



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

TESIS

**Estudio de la resistencia y capacidad de remoción de metales y metaloides
en bacterias aisladas de suelos contaminados por la actividad minera en el
municipio de Concepción del Oro en el estado de Zacatecas**

PRESENTA

Ricardo Ortiz Macarena

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA**

TUTORES

Dr. Francisco Javier Avelar González

COMITÉ TUTORAL

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores

Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera

Aguascalientes, Ags., 06 de diciembre del 2023

CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **RICARDO ORTIZ MACARENA** con ID 308144 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LA RESISTENCIA Y CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE METALES Y METALOIDES EN BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS CONTAMINADOS POR LA ACTIVIDAD MINERA EN EL MUNICIPIO DE CONCEPCIÓN DEL ORO EN EL ESTADO DE ZACATECAS**, un


trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.


**ATENTA
MENTE**


“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 04 de diciembre


Dr. Francisco Javier Avelar González
Tutor de tesis

de 2023.


Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Asesor de tesis


Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Asesor de tesis

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-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 7/12/2023

NOMBRE: RICARDO ORTÍZ MACARENA ID 308144

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA LGAC (del posgrado): TOXICOLOGÍA

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Estudio de la resistencia y capacidad de remoción de metales y metaloides en bacterias aisladas de suelos contaminados por la actividad minera en el municipio de Concepción del Oro en el Estado de Zacatecas

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): El presente estudio reforzará el conocimiento del nivel de contaminación presente en la zona de la mina de Concepción del Oro, y obtener las cepas resistentes a los metales y metaoide de tal manera que puedan ser inmovilizados y de esta forma generar estrategias de biorremediación para mitigar el impacto ambiental causado por la actividad minera.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

| <i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i> | |
|--|--|
| 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 |
| SI | Generó transferencia del conocimiento o tecnológica |
| SI | Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio) |
| <i>El egresado cumple con lo siguiente:</i> | |
| 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 |
| SI | 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 |
| N.A. | Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda) |
| <i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i> | |
| N.A. | Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa |
| N.A. | El estudiante es el primer autor |
| N.A. | El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico |
| N.A. | En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación. |
| N.A. | Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados |
| N.A. | 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:

Sí X

No

FIRMAS

Elaboró:

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

DRA. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ELSA MARCELA RAMÍREZ LÓPEZ

* 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:

P.A.

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ 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.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, a mi tutor, asesores y profesores durante este proceso por darme la oportunidad de realizar mis estudios en la institución, apoyarme y brindarme sus conocimientos durante esta etapa de mi formación académica.

Al CONAHCYT por el apoyo brindado este tiempo para poder realizar mis estudios.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Aguascalientes por permitirme realizar la retribución social y parte de la experimentación en sus instalaciones, al personal por su apoyo y enseñanzas para llevar a cabo mis funciones y experimentación dentro del mismo.

A mis amigos de Morelia por su amistad, consejos y ánimos, y a los nuevos amigos que hice en la maestría por su apoyo y hacer de esta etapa algo que en verdad disfrute y es de las mejores cosas que me llevo de este proceso.

Y en especial quisiera agradecer a mi familia por siempre estar presentes y apoyar las decisiones que he tomado, procurar que esté bien, aconsejarme, darme seguridad, ánimos y su ejemplo para seguir creciendo y desarrollándome como persona y profesionista.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| 1. ANTECEDENTES | 8 |
| 1.1 CONTAMINACIÓN DEL SUELO | 8 |
| 1.2 CONTAMINACIÓN POR METALES..... | 9 |
| 1.3 LA INDUSTRIA MINERA..... | 12 |
| 1.4 MICROORGANISMOS DE SUELO..... | 17 |
| 1.5 USO BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS TOLERANTES A METALES | 18 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 3. HIPÓTESIS DEL TRABAJO | 20 |
| 4. OBJETIVOS..... | 21 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL..... | 21 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 5. METAS | 22 |
| 6. METODOLOGÍA | 23 |
| 6.1 AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE TIERRA . | 23 |
| 6.2 PRUEBAS DE TOLERANCIA A METALES Y METALOIDES..... | 23 |
| 6.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS TOLERANTES..... | 24 |
| 6.4 REMOCIÓN DE METALES DEL MEDIO..... | 24 |
| 7. RESULTADOS | 25 |
| 7.1 AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE TIERRA. | 25 |
| 7.2 PRUEBAS DE TOLERANCIA A METALES Y METALOIDES..... | 38 |
| 7.2.1 PRUEBAS DE TOLERANCIA A PLOMO | 38 |
| 7.2.2 PRUEBAS DE TOLERANCIA A CADMIO..... | 42 |
| 7.2.3 PRUEBAS DE TOLERANCIA A ARSÉNICO | 46 |
| 7.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS TOLERANTES..... | 49 |
| 7.4 REMOCIÓN DE METALES DEL MEDIO..... | 61 |
| 7.4.1 CURVAS DE CRECIMIENTO | 61 |
| 7.4.2 RENDIMIENTO DE REMOCIÓN DE METALES | 63 |
| 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 66 |
| 9. CONCLUSIONES | 67 |
| 10. REFERENCIAS..... | 68 |

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1 Principales metales encontrados en los suelos. La información fue tomada de Jiménez Ballesta et al., 2017...... 9

Tabla 2 Principales efectos en la salud causado por metales. Información tomada de Rai et al., 2019...... 11

Tabla 3 Regiones mineras del estado de Zacatecas. Información tomada de S.G.M., 2020..... 14

Tabla 4 Tipos de morfología encontrada en el cultivo de las muestras de suelo. 25

Tabla 5 Resultados de la Tinción Gram...... 29

Tabla 6 Pruebas de tolerancia a plomo...... 38

Tabla 7 Pruebas de tolerancia a cadmio 42

Tabla 8 Prueba de tolerancia a arsénico 46

Tabla 9 Identificación por Maldi-Tof...... 50

Tabla 10 Significado de los valores obtenidos. 51

Tabla 11 Significado de las categorías de consistencia. 51

Tabla 12 Identificación bioquímica. 52

Tabla 13 Controles de calidad en la lectura de plomo. 63

Tabla 14 Porcentaje de remoción de plomo...... 63

Tabla 15 Controles de calidad en la lectura de cadmio. 64

Tabla 16 Porcentaje de remoción de cadmio...... 65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Regiones mineras del estado de Zacatecas y su ubicación. Tomado de S.G.M., 2020. 16

Figura 2 Muestras de tierra utilizadas. 26

Figura 3 Colonias con la morfología "1" a la izquierda y "2" a la derecha. 26

Figura 4 Colonias con la morfología "3" a la izquierda y "4" a la derecha. 26

Figura 5 Colonias con la morfología "5" a la izquierda y "6" a la derecha. 27

Figura 6 Colonias con la morfología "7" a la izquierda y "8" a la derecha. 27

Figura 7 Colonias con la morfología "9" a la izquierda y "10" a la derecha. 27

Figura 8 Colonias con la morfología "11" a la izquierda y "12" a la derecha. 28

Figura 9 Colonias con la morfología "14" a la izquierda y "13" a la derecha. 28

Figura 10 Colonias con la morfología "15" a la izquierda y "16" a la derecha. 28

Figura 11 Colonias con la morfología "17" a la izquierda y "19" a la derecha. 29

Figura 12 Cepa 23 bacilos Gram positivos. Vistos desde el objetivo 100x. 49

Figura 13 Cepa 52 bacilos Gram positivos. Vistos desde el objetivo 100x. 49

Figura 14 Cepa 67 bacilos Gram positivos. Visto desde el objetivo 100x. 50

Figura 15 Cepa 68 bacilos Gram positivos. Vistos desde el objetivo 100x. 50

Figura 16 Especies con mayor coincidencia de la cepa 23. 53

Figura 17 Alineamiento de la secuencia de la cepa 23. 54

Figura 18 Especies con mayor coincidencia de la cepa 52. 55

Figura 19 Alineamiento de la secuencia de la cepa 52. 56

Figura 20 Especies con mayor coincidencia de la cepa 67. 57

Figura 21 Alineamiento de la secuencia de la cepa 52. 58

Figura 22 Especies con mayor coincidencia de la cepa 68. 59

Figura 23 Alineamiento de la secuencia de la cepa 52. 60

Figura 24 Remoción de plomo durante los 8 días. 63

Figura 25 Remoción de cadmio durante los 8 días. 64

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Registro del crecimiento bacteriano expuesto a Plomo en caldo nutritivo 39

Gráfica 2 Registro del crecimiento bacteriano expuesto a Cadmio en caldo nutritivo. 43

Gráfica 3 Registro del crecimiento bacteriano expuesto a Arsénico en caldo nutritivo. 47

Gráfica 4 Curva del crecimiento de la cepa 23. 61

Gráfica 5 Curva del crecimiento de la cepa 52. 61

Gráfica 6 Curva del crecimiento de la cepa 67. 62

Gráfica 7 Curva del crecimiento de la cepa 68. 62

ACRÓNIMOS

1. **NCBI: National Center for Biotechnology Information.**
2. **SEMARNAT: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales.**
3. **NOAEL: No Observed Adverse Effect Level.**
4. **LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level.**
5. **RfD: Dosis de referencia.**
6. **SGM: Servicio Geológico Mexicano.**
7. **ONU: Organización de las Naciones Unidas.**



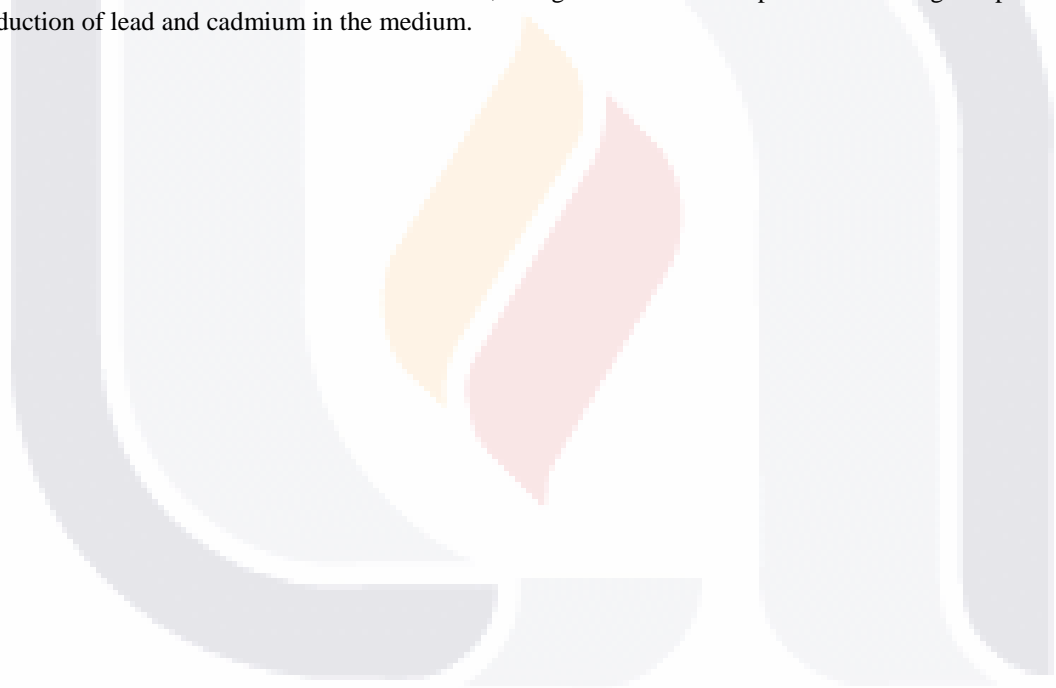
RESUMEN

Se aislaron bacterias a partir de suelos contaminados por la minería en el municipio de Concepción del Oro en Zacatecas con el propósito de encontrar cepas tolerantes a altas concentraciones de metales específicamente plomo, cadmio y arsénico y después probar si poseen la capacidad de inmovilizar dichos metales del medio, de esta manera se obtendrían bacterias con un potencial uso biotecnológico en estrategias de biorremediación, de las cepas bacterianas que fueron expuestas a plomo, cadmio y arsénico, 4 cepas diferentes: c23, c52, c67 y c68, llegaron a tolerar concentraciones de hasta 135mg/l, 30mg/l y 6000mg/l respectivamente. Posteriormente estas 4 cepas fueron identificadas por medio de microscopia, pruebas bioquímicas y espectrometría de masas Maldi-Tof encontrándose que son bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. La confirmación del género y especie se realizó posteriormente por técnicas moleculares obteniéndose una secuencia del genoma y comparándola con bases de datos como NCBI, encontrándose que las cepas tolerantes son *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*. Las pruebas de inmovilización de metales en medio líquido se llevaron a cabo exponiendo las bacterias a los metales antes mencionados en una concentración inicial de plomo, cadmio y arsénico a 55 mg/l, 20 mg/l y 1000 mg/l respectivamente durante un periodo de 8 días de incubación a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante este periodo de tiempo se tomaron alícuotas para establecer una curva de crecimiento, analizando la densidad óptica por medio de espectrometría UV-Vis, y de reducción en la concentración de metales por medio de espectrofotometría de absorción atómica, se determinó que hubo una disminución en la concentración inicial de los metales siendo c23 la que presentó los mayores porcentajes de reducción de plomo y cadmio en el medio.



