitud van a formar una “banda” en el gel para poder identificar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN. Como ejemplo, una reacción de PCR que produce un fragmento de 400 pares de bases (pb) se vería así en gel:



**Figura 3. Representación de electroforesis de una reacción que produce 400 pares de bases (pb).**



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia metodológica establecida consistió en primer lugar con la elección del sitio en base sus características, posteriormente se realizó el muestreo de suelo y la caracterización fisicoquímica de éste se realizó determinando los siguientes parametros: pH, conductividad, potencial redox, nitrógeno total, fósforo total, materia orgánica y concentración de metales. Se realizó un enriquecimiento de microorganismos en medio líquido, con los metales utilizados (Pb y Cr) a una concentración 20 ppm de cada metal. A partir de los medios enriquecidos, se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos por dilución en placa. Se realizó una caracterización preliminar de cepas en agar macroscópica y microscópicamente, se realizó una prueba de resistencia en medio solido en placa utilizando los metales de interés, a partir de esto se seleccionaron las cepas resistentes, se obtuvo biomasa seca de cada bacteria seleccionada y se realizaron experimentos de absorción con biomasa seca. Se evaluó el efecto del pH, tiempo de contacto y concentración inicial del metal en la bioadsorción de los metales.

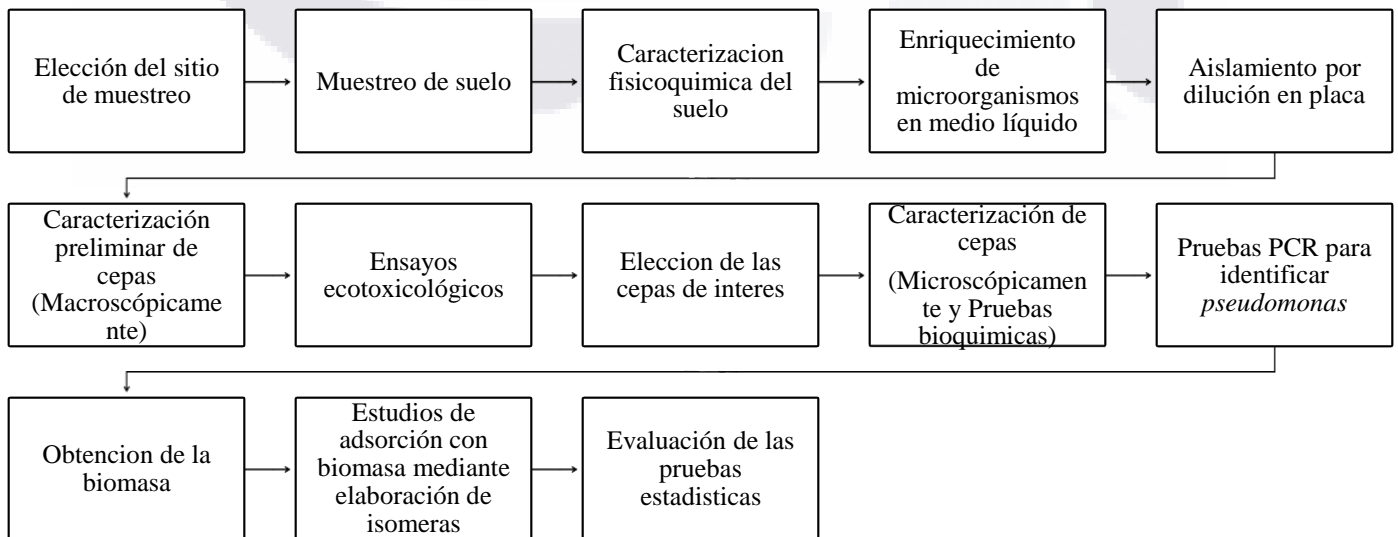


Figura 4. Estrategia metodológica

## **3.2 IDENTIFICACION DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS DEL SUELO**

### **3.2.1 Muestreo del suelo**

#### **3.2.1.1 Sitio del muestreo**

Se eligió para sitio de muestreo el municipio minero de Real de Asientos, Ags., el cual está ubicado aproximadamente a 61 kilómetros de la capital del Estado, a una altura de 2,150 metros sobre el nivel del mar. Al sur y suroeste tiene colindancia con el municipio de Aguascalientes; con Pabellon de Arteaga limita al oriente con Pabellón de Arteaga, al noreste limita con el municipio de Tepezalá; al norte y noreste colinda con el Estado de Zacatecas y al sureste con el Estado de Jalisco. Está dividido en 67 localidades, de las cuales las más importantes son: Asientos, cabecera municipal y Villa Juárez (Bautista-Hernandez, 2008).

Cuenta con una superficie de 547.22 kilómetros cuadrados, el clima es templado en la mayoría de sus estaciones, pero en el verano el clima es cálido, cuenta con una temperatura media anual de 18°C; la época más calurosa se presenta entre los meses de mayo a agosto. La precipitación pluvial media anual es de 488 milímetros y su régimen de lluvia es en los meses de julio, agosto y septiembre; mientras que la lluvia invernal es de cinco y 10 por ciento anual. El promedio de heladas al año es de 45 días. La dirección de los vientos, en general, es de sureste a noreste de marzo a octubre y de noreste a sureste de noviembre a febrero ((Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal [INAFED], 2010).

Su tipo de minado es subterráneo, la producción en esta unidad es de concentrados de plomo, zinc y cobre, con contenidos de oro, plata, plomo, zinc y cobre. Los primeros trabajos mineros, datan de 1548 y el auge de la minería en este municipio ocurrió entre 1712 y 1727.

En este municipio, en el año 1548 se fundó la Mina Real de Asientos, ubicada en Carr. Tepazala-Asientos, en el 2007 pasa a ser Unidad Santa Francisca, con lo cual se intensifican actividades de exploración, en el 2008 empiezan operaciones en donde se realizan las actividades del proceso del mineral como es: la trituración, molienda y concentración por flotación, sus productos son plata, plomo, cobre y zinc en concentrados (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal [INAFED], 2010).

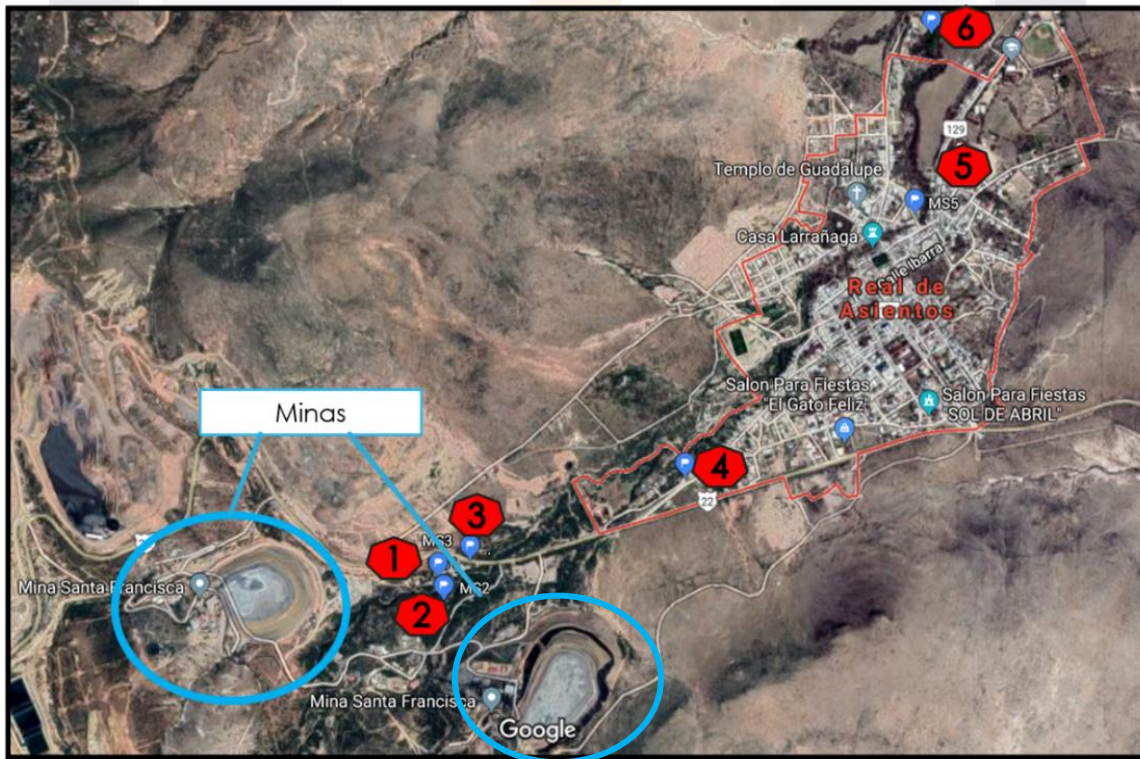
Se eligió este municipio como sitio de muestreo debido a la alta probabilidad de conseguir las bacterias de nuestro interés, ya que es un sitio en el que se ha realizado minería por varios años, y existe una elevada posibilidad de encontrar bacterias capaces de realizar interacciones con los metales.



**Figura 5. Foto de la Mina Real de Asientos**, ubicada en Carretera Tepazala-Asientos, Aguascalientes, México. (Servicio Geológico Mexicano, 2018). <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/AGUASCALIENTES.pdf>

### 3.2.1.2 Toma de muestra

Se realizó el muestreo la primera semana de septiembre 2019, en la estación de verano, dónde oscilaba una temperatura de 28°C. Se tomaron muestras en 6 diferentes áreas (Figura 6) a aproximadamente 10 centímetros de profundidad, en diferentes puntos para formar una muestra compuesta de cada una de las 6 áreas, tomando en cada punto aproximadamente 4kg de suelo, de los cuales se repartieron en 2 partes proporcionales, una para las pruebas fisicoquímicas del suelo y la otra se destinó para las pruebas microbiológicas. Se recibió el suelo en bolsas estériles y se conservó en una hielera con hielo hasta su refrigeración a 4°C, el suelo fue etiquetado conforme a la distancia de las minas, en forma ascendente del más cercano al más lejano.



**Figura 6. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.** Se señalan con números los seis puntos de muestreo, en forma ascendente conforme a la distancia a la mina, 1 (S1), 2 (S2), 3 (S3), 4 (S4), 5 (S5) y 6 (S6), la mina se señala en círculos celestes, en donde se realizan diferentes operaciones, pero son pertenecientes a la misma Minera. Fuente: Google Maps.

### **3.2.2 Preparación del suelo muestreado para el análisis.**

1. Registro; al llegar las muestras al laboratorio se registraron con la identificación de campo: (a) nombre del muestreador; (b) procedencia; (c) fecha del muestreo; (d) tipo de prueba.
2. Secado; sobre superficies de vidrio limpias, en una estufa a 50°C durante 5 días.
3. Molienda; para realizar la molienda, deben retirarse con anticipación de la muestra, las rocas y el material orgánico visible, posteriormente se hace la molienda con morteros limpios
4. Tamizado; el suelo molido se hace pasar por un tamiz con aberturas de 0.5 mm de diámetro de acero inoxidable. Este grado de fineza es conveniente para la mayoría de los análisis requeridos, una vez tamizado el material se separa 1.5 kg de suelo, cantidad suficiente para realizar las determinaciones químicas y físicas.
5. Homogeneizado; este paso es necesario para evitar sesgo en la selección de la submuestra que va a ser destinada para las determinaciones analíticas.
6. Recepción en frascos de plástico estériles con tapa hermética
7. Etiquetado

#### **3.2.2.1 Preparación de la disolución.**

En tubos de 50 ml se colocaron 5 gr de suelo por triplicado, cada tubo se aforó a 50 ml con agua destilada y se colocaron en un agitador por 24 horas, y

se dejaron sedimentar por 2 horas (Robledo-Santoyo & Maldonado-Torres, 1997).

### 3.2.3 Técnicas utilizadas para la caracterización de parámetros físicos y químicos del suelo.

De cada muestra de suelo se obtuvieron 3 submuestras por lo que cada prueba fisicoquímica se realizó por triplicado, las técnicas elegidas reúnen los requisitos de exactitud y estandarización requeridos para la obtención de resultados confiables (Tabla 2).

**Tabla 2 Técnicas utilizadas para las pruebas fisicoquímicas**

Caracterización	Técnica/Método	Fuente
<b>Textura del suelo</b>	Bouyoucos través del método AS-09	García-Gutiérrez C. & Félix Herrán J. (2014)  NOM-021-SEMARNAT-2000 (antes NOM-021-RECNAT-2000) NORMA OFICIAL MEXICANA, QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES DE FERTILIDAD, SALINIDAD Y CLASIFICACIÓN DE SUELOS. ESTUDIOS, MUESTREO Y ANÁLISIS
<b>pH</b>	Potenciómetro	García-Gutiérrez C. & Félix Herrán J. (2014)
<b>Potencial Redox</b>	Potenciómetro	Robledo-Santoyo & Maldonado-Torres (1997)
<b>Conductividad</b>	Potenciómetro	Robledo-Santoyo & Maldonado-Torres (1997)
<b>Concentración de metales Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb, Zn</b>	Espectrofotometría de Absorción Atómica por extracción ácida, mezcla ácida de digestión (H <sub>2</sub> O: HCl:HNO <sub>3</sub> ). Con espectrofotómetro Modelo PinAAcle 900H marca Perkin Elmer, Método 3030E, 3113B	Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. APHA-AWWA-WPCF (1989)

<b>Contenido de materia orgánica</b>	Walkley-Black Método titulométrico. Oxidación de la materia con dicromato de potasio en medio ácido.	NOM-021-SEMARNAT-2000 (antes NOM-021-RECNAT-2000)
--------------------------------------	--	---

### 3.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

#### 3.3.1 Enriquecimiento de microorganismos

Se prepararon soluciones Stock de 500 ppm de los metales utilizados (Tabla 3. Sales utilizadas)

**Tabla 3. Sales utilizadas**

<b>Metal</b>	<b>Sal</b>	<b>Formula</b>
<b>Plomo (Pb)</b>	Nitrato de Plomo	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>Cromo (Cr)</b>	Dicromato de Potasio	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
<b>Cadmio (Cd)</b>	Cloruro de Cadmio	Cd Cl <sub>2</sub>
<b>Zinc (Zn)</b>	Sulfato de Zinc	Zn SO <sub>4</sub>

El enriquecimiento se realizó en matraces con 100 ml de caldo nutritivo estéril (autoclave 15 lb por 15 min.); al que se le adicionó, una vez frío, el volumen necesario de la solución Stock del metal (500 ppm), para obtener una concentración final de 10 ppm de cada metal. El medio de cultivo se inoculó con 1gr de suelo, esto se realizó con cada una de las 6 muestras, y se incubó a 35°C.