ABSTRACT

Bacteria were isolated from soils contaminated by mining in the municipality of Concepción del Oro in Zacatecas with the purpose of finding strains tolerant to high concentrations of metals, specifically lead, cadmium and arsenic, and then testing whether they have the ability to immobilize said metals from the soil. In this way bacteria with a potential biotechnological use in bioremediation strategies would be obtained, from the bacterial strains that were exposed to lead, cadmium and arsenic, 4 different strains: c23, c52, c67 and c68, managed to tolerate concentrations of up to 135mg/l, 30mg/l and 6000mg/l respectively. Subsequently, these 4 strains were identified by means of microscopy, biochemical tests and Maldi-Tof mass spectrometry, finding that they are bacteria belonging to the genus *Bacillus*. Confirmation of the genus and species was subsequently carried out by molecular techniques, obtaining a genome sequence and comparing it with databases such as NCBI, finding that the tolerant strains are *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. The metal immobilization tests in liquid medium were carried out exposing the bacteria to the aforementioned metals in an initial concentration of lead, cadmium and arsenic at 55 mg/l, 20 mg/l and 1000 mg/l respectively for a period of 8 days of incubation at $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$, during this period of time aliquots were taken to establish a growth curve, analyzing the optical density by means of UV-Vis spectrometry, and the reduction in the concentration of metals by means of spectrophotometry. of atomic absorption, it was determined that there was a decrease in the initial concentration of metals, being c23 the one that presented the highest percentages of reduction of lead and cadmium in the medium.



INTRODUCCIÓN

La minería en México constituye una de las principales actividades económicas del país aportando el 2.3% del Producto Interno Bruto además de que cerca del 70% del territorio podría ser explotado para dicho fin, sin mencionar que a nivel mundial México destaca en la producción de 17 minerales siendo el mayor productor de plata. Sin embargo, la actividad minera supone un gran impacto ecológico debido a la generación de residuos tóxicos que generalmente tienen un mal manejo llegando a ocasionar la contaminación de acuíferos, el drenaje al subsuelo de ácidos, la sedimentación y deposición de metales, sumado al hecho de que al construir las minas se deforestan amplias zonas de vegetación afectando la biodiversidad del lugar.

Como ya se mencionó la minería es una de las principales causas de la contaminación por metales, las propiedades tóxicas de los metales se deben a su capacidad de formar enlaces covalentes con grupos orgánicos formando iones lipofílicos y compuestos capaces de unirse a las macromoléculas de las células facilitando su distribución en la biosfera. Otra propiedad que los hace tóxicos es que no pueden ser biodegradados, una vez entran a los organismos estos buscarán atraparlos por medio de proteínas o gránulos intracelulares para después excretarlos y en caso de que los metales no puedan ser excretados estos tienden a bioacumularse en los tejidos causando complicaciones biológicas y fisiológicas.

La contaminación por metales en México es un problema muy grave dada la importancia que tiene la minería para el desarrollo económico del país constituyendo un riesgo al estado de la salud de los organismos y del ambiente mismo, partiendo del principio de adaptabilidad que presentan las especies bacterianas para soportar ambientes hostiles, el presente trabajo tiene como finalidad el encontrar especies bacterianas capaces de tolerar altas concentraciones de metales y determinar si las mismas poseen la facultad de inmovilizarlos del medio. Para llevar a cabo dicho proyecto se aislaron bacterias de suelos contaminados por la actividad minera en el municipio de Concepción del Oro en Zacatecas, dichas bacterias fueron expuestas a distintas concentraciones de plomo, cadmio y arsénico, posteriormente las bacterias que presentaron una mayor tolerancia se identificaron por distintas metodologías como lo fueron microscopia, espectrometría de masas, pruebas bioquímicas y técnicas moleculares. Finalmente se probó la capacidad de las bacterias para inmovilizar los metales del medio.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. ANTECEDENTES

1.1 CONTAMINACIÓN DEL SUELO

La contaminación ambiental es definida por SEMARNAT como la presencia de materia o energía cuya naturaleza, ubicación o cantidad producen efectos ambientales indeseables, o bien como la alteración hecha o inducida por el hombre a la integridad física, biológica, química y radiológica del medio ambiente (SEMARNAT, 2019). La naturaleza de los contaminantes es variada desde agentes químicos, físicos, biológicos o de radiación y generalmente la contaminación está asociada al desarrollo económico y social de un país sobre todo cuando no son tomadas en cuenta las consecuencias para el ambiente. La contaminación ambiental engloba diferentes tipos de contaminación como lo son la contaminación atmosférica, la hídrica, del suelo, la acústica, la lumínica, la visual y la térmica (Guzmán, 2022).

El suelo es un sistema abierto, complejo, autoorganizativo, estructural y funcional, es uno de los recursos naturales más importantes por su papel como sostén de la vida en el globo terráqueo. El suelo, al ser de carácter anisótropo, parte de un material parental que bajo determinadas condiciones climáticas, bióticas y geomorfológicas se va alterando progresivamente en un tiempo determinado. De esta manera, el suelo se conforma por distintas capas u horizontes diferenciados entre sí por las características físico-químicas y biológicas como el pH, potencial redox, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio, textura, estructura, porosidad, capacidad de retención de agua, densidad, entre otros (Jiménez Ballesta, 2017a).

Los suelos cumplen importantes funciones para el ecosistema y el desarrollo de actividades sociales y económicas como:

- **Producción de alimentos y biomasa:** da soporte y proporciona nutrientes a las plantas para la producción de alimentos y biomasa. Más del 95% de la producción mundial de alimentos depende del suelo.
- **Escenario para que sucedan los ciclos biogeoquímicos:** el suelo tiene una posición central e insustituible en la sucesión de los ciclos biogeoquímicos, asegurando el paso de los elementos químicos de los sistemas bióticos a los abióticos.
- **Almacenamiento o fijación de carbono:** el suelo es el mayor sumidero de carbono en el planeta, a través de la captura de carbono impide que el CO₂ vaya a la atmósfera y por medio de la acción de plantas y organismos del suelo el carbono se transforma en materia orgánica que se acumula.
- **Almacenamiento y filtración de agua:** el suelo capta, filtra y almacena agua durante el ciclo hidrológico permitiendo la recarga de los acuíferos, al hacer esto puede capturar contaminantes del agua ayudando a la purificación de la misma.
- **Soporte de las actividades humanas y fuente de materias primas:** en el suelo se realizan actividades industriales, se realizan obras civiles y suministra materias primas como arcilla, metales entre otros.

- **Reserva de biodiversidad:** es el hogar de una gran cantidad de organismos tanto en su exterior como en su interior.
- **Depósito del patrimonio geológico y arqueológico:** en el suelo se almacenan restos que son parte de la historia de la humanidad y de la Tierra (Burbano-Orjuela, 2016).

La contaminación de los suelos puede verse como la degradación química que ocurre cuando estos reciben cantidades de contaminantes tales que sobrepasan su capacidad natural de autodepuración y deriva en la pérdida de su productividad. La contaminación del suelo si bien puede suceder de manera natural, como cuando la misma evolución del suelo favorece la concentración de ciertos metales, lo más común es que tenga un origen antropogénico como puede ser el almacenamiento inadecuado de residuos, explotaciones mineras, derrames de petróleo o sus derivados, actividad agrícola, etc. (Jiménez Ballesta, 2017a).

1.2 CONTAMINACIÓN POR METALES

Dentro de los contaminantes del suelo se encuentran los denominados “metales pesados” que engloban a elementos químicos metálicos y metaloides. Los metales pesados o simplemente metales son clasificados dentro de este grupo en base a su peso atómico el cual va de 63.55u (Cu) a 200.59u (Hg) o bien en base a su densidad que puede ser de 4 g/cm³ a 7 g/cm³. Aunque los metales pesados suelen ser tóxicos en concentraciones elevadas hay algunos que en concentraciones adecuadas son necesarios para los organismos como es el caso del zinc o el selenio (MITECO, s.f.).

Si bien, los metales se encuentran de manera natural en la corteza terrestre es la actividad humana la principal causa de su dispersión en el ambiente por medio de actividades como la minería, la metalurgia, la industria automotriz, la agricultura, etc. Las propiedades tóxicas de los metales se deben a su capacidad de formar enlaces covalentes con grupos orgánicos formando iones lipofílicos y compuestos capaces de unirse a las macromoléculas de las células facilitando su distribución en la biosfera. Otra propiedad que los hace tóxicos es que no pueden ser biodegradados, una vez entran a los organismos estos buscarán atraparlos por medio de proteínas o gránulos intracelulares para después excretarlos y en caso de que los metales no puedan ser excretados estos tienden a bioacumularse en los tejidos causando complicaciones biológicas y fisiológicas (Briffa *et al.*, 2020).

En la tabla 1 se resumen los metales más comunes en suelos.

Tabla 1 Principales metales encontrados en los suelos. La información fue tomada de Jiménez Ballesta et al., 2017.

| Metal | Características |
|------------|---|
| Plomo (Pb) | Se encuentra de manera natural en forma de plomo iónico o formando óxidos e hidróxidos de plomo siendo los fosfatos, carbonatos e hidróxidos de plomo los compuestos insolubles |

| | |
|----------------------|--|
| | predominantes. Pb(II) es la forma más común y reactiva mientras que el sulfuro de plomo (PbS) es la forma sólida más estable dentro de la matriz del suelo. |
| Cromo (Cr) | Se encuentra siempre formando compuestos en la naturaleza, su principal fuente de emisión es la galvanoplastia y eliminación de residuos que lo contienen. Cr(VI) es su forma más tóxica y móvil en forma de cromato (CrO_4^{2-}) y dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). El Cr(III) es la forma predominante en ambientes ácidos y su movilidad se ve restringida a los procesos de adsorción a los coloides del suelo. En cantidades traza el Cr(III) es necesario en el metabolismo de glucosa y lípidos en los animales, sin embargo, en grandes cantidades es un carcinógeno al igual que el Cr(VI). |
| Arsénico (As) | Es un metaloide encontrado en gran cantidad de minerales como óxido de arsénico (As_2O_3). En ambientes aeróbicos predomina el As(V) en la forma de arseniato (AsO_4^{3-}) en varios estados de protonación. A mayores niveles de pH aumenta la movilidad del As, aunque al adsorberse a los coloides del suelo puede ser transportado a través de aguas subterráneas y superficiales. |
| Zinc (Zn) | Es un metal de transición cuya presencia a aumentado debido a la actividad humana, si bien, es un oligoelemento esencial para animales y plantas puede ser tóxico en altas concentraciones. En suelo las altas concentraciones de Zn retrasan la descomposición de materia orgánica al afectar el desarrollo de microorganismos y gusanos descomponedores. |
| Cadmio (Cd) | Es un metal de transición y uno de los más tóxicos junto al plomo y el mercurio, se encuentra en forma de iones Cd(II) y por su similitud química con el Zn puede sustituirlo causando alteraciones en el metabolismo. La lluvia ácida, la acidificación del suelo y las aguas superficiales aumentan su movilidad en el ambiente sumado a su presencia en varios procesos productivos. |
| Cobre (Cu) | Es un elemento esencial para plantas y animales, generalmente no representa un riesgo para la salud de los mismos salvo cuando está en forma de cobre iónico Cu(II) pudiendo causar daños en hígado, riñón y estómago. |
| Mercurio | Es un metal líquido que normalmente se recupera como subproducto de procesos de extracción de minerales. El mercurio que es emitido en forma de vapor o sólida se incorpora al suelo mediante deposición seca o húmeda a través de cenizas volantes y agua de lluvia. El mercurio elemental se transforma a formas alquiladas mediante procesos bióticos o abióticos, estas especies de mercurio son las más tóxicas y llegan a ser volátiles en el aire y solubles en el agua. |
| Níquel | Es un elemento esencial a bajas concentraciones, se encuentra en diversas formas como Ni(II), $\text{Ni}(\text{OH})_2$, Ni_3O_4 , Ni_2O_3 , NiO_2 o Ni^{2+} dependiendo del pH del entorno. A medida que asciende el pH aumenta la movilidad del níquel pudiendo ser lixiviado hacía las capas freáticas. |