#### 3.3.2 Aislamiento de bacterias por la técnica de dilución en placa

A partir de los cultivos ya enriquecidos se realizó el aislamiento mediante la técnica de dilución en placa, utilizada por Bautista-Hernández (2008). En tubos

de ensaye que contenían 9 ml de solución salina amortiguadora por fosfatos (PBS), se adicionó 1 ml del cultivo enriquecido y se mezcló vigorosamente con la ayuda de un vortex, obteniéndose, así la primera dilución, posteriormente se extrajo 1 ml de esta dilución y se adicionó a otro tubo y esto se repitió hasta un cuarto tubo y tener la dilución 10x4.

Se tomó 0.1 ml de la dilución 10x4 y se agregó a cajas de Petri a las que se les adicionaron 15 ml de agar nutritivo, se homogeneizo la muestra haciendo giros y los cultivos se incubaron a 37°C por 72 h.

Se seleccionaron las cepas más aisladas de las demás y se sembraron por agotamiento en cajas de Petri con Agar Nutritivo, se etiquetaron conforme al suelo de procedencia, el número de la etiqueta indica a que suelo pertenecen S1 (1) ... S6 (6). Las colonias obtenidas fueron resembradas por agotamiento hasta obtener cepas puras.

### **3.3.3. Caracterización de la morfología microbiológica**

#### **3.3.3.1 *Tinción de Gram y observación microscópica.***

Se realizó tinción de Gram (Madigan *et al.*, 2015) y observación en el microscopio para identificar el tipo de pared celular, la morfología celular y observar que no existiera contaminación con bacterias de otras colonias de los aislados.

#### **3.3.3.2 *Prueba de catalasa***

Este método de ensayo se utiliza para determinar la presencia de catalasa en un cultivo microbiano. En este método se usa asa de cultivo cargada con células del cultivo de agar, se mezcla en un portaobjetos con una gota de peróxido de



hidrógeno al 30 %. La aparición inmediata de burbujas es indicativa de la presencia de catalasa. Las burbujas son O<sub>2</sub> producido por la siguiente reacción (Madigan *et al.*, 2015):  $H_2 O_2 + H_2 O_2 \rightarrow 2H_2 O + O_2$

### 3.3.3.3 *Prueba de oxidasa*

Para esta prueba se utilizó el método indirecto sobre papel (Fontalvo J., 2012)

- Se colocan 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro de en un trozo de papel filtro de 3x3cm aprox.
- Se extiende con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado
- La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos, de color azul.

### 3.3.3.4 *Caracterización de la morfología macroscópica de la colonial en agar*

Se identificaron las siguientes características macroscópicas de la colonia en Agar Nutritivo: Forma macroscópica, Borde, Elevación, Opacidad, Pigmentación. Tomando en cuenta las siguientes especificaciones reportadas en la literatura (Fontalvo, 2012).

#### a) **Características ópticas**

- Opaca: No permite paso de luz a través de ella
- Traslúcida: Pasa algo de luz pero no lo suficiente
- Opalescente: Apariencia suavemente iridiscente
- Sin brillo
- Brillante

## b) Pigmentación

Incolora o de color específico

## c) Elevación



Figura 7. Tipos de formas de elevación. Fuente: Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología (Fontalvo J., 2012)

## d) Forma Macroscópica

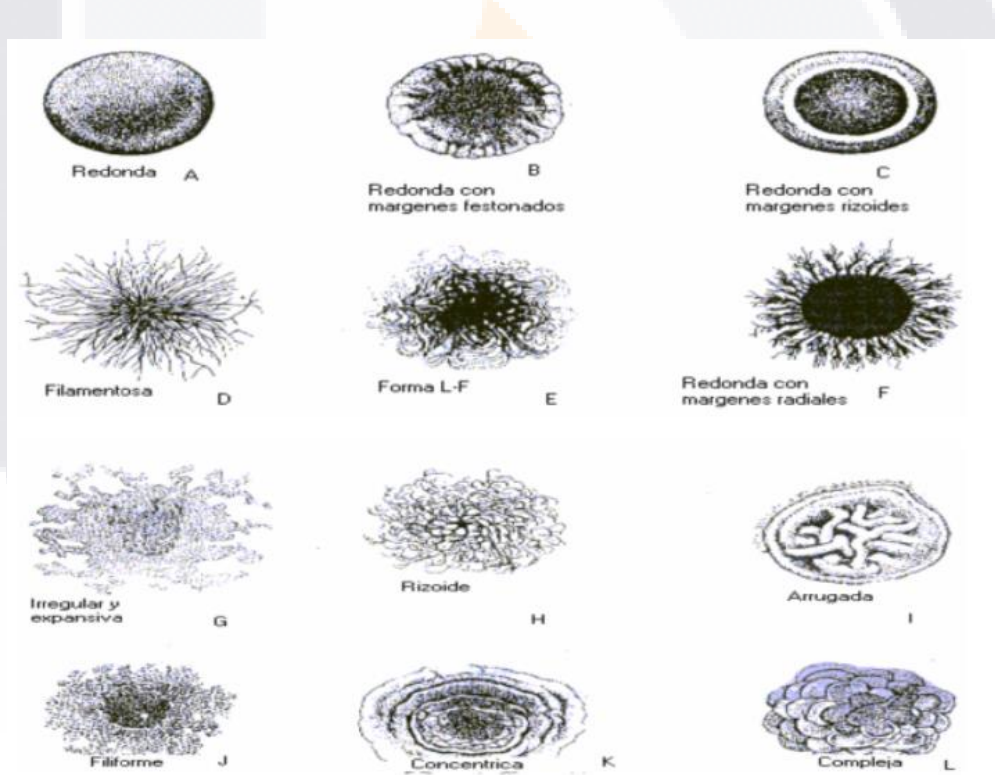


Figura 8. Formas Macroscópicas. Fuente: Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología (Fontalvo J., 2012)

### e) Borde

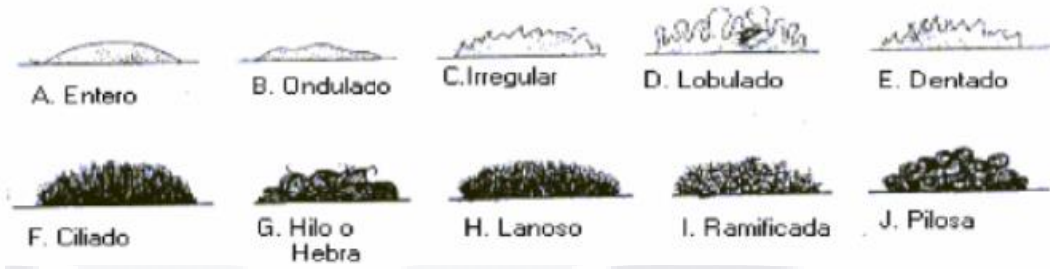


Figura 9. Tipos de Formas del Borde. Fuente: Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología (Fontalvo J., 2012)

### 3.4 ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS EN BACTERIAS

Para realizar las pruebas de ecotoxicidad bacteriana por metales, se utilizaron soluciones de Pb, Cr, Cd y Zn a concentración de 500 ppm, estas pruebas se realizaron por el test de difusión en discos de papel sobre agar nutritivo. Primeramente, las cepas de fueron activadas en caldo BHI (Infusión cerebro corazón) por incubación a 37 °C durante 48 horas, tomando como indicador de crecimiento la turbidez, se obtuvo una turbidez estandarizada de 0.5 unidades McFarland en el inóculo para los ensayos (Ulloa, 2015). Las placas con Agar Nutritivo se inocularon por rayado con hisopos de algodón sobre toda la superficie para asegurar un crecimiento distribuido uniformemente (Los discos de papel de filtro estériles (5mm) se impregnaron con las soluciones de metales independientemente, se colocaron sobre la biopelícula bacteriana de las placas, presionando levemente para asegurar su contacto, de manera similar a el método de antibiograma y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Los ensayos se realizaron por duplicado, se agregó un disco de cada metal en la caja

colocando un disco sin solución metálica en cada placa cómo control. Esta prueba se hizo con la finalidad de observar si había diferentes comportamientos de crecimiento según el metal y para descartar las colonias que no resistieran estas concentraciones de metal.

### **3.5 PRUEBA PCR PARA IDENTIFICA *PSEUDOMONAS***

Se realizó una PCR para evaluar si alguna de las cepas aisladas era perteneciente al género de *pseudomona*, para esto se seleccionaron las cepas que cumplían con las características morfológicas y bioquímicas reportadas en la literatura con este género. Las *pseudomanas* son bacilos aerobios gramnegativos de la familia *Pseudomonadaceae*, con catalasa positiva (Zago & Chugani, 2009).

#### **3.5.1 Extracción de ADN**

Se utilizó el Método de extracción de ADN con solventes orgánicos (Fenol-Cloroformo) (Orfao de Matos, 2009). Para la aplicación de este método se realizó la lisis celular mediante ebullición.

#### **3.5.2 Método (PCR)**

Se utilizó un oligo de *psudomona* para comparar con las colonias aisladas que presentaron características microbiológicas similares a *pseudomona*, las cuáles fueron las cinco siguientes: 1A, 3D-2a, 3E, 4B-1a y 5E.

#### **Procedimiento:**

a) *Determinar las cantidades de componentes y reactivos.*

Para determinar el volumen a añadir a la reacción de cada uno de los componentes se siguió la siguiente formula:

$$V_{inicial} \times C_{inicial} = V_{final} \times C_{final}$$

Donde: V representa el volumen y C la concentración.

**Tabla 4. Reactivos utilizados en el PCR**

Reactivos	Cantidad 1x
Taq 10x	1.25 µl
aNTP's	1.25 µl
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µl
PF (PA-GS-F)	0.625 µl
PR (PA-GS-R)	0.625 µl
ddH <sub>2</sub> O	6.1 µl
Taq,5 µl	0.2 µl
DNA	1 µL

Se utilizaron 2 oligos de *Pseudomona* marca Alpha DNA, con las siguientes características:

**Revers:**

Nombre del oligonucleótido: PA-GS-R

Oligo: 554024, pmole/OD: 5540, Picomoles: 61468, 615µl

Secuencia: (5' a 3'): CACTGGTGTTTCCTTCCTATA

Composición:

**Tabla 5. Porcentajes de composición del Oligo Reverse**

Nucleótido	Numero	%
<b>A</b>	3	15.00
<b>C</b>	6	30.00
<b>G</b>	3	15.00
<b>T</b>	8	40.00
<b>otros</b>	0	0.00
<b>A+T</b>	11	55.00
<b>C+T</b>	9	45.00

**Forward:**

Nombre del oligonucleótido: PA-GS-F

Oligo: 554023, pmole/OD: 5192 , Picomoles: 39707, 397  $\mu$ l

Secuencia: (5' a 3'): GACGGGTGAGTAATGCCTA

Composición:

**Tabla 6. Porcentajes de composición del Forward**

Nucleótido	Numero	%
<b>A</b>	5	26.32
<b>C</b>	3	15.79
<b>G</b>	7	36.84
<b>T</b>	4	21.05
<b>otros</b>	0	0.00
<b>A+T</b>	9	47.37
<b>C+T</b>	10	52.63

b) Preparación de microtubos.

Ya determinadas las cantidades de cada reactivo y compuesto se distribuyen en microtubos de PCR y se añade el DNA a cada muestra, y el mismo volumen de agua en el control negativo, el cual es una muestra en la se incluyen todos los componentes de la reacción, excepto el DNA. Los componentes y la mezcla de reacción se mantuvieron en hielo durante el proceso, con el fin de evitar su degradación.

c) Termociclador.

Una vez preparados los tubos de reacción se introdujeron en el termociclador, dónde se utilizó el programa Pseudo-Page el cual consta de 35 ciclos en dónde se llevaron a cabo las siguientes fases:

Desnaturalización inicial 94°C/5min

Desnaturalización 94°C/30seg - 35 ciclos

Alineación 52°C/45seg - 35 ciclos

Extensión 68°C/45seg - 35 ciclos

Extensión final 72°C/10min

Hold 4°C

Esta reacción genera 616 pares de bases (Amplifica 616pb).

#### d) Electroforesis

Para esta prueba se utilizó Gel preparado con 40 ml de gel Agarosa 1.5%, 5 ml de TAE 0.5%, 4 µL de Syber Safe y 0.6 g de Agarosa. La electroforesis se realizó a 100 volts durante 40 min.

### **3.6. PRODUCCIÓN DE BIOMASA**

En primera instancia se hizo un preinóculo, inoculando 5 ml de Caldo BHI (infusión de cerebro y corazón) una asada de la colonia de interés, incubando a 35 °C a 50 rpm hasta presentar turbidez. Posteriormente se transfirieron los inóculos a matraces con 400 ml de Caldo BHI estéril, sin metal, incubando, en este caso a 35 °C por 72 h, por duplicado, con el fin de obtener la cantidad necesaria de biomasa. Se obtuvo la biomasa por centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos, lavando tres veces con medio PBS para la remoción de posible material residual del caldo. La pastilla celular se secó a 50°C durante 48 h en estufa, hasta alcanzar peso constante. Una vez seca la biomasa, se trituró en un mortero.

### **3.7. PRUEBAS DE BIOADSORCIÓN DE Cr (II) Y Pb (II) USANDO BIOMASA BACTERIANA INACTIVA**

Con el fin de evaluar la eficiencia de remoción las capacidades de adsorción de las biomosas obtenidas y determinar su capacidad máxima de adsorción (Qmax) se realizaron cinéticas de adsorción, poniendo en contacto la biomasa y las soluciones de metal (Pb y Cr). Para esto se agregaron 0.1 g de biomasa

seca en 100 ml de solución metálica (1.0 g de biomasa/L), se mantuvieron en agitación mecánica de 60 rpm por los siguientes tiempos de contacto; 0, 30, 60 y 120 min. En cada tiempo de contacto, la biomasa y la solución se separaron en cada tiempo por centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos. La concentración de metal utilizada fue de 50 ppm tanto para Cromo y Plomo.

Para las pruebas de adsorción se eligieron 2 cepas, la 1A y 4G-2, la primera se eligió por ser positiva en el resultado de PCR, por lo que es una de las 3 cepas que resultaron positivas de la familia *psudomona*, además de ser la que al activarse en el caldo BHI presentaba el crecimiento más rápido (turbidez en 30 hrs) en comparación con las tres positivas, la cepa 4G-2 fue la que presentó el crecimiento más rápido de las 23 cepas aisladas (24 hrs), además de que ambas presentaron crecimiento en Cr y Pb en el ensayo eco-toxicológico. El factor de velocidad de crecimiento es de interés debido a que es posible obtener la biomasa necesaria más rápido.

### **3.8. ANALISIS ESTADISTICOS**

#### **3.8.1 Determinar los %de remoción**

La ecuación para determinar el % de remoción fue la siguiente (Monge, 2009).

$$\%R = \frac{100 * (C_0 - C_e)}{C_0}$$

**Dónde:**

**Co:** Concentración inicial del soluto en mg / L



**C<sub>f</sub>**: Concentración final del soluto en mg / L

**% R**: Porcentaje de remoción

### Cálculo de la capacidad de Bioadsorción

$$q\left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{V * (C_i - C_f)}{C_f}$$

Dónde:

**C<sub>i</sub>** : Concentración inicial del metal en la solución (mg/L)

**C<sub>f</sub>** : Concentración final del metal en la solución (mg/L)

**V**: Volumen de la disolución (L)

**m**: peso de la biomasa seca (g)

### 3.8.2. Construcción de las gráficas de % de remoción de metal en el solvente por tiempo para cada cepa con Cr y Pb.

Se graficó el % remoción del metal por tiempo de la biomasa de las cepas 1A y 4G-2 en los metales Cr y Pb, individualmente. Las estadísticas descriptivas y las graficas se realizaron en el programa GraphPad Prism.

### 3.8.3. Linealización de la isoterma de Langmuir

El modelo de Langmuir es el modelo más utilizado para describir isothermas de adsorción simples y para comparar el comportamiento de diferentes biosorbentes, permite establecer la máxima capacidad de unión ( $Q_{max}$ ) en mg o mmoles de metal/g de biomasa.

Los parámetros para usar este modelo se obtienen de la linearización  $C_{eq}/q$  vs  $C_{eq}$ . La ecuación de regresión lineal tendrá una ordenada al origen  $x$  y una pendiente  $y$ , los parámetros se dan por las siguientes ecuaciones: (Cary, 2002)

$$y = 1/q_{max} ,$$

$$q_{max} = 1/y$$

$$x = 1/q_{max} * b ,$$

$$b = (1/x)/ q_{max}$$

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. RESULTADOS FISICOQUIMICOS DEL SUELO

#### 4.1.1. Identificación de las zonas de muestreo

Se identificaron las zonas de muestreo como “S1... S6” en base a la distancia de las Minas, Mina), se recaudaron sus coordenadas y la distancia aproximada a la fuente de emisión además de la descripción general del área de muestreo. (Tabla 7). Dónde el área más cercana fue a aproximadamente 843 m de distancia, mientras que el punto más lejano de muestreo fue a 3.3 km de la mina.

**Tabla 7. Coordenadas y Descripción de las áreas de muestreo.**

Área de muestreo	Coordenadas	Descripción	Distancia aproximada a la mina
S1	22°13'43.0"N 102°06'17.5"W 22.228619, -102.104864	Este es el punto de muestreo más cercano a la mina, pasaba una escorrentía minera a unos centímetros, en esta área había árboles	843 m
S2	22°13'43.2"N 102°06'17.3"W 22.228661, -102.104792	Se tomó de un punto cercano a la desembocadura de la escorrentía, el color de la muestra era rojizo, había árboles y plantas cerca.	858 m
S3	22°13'45.6"N 102°06'18.2"W 22.229341, -102.105049	La recolección en este punto se realizó a unos metros del templo de Tepozalá, había vegetación y en la muestra contenía rizosfera.	1.3 km
S4	22°13'57.1"N 102°05'47.3"W 22.232522, -102.096458	Se tomó la muestra de este punto en suelo junto al río, había mucha vegetación y era una zona húmeda, el suelo era aparentemente más blando.	1.8 km
S5	22°14'27.7"N 102°05'18.1"W 22.241019, -102.088356	Este punto es el más cercano a la ciudad, no había vegetación cercana, las casas habitación estaban aproximadamente a 20 m de distancia.	2.9 km
S6	22°14'48.7"N 102°05'15.8"W	Se tomó la muestra de este punto en suelo junto al río, había mucha vegetación y era una zona húmeda a orillas de la ciudad.	3.3 km

Utilizando las técnicas reportadas en la *Tabla de Técnicas utilizadas para la caracterización de parámetros físicos y químicos del suelo (Ver Tabla 2)*. Se obtuvieron los resultados de los análisis fisicoquímicos de pH, Conductividad Eléctrica, Nitrógeno Total, Fosforo Total, Materia Orgánica y Potencial Redox para cada una de las muestras compuestas de suelo, evaluados por triplicado (Tabla 8). Posteriormente

**Tabla 8. Resultados fisicoquímicos de las muestras de suelo.**

Área	Muestra	pH	Conductividad Eléctrica CE	Nitrógeno T mg/L	Fosforo T mg/L	% Materia Orgánica	Potencial Redox
S1	a	7.30	2436	20	0.61	5.04	132.9
	b	7.34	2432	23	0.65	5.20	158.9
	c	7.34	2418	22	0.48	5.40	155.5
S2	a	7.44	2063	5	1.7	2.49	154.8
	b	7.39	2065	5	1.58	2.32	158.1
	c	7.39	2114	2	1.69	2.39	162.1
S3	a	7.34	2225	2	1.01	3.15	176.1
	b	7.39	2203	2	0.96	3.24	149.8
	c	7.39	2200	2	0.98	3.22	159.9
S4	a	7.40	323	2	1.11	6.67	-59.9
	b	7.33	318	2	1.16	6.38	-64.5
	c	7.36	319	2	1.15	6.52	-45.3
S5	a	7.29	1029	3	1.6	3.01	186.6
	b	7.31	999	0	1.4	3.77	173.5
	c	7.29	1002	2	1.43	3.56	169.8
S6	a	7.02	908	26	4	4.61	172.9
	b	7.06	914	20	4	4.19	171.5
	c	7.05	947	28	4	4.33	194.2

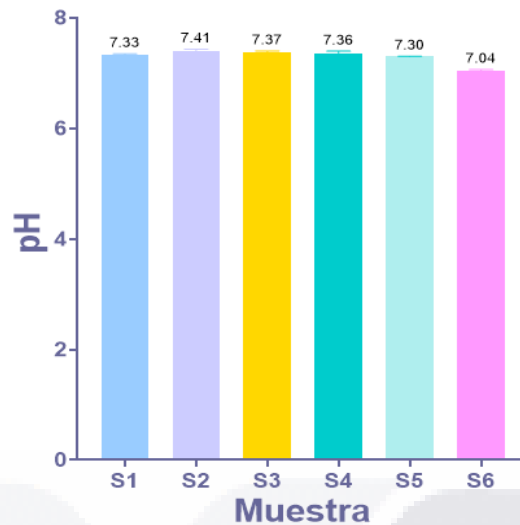
Los resultados de cada parámetro determinado se compararon con un análisis estadístico descriptivo, para facilitar la interpretación e integración de los resultados, cada parámetro se representó mediante una gráfica de barras, con la finalidad de apreciar las diferencias por suelo entre cada parámetro analizado (GraphPad).

#### 4.1.2. pH

Los valores de las medianas de los resultados de pH obtenidos en las 6 muestras de suelo oscilaron entre 7.04 a 7.41, Tomando en cuenta la Clasificación de los suelos en función a su acidez (*Ver Tabla 9*) la muestra de suelo más alejada de la mina (S6) es la que se acerca más a la neutralidad (pH 7.04) las muestras S1, S3, S4 y S5 también tuvieron valores neutros pH 7.33, 7.37, 7.36 y 7.30 respectivamente, la muestra S2 fue la única muestra que presentó un grado Moderadamente alcalino con un valor de pH de 7.4( *Ver figura 10*).

**Tabla 9. Clasificación de los suelos en función a su acidez** Fuente: NOM-021-SEMARNAT-2000

<b>Grado de acidez o alcalinidad</b>	<b>pH</b>
<b>Extremadamente ácido</b>	< 4.6
<b>Ácido</b>	4.6 – 5.4
<b>Moderadamente ácido</b>	5.5 – 6.4
<b>Neutro</b>	6.5 – 7.3
<b>Moderadamente alcalino</b>	7.4 – 8.1
<b>Alcalino</b>	8.2 – 8.8
<b>Extremadamente alcalino</b>	>8.9

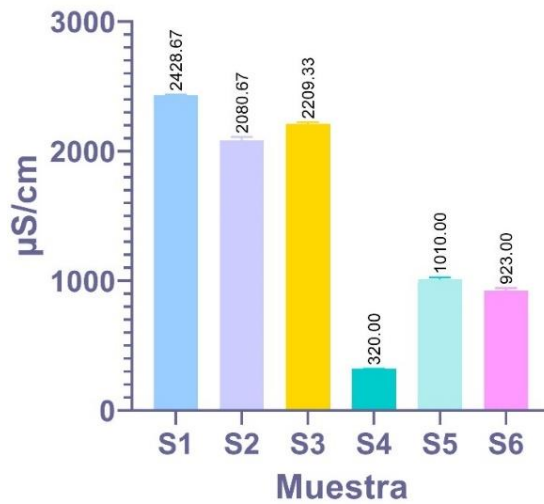


**Figura 10. Grafica de barras de los valores de pH por muestra de suelo.** Todas las muestras rondaron en pH 7, siendo la mínima de 7.04 (S6) y la máxima de 7.41 (S2).

#### 4.1.3. Conductividad Eléctrica (CE)

En función de conductividad, los suelos pueden ser clasificados en muy salinos si su conductividad es mayor de 1150  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , salinos si está en el rango de 650 a 1150  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , ligeramente salino si su conductividad tiene un valor de entre 350 y 650  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y no salino si es menor a 350  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Ramos-Gómez, 2012). Los resultados de las mediciones de CE en suelo muestran diferentes condiciones de salinidad en cada área, siendo el área más cercana a la mina (S1) el área con mayor salinidad, mientras que la cuarta área más próxima (S4) muestra la menor conductividad. En base a las clasificaciones de salinidad de los suelos en función de la CE, podemos decir que el suelo en las áreas S1, S2 y S3 son suelos muy salinos, los S5 y S6 salinos, mientras que el suelo del área S4 tiene un valor de CE que lo clasifica como no salino (*Ver Figura 11*).

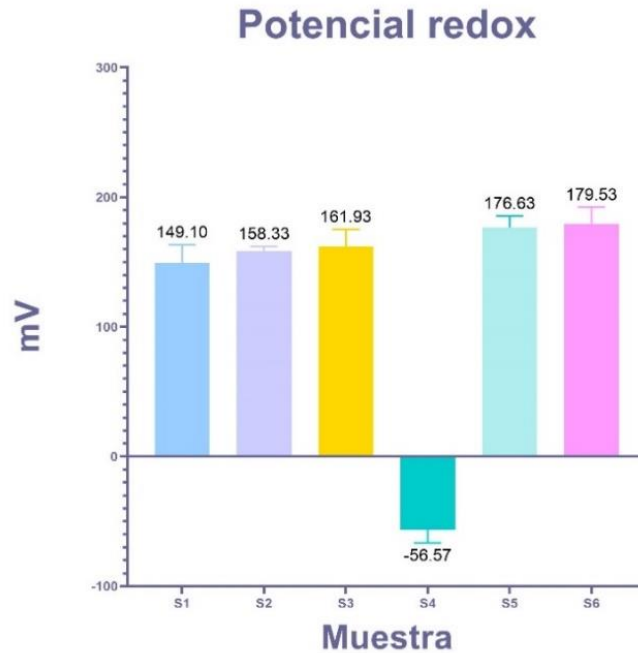
### Conductividad Eléctrica



**Figura 11. Grafica de barras de los valores de Conductividad Eléctrica (µS/cm) por muestra de suelo. La muestra con valores más bajos fue la S4 con 320 µS/cm y la más alta la S1 con 2428 µS/cm**

#### 4.1.4. Potencial Redox

Los resultados obtenidos de Potencial redox señalan que las áreas muestreadas con mayor potencial redox son las 2 más alejadas de la Mina (S5 y S6), teniendo valores de 176.63 y 179.53 mV respectivamente, clasificándose como oxidantes, el suelo S4 es el único que presento valores negativos (-56.57 mV) por lo tanto se clasifica como reductor, en general todas las muestras a excepción de la S2 oscilan en los mismos niveles de potencial redox, por lo que las muestras S1, S2, S3 también se clasifican como suelos de comportamiento oxidante (*Ver Figura 12*).



**Figura 12. Grafica de barras de los valores de Potencial Redox por muestra de suelo.** Todas las muestras mostraron valores de oxidación a excepción de la muestra S4 que presento valores negativos (-56.57) que representan un comportamiento reductor en suelo.

En los suelos normales el ambiente es aireado y por tanto la tendencia general es oxidante, cuando los suelos son húmedos se tiende a tener un ambiente reductor ocasionado por la saturación en agua, esto es uno de los factores que intervienen para que la muestra de suelo S4 sea la única muestra que presente Potencial Redox negativo ya que esta fue la muestra obtenida junto al río, (Ver. *Tabla 7. Coordenadas y Descripción de las áreas de muestreo*) además de que esta muestra presentó los valores más altos de materia orgánica y cómo se mencionó anteriormente, Gómez M., (2012) señala que las reacciones redox, se intensifica gracias al rompimiento de las moléculas orgánicas en medios anegados ocasionando potenciales redox negativos.



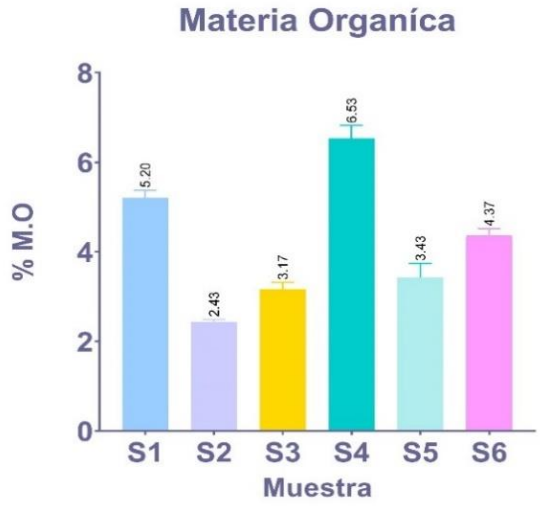
#### 4.1.5. Materia Orgánica (M.O.)