Los metales al dispersarse por el ambiente pueden ingresar a las personas por medio de su absorción a través de la piel, por medio de la respiración o por la ingesta de alimentos contaminados por los mismos ya que pueden integrarse a la cadena alimenticia al contaminar los cuerpos acuíferos y estos son utilizados para el riego de cultivos, para el consumo humano o de animales. Una vez que ingresan a los organismos y a la cadena alimenticia suceden los fenómenos de bioacumulación, acumulación de los metales en los tejidos, y la biomagnificación que es la presencia de una mayor concentración de metales en los tejidos de los organismos ubicados en los niveles más altos de la cadena alimenticia. Los tejidos que presentan una mayor actividad metabólica como el hígado o riñones tienden a acumular más los metales (Zaynab *et al.*, 2022).

La tabla 2 resume de manera general las principales afectaciones a la salud causadas por cada metal.

Tabla 2 Principales efectos en la salud causado por metales. Información tomada de Rai et al., 2019.

| Metal | Dosis de respuesta | Riesgos a la salud |
|----------------------|---|--|
| Plomo (Pb) | NOAEL: 25 µg/l RfD (mg/kg/día): 0.35×10^{-3} Límite tóxico: $\geq 70 \mu\text{dl}$ | Encefalopatía, daño al sistema nervioso central, al sistema circulatorio y al sistema cardiovascular. Puede afectar el desarrollo cognitivo en niños. Afectar funciones metabólicas y renales. Puede ocasionar anemia, daño nefrótico y está relacionado con el desarrollo de cáncer. |
| Cromo (Cr) | El límite tóxico en personas no está definido aún. | Puede ocasionar falla renal y del hígado, hemólisis y hemorragia gastrointestinal, colapso del sistema respiratorio al causar cáncer de pulmón o fibrosis pulmonar. |
| Arsénico (As) | Límite tóxico: $\geq 50 \mu\text{g/l}$ | Disfunción multiorgánica, encefalopatía, depresión de la médula ósea, hepatomegalia, melanosis, diarrea, neuropatía severa, síndrome del QT largo, enfermedad vascular, cáncer en pulmón, riñón, vejiga y piel y diabetes. |
| Zinc (Zn) | LOAEL: 59.3 mg/Kg/día RfD: $1.00 \times 10 \text{ mg/Kg/día}$ | Problemas respiratorios, en mujeres adultas puede disminuir de manera significativa (47%) la concentración de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos. |
| Cadmio (Cd) | NOAEL (en alimentos): 0.01 mg/Kg/día RfD: $0.01 \times 10^{-2} \text{ mg/Kg/día}$ | Afecta la función renal mediante el aumento de la secreción de proteínas de bajo peso molecular ($\beta 2$ macroglobulinas y $\alpha 1$ macroglobulinas) y de enzimas (N-Acetil- β -D-glucosaminidasa), causa neumonitis, inhibición de hormonas sexuales (progesterona y estradiol), disrupción endocrina, proteinuria y actúa como carcinógeno. |

| | | |
|-------------------|--|---|
| Cobre (Cu) | LOAEL: 10 mg/Kg/día | Afecta funciones metabólicas y renales. En ratas se ha observado que puede ocasionar exceso de condensación de proteínas en células epiteliales de los túbulos proximales. |
| Mercurio | 10 µg/l en sangre 20 µg/l en orina | El mercurio inorgánico puede ocasionar daño en pulmones y riñones y proteinuria. El mercurio orgánico puede ocasionar daño en el sistema nervioso central, hipersensibilidad, síndrome nefrótico y la enfermedad de Minamata. |
| Níquel | NOAEL: 5 mg/Kg/día RfD: 0.05x10 ⁻¹ mg/Kg/día | Afecta la función renal y disminuye el peso corporal y de los órganos. |

*NOAEL: Nivel sin efecto adverso observado; LOAEL: Nivel más bajo con efecto adverso observado; RfD: Dosis de referencia, dosis por unidad de peso corporal y día que es probable que no represente un riesgo.

La presencia de metales en el suelo baja la calidad del mismo y puede ocasionar diversos efectos adversos en los ecosistemas principalmente a través de procesos microbianos y las interacciones suelo-microbio. Algunos metales resultan tóxicos para las plantas ocasionando daños en su desarrollo y procesos fisiológicos como la reducción de su ratio de crecimiento, movimiento del estoma y desbalance de los nutrientes y la inhibición de la fotosíntesis. A nivel celular los metales dañan las membranas celulares de las plantas y al generar una mayor producción de especies reactivas de oxígeno se llegan a destruir biomoléculas y organelos (Qin *et al.*, 2021).

Una vez los metales se depositan en los suelos por medio de arrastre pueden llegar a distintos mantos acuíferos donde se pueden depositar en los sedimentos y ser absorbidos por las plantas acuíferas o bien pueden ingresar a los organismos acuáticos como peces y moluscos donde se acumulan en sus tejidos y ocasionar una serie de afectaciones como mutaciones, infertilidad, afectar el desarrollo embrional o larval, disminuir la esperanza de vida de los organismos así como comprometer las funciones de distintos órganos (Taslina *et al.*, 2022).

1.3 LA INDUSTRIA MINERA

La minería es el conjunto de actividades que son llevadas a cabo en yacimientos con el propósito de extraer y explotar los recursos minerales acumulados en el suelo y subsuelo. Está considerada como el inicio de todas las cadenas productivas industriales llegando a marcar las épocas del progreso conforme se utilizaban los minerales desde la Edad del Bronce hasta la Época Cibernética (Camimex, 2020; Mexicomintero, 2018). La minería y el procesamiento de los minerales contribuyen enormemente a la economía de una nación, además, es a través de ella que se obtienen recursos invaluable para la civilización moderna. Sin embargo, a medida que crece la demanda por los recursos mineros también lo hace el impacto negativo que esta industria genera en el ambiente, por lo que se busca que para el 2050 sea una actividad sostenible. Los medios a través de los cuales la minería impacta sobre el ambiente es por el mal manejo de los residuos ya que puede ocasionar la contaminación de

acuíferos, el drenaje al subsuelo de ácidos, sedimentación y deposición de metales, además, al construir las minas se deforestan amplias zonas de vegetación afectando la biodiversidad del lugar (Farjana *et al.*, 2019).

Existen distintas herramientas para determinar el impacto en los ecosistemas provocado por la minería, una de estas herramientas es la evaluación del ciclo de vida (ECV) donde se considera todas las etapas involucradas desde el momento de la extracción hasta la disposición final y en ella se cuantifica todos los daños asociados a cada etapa basados en un inventario del ciclo de vida para finalmente hacer una interpretación. Otra herramienta utilizada es el uso de los datos generados por el cambio de uso de suelos. Al combinar ambas herramientas, que llegan a estar relacionadas, se obtiene un estudio más completo y se ha podido determinar que la minería produce importantes efectos en el cambio de uso del suelo al producir la pérdida de vegetación por la deforestación y generar una importante emisión de CO₂ (Islam *et al.*, 2020).

Aproximadamente el 70% del territorio mexicano tiene potencial para ser explotado por la minería, sin embargo, solo se explota alrededor del 30%, el sector minero-metalúrgico contribuye al 2.3% del Producto Interno Bruto Nacional y al 8.3 del Producto Interno Bruto Industrial. A nivel mundial México se encuentra entre los 10 primeros productores de 17 minerales: 1° plata; 2° fluorita; 3° sulfato de sodio y wollastonita; 5° bismuto, molibdeno y plomo; 6° cadmio, sulfato de magnesio, zinc, diatomita y barita; 8° yeso, sal y oro; y 9° cobre. Para el 2020 México, con un 25% del total mundial, fue el segundo destino de América Latina con mayor presupuesto para exploración según el informe de S&P Global Market Intelligence, de igual forma fueron invertidos 3 mil 532.62 millones de dólares al sector minero y se obtuvo una producción de 13 mil 95 millones de dólares (Camimex, 2020; Secretaría de Economía, 2022).

Ubicado en la región centro-norte del país y a una altura de 2,100 metros sobre el nivel del mar se encuentra el estado de Zacatecas, es el octavo estado más extenso del país con una superficie de 75,284 Km² y su paisaje se caracteriza por ser rocoso, con cañones, sierras y llanos donde se ubican importantes yacimientos de oro, plata, plomo, cobre, zinc y manganeso. La minería en Zacatecas comenzó alrededor del año 1548 cuando fueron descubiertos yacimientos de plata y es el segundo estado de mayor importancia minera en el país (Almeida *et al.*, 2019; S.G.M., 2020).

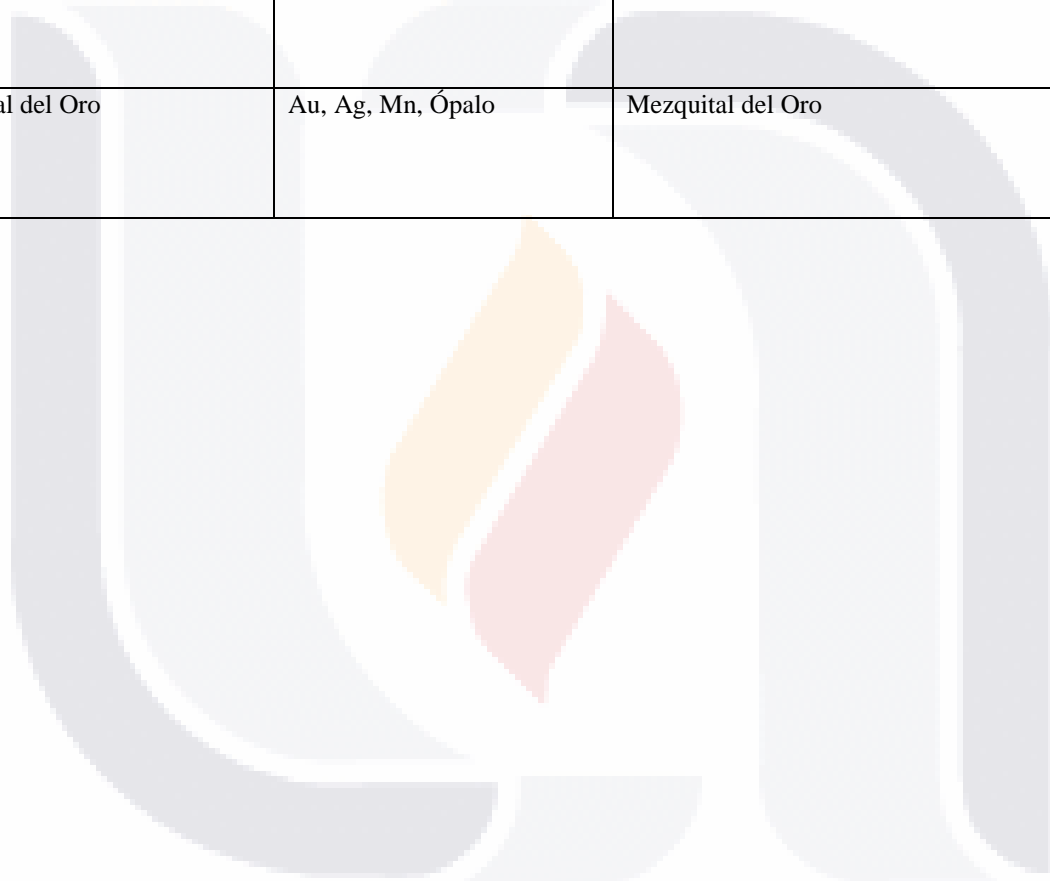
En 2019 el estado tuvo una producción minera de 194,437, 101,909.07 billones de pesos lo que correspondió al 20.18% del valor total nacional.

Por su ubicación y tipo de minerales Zacatecas se divide en 17 regiones mineras, que se enlistan en la tabla 1, en las que tienen actividades 19 empresas (S.G.M., 2020).

Tabla 3 Regiones mineras del estado de Zacatecas. Información tomada de S.G.M., 2020.

| Región | Mineralización | Distrito y zonas mineras |
|--------------------------------|------------------------------------|--|
| 1.- San Julián | Au, Ag, Pb, Zn, Cu | San Julián |
| 2.- Concepción del Oro | Au, Ag, Pb, Zn, Cu | Peñasquito, Melchor Ocampo, Nochebuena, Providencia y El Salvador |
| 3.- Miguel Auza-Juan Aldama | Au, Ag, Pb, Cu, Sn | Miguel Auza- Juan Aldama |
| 4.-Nuevo Mercurio-Camino Rojo | Au, Hg | Nuevo Mercurio |
| 5.- Gral. Francisco R. Murguía | Au, Ag, Pb, Zn, Sb | Santa Rita, San Gregorio, Concordia y El Rosario |
| 6.-Sombrerete- Chalchihuites | Au, Ag, Pb, Zn, Cu, Sn, Hg, Caolin | Sombrerete, San Martín, Chalchihuites |
| 7.- Saín Alto | Hg, Sn | Cerro Colorado, Bonancita, Sauz y Nuevo Mercurio |
| 8.- Villa de Cos | Mn, Hg, Sb, F, Ónix, Sal | La Abundancia, Manganita, La Prieta, San Felipe de Jesús, Tenango, El Capirote, El Burrito y Sarteneja |
| 9.- Jiménez de Teúl | Au, Ag, Pb, Zn, Cu, Sn | Jiménez de Teúl |
| 10.- Fresnillo | Ag, Au, Pb, Zn | Fresnillo |
| 11.- Valparaíso | Au, Ag, Sn, Bi | Valparaíso |
| 12.- Zacatecas | Ag, Pb, Zn, Cu, Cd | Zacatecas |

| | | |
|----------------------------------|--------------------------|--|
| 13.- Villanueva-Jalpa | Fluorita, Ag, Pb, Zn, Cu | Villanueva Jalpa |
| 14.- Pánfilo Natera- Ojocaliente | Ag, Pb, Zn, Wollastonia | Pánfilo Natera, Ojocaliente, Luis Moya |
| 15.- Real de Ángeles | Pb, Ag, Zn | Real de Ángeles |
| 16.- Pinos | Ag, Au, Sn, Caolin | Pinos |
| 17.- Mezquital del Oro | Au, Ag, Mn, Ópalo | Mezquital del Oro |



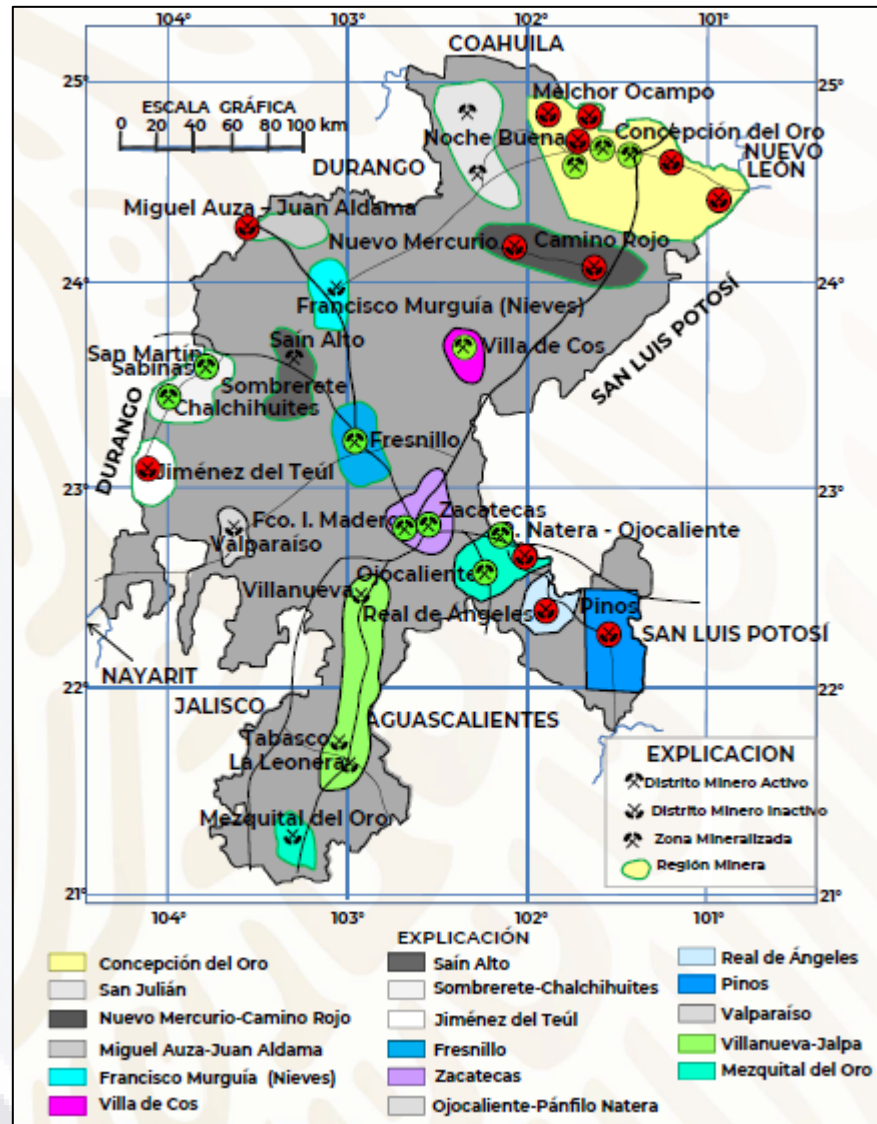


Figura 1 Regiones mineras del estado de Zacatecas y su ubicación. Tomado de S.G.M., 2020.

México al tratarse de un país con alta producción minera tiene sitios altamente contaminados por metales entre los que se encuentran los municipios de Guadalupe y Zacatecas en el estado de Zacatecas y donde se encuentran altas concentraciones de arsénico y plomo en suelos y mantos acuíferos utilizados para la agricultura, en el estado de Hidalgo se ubica el municipio de Zimapán donde las concentraciones de arsénico exceden hasta 10 veces lo estipulado por la OMS o la población minera de Villa de la Paz en San Luis Potosí (Covarrubias & Peña Cabriaes, 2017).

1.4 MICROORGANISMOS DE SUELO

Los suelos son el reservorio de un gran número de plantas y organismos vertebrados, pero además también constituye el hogar de bacterias, hongos, protozoos, nematodos, gusanos de tierra y artrópodos. De estos organismos las bacterias son quienes tienen el rol principal en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo y sulfuro permitiendo mantener la fertilidad del suelo, el reciclaje de nutrientes y aumenta la disponibilidad de los mismos para las plantas; es este metabolismo el que las hace de interés para ser empleadas en técnicas de remediación (Yang & van Elsas, 2018). Las bacterias tienen la capacidad de habitar distintos hábitats incluso aquellos donde se presentan condiciones extremas como altas temperaturas, altas concentraciones de sales o contaminantes e incluso donde el agua es muy escasa, se distinguen 4 grupos funcionales: las descomponedoras, las mutualistas, las patógenas y las litótrofas. Dentro de estos grupos hay géneros de bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Gluconobacter*, *Flavobacterium* y *Herbaspirillum* que al fijar el nitrógeno aumentan la fertilidad del suelo y promueven el crecimiento de las plantas (Alown *et al.*, 2021). Las poblaciones de bacterias, así como los géneros de las mismas que habitan un determinado lugar están ligadas principalmente al pH del suelo, la disponibilidad del nitrógeno, el contenido de carbono orgánico, la temperatura y el potencial redox, aunque, todas las poblaciones de bacterias cumplen las mismas funciones en los nichos ecológicos en que se encuentren como lo es el consumo y producción de gases atmosféricos (hidrógeno, dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno, compuestos volátiles), cambiar la acidez del suelo, regular el carbono del suelo y el reciclaje de nutrientes, afectar la disponibilidad del agua mediante la alteración de la conductividad hidráulica y la hidrofobicidad del suelo (Fierer, 2017).

Las bacterias funcionan como buenos indicadores de la calidad del suelo ya que muestran sensibilidad a la presencia de contaminantes, por ejemplo, en el caso de los metales pueden ocasionar la destrucción de la membrana celular, reducir su actividad enzimática, disminuir su función celular y reducir el número de genes dependiendo de la cantidad de metales presentes. Como indicadores de la calidad del suelo las bacterias ofrecen ciertas ventajas:

- Son de los organismos con mayor actividad en los suelos, por lo que son más susceptibles al estrés generado por los metales.
- Además de su abundancia, están relacionados con la degradación de los contaminantes, así como con la fertilidad de los suelos.
- Las pruebas realizadas para el diagnóstico suelen ser baratas, rápidas, fáciles de realizar y necesitan una pequeña cantidad de muestra (Tang *et al.*, 2019).

A pesar de que la presencia de metales en el suelo llega a alterar las poblaciones microbianas haciendo que estas disminuyan, la exposición a largo plazo genera la aparición de microorganismos capaces de tolerar dichas condiciones. La tolerancia a los metales se logra por diferentes estrategias que emplean las bacterias como la expulsión de las especies metálicas de la superficie celular, la bioacumulación de los iones metálicos dentro de

la célula, la biotransformación de los metales hacia especies menos tóxicas o la adsorción de los metales en la pared celular (Ahemad, 2019).

1.5 USO BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS TOLERANTES A METALES

Debido al daño ocasionado por la presencia de contaminantes en el suelo se han ido desarrollando técnicas de remediación siendo los métodos químicos y físicos los primeros en desarrollarse, sin embargo, suelen ser costosos y en algunos casos afectar la integridad de los suelos. Métodos más modernos incluye el uso de microorganismos aprovechando las capacidades metabólicas de estos, resultando en procesos más económicos y amigables con el ambiente. Hay 3 estrategias que se pueden emplear en la biorremediación:

- **Atenuación natural:** se monitorea la degradación de los contaminantes sin la intervención directa.
- **Bioestimulación:** consiste en ajustar condiciones ambientales como temperatura o humedad, añadir nutrientes y aceptores de electrones a los suelos contaminados con el fin de propiciar el aumento en la población de los microorganismos y disminuir la concentración de los contaminantes. Se emplean los microorganismos nativos del área a remediar.
- **Bioaumentación:** son inoculados microorganismos degradantes buscando aumentar la degradación de los contaminantes. Se utiliza cuando las poblaciones nativas no son capaces de degradar los contaminantes presentes o su cantidad es muy poca (Alkorta *et al.*, 2017).