Los resultados de % de M.O. jerárquicamente de menor a mayor quedaron en esta secuencia S2, S3, S5, S6, S1 y S4, con los siguientes porcentajes; 2.43, 3.17, 3.43, 4.37, 5.20 y 6.53, respectivamente. En base a la *Figura 13. Clasificación de los suelos no volcánicos según el porcentaje de MO.* la muestra S4 fue la única que se clasificó como Muy Alto en MO, las muestras S1 y S6 se clasifican como Altos en MO mientras que S2, S3 y S5 como clasificación Media en % de Materia Orgánica (*Ver Figura 14*)

**Figura 13. Clasificación de los suelos no volcánicos según el porcentaje de materia orgánica.** Fuente NOM-021-SEMARNAT-2000.

Clase	% M.O.
Muy bajo	<0.5
Bajo	0.6- 1.5
Medio	1.6 – 3.5
Alto	3.6-6.0
Muy Alto	>6.0

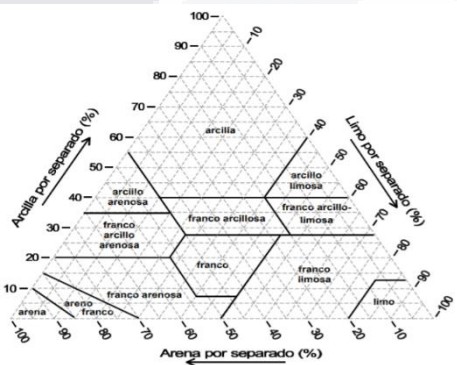
El porcentaje tan elevado de MO en la muestra S4 indica que este suelo tiene propensión de presentar condiciones para la generación de bacterias reductoras que intervengan en las reacciones de descomposición orgánica.



**Figura 14. Grafica de barras de los valores de % de Materia Orgánica por muestra de suelo.** La muestra con mayor porcentaje de materia orgánica fue la S4, mientras que la que tuvo menor porcentaje fue la S2.

**4.1.6. Textura de suelo**

La textura del suelo proporciona una idea general de las propiedades físicas del suelo. Los porcentajes de limo, arena y arcilla sirven para determinar la textura correspondiente, con el triángulo de texturas (*Figura 15*). Los resultados de la clasificación de los suelos indican que todas las muestras pertenecen a la Clase de Suelo Franco Arenoso a excepción de la muestra S2 que se clasifica como Arenoso Franco (*Ver Tabla 10*).



**Figura 15. Triángulo textural del suelo, USDA,**  
Fuente: Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud

**Tabla 10. Resultados de la clasificación textural del Suelo.**

Muestra	Lectura a 40S	Temp. °C	Lectura a 2hrs	% Arena	% Arcilla	% Limo	Clase
S1	30	25	3	68.02	4.98	28.98	Franco arenoso
S2	19	25	1	79.02	2.98	19.98	Arenoso franco
S3	23	25	2	75.02	3.98	22.98	Franco arenoso
S4	30	25	17	68.02	18.98	14.98	Franco arenoso
S5	18	25	10	80.02	11.98	9.98	Franco arenoso
S6	28	25	0	70.02	1.98	29.98	Franco arenoso

Galán E. & Romero A. (2008) Mencionaron que los suelos arcillosos retienen más metales por adsorción, debido al complejo de cambio de los minerales de la arcilla. En cambio, los arenosos carecen de capacidad de fijación y esto llega a ocasionar que se contamine el nivel freático. En general las 6 muestras presentan altos porcentajes de arena y bajos porcentajes de arcilla lo que podría indicar su predisposición para facilitar la movilidad de los metales ya que poseen menor capacidad de fijación.

#### **4.1.7. Determinación de metales en suelos.**

Mediante Absorción Atómica en Flama (Ver Tabla 2), se determinó la concentración de Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Fierro (Fe), Manganeso (Mn), Níquel (Ni), Plomo (Pb) y Zinc (Zn) estimada en Partes por millón (PPM).

Para evaluar las condiciones de calidad de suelo en base a las concentraciones de metales, se tomaron como referencia la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 *Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio,*

aplicable en México y de las *Guías canadienses de la calidad del suelo para la protección del medio ambiente y la salud humana (Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health 2007)* las cuales sirven sólo como referencia para determinar cuándo un suelo se encuentra contaminado por las sustancias que ahí mencionan pero en México no existe ninguna norma que establezca límites máximos permisibles de metales en suelos para ningún tipo de uso (Industrial/Residencial/Comercial/Agrícola).

**Tabla 11. Valores guía referenciales para concentraciones admisibles de metales en suelos**

Metal	Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health		NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004	
	Residencial	Industrial	Agrícola/Residencial/Comercial	Industrial
<b>Uso de Suelo</b>				
<b>Cadmio (Cd)</b>	10	22	37	450
<b>Cobre (Cu)</b>	63	91	-	-
<b>Cromo (Cr)</b>	64	87	280	510
<b>Fierro (Fe)</b>	-	-	-	-
<b>Manganeceo (Mn)</b>	-	-	-	-
<b>Niquel (Ni)</b>	50	50	1,600	20,000
<b>Plomo (Pb)</b>	140	600	400	800
<b>Zinc (Zn)</b>	200	360	--	--

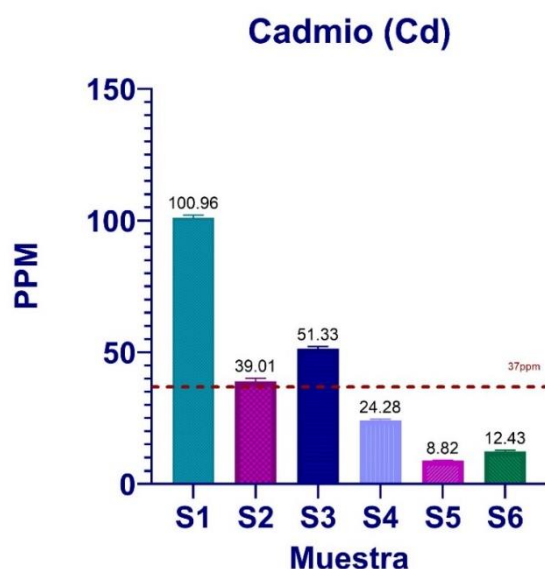
**4.1.7.1. Cadmio (Cd)**

Tomando en cuenta los valores para uso de suelo Industrial el cadmio presenta valores por encima de lo referenciado en la guía canadiense (22 ppm) en las

muestras S1, S2, S3 y S4, la muestra S1 presentó una concentración más de cuatro veces mayor a la establecida por dicha guía, mientras que en la referencia mexicana (NOM 147) excluye a todas las muestras cómo contaminadas por Cadmio (450 ppm) pero si se toma en cuenta lo indicado para uso de suelo Residencial las muestras S1, S2 y S3 se encuentran por encima de este valor (37 ppm). En 2016 en la comunidad de Asientos se han reportado valores de Cd de 25 ppm en suelos y sedimentos (Mitchell K.N.).

**Tabla 12. Medias de las concentraciones de Cadmio en las Muestras de Suelo en PPM.**

Cadmio (Cd)	S1	S2	S3	S4	S5	S6
<b>Media</b>	101	39.01	51.33	24.28	8.821	12.43
<b>Coefficiente de variación</b>	1.100%	2.935%	1.628%	1.400%	2.039%	2.972%



**Figura 16. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Cadmio en Suelo.** La muestra que presenta mayor contaminación de Cd es la S1 con 100 ppm mientras que la de menor concentración es la S5 con 12.43 ppm se aprecia tendencia a la disminución de la concentración al incrementar la distancia a las Minas.

--- PPM de referencia indicados por NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004

#### 4.1.7.2. Cobre (Cu)

Para Cobre no existen valores de referencia en suelo en normas mexicanas, sin embargo, las seis muestras analizadas mostraron concentraciones de Cobre por encima de lo referenciado en la guía canadiense para suelo residencial (63 ppm) siendo la muestra S1 la más contaminada por este metal con concentraciones 13 veces por encima de lo referenciado en dicha norma. Un estudio realizado por Mitchell K.N. en 2016 en esta misma comunidad reportó valores de contaminación por Pb en suelo de hasta 380 ppm, mientras que en sedimentos reportó hasta 800 ppm.

Tabla 13. Medias de las concentraciones de Cobre en las Muestras de Suelo en PPM.

Cobre (Cu)	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Media	838.7	336.1	392	280.5	131.5	171
Coefficiente de Variación	0.9530%	1.605%	0.6627%	1.868%	2.386%	0.5797%

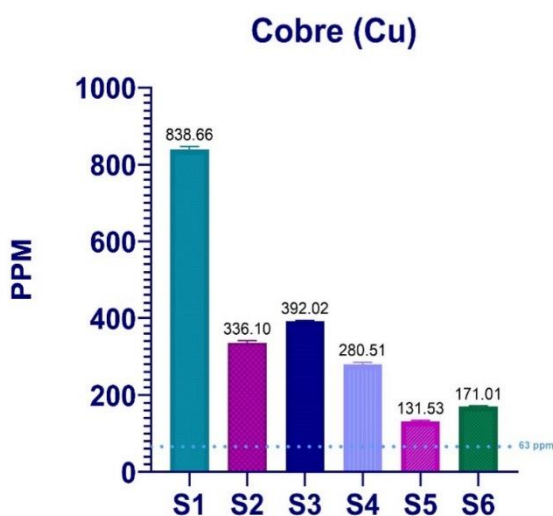


Figura 17. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Cobre en Suelo. La muestra que presenta mayor contaminación de Cu es la S1 con 838 ppm mientras que la de menor concentración es la S5 se aprecia tendencia a la disminución de la concentración al incrementar la distancia a las Minas. Todas las muestras presentan valores de Cu por encima de lo referenciado como cantidad de contaminación.

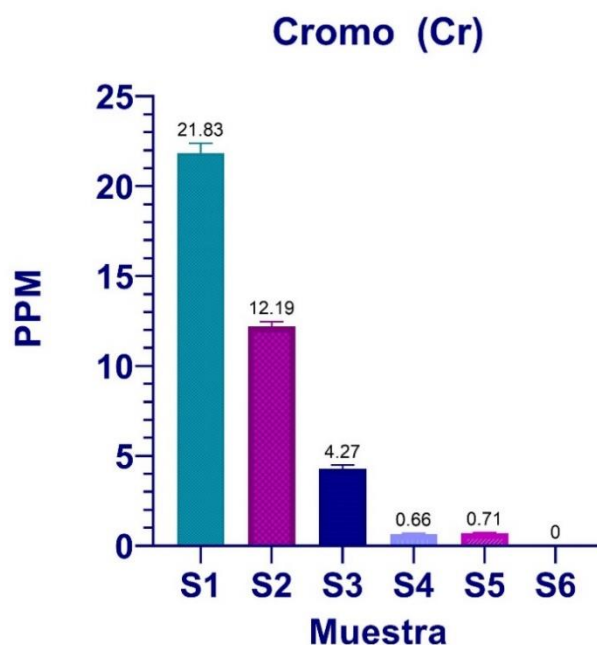
..... PPM de referencia indicados por *Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health*

### 4.1.7.3. Cromo (Cr)

Los valores de Cromo no excedieron los valores indicados en la norma mexicana NOM-147 (510 ppm) así como tampoco para la guía canadiense (87 ppm) en ninguna de las muestras analizadas. El estudio realizado por Mitchell K.N. (2016) en suelos y sedimentos de la misma comunidad mostró valores de Cr que iban desde 5 ppm hasta 20 ppm).

**Tabla 14. Medias de las concentraciones de Cromo en las Muestras de Suelo en PPM.**

Cromo (Cr)	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Media	21.83	12.19	4.273	0.6647	0.7087	0
Coefficiente de variación	2.533%	2.312%	5.026%	5.094%	4.558%	



**Figura 18. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Cromo en Suelo.** Se puede apreciar que decrece la concentración del metal conforme aumenta la distancia a la Mina. Todos los resultados están por debajo de lo establecido en la normatividad, siendo el valor más alto de 21.8 ppm en la muestra S1.

#### 4.1.7.4. Fierro (Fe)

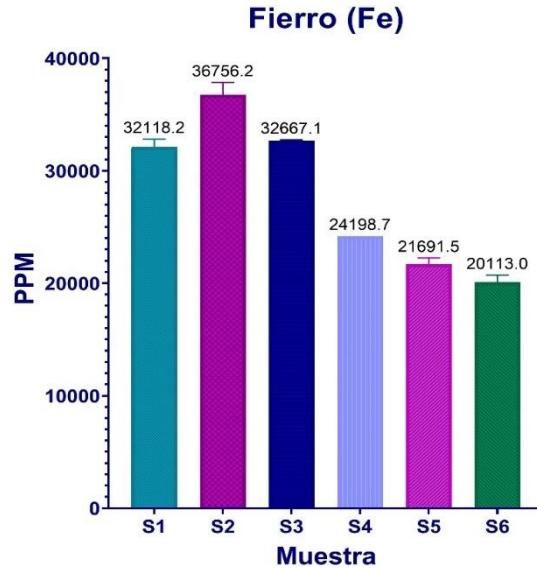
La concentración de este metal está por encima de las 20,000 ppm por millón en todas las muestras analizadas, en la normatividad de referencia no hay valores admisibles indicados para este metal, pero Acevedo-Sandoval (2004) menciona que el contenido de hierro en el suelo varía de 0.5 a 5% y que la media estimada es de 3.8% recalando que el hierro no silícico constituye hasta 50% de la masa del suelo por lo que se podría inferir que las concentraciones tan elevadas de Hierro en los resultados están mediadas por condiciones naturales, sin descartar el contenido agregado por la cantidad antropogénica ya que al igual que en los demás metales, gráficamente se observa la tendencia al aumento de su concentración en función de la cercanía a la mina.

El Hierro (Fe) es uno de los elementos más frecuentes en las rocas y en los suelos agrícolas, provoca la formación de hidróxidos de hierro, según estudios, el fierro intercambiable en suelo oscila entre 1 y 1000 mg kg<sup>-1</sup>. La formación de óxidos de hierro en el suelo es intervenida por la materia orgánica y las bacterias, la materia orgánica forma quelatos metálicos con el Fierro además algunas bacterias participan en el ciclo del hierro, cuándo los suelos tienden a ser ácidos, los óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos de hierro constituyen un grupo de coloides que son capaces de adsorber amplias cantidades de metales y tienen importante influencia en sus concentraciones (Acevedo-Sandoval et al., 2004).

**Tabla 15. Medias de las concentraciones de Fierro en las Muestras de Suelo en PPM.**

<b>Fierro (Fe)</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>
<b>Media</b>	32118	36756	32667	24199	21692	20113
<b>Coefficiente de variación</b>	2.173%	2.972%	0.2767%	0.500%	2.502%	3.012%





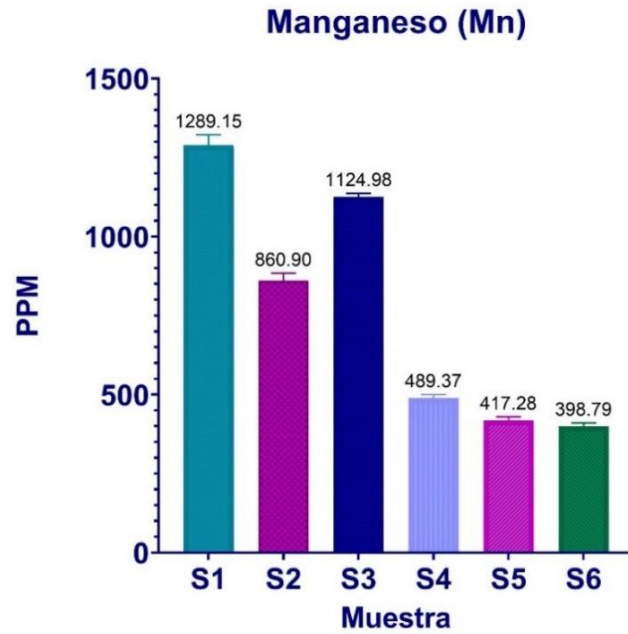
**Figura 19. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Fierro en Suelo.** La muestra con mayor concentración de Fierro es la S2 con 36, 756 ppm. A partir de la muestra S2 a s6 se ve un decremento de las concentraciones conforme aumenta la distancia a la Mina.

#### 4.1.7.5. Manganeso

Para este metal no existen valores referenciados en la normatividad, este es uno de los es un elemento traza requerido en mínimas concentraciones para el crecimiento, desarrollo y función de los seres humanos, pero en exceso puede ser un potente neurotóxico (Ayala L & Azcona-Cruz M, 2017). En todas las muestras se encontrar concentraciones por encima de las 390 ppm, siendo la concentración más alta la de la muestra S1 con 1289 ppm.

**Tabla 16. Medias de las concentraciones de Manganeso en las Muestras de Suelo en PPM.**

Manganeso (Mn)	S1	S2	S3	S4	S5	S6
<b>Media</b>	1289	860.9	1125	489.4	417.3	398.8
<b>Coficiente de variación</b>	2.505%	2.684%	1.050%	2.199%	2.932%	2.911%



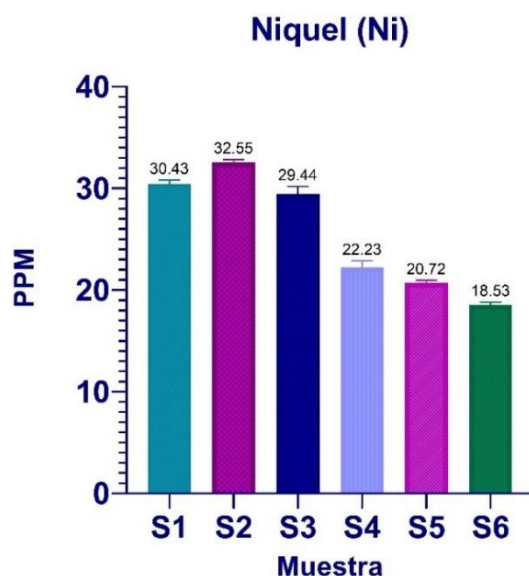
**Figura 20. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Manganeso en Suelo.** El valor más alto de Manganeso nuevamente lo mostró la muestra S1 con 1289 ppm. Las muestras S4, S5 y S6 muestran resultados muy parecidos de este metal, con un rango de entre 398 a 489 ppm.

#### 4.1.7.6. *Níquel (Ni)*

Las concentraciones de Níquel no sobrepasan en ninguna muestra las cantidades establecidas por la normatividad, ya que para suelos industriales se establecen 50 ppm (Canadá) y 20, 000 pmm (México) y para suelos de uso habitacional se establece 50 ppm (Canadá) y 1600 ppm (México) como criterios de contaminación por Ni. Cabe mencionar la enorme diferencia de criterios entre ambas normas para establecer que el suelo está contaminado por Níquel, ya que la normatividad mexicana da un rango 30 veces más amplio que la guía canadiense para suelo de uso habitacional y 400 veces mayor para suelo de uso industrial.

**Tabla 17. Medias de las concentraciones de Níquel en las Muestras de Suelo en PPM.**

Níquel (Ni)	S1	S2	S3	S4	S5	S6
<b>Media</b>	30.43	32.55	29.44	22.23	20.72	18.53
<b>Coefficiente de variación</b>	1.288%	0.8835%	2.549%	2.850%	1.091%	1.465%



**Figura 21. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Níquel en Suelo.** Se puede apreciar que decrece la concentración del metal conforme aumenta la distancia a la Mina a partir de la muestra S2 a la S6, siendo la muestra S2 la que presentó los resultados más elevados de este metal (32 ppm). Todos los resultados están por debajo de lo establecido en la normatividad.

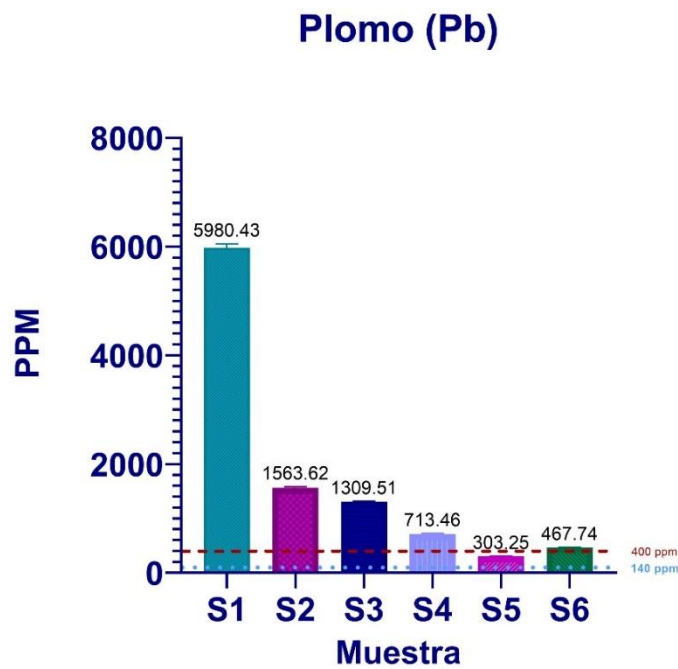
#### 4.1.7.7. Plomo (Pb)

Todas las muestras sobrepasan los niveles indicados por la guía canadiense para suelo de uso residencial (140 ppm) y para la referencia de suelo de uso industrial sólo las muestras S5 y S6 no sobrepasan el valor de referencia (600 ppm), con la NOM-147-SEMARNAT-2004 lo establecido para suelo residencial son 400 ppm y sólo la muestra 5S no lo sobrepasa, mientras que el indicador de contaminación por plomo para suelo industrial es de 800ppm y lo sobrepasan 3 de las 6 muestras, la muestra S1 sobrepasa 10 veces los niveles aceptables de suelo industrial de la guía canadiense, 7 veces los niveles de

referenciados de la NOM-147-SEMARNAT-2004 con una concentración de 5980 ppm. En esta misma comunidad de Asientos Ags., (Mitchell, 2016) reportó muestras en suelo con concentraciones de Plomo de hasta 1000 ppm y en sedimentos reportó concentraciones que iban desde 1000 ppm a 3800 ppm.

**Tabla 18. Medias de las concentraciones de Plomo en las Muestras de Suelo en PPM.**

Plomo (Pb)	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Media	5980	1564	1310	713.5	303.2	467.7
Coefficiente de variación	1.171%	1.184%	0.4382%	1.400%	0.7380%	0.3752%



**Figura 22. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Plomo en Suelo.** La muestra que presenta mayor contaminación de Pb es por mucho la muestra S1, la cual se encuentra a aprox. 850 metros de distancia de la fuente de emisión, los otros puntos también presentan valores altos, pero lo obtenido en el área del suelo S1 sobrepasa por al menos 5 veces lo obtenido en las demás muestras, mientras que las otras 4 muestras rondan en valores que van de 303 ppm a 1563 ppm.

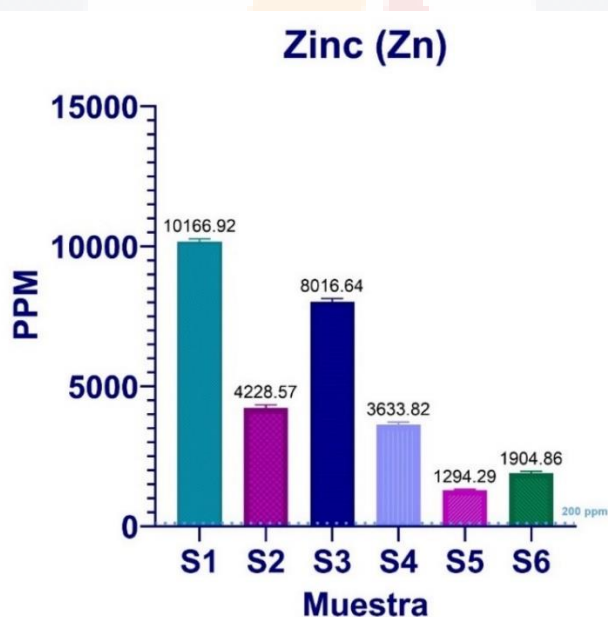
..... PPM de referencia indicados por *Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health*

#### 4.1.7.8. Zinc

Todas las muestras sobrepasan con al menos 3 veces más Zinc del establecido por las guías ambientales canadienses para suelo Industrial (360 ppm) llegando incluso a sobrepasarlo hasta 28 veces (S1) y con al menos 7 veces lo establecido para suelo residencial. A pesar de ser un metal conocido por sus efectos tóxicos, no hay índices de referencia de contaminación por Zinc en suelo en normatividad mexicana. En 2016 se reportaron concentraciones Zn en sedimentos de la misma comunidad de hasta 12 000 ppm (Mitchell, 2016).

**Tabla 19. Medias de las concentraciones de Zinc en las Muestras de Suelo en PPM.**

Zinc (Zn)	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Media	10167	4229	8017	3634	1294	1905
Coefficiente de variación	1.052%	2.703%	1.473%	2.475%	2.132%	3.208%



**Figura 23. Grafica de barras de las medias de las concentraciones obtenidas de Zinc en Suelo.** Los valores más altos resultaron en las muestras S1 y S3 con valores de 10,166 y 8,016 ppm respectivamente, el valor más bajo pertenece a la muestra S5 con 1294 ppm.

#### 4.1.8. Resumen de los resultados fisicoquímicos

**Tabla 20. Resumen de los resultados fisicoquímicos en cada muestra de Suelo.**

Parámetro	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Ph	7.33	7.41	7.37	7.36	7.30	7.04
Conductividad eléctrica μS/cm	2428.67	2080.57	2209.33	320.0	1010.0	923.0
Potencial Redox mV	149.1	158.33	161.93	-56.57	176.63	179.53
% Materia Orgánica	5.20	2.43	3.17	6.53	3.43	4.37
Clase textural del suelo	Franco arenoso	Arenoso franco	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso
Cd ppm	101	39.01	51.33	24.28	8.821	12.43
Cu ppm	838.7	336.1	392	280.5	131.5	171
Cr ppm	21.83	12.19	4.273	0.6647	0.7087	0
Fe ppm	32118	36756	32667	24199	21692	20113
Mn ppm	1289	860.9	1125	489.4	417.3	398.8
Ni ppm	30.43	32.55	29.44	22.23	20.72	18.53
Pb ppm	5980	1564	1310	713.5	303.2	467.7
Zn ppm	10167	4229	8017	3634	1294	1905

## **4.2. ANALÍISIS MICROBIOLÓGICO**

### **4.2.1. Aislamiento de bacterias por la técnica de dilución en placa.**

Por la técnica de dilución en placa y utilizando la estría cruzada, se logró aislar 23 colonias, estas técnicas se repitieron hasta que se lograra apreciar cultivos puros (Fig. 23). Su etiquetado se realizó conforme a la muestra de dónde se obtuvo, el número al inicio del nombre dado representa el suelo del que se obtuvo, ejemplo: 1A, pertenece a la muestra de suelo S1.

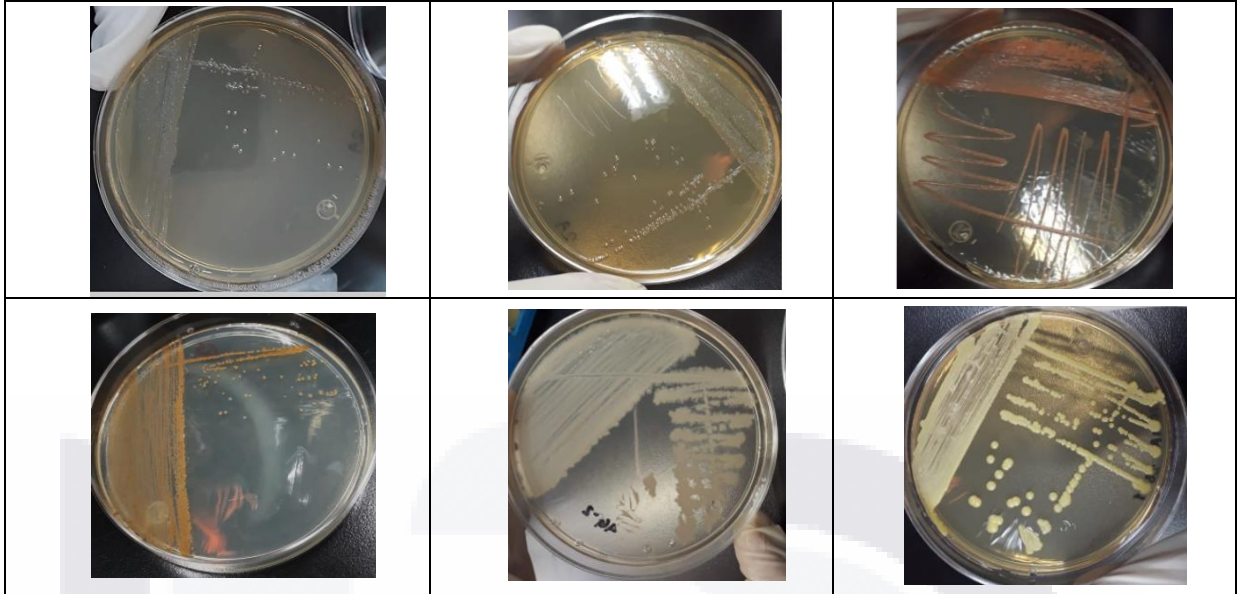


Figura 24. Ejemplos de las colonias sembradas en cajas con Agar Nutritivo por la técnica de estría cruzada.