Los mecanismos de tolerancia a los metales que presentan las bacterias pueden ser aprovechados en la aplicación de técnicas de biorremediación como lo es la adsorción de los metales en la superficie de la pared celular, esto sucede por la atracción que los metales sienten hacia ciertos grupos funcionales de las paredes como los grupos carbonatos y está influenciada principalmente por el pH del medio y por lo mismo al variar el pH del medio puede ser un proceso reversible. Otro mecanismo que se utiliza es la bioacumulación en la cual los metales atraviesan la membrana celular de las bacterias mediante proteínas de transporte específicas y una vez dentro son secuestrados por proteínas ricas en grupos sulfhidrilo o por vacuolas (Rebello *et al.*, 2021). Otro de los mecanismos estudiados es la biomineralización microbiana inducida por la precipitación de fosfato en la cual las enzimas fosfatasas de las bacterias incrementan la viabilidad del fosfato y mediante la precipitación de minerales que contienen fósforo, de la superficie celular, es mediada la mineralización de los iones metálicos (Jiang *et al.*, 2020). También se aprovecha la capacidad de las bacterias para cambiar el estado redox de los metales y metaloides, esto lo logran al utilizar dichos metales como aceptores finales de electrones, por medio de reacciones enzimáticas, cambiándolos a especies más estables e insolubles y por lo tanto menos dañinas (Yin *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICACIÓN

La minería constituye la actividad principal en el estado de Zacatecas llegando a tener una producción de 194,437, 101,909.07 billones de pesos en el año 2019. Dentro del estado se ubican 17 zonas mineras y laboran 19 empresas que se encargan de extraer minerales como: oro, plata, plomo, zinc, cobre, entre otros. Sin embargo, la minería libera al medio gran cantidad de contaminantes, entre ellos metales y metaloides como plomo, arsénico y cadmio, que al ser dispersados por medio del viento y del agua de escorrentía llegan a contaminar el suelo, subsuelo y mantos acuíferos superficiales y subterráneos, constituyendo una problemática ambiental y un riesgo para la salud de los organismos en los cuales se bioacumulan y biomagnifican en sus tejidos.

La presencia de metales en el suelo puede alterar a las comunidades bacterianas presentes en el, ya sea que se disminuya su biomasa o bien que sean menos productivas, aunque, también pueden desarrollarse colonias tolerantes a los metales. La tolerancia a los metales está dada por una serie de mecanismos que incluyen la biosorción, la bioacumulación, la biomineralización o la quimiosorción mediada por microorganismos.

La remediación de suelos es la actividad a través de la cual se busca recuperar la calidad del suelo y subsuelo mediante la modificación, extracción o inmovilización del contaminante, para ello existen métodos químicos y físicos, sin embargo, estos métodos suelen ser costosos, utilizan altas cantidades de reactivos y pueden generar lodos tóxicos por lo que una alternativa más económica y con una menor generación de residuos es el empleo de microorganismos tolerantes a los contaminantes que se deseen tratar.

Por su actividad minera Zacatecas se encuentra entre los sitios más contaminados por metales en México, previamente se colectaron muestras en zonas cercanas a minas y se encontraron concentraciones de plomo, cadmio y arsénico con valores de 54,119.8 mg/Kg, 321.5 mg/Kg y 11,233.8 mg/Kg respectivamente. Estas condiciones si bien constituyen un riesgo ambiental y a la salud de los seres vivos, también son las adecuadas para encontrar organismos micro y macroscópicos tolerantes a los metales con potencial para ser empleados en técnicas de biorremediación de suelo y agua. De esta manera se pretende realizar el aislamiento e identificación de bacterias a partir de las muestras colectadas, a las que se les realizarán pruebas de tolerancia a metales y metaloides y posteriormente se determinará su capacidad para removerlos del medio.

Terminado el trabajo se tendrá un grupo de bacterias con potencial biotecnológico, con las cuales se podrá seguir trabajando en pro de encontrar su posible uso en biorremediación de sitios contaminados por metales y metaloides.

El trabajo a desarrollar se ubica dentro del objetivo 12 del desarrollo sustentable de la ONU “Producción y consumos responsables” y en los Programas Nacionales Estratégicos 6 y 8 “Agentes Tóxicos y Procesos Contaminantes” y “Sistemas Socioecológicos y Sustentabilidad” respectivamente, al buscar elementos que permitan dar solución a la problemática de la contaminación en suelo generada por la minería.

3. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Las bacterias aisladas de suelos contaminados por la actividad minera en el estado de Zacatecas, presentan una tolerancia a concentraciones elevadas de metales y metaloides y poseen los mecanismos para su captación y e inmovilización en el suelo.



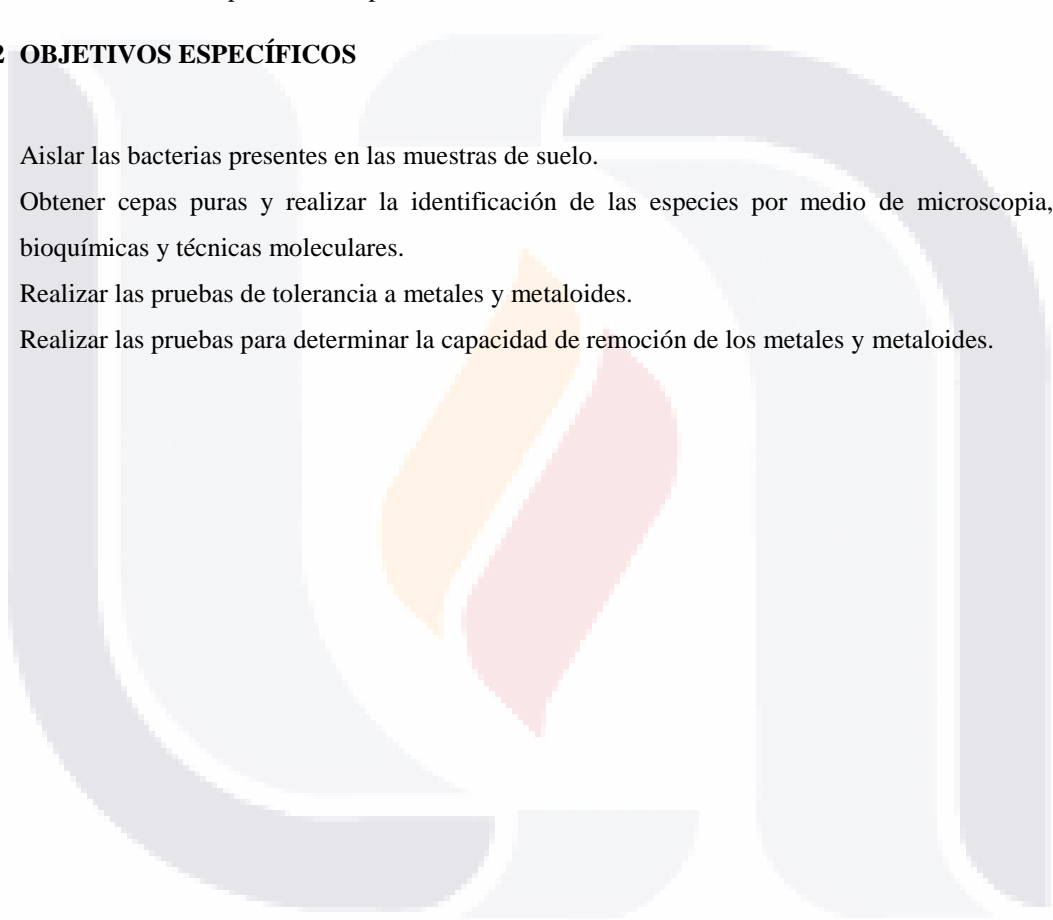
4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la tolerancia y capacidad de remoción de metales y metaloides en bacterias aisladas de sitios cercanos a las minas en el municipio de Concepción del Oro en el estado de Zacatecas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar las bacterias presentes en las muestras de suelo.
- Obtener cepas puras y realizar la identificación de las especies por medio de microscopía, pruebas bioquímicas y técnicas moleculares.
- Realizar las pruebas de tolerancia a metales y metaloides.
- Realizar las pruebas para determinar la capacidad de remoción de los metales y metaloides.



5. METAS

- Obtener cepas bacterianas a partir de las muestras de suelos contaminados por metales.
- Conocer las concentraciones de plomo, cadmio y arsénico que son capaces de tolerar las cepas obtenidas de las muestras de suelo.
- Identificar la especie de la cepa bacteriana que demuestre mayor tolerancia a los metales mencionados previamente.



6. METODOLOGÍA

6.1 AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE TIERRA.

Tomando como base el trabajo de Audu *et al.*, 2020 se preparó una solución salina al 0.8% de NaCl empleando el reactivo Cloruro de Sodio, cristal (J.T. Baker Ref. 362401). 30 ml de la solución de NaCl al 0.8% se depositaron en un tubo cónico y en él se suspendieron 3g de muestra de suelo, se agitó y se dejó en incubación durante 24 horas a 28°C en la incubadora (Thomas Scientific modelo no. TSINC2), esto debido al tiempo que tenían las muestras de suelo en almacenamiento. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml y se depositó en una placa de Petri que contenía agar nutritivo (BD Bioxon Ref. 210400) y se sembró por arrastre buscando obtener colonias aisladas en la placa, la placa inoculada se incubó a 28°C durante 24 horas.

Las colonias desarrolladas fueron clasificadas en base a su morfología colonial tomando en cuenta tamaño, color, forma, brillo y tipo de bordes. Cada colonia que haya crecido separada del resto se resembró en una placa nueva de agar nutritivo bajo las mismas condiciones de cultivo. De las placas donde solo se observó un solo tipo de colonias se tomaron 3 colonias al azar, para confirmar la presencia de un solo tipo de bacteria, y se depositaron en portaobjetos con una gota de agua destilada para obteniendo un frotis y realizar la tinción Gram siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante Hycel del manual no. 541, los reactivos utilizados fueron Alcohol-Cetona 1:1 Código: 80200 de la marca Golden Bell, el colorante Violeta de Genciana Cat. 6269, colorante Safranina Cat. 826 y Yodo Gram Cat. 724 de la marca Hycel. Las tinciones Gram se observaron en el microscopio LEICA modelo DME.

6.2 PRUEBAS DE TOLERANCIA A METALES Y METALOIDES

Tomando como base el trabajo de Niane *et al.*, 2019. Se prepararon 3 soluciones madre: solución de nitrato de plomo ($Pb(NO_3)_2$) (Fermont Ref. 41792) con una concentración de plomo de 58,210 mg/l de plomo, solución de cloruro de cadmio ($CdCl_2$) (Fermont Ref. 24262) con una concentración de cadmio de 867 mg/l y una solución de arsenato de sodio dibásico heptahidratado ($HAsNa_2O_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma-Aldrich Ref. S9663-50G) con una concentración de arsénico de 9,150 mg/l. En tubos de vidrio se vaciaron 5 ml de caldo nutritivo (BD Bioxon Ref. 210300) que se inoculó con las colonias aisladas y se incubaron a 28°C durante 24 horas.

Placas de agar nutritivo fueron adicionadas con las soluciones madre de los metales a distintas concentraciones de plomo a 16.8 mg/L, 84 mg/L, 109 mg/L, 134 mg/L, 151 mg/L, 168 mg/L y 185 mg/L; y de cadmio a 10 mg/L, 15 mg/L, 40 mg/L y 50 mg/L; para posteriormente ser inoculadas tomando 100 μ l de las cepas cultivadas en los caldos nutritivos e incubadas a 28°C durante 72 horas. Pasado el tiempo se observó si hubo desarrollo bacteriano en las placas y se registró la concentración de los metales a la que cada cepa dejó de desarrollarse.

La tolerancia a arsénico se probó en caldo de cultivo nutritivo al que se añadió el arsénico a distintas concentraciones y posteriormente se inoculó con las bacterias, el caldo inoculado se incubó a 28°C durante 72 horas. Pasado el tiempo la presencia de turbidez en el caldo de cultivo indicaría que hubo un crecimiento bacteriano. Las concentraciones de arsénico a las que fueron expuestas las bacterias fueron: 1000 mg/l, 2000 mg/l, 4000 mg/l y 6000 mg/l. La tolerancia a plomo y cadmio fue probada de igual manera en caldo de cultivo.

6.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS TOLERANTES.