#### 4.2.2. Tinción de Gram

Gracias a este método se identificó que 9 de las 23 colonias eran Gram negativo y 14 Gram positivo (*Ver Tabla 21*).

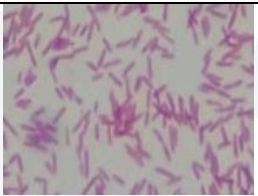
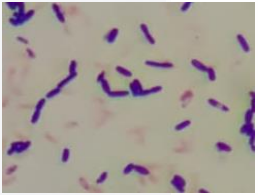

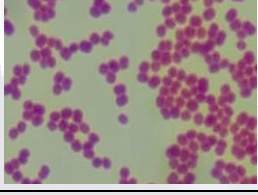
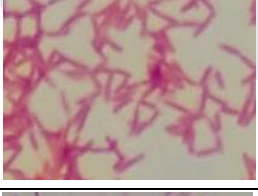

#### 4.2.3. Identificación microbiológica

A nivel microbiológico se identificó la morfología celular de las cepas, su tipo de pared (Gram), y si las colonias resultaban positivas a catalasa y oxidasa. De esto se obtuvieron colonias con diversidad morfológicas dónde dominaron los bacilos, 20 colonias resultaron positivas a catalasa, 15 obtuvieron oxidasa positiva, de éstas, 13 resultaron tanto con catalasa cómo oxidasa positiva y sólo una presentó catalasa y oxidasa negativas (5E).

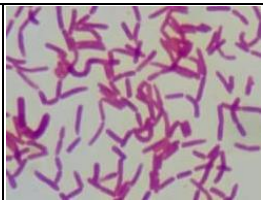



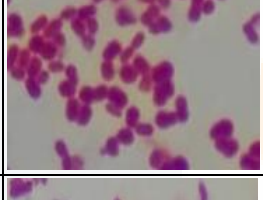
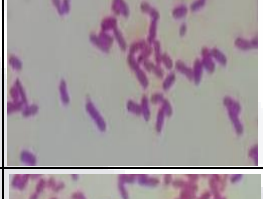
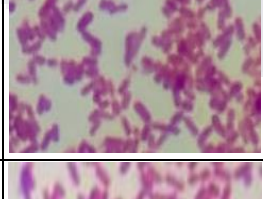

#### 4.2.4. Identificación macrobiología


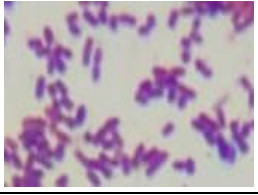

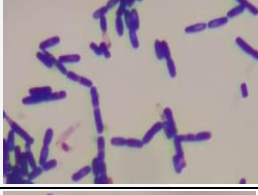
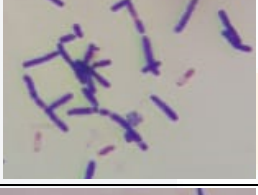

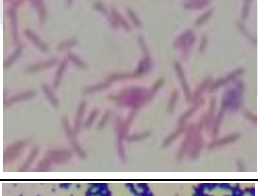
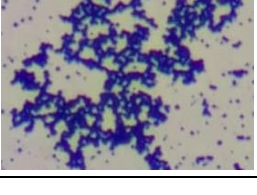
En base a lo descrito en 2012 en la literatura por Fontalvo J., se determinaron las características microbiológicas de las colonias sembradas en Agar Nutritivo (Ver Tabla 21)

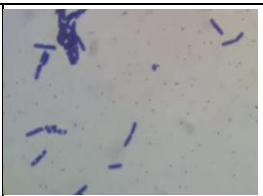
**Tabla 21. Resultados de la identificación micro y macro biológica de las cepas.**

No.	NOMBRE ASIGNADO	PRUEBAS BIQUÍMICAS		TINCIÓN DE GRAM		MORFOLOGÍA COLONIAL BACTERIANA EN MEDIOS DE CULTIVO (AGAR NUTRITIVO)					
		OXIDASA	CATALASA	FOTOGRAFÍA	RESULTADO	FORMA MACROSCOPICA	ELEVACIÓN	MARGEN	COLOR	TEXTURA	OPACIDAD
1	1A	+	+		Bacilos gram (-) medianos, separados	Circular/Granular	Convexa	Umblicada	Beige con halo claro	Aspera-Cremosa	Ligeramente
2	1E	+	+		Bacilo corto gram (+)	Irregular	Plana	Entera	Beige	Dura-Aspera	Si
3	3A	+	-		Bacilos gram (+) medianos, separados	Circular	Elevada	Entera	Beige-Translucida	Creмосa	No
4	3C-1A	+	-		Cocos gram (+)	Puntiforme	Elevada	Entera	Amarilla	Creмосa	No
5	3C-1B	-	+		Bacilos cortos, gram (-)	Irregular	Elevada	Entera	Blanca-Translucida	Creмосa	No
6	3D	+	-		Estreptobacilos gram(+)	Circular	Convexa	Entera	Amarillo-Claro	Creмосa	No



7	3D-2A	+	+		Bacilos gram(+)	Circular	Semi-convexa	Semi-Ondulado	Amarillo	Cremosa	Si
8	3D-2B	-	+		Filamento gram (+)	Circular	Elevada	Entera	Blanca-Amarilla	Cremosa	Si
9	3D-3	+	-		Cocos gram (+)	Circular	Plana	Entera	Rosa	Cremosa	Si
10	3E	+	+		Bacilos gram (-)	Circular	Semi-convexa	Entera	Translucida, ligeramente amarilla	Pegajosa	Si
11	3F	+	-		Cocobacilo gram (-)	Circular	Semi-Convexa	Entera	Blanca-Translucida	Pegajosa	No
12	4B-1A	+	+		Bacilo corto gram (+)	Granular	Plana	Entera	Amarilla-Naranja	Cremosa	No
13	4B-1B	+	+		Bacilo corto gram (+)	Circular	Semi-convexa	Liso	Amarillo	Pegajosa	No
14	4B-2	+	-		Cocobacilo gram (-)	Puntiforme	Elevada (Semi-convexa)	Entera	Amarilo-Naranja	Cremosa	Luminosa

15	4C-A	+	+		Bacilo gram (-)	Irregular	Elevado	Ondulada	Blanco	Cremosa	Si
16	4E	+	+		Cocobacilo corto gram (+)	Circular	Convexa	Entera	Naranja-Beige	Cremosa	No
17	4C-B	+	+		Bacilo gram (-) Presenta esporas	Granular	Plana-Elevada	Lisa-Ondulada	Blanco/Beige	Cremosa	No
18	4G-1	+	+		Bacilos gram (+) con esporas	Irregular	Plana	Erosionado	Blanco/Beige	Cremosa	No
19	4G-2	+	+		Bacilos gram (+) solos y en cadenas	Irregular	Plana	Erosionado	Blanco/Beige	Cremosa	Si
20	5A	+	-		Bacilos gram (+) solos y en pares	Irregular	Plana	Ondulada	Superficial parece blanca pero por dentro es transparente	Pegajosa	Si
21	5E	+	+		Bacilo gram (-) delgados	Puntiforme	Plana	Entera	Blanca-Translucida	Cremosa	Si
22	5D	-	-		Bacilos gram (-)	Puntiforme		Arrisada	Naranja-Rojo	Aspera-Dura	No

23	6A	+	+		Bacilos gram (+) solos y en pares	Filamentosa/Irregular	Plana	Erosionado	Blanco	Cremosa	Si
----	----	---	---	---	-----------------------------------	-----------------------	-------	------------	--------	---------	----

### 4.3. ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS EN BACTERIAS

El resultado de la prueba de toxicidad sirvió para evaluar solamente si había crecimiento en el metal sin cuantificar la cantidad de UFC, los metales utilizados fueron Cd, As, Cr, Pb y Zn a 500 ppm. De las 23 colonias utilizadas, 20 tuvieron crecimiento en As, 15 en Pb, 10 en Cd, 8 en Cr y 4 en Zn. Tres cepas sólo presentaron crecimiento en un metal, mientras que hubo 4 cepas que presentaron crecimiento en 4 de los 5 metales probados. El metal en el que hubo mayor respuesta de crecimiento fue As, seguido de Cd, Pb, Cr y Zn.

**Tabla 22. Resultados de crecimiento de cepas en metal por el método del antibiograma modificado.** El 0 representa ausencia de crecimiento y el 1 representa crecimiento.

No.	CEPA	Cd	As	Cr	Pb	Zn	Total, metales resistidos
1	1 <sup>a</sup>	1	1	1	1	0	4
2	1E	0	1	0	1	0	2
3	2E	0	1	0	1	0	2
4	3 <sup>a</sup>	0	1	0	0	1	2
5	3C-1B	0	1	0	1	1	3
6	3D	0	1	0	0	1	2
7	3D-2 <sup>a</sup>	0	1	0	0	0	1
8	3D-2B	0	0	1	0	0	1
9	3D-3	1	1	1	0	0	3
10	3E	0	1	0	1	0	2
11	3F	0	1	0	0	0	1
12	4B-1A	0	0	1	1	0	2
13	4B-1B	1	1	0	1	0	3
14	4B-2	1	1	0	1	0	3
15	4C-A	1	1	1	1	0	4
16	4E	1	1	1	1	0	4

<b>17</b>	4C-B	0	1	0	0	1	2
<b>18</b>	4G-1	0	0	1	0	0	1
<b>19</b>	4G-2	1	1	1	1	0	4
<b>20</b>	5A	1	1	0	1	0	3
<b>21</b>	5E	1	1	0	1	0	3
<b>22</b>	5D	0	1	1	1	0	3
<b>23</b>	6A	1	1	0	1	0	3
	<b>Total</b>	10	20	8	15	4	

Cuatro cepas llegaron a crecer hasta en 4 metales, 8 hasta en 3 metales, 7 en 2 y 4 sólo crecieron en 1 metal, por lo que, de las 23 cepas, 12 lograron crecer en más de 3 metales.

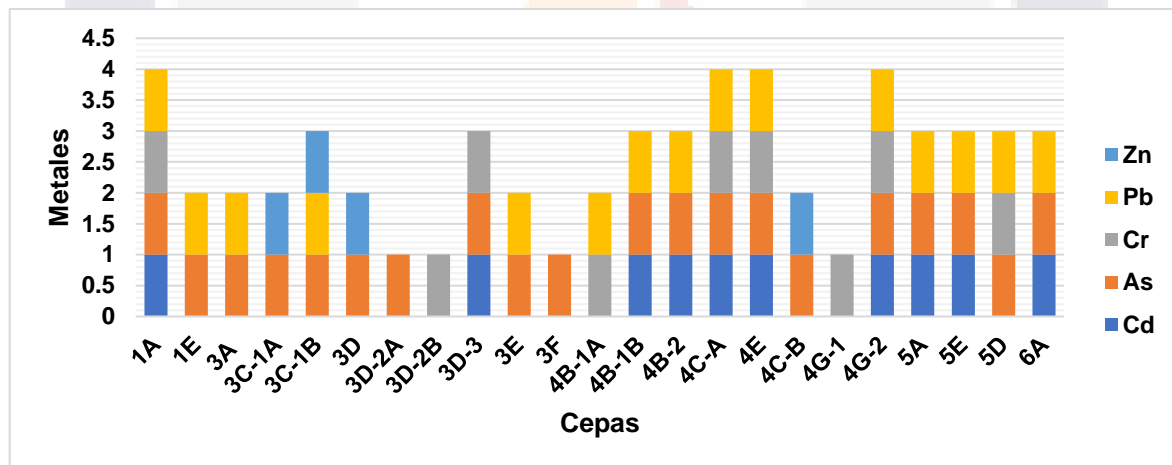
Al mostrar mayor crecimiento bacteriano en el As podría inferirse que existen concentraciones elevadas de As en las muestras de suelo, por lo que se tendría que analizar la concentración de este metal para discernir si es una característica que han ido desarrollando debido a sus condiciones ambientales o si son capaces de generar la adaptación para resistir este metal.

El segundo metal con mayor crecimiento es el Pb, en base a los resultados de concentración, se encuentra en concentraciones considerables por lo que se puede discernir que las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a este metal debido a la interacción que han realizado con este metal en el sitio de muestreo, además de que se logró apreciar en las pruebas que cuando hubo crecimiento en este metal en las placas de Agar Nutritivo, presentaron cambios de coloración tornando de un color café-rojizo el área dónde estaba el disco de este metal en las placas (Ver Figura x).

El tercer metal dónde se logró crecimiento fue el Cd del cuál no se obtuvieron concentraciones de 500 ppm o más en suelo muestreado, lo que podría indicar que estas bacterias se adaptaron a estas concentraciones o poseen algún

mecanismo de resistencia a este metal, a pesar de no estar habitualmente en concentraciones así de grandes.

En Cromo se obtuvieron concentraciones muy bajas en las muestras y a pesar de esto, 8 cepas crecieron en la concentración de 500 ppm de este metal, con el Zn ocurrió lo inverso ya que este metal se encontró en concentraciones elevadas por encima de las 500 ppm en las muestras de suelo y aún así solo 4 cepas presentaron crecimiento lo que pudiera indicar que las bacterias que no crecieron en este metal en las placas, reciben participación de otro u otros microorganismos en una relación de consorcio que las ayuda a sobrevivir en el tipo de ambiente en el que se encontraron ya que por si solas no pudieron crecer bajo estas condiciones.



**Figura 25. Gráfico de columnas de los metales en dónde se obtuvo crecimiento** Muestra los metales en dónde creció cada cepa. Las bacterias que se aislaron de la muestra S4, mostraron más capacidad de crecimiento en metales.

Se aprecia que se lograron aislar más bacterias del suelo S4 y que además 3 de estas presentaron capacidad para crecer individualmente ante cuatro metales distintos. La muestra S4 fue la única que presentó actividades de reducción en suelo, y la más abundante en materia orgánica lo que podría ser un indicio para

considerar que estos factores influyen sobre el comportamiento y características de las bacterias.