La identificación de las bacterias tolerantes se realizó en las instalaciones del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Aguascalientes en el área de Control Microbiológico. Se realizó tinción Gram de las bacterias posteriormente por espectrofotometría de masas Maldi-Tof se hizo una identificación proteómica utilizando el equipo Maldi-Tof BD Modelo Microflex Bruker. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron llevadas a cabo en el equipo BD Phoenix™ M50 System. Finalmente se realizó la extracción del ADN de las bacterias utilizando el kit DNA Bacteria Plus Kit 50, se midió la pureza del ADN extraído con el espectrofotómetro BioDrop y se realizó la secuenciación del genoma de las bacterias utilizando los equipos MiniSeq™ Illumina y el termociclador Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler haciendo uso de los kits proporcionados por la empresa Illumina, con el genoma obtenido se realizó una prueba BLAST comparándolo con un banco de genes para encontrar las especies que tienen mayor similitud.

6.4 REMOCIÓN DE METALES DEL MEDIO

Tomando como base los trabajos de Oziegbe *et al.*, 2021 y Al Disi *et al.*, 2022, se planteó la siguiente metodología para determinar la capacidad de las bacterias tolerantes, a plomo, cadmio y arsénico, para remover dichos metales del medio. Se obtuvo biomasa de las cepas 23, 52, 67 y 68 inoculándolas, por separado, en 100 ml de caldo nutritivo e incubando a 30°C durante 48 horas en agitación constante, la biomasa formada se separó por medio de centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y se lavó con agua destilada. En tubos cónicos se obtuvo un volumen final de 35 ml conformado por caldo de cultivo, solución de plomo, cadmio o arsénico a una concentración de 55 mg/l, 20 mg/l o 1000 mg/l respectivamente y biomasa de las cepas 23, 52, 67 y 68. Las cepas 23 y 68 se probaron en plomo y cadmio, la cepa 67 en arsénico y la cepa 52 en plomo, cadmio y arsénico. Se incubaron los cultivos durante 8 días a 30°C y agitándose a 150 rpm, tomándose alícuotas de 3 ml cada 2 días para medir la densidad óptica en el espectrofotómetro Hach modelo DR/4000U midiendo a una longitud de onda de 600nm y así obtener una cinética de crecimiento. Para determinar la remoción de los metales del medio se tomaron alícuotas de 3 ml de los cultivos a los días 0, 4 y 8, por medio de centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos se separó la biomasa y se dio un tratamiento de digestión ácida al sobrenadante para determinar la concentración de metales presentes por medio de espectrofotometría de absorción atómica, por flama para plomo y cadmio y con horno de grafito para arsénico, utilizando el espectrofotómetro de absorción atómica de la marca PerkinElmer modelo PinAAcle 900H. Las pruebas fueron realizadas por triplicado.

7. RESULTADOS

7.1 AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE TIERRA.

Se inocularon 24 muestras de tierra, de las cuales crecieron 96 colonias que fueron posibles tomarlas y pasarlas en placas nuevas con la finalidad de aislarlas. De las 96 colonias se diferenciaron 19 tipos de morfología colonial las cuales se enlistan en la siguiente tabla.

Tabla 4 Tipos de morfología encontrada en el cultivo de las muestras de suelo.

| Morfología | Forma | Color | Brillo | Borde |
|------------|------------|------------------|-----------|---------|
| 1 | Circular | Crema | Brillante | Liso |
| 2 | Circular | Gris | Brillante | Liso |
| 3 | Circular | Gris | Brillante | Dentado |
| 4 | Circular | Naranja | Brillante | Liso |
| 5 | Circular | Blanco | Brillante | Liso |
| 6 | Estrellada | Blanco | Brillante | Dentado |
| 7 | Circular | Naranja | Brillante | Liso |
| 8 | Circular | Centro café | Opaca | Liso |
| 9 | Circular | Gris cremosa | Brillante | Liso |
| 10 | Circular | Amarillo | Brillante | Liso |
| 11 | Circular | Blanco | Opaco | Liso |
| 12 | Swarming | Gris | Opaco | Dentado |
| 13 | Circular | Amarillo | Opaco | Dentado |
| 14 | Circular | Gris translucido | Opaco | Liso |
| 15 | Circular | Amarillo cremoso | Brillante | Liso |
| 16 | Circular | Rosa | Opaco | Liso |
| 17 | Circular | Transparente | Brillante | Lisa |
| 18 | Circular | Negro | Opaco | Dentado |
| 19 | Circular | Crema | Opaco | Dentado |

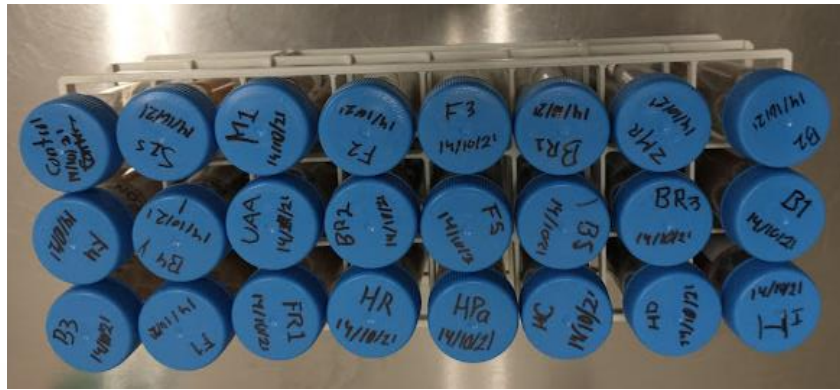


Figura 2 Muestras de tierra utilizadas.

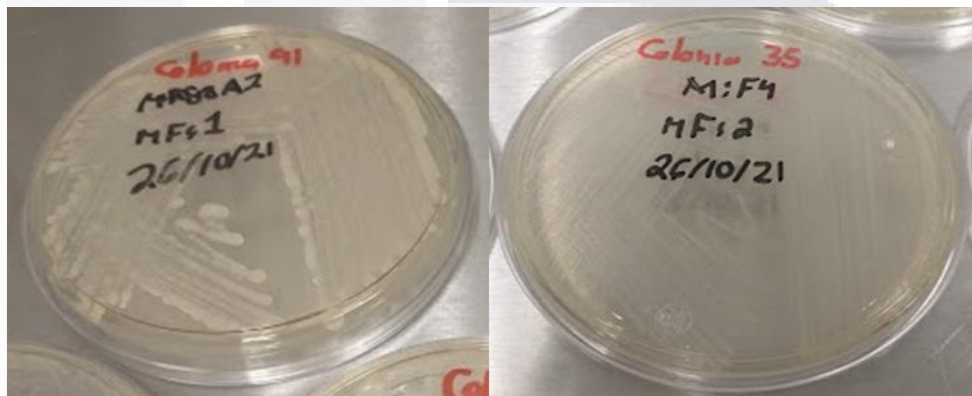


Figura 3 Colonias con la morfología "1" a la izquierda y "2" a la derecha.

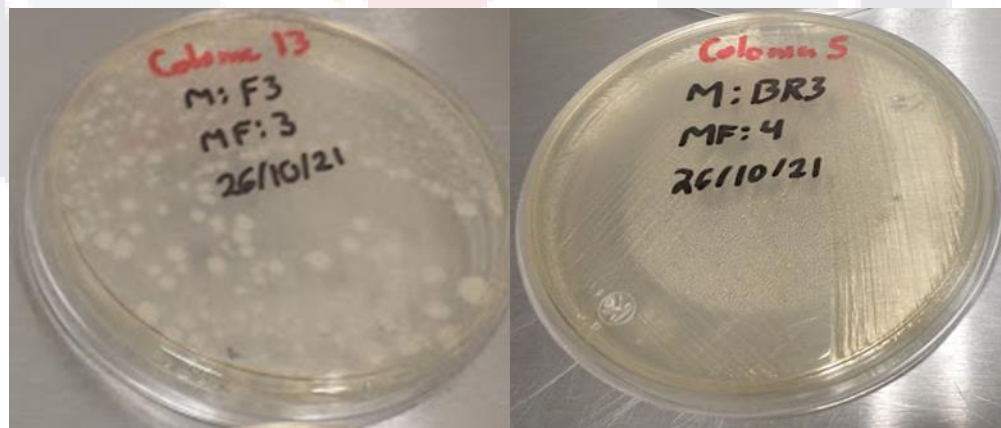


Figura 4 Colonias con la morfología "3" a la izquierda y "4" a la derecha.

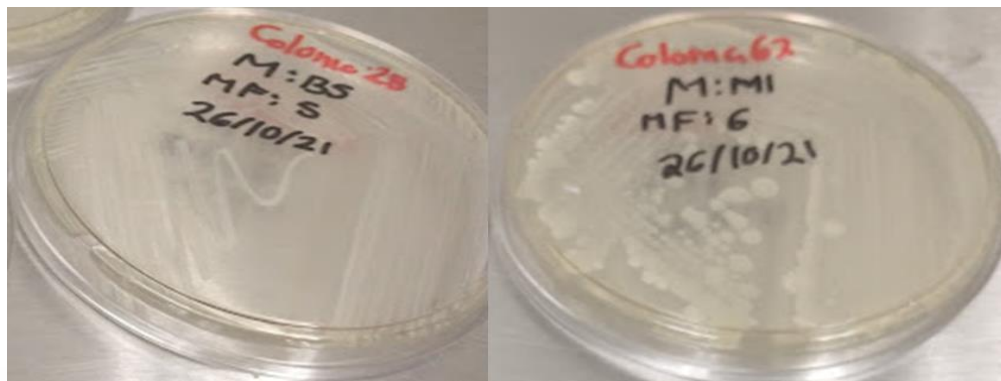


Figura 5 Colonias con la morfología "5" a la izquierda y "6" a la derecha.

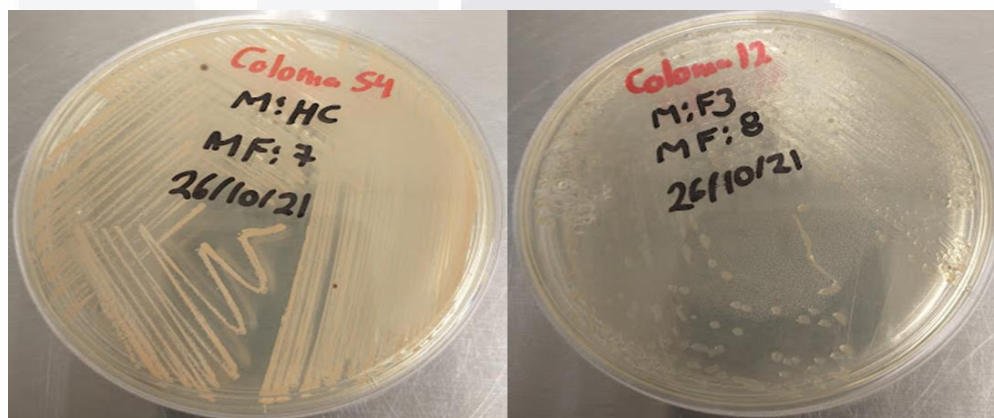


Figura 6 Colonias con la morfología "7" a la izquierda y "8" a la derecha.

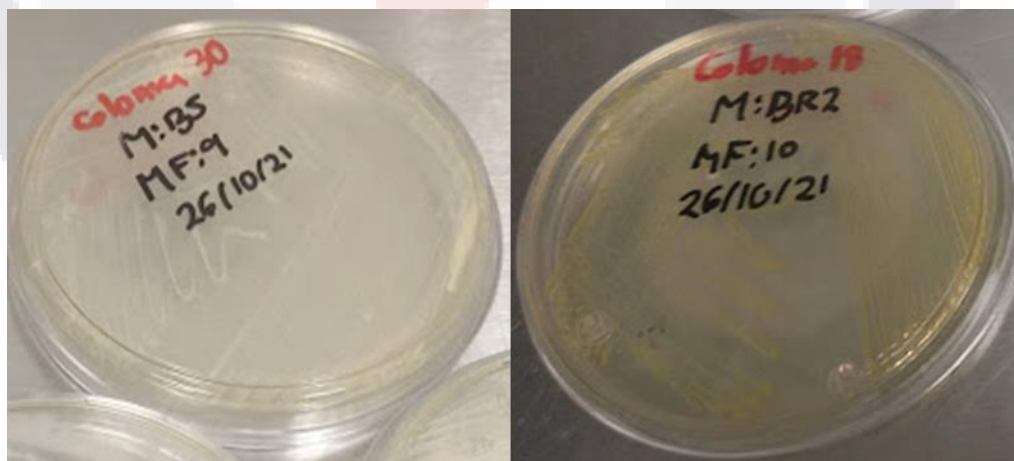


Figura 7 Colonias con la morfología "9" a la izquierda y "10" a la derecha.