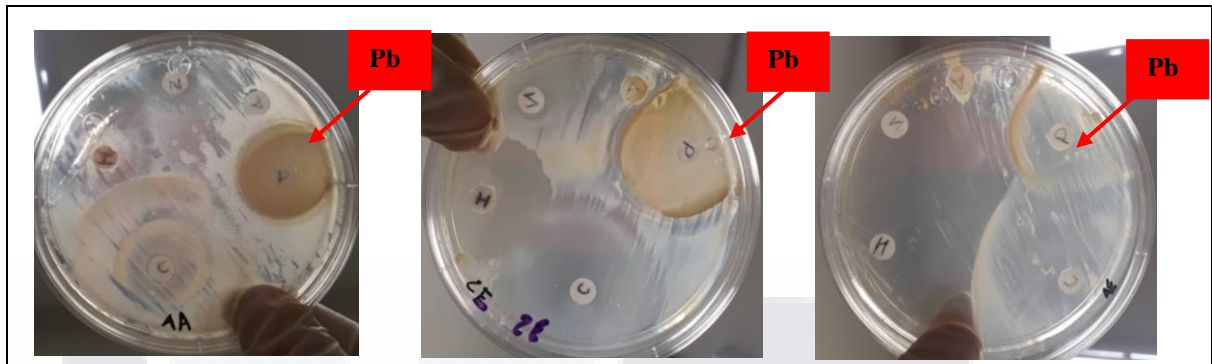


Figura 26. Ejemplos de cepas que generaron color rojizo en el área de Plomo. Las colonias que lograron crecimiento en Pb cambiaban el color del área

#### 4.4. RESULTADOS PCR

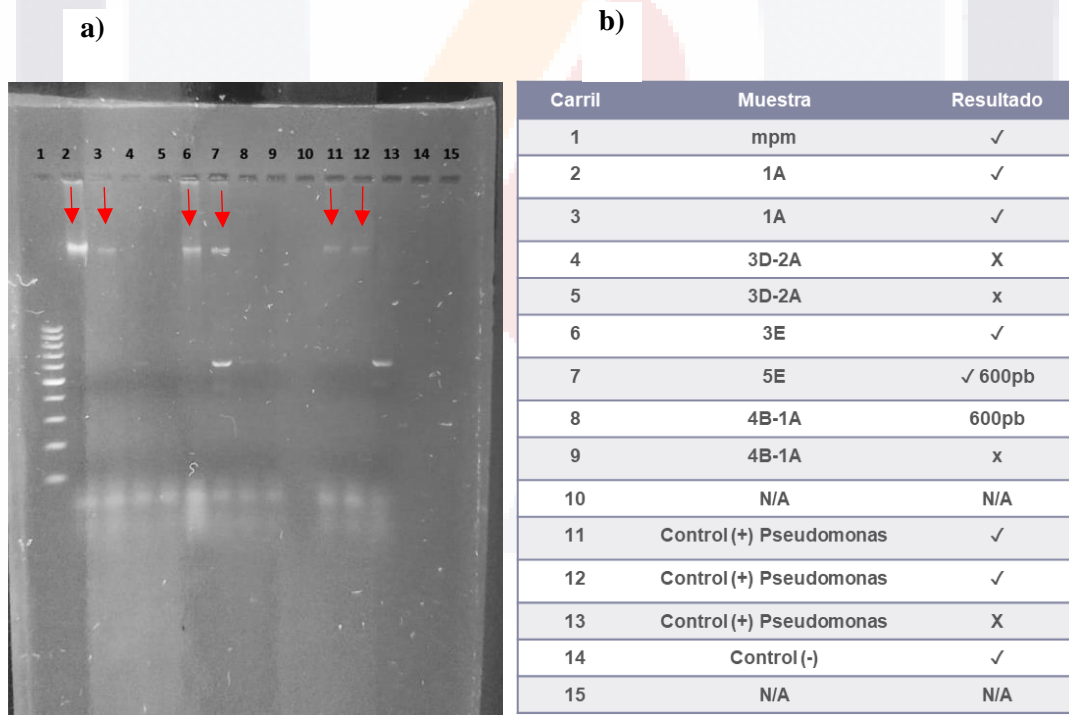


Figura 27. Resultados de PCR. a) Resultados de Electroforesis b) Acomodo de las muestras por carril. Las cepas 1A, 3E y 5E, mostraron amplificación en las mismas bandas que amplificaron los controles de pseudomona.

Las cepas que mostraron características microbiológicas de la pseudomona (1A, 3D-2A, 3E, 5E y 4B-1A) se eligieron para una prueba PCR, de estas sólo las cepas 1A, 3E y 5E mostraron resultado positivo lo que indican que pueden pertenecer a este género.

Estas cepas mostraron resultados distintos en los ensayos del antibiograma modificado, esto podría deberse a que no pertenecen a la misma familia, y si pertenecieran a la misma familia un factor para estas diferencias es que no pertenecen a la misma zona y se originaron en contacto con concentraciones distintas de metales.

#### **4.5. PRUEBAS DE ADSORCION**

Para las pruebas de adsorción se eligió una de las cepas que resultaron positivas en la prueba de PCR (1A) y la cepa 4G2, ya que esta cepa mostró crecimiento rápido en caldo BHI y este es un factor considerable para la producción de biomasa, además de que ambas cepas fueron resistentes a 4 de los 5 metales.

La cepa 1A presenta cómo característica ser Bacilos gram (-) de oxidasa y catalasa positiva mientras que la cepa 4G2 son Bacilos gram (+) en cadenas, con catalasa y oxidasa positivas.

Se selecciono el Plomo por ser uno de los metales más abundantes en las muestras de suelo y el Cromo por ser uno de los metales menos abundantes en las muestras, pero ambos con efectos ecotóxicos importantes.

##### **4.5.1. Prueba de adsorción de Plomo**

Los tiempos de contacto fueron 30, 60 y 120 min y las biomasas 1A y 4G2 se pusieron en contacto con la solución de Pb, los porcentajes variaron entre cada

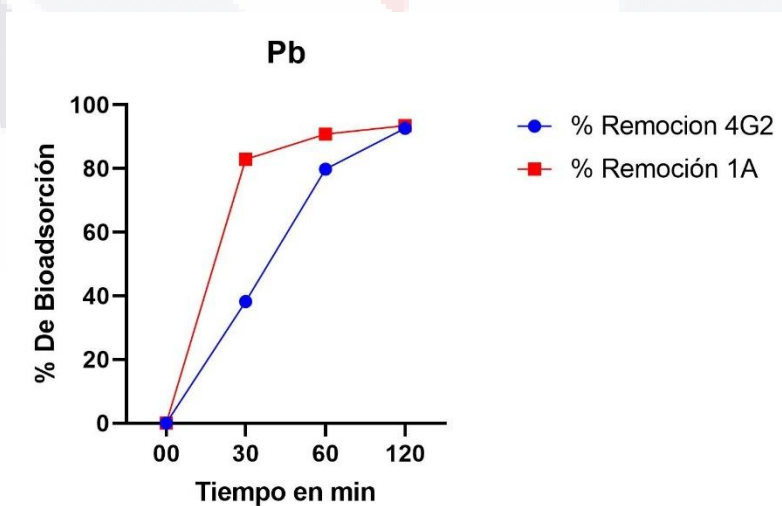
cepa (Ver Tablas 23 y 24) al igual que el comportamiento de bioadsorción. (Ver Figura).

**Tabla 23. Resultados de Concentraciones finales, porcentaje de bioadsorción y afinidad de sorción (q) por tiempo de la biomasa de la cepa 1A en Pb.**

Tiempo de contacto (minutos)	Plomo residual promedio (ppm) Cf	Porcentaje de bioadsorción (%)	Afinidad de sorción (q)
0	38.4661	0	0
30	6.5945	82.8563	318.716
60	3.5446	90.7850	349.215
120	2.5171	93.4563	359.49

**Tabla 24. Resultados de Concentraciones finales, porcentaje de bioadsorción y afinidad de sorción (q) por tiempo de la biomasa de la cepa 4G2 en Pb.**

Tiempo de contacto (minutos)	Plomo residual promedio (ppm) Cf	Porcentaje de bioadsorción (%)	Afinidad de sorción (q)
0	52.0435	0	0
30	32.1454	38.2336	198.98125
60	10.5021	79.8206	415.41434
120	3.8431	92.6157	482.00425



**Figura 28. Porcentaje de bioadsorción de plomo de la biomasa de las cepas 1A vs 4G2 función del tiempo. Fuente: Datos experimentales**



La comparación de los porcentajes de bioadsorción de la cepa 1A y 4G2 en plomo señalan que en el primer tiempo de contacto la biomasa de 1A removió de la solución 50% más Pb que la biomasa de 4G2, en el segundo tiempo los porcentajes de adsorción ya eran cercanos y en el tercer tiempo ya eran casi iguales, por lo tanto, aunque la biomasa de la cepa 1A mostró más remoción a los 30 min, a los 120 min ya tenían resultados casi iguales, llegando la biomasa 1A a alcanzar 93.4 % de remoción y 4G2, 92.6%. Sin embargo, aunque en la gráfica se aprecia que estaba comenzando a haber menores grados de remoción entre el segundo y tercer tiempo, no se alcanza a apreciar que se llegue al equilibrio, por lo que eran necesarias las cuantificaciones de más tiempos de contacto, hasta observar una tendencia logarítmica en la curva.

#### 4.5.2. Prueba de adsorción en Cromo

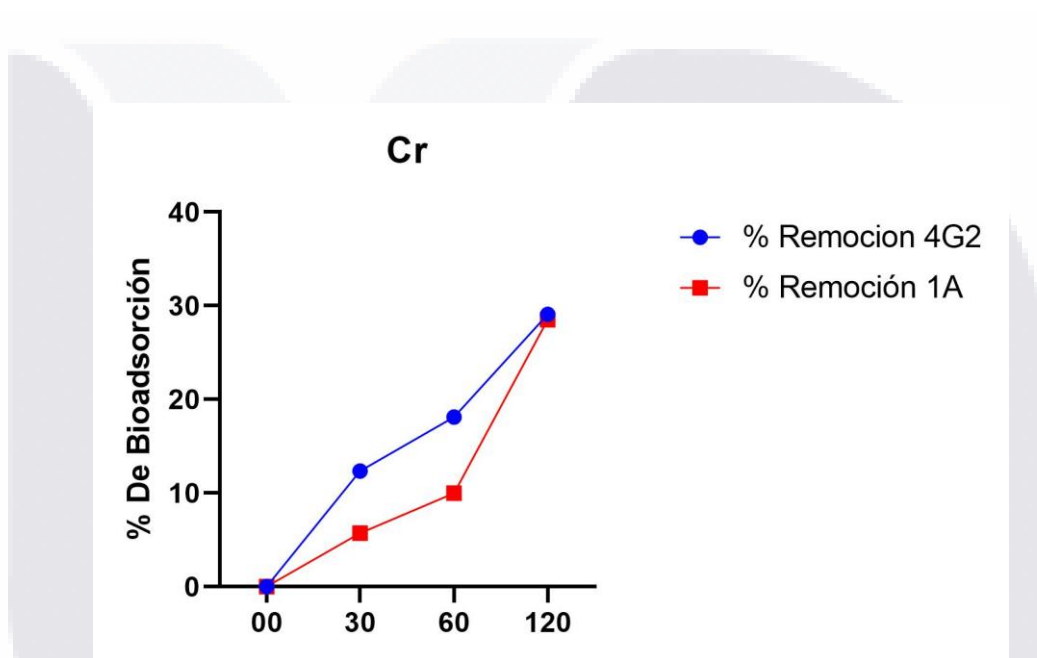
Los tiempos de contacto fueron 30, 60 y 120 min y las biombras 1A y 4G2 se pusieron en contacto con la solución de Pb, los porcentajes variaron entre cada cepa (Ver Tablas 25 y 26) al igual que el comportamiento de bioadsorción. (Ver Figura 28).

**Tabla 25. Resultados de Concentraciones finales, porcentaje de bioadsorción y afinidad de sorción (q) por tiempo de la biomasa de la cepa 1A en Cr.**

Tiempo de contacto (minutos)	Plomo residual promedio (mg/L) Cf	Porcentaje de bioadsorción (%)	Afinidad de sorción (q)
0	56.8365	0	
30	53.5888	5.7141	32.477206
60	51.1704	9.9692	56.661629
120	40.6368	28.5024	161.99771

**Tabla 26. Resultados de Concentraciones finales, porcentaje de bioadsorción y afinidad de sorción (q) por tiempo de la biomasa de la cepa 4G2 en Cr.**

Tiempo de contacto (minutos)	Plomo residual promedio (mg/L) Cf	Porcentaje de bioadsorción (%)	Afinidad de sorción (q)
0	56.8365	0	
30	49.8174	12.3497	70.191422
60	46.5342	18.1263	103.02373
120	40.3091	29.0789	165.27424



**Figura 29. Porcentaje de bioadsorción de cromo de la biomasa de las cepas 1A vs 4G2 función del tiempo. Fuente: Datos experimentales**

En esta comparación, la biomasa que comenzó a remover mayor cantidad de Cr desde el primer tiempo fue la de 4G2, aproximadamente removi6 50% m6s que la 1A en el primer y segundo tiempo, pero en el tercer punto casi empataron sus porcentajes de remoci6n, en esta grafica a diferencia de la de Pb se ve un aumento de casi el 50% de remoci6n entre el segundo y tercer punto en ambas biomosas, lo que indica que a6n no se estaba tan cerca del equilibrio como en la prueba con Pb. Al tiempo de 120 min, la biomasa 1A removi6 28.5 % y la 4G2, 29.0 % teniendo resultados 70 % menos eficientes que en la remoci6n de

Pb, en estos tiempos. En esta prueba también es necesario realizar más cuantificaciones en más tiempos de contacto, hasta alcanzar el equilibrio.

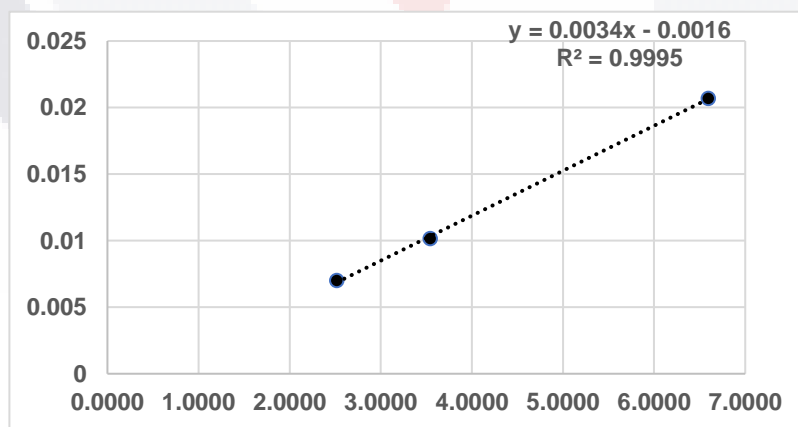
Es interesante que al llegar al min 120 ambas biomasa presentaron comportamientos similares de adsorción, después de que en el primer y segundo punto mostraban diferentes resultados.

#### 4.6. LINEALIZACIÓN POR MODELO DE LANGMUIR Y DETERMINACIÓN DE QMAX

El modelo de Langmuir es utilizado para describir isothermas de adsorción simples y para comparar el comportamiento de diferentes biosorbentes, además nos permite establecer la máxima capacidad de unión (Qmax).

##### 4.6.1. *Isoterma de Langmuir para Plomo con biomasa IA*

Con los datos consignados en la Tabla 23, se realizó la modelación según la ecuación de Langmuir, cómo se muestra en la Figura 29:

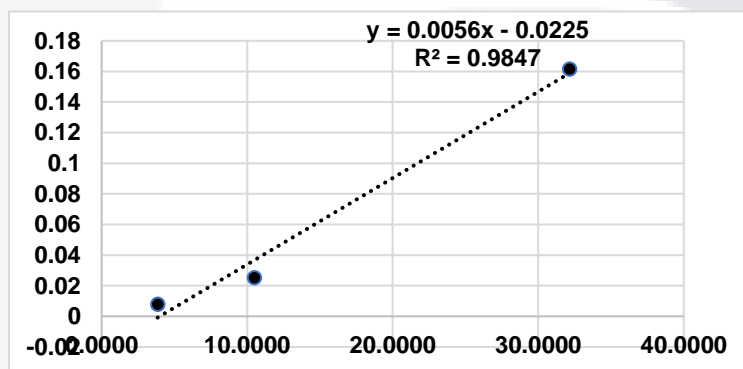


**Figura 30. Linealización de la isoterma de Langmuir para Plomo usando la biomasa de la cepa IA**  
Fuente: Datos experimentales

Al realizar la linealización se obtuvo una R2 de 0,999 lo que nos indica que la bioadsorción de Pb usando la biomasa IA, se ajusta en un 99,9% al modelo de la isoterma de Langmuir, que tiene una capacidad máxima de bioadsorción (Qmax) de 294.117 mg Pb/g.

#### 4.6.2. Isoterma de Langmuir para Plomo con biomasa 4G2

Con los datos consignados en la Tabla 24, se realizó la modelación según la ecuación de Langmuir, cómo se muestra en la Figura 21:

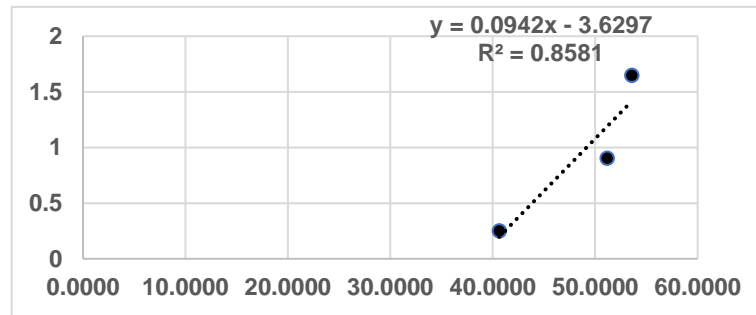


**Figura 31. Linealización de la isoterma de Langmuir para Plomo usando la biomasa de la cepa 4G2**  
Fuente: Datos experimentales

Podemos apreciar en la gráfica de linealización (Fig. 30) de esta prueba que se obtuvo una R2 de 0,9987 lo que nos indica que la bioadsorción de Pb usando la biomasa 4G2, se ajusta en un 99,8% al modelo de la isoterma de Langmuir, con una capacidad máxima de bioadsorción (Qmax) de 177.30 mg Pb/g.

#### 4.6.3. Isoterma de Langmuir para Cromo con biomasa 1A

Con los resultados obtenidos de Cf y q (Ver Tabla 23), se obtuvo la modelación de la ecuación de Langmuir, cómo se muestra en la Figura 31:



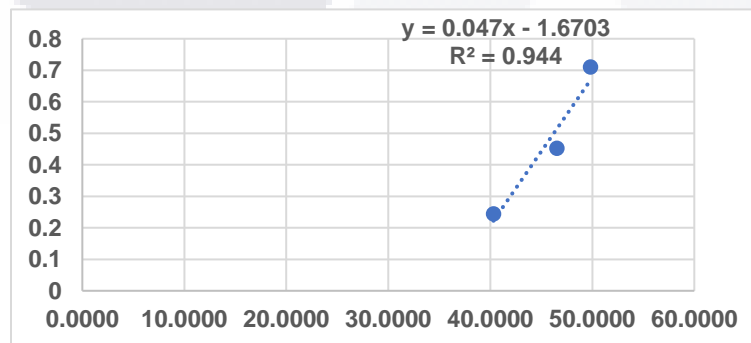
**Figura 32. Linealización de la isoterma de Langmuir para Cromo usando la biomasa de la cepa 1A**

Fuente: Datos experimentales

La figura 31, nos muestra un R2 de 0, 8581 lo que nos indica que lo que nos indica que el mecanismo de bioadsorción de Cromo usando la biomasa 1A, se ajusta un 85,8% al modelo de la isoterma de Langmuir, siendo este valor algo bajo por lo que se podría buscar evaluar con otros modelos o obtener el modelo de adsorción completo con los valores de equilibrio para evitar errores, con este modelo se obtuvo una capacidad máxima de bioadsorción (Qmax) de 10.615 mg Cr/g.

#### 4.6.4. Isoterma de Langmuir para Cromo con biomasa 4G2

Con los resultados de la Tabla 25, se consiguió la modelación de la ecuación de Langmuir, (Figura 32).



**Figura 33. Linealización de la isoterma de Langmuir para Cromo usando la biomasa de la cepa 4G2**

Fuente: Datos experimentales

Con este modelo se obtuvo un R<sup>2</sup> de 0,944 por lo que el modelo se ajusta un 94.4% al modelo de la isoterma de Langmuir, con este modelo se obtuvo una capacidad máxima de bioadsorción (Q<sub>max</sub>) de 21.276 mg Cr/g.

## 5. CONCLUSIONES

- Las concentraciones de materia orgánica pueden intervenir de manera significativa en los estados Redox del suelo.
- El 50% de las cepas aisladas lograron crecer aisladas en placas de Agar Nutritivo en concentraciones de 500 ppm en al menos 3 metales, predominando en As, Pb y Cd.
- La cepa 1A se encontró en un suelo con concentraciones elevadas de metal: Pb 5,980 ppm, Zn 10,167 ppm, Cu 838 ppm, Mn 1,289 ppm, Fe 32,118 ppm. Lo que indica que tiene capacidades de resistencia o tolerancia para estos metales.
- La cepa 4G2 se encontraba en un suelo con concentraciones también muy altas de metales: Pb 713 ppm, Zn 3,634 ppm, Cu 280 ppm, Mn 489 ppm, Fe 24,199 ppm. Lo que señala al igual que la cepa 1A, es acreedora de mecanismos que la ayudan a vivir en estos ambientes.
- Se logró identificar que las cepas 1A, 3E y 5E pertenecen al género *pseudomona*.
- Las 3 cepas que se identificaron como *pseudomona* presentaron comportamientos distintos de crecimiento ya que la 1A creció en As, Cd, Cr y Pb, la cepa 3E, en As y Pb y la 5E en Cd, As y Pb. Teniendo en común el As y Pb. Lo que podría sugerir que se traten de familias diferentes o que al haberse desarrollado en ambientes con distintas concentraciones no posean los mismos mecanismos.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- En los modelos de adsorción se requiere la medición de más tiempos de contacto para encontrar el tiempo ideal de equilibrio.
  - Las biomásas si presentaron adsorción en ambos metales, siendo más significativa con Pb.
  - La biomasa que presentó mejor capacidad máxima de recuperación metálica ( $Q_{max}$ ) en Pb fue la 1A con una  $Q_{max}= 294.1$  mg/g.
  - La biomasa con mejor capacidad máxima de recuperación metálica ( $Q_{max}$ ) en Cr fue la 4G2 con una  $Q_{max}= 21.2$  mg/g.
  - A pesar de que la biomasa de la cepa 1A tuvo buenos resultados de adsorción en plomo (93.4 %) no mostró lo mismo con el Cr ya que en este metal tuvo un porcentaje de adsorción de 28.5 %, demostrando que las capacidades de adsorción pueden depender del metal con el que se interactúe.

**Otras conclusiones:**

- Las concentraciones de materia orgánica se involucran en los estados Redox del suelo, al ser el factor oxido-reducción.
- Las concentraciones de Pb, Cd, Zn y Cu rebasan las concentraciones establecidas como referentes para determinar al suelo como contaminado en la normatividad canadiense y mexicana.
- No existen normatividad mexicana que establezca límites máximos permisibles de metales en suelo.
- Metales como Mn y Fe no tienen concentraciones de referencia en normatividad mexicana.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Acevedo-Sandoval, O., Ortiz-Hernández, E., Cruz-Sánchez, M., & Cruz-Chávez, E. (2004). Role of Iron Oxides in Soils. *Terra Latinoamericana*, 485–487. <http://www.redalyc.org/pdf/573/57311096013.pdf>

Bautista-Hernandez, D. (2008). Bioadsorción De Metales Pesados Mediante El Uso De Biomasa Bacteriana Aislada De Jales Mineros. 108.

Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172–197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>

Casanova-Olivo, E. F. (1991). Introducción a la ciencia del suelo. Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health TETRACHLOROETHYLENE 1997

Cervantes, C., Espino-saldaña, A. E., León-rodríguez, I. L., Rivera-cano, M. E., Gutiérrez-corona, J. F., & Rodríguez-zavala, J. S. (2006). *Artemisa*. October 2014.

Chiou., C. T. (2002). Cary T. Chiou. Partition and Adsorption of Organic Contaminants in Environmental Systems. Wiley-Interscience. USA. pp. 257.

Del Carpio Jiménez, C. (2017). Estudio de la biosorción de Pb (II) y Cd (II) usando como biomasa a *Escherichia coli* aislada de las aguas contaminadas del río Huantanay de la ciudad de Cusco. Ii, 164. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/5361/CNDdecajic.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

EPA, A. d. (09 de 2012). Guía del ciudadano sobre la biorremediación. Obtenido de EPA: <https://semspub.epa.gov/work/HQ/189912.pdf>

FAO, O. d. (2018). FAO. Obtenido de La contaminación de los suelos está contaminando nuestro futuro: <http://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1126977/>

Fontalvo, J. L. (2012). Manual de practicas de laboratorio de



Microbiología. Editorial Unimagdalena pg 28-30.

Gadd, G. M. (1992). Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters*, 100(1–3), 197–203.

[https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90209-7)

Galán Huertos, E., & Romero Baena, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla*, 10, 48–60.

Gerbino, O. E. (2013). Interacción de *Lactobacillus kefir* con plomo, cadmio, zinc y níquel: Análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular.

Gerard J. Tortora, B. R. (2007). Introducción a la microbiología. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana .

González, G. P. (2005). Disponibilidad de Metales Toxicos en sitios contaminados. Aplicaciones y limitaciones de la fraccionación en la determinación de gradientes de polución. *Madrid*, 376.

Herrera Vargas, J. (2013). "Aislamiento De Bacterias Resistentes Al Plomo a Partir De Suelos Contaminados Con Este Metal". *Universidad Nacional Campus Omar Dengo*, 53(9), 1689–1699.

Instituto Nacional del cambio climatico, I. N. (05 de 11 de 2007). Suelo. Obtenido de

<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/459/cap4.html>

Jaramillo-Juarez, F. (2006). Toxicología Basica. Aguascalientes, Ags. Mex.: Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Jimenez, C. D. carpio. (2017). Estudio de la bioadsorción de pb (II) y cd (II) usando como biomasa a *Escherichia coli* aislada de las aguas contaminadas del río Huatanay de la ciudad. Ii.

Lozano-Rivas, W. A. (2018). Suelos. *Suelos*.

<https://doi.org/10.2307/j.ctv8j5r0>

Merroun, M. (2007). Interactions between metals and bacteria: Fundamental and applied research. *Nature*, 4, 5.

Mitchell, K. N. (2016). Stabilisation of Metals in Soils and Sediments Contaminated by Mining Activity Using Biomass.

Montes, J. Á. (2016). Efecto de los metales pesados en suelo de jales mineros de San Luis Potosí. 160.

NORMA Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.

Pérez, A. M. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). *Repositorio Institucional de La Universitat Politècnica de València*, 10.

[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción en cadena de la polimerasa.pdf](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf)

Ramos-Gómez, M. S. (10 de 04 de 2012). TRATAMIENTO DE JALES Y SEDIMENTOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS MEDIANTE LA APLICACION DE BIOSOLIDOS. (U. A. AGUASCALIENTES, Intérprete) AGUASCALIENTES.

Rivas, Carlos F, Núñez, O., Longoria, F., & Gonzalez, L. (2014). Isoterma De Langmuir Y Freundlich Como Modelos Para La Adsorción De Componentes De Ácido Nucleico Sobre Wo 3. *Saber*, 26(1), 43–49.

Rodríguez Eugenio, Natalia; McLaughlin, M., & Pennock, D. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. In *Organizacion de las Naciones Unidas para la alimentacion y la agricultura FAO*. <http://www.fao.org/3/I9183ES/i9183es.pdf>

Rosa, D. d. (2008). Evaluación agro-ecológica de suelos para un desarrollo rural sostenible. En D. d. Rosa, Evaluación agro-ecológica de suelos para un desarrollo rural sostenible (pág. 404). Sevilla: Mundi-Prensa.

Suárez, P., & Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 27(4), 160–164.

Ulloa, F. (2015). Análisis De Los Métodos Para Medir La Turbidez De Los Inóculos Y Su Influencia En El Antibiograma De La Bacteria E Coli En Urocultivos. *Universidad Técnica de Ambato*, 1–134.

[http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10786/1/TESIS FREDDY ULLOA.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10786/1/TESIS%20FREDDY%20ULLOA.pdf)

Volke, T., Velasco, J., & Perez, D. la R. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides* (Issue May). <https://books.google.com.ec/books?isbn=9688174920>

Yadav, R., & Shukla, P. (2017). Probiotics for human health: Current

progress and applications. In *Recent advances in Applied Microbiology*.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-5275-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5275-0_6)

Zago, A., & Chugani, S. (2009). Pseudomonas. *Encyclopedia of Microbiology*, 245–260. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00203-0>

Yulieth C. Reyes, I. V. (2016). CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS: IMPLICACIONES EN SALUD, AMBIENTE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, Vol. 16 N° 2, Julio-Diciembre 2016, pp. 66-77, Sogamoso-Boyacá. Colombia.