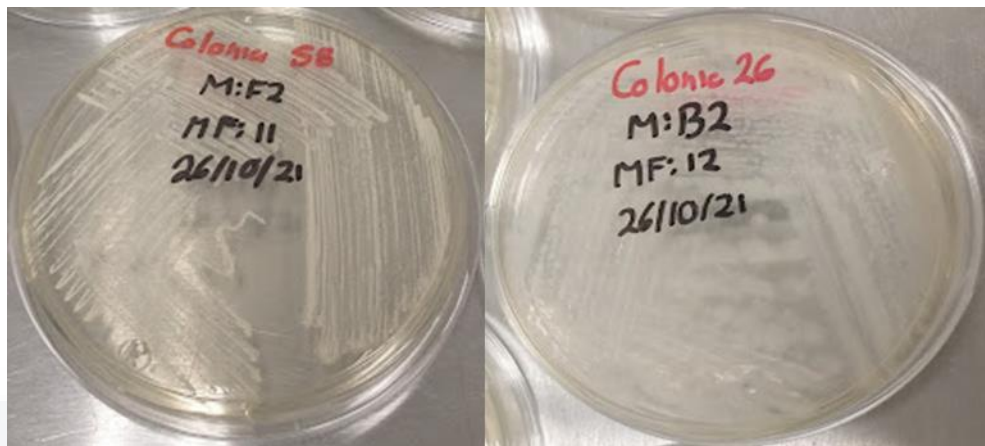


Figura 8 Colonias con la morfología "11" a la izquierda y "12" a la derecha.

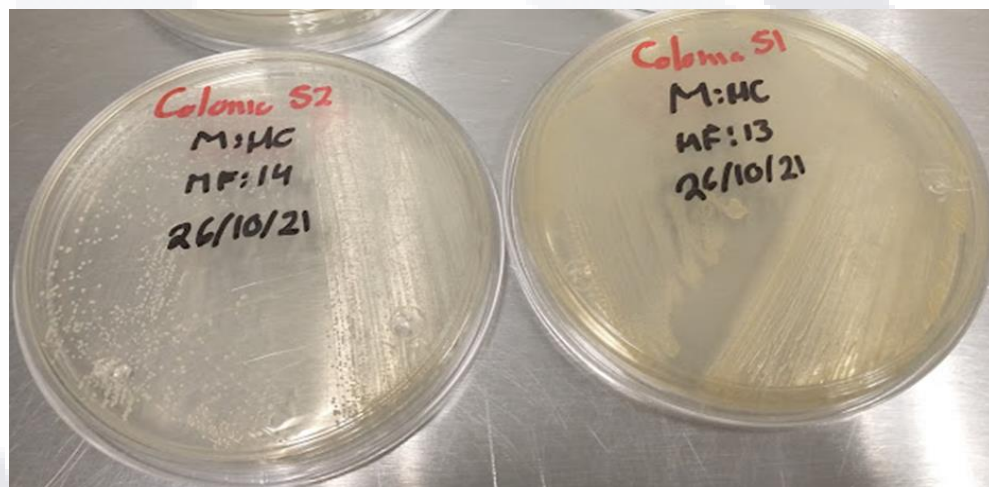


Figura 9 Colonias con la morfología "14" a la izquierda y "13" a la derecha.

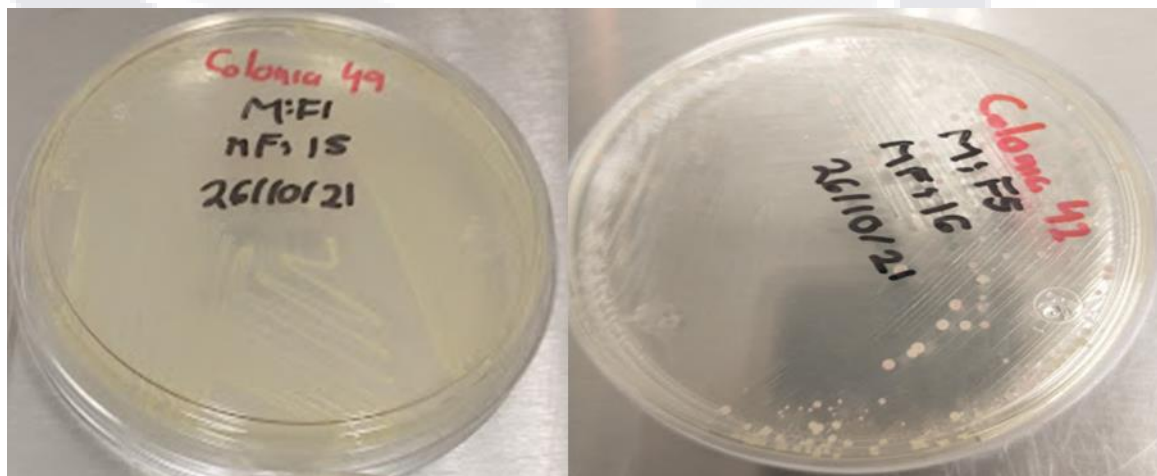


Figura 10 Colonias con la morfología "15" a la izquierda y "16" a la derecha.

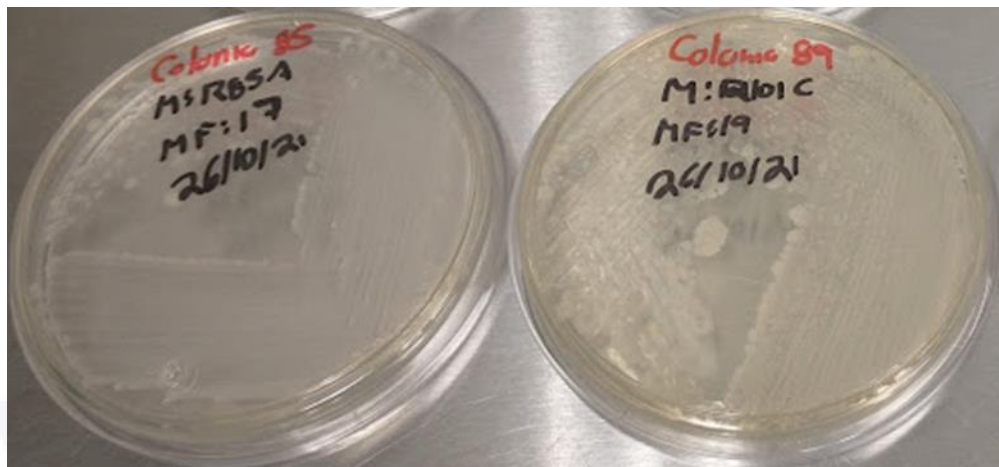
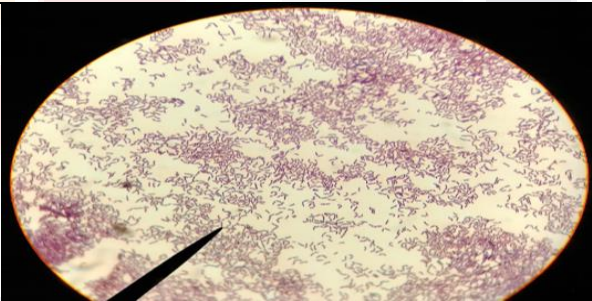
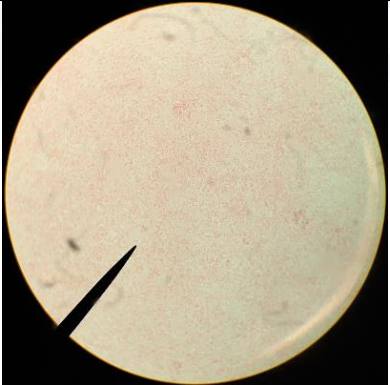
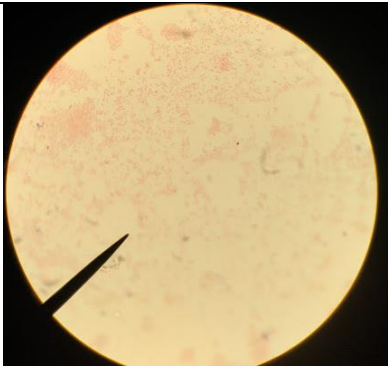

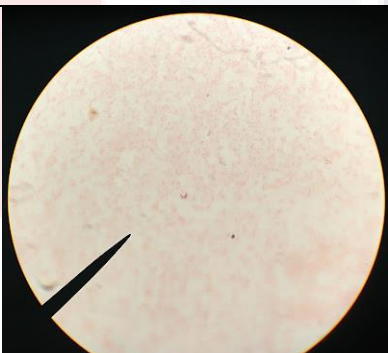
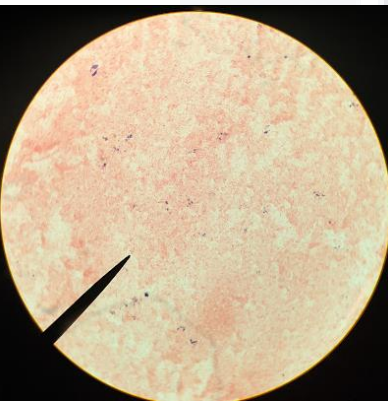


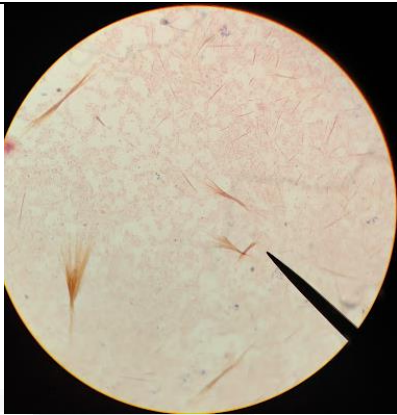
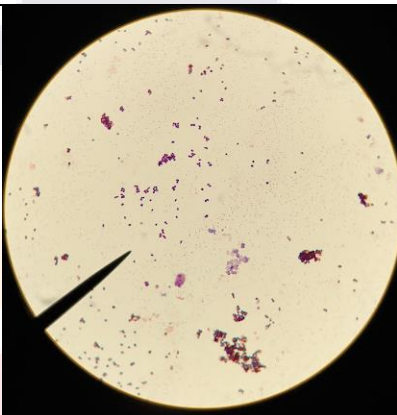


Figura 11 Colonias con la morfología "17" a la izquierda y "19" a la derecha.

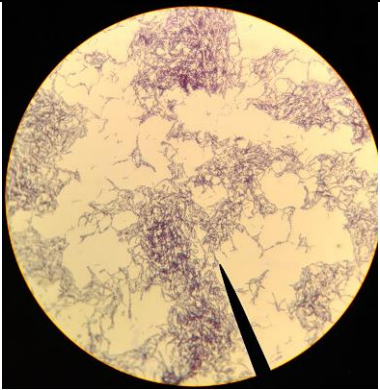
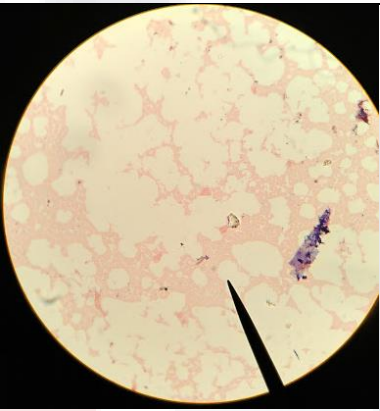
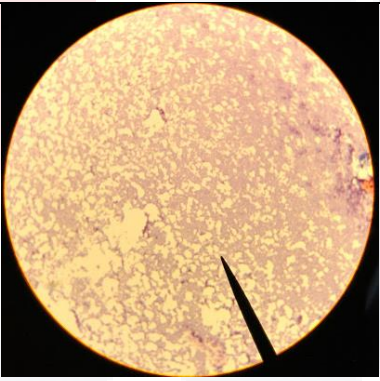
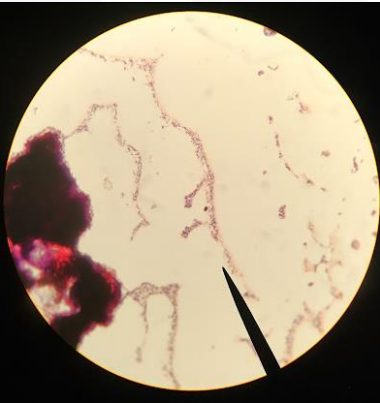
Al realizar la tinción Gram de las 3 colonias al azar en cada una de las 96 placas, solo en 32 placas coincidieron los resultados observados en las 3 tinciones Gram. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

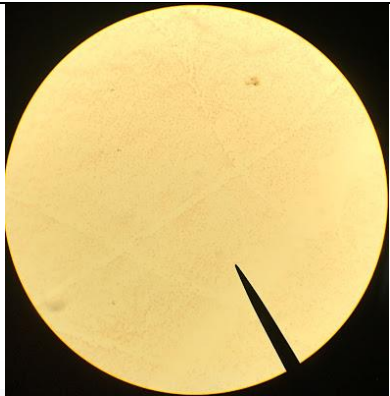
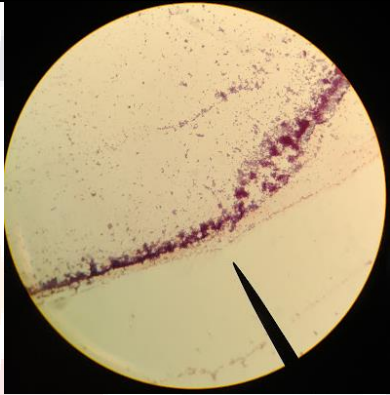
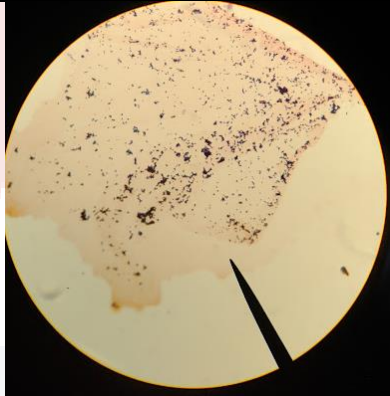

Tabla 5 Resultados de la Tinción Gram.

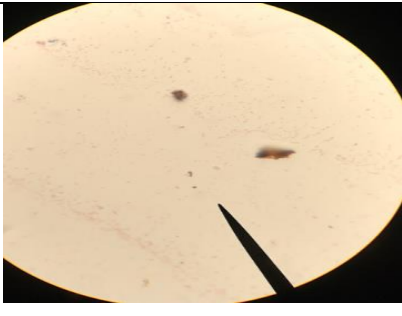
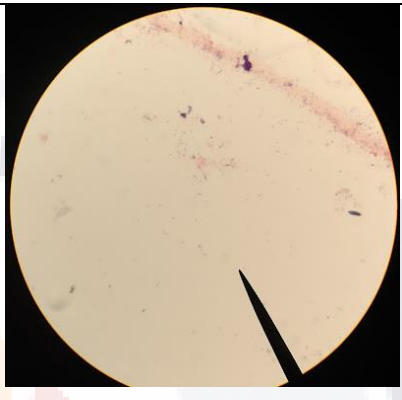
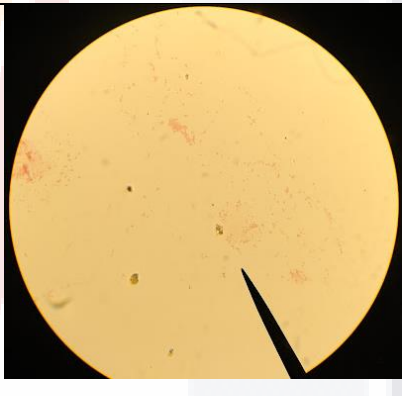
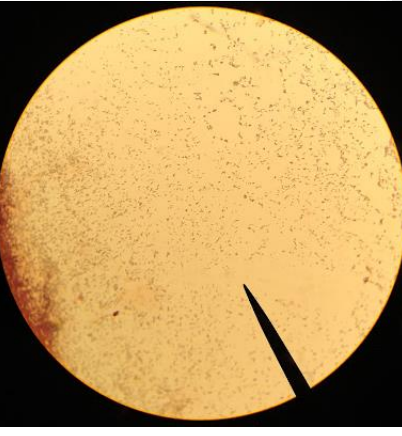
| Colonia/Placa | Tinción Gram | |
|---------------|----------------|--|
| 3 | Bacilos Gram + |  |
| 5 | Bacilos Gram - |  |

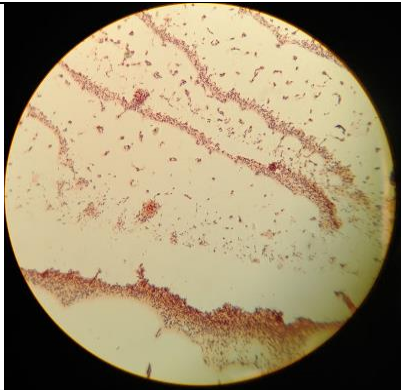

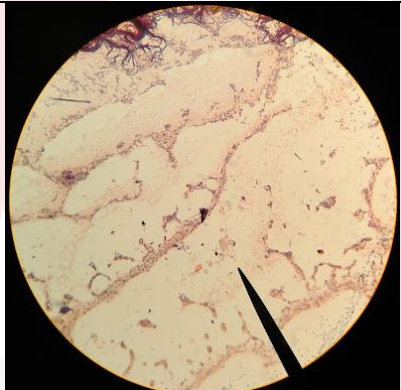
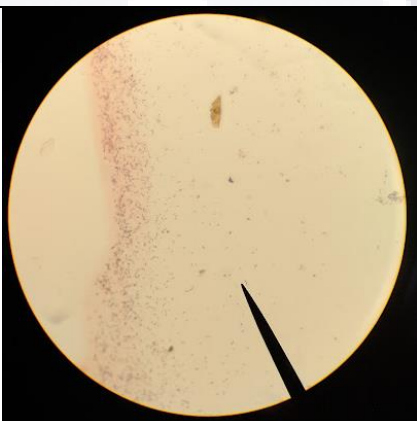
| | | |
|----|----------------|---|
| 7 | Bacilos Gram - |  A circular microscopic field showing Gram-negative bacilli. The bacteria appear pinkish-red against a light background. A black pointer is visible in the lower-left quadrant. |
| 8 | Bacilos Gram + |  A circular microscopic field showing Gram-positive bacilli. The bacteria appear purple against a light background. A black pointer is visible in the lower-left quadrant. |
| 9 | Bacilos Gram - |  A circular microscopic field showing Gram-negative bacilli. The bacteria appear pinkish-red against a light background. A black pointer is visible in the lower-left quadrant. |
| 11 | Bacilos Gram - |  A circular microscopic field showing Gram-negative bacilli. The bacteria appear pinkish-red against a light background. A black pointer is visible in the lower-left quadrant. |

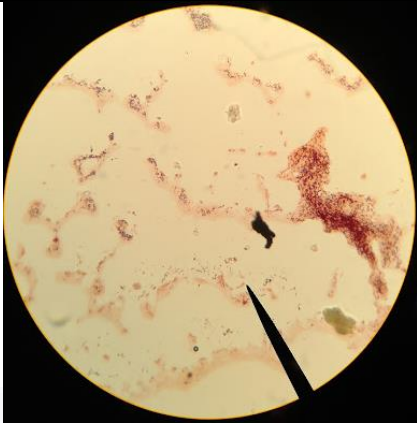
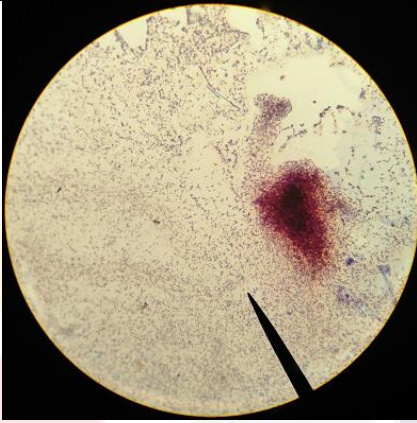
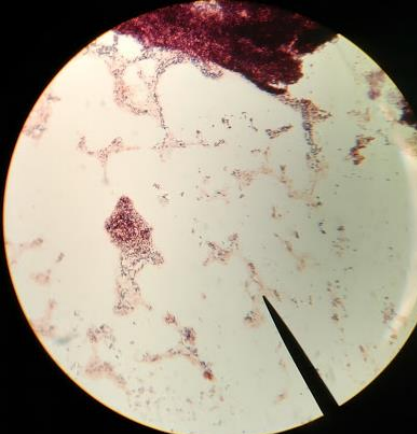
| | | |
|----|----------------|--|
| 12 | Bacilos Gram - |  Microscopic image showing Gram-negative bacilli. The bacteria appear pink (counterstained) against a light background. They are rod-shaped and scattered across the field of view. A black pointer is visible in the lower right quadrant. |
| 20 | Cocos Gram + |  Microscopic image showing Gram-positive cocci. The bacteria appear purple (stained) against a light background. They are small, spherical cells, some appearing in pairs or small clusters. A black pointer is visible in the lower left quadrant. |
| 21 | Bacilos Gram + |  Microscopic image showing Gram-positive bacilli. The bacteria appear purple (stained) against a light background. They are rod-shaped and some are arranged in chains. A black pointer is visible in the lower left quadrant. |
| 23 | Bacilos Gram + |  Microscopic image showing Gram-positive bacilli. The bacteria appear purple (stained) against a light background. They are rod-shaped and some are arranged in chains. A black pointer is visible in the lower left quadrant. |


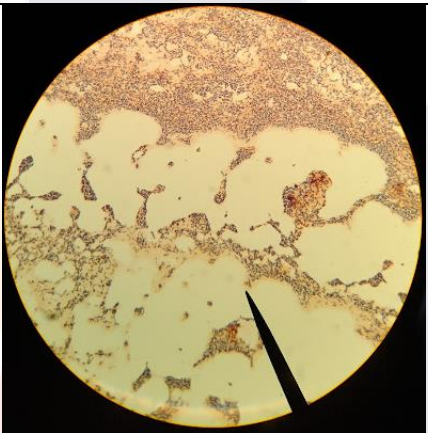

| | | |
|----|----------------|--|
| 26 | Bacilos Gram + |  A circular micrograph showing a dense field of purple-stained, rod-shaped bacteria (bacilli) against a yellowish background. A black arrow points to a specific cluster of these bacilli. |
| 33 | Cocos Gram - |  A circular micrograph showing a field of pink-stained, spherical bacteria (cocci) against a yellowish background. A black arrow points to a small cluster of these cocci. |
| 35 | Cocos Gram + |  A circular micrograph showing a dense field of purple-stained, spherical bacteria (cocci) against a yellowish background. A black arrow points to a small cluster of these cocci. |
| 46 | Bacilos Gram + |  A circular micrograph showing purple-stained, rod-shaped bacteria (bacilli) against a yellowish background. A black arrow points to a cluster of these bacilli. |

| | | |
|-----------|----------------|--|
| 49 | Cocos Gram - |  |
| 52 | Bacilos Gram + |  |
| 54 | Cocos Gram + |  |
| 61 | Bacilos Gram + |  |

| | | | |
|-----------|----------------|--|--|
| 67 | Bacilos Gram + | |  Microscopic image showing Gram-positive bacilli. The field is mostly clear with a few dark, rod-shaped structures. A black arrow points to one of these structures. |
| 68 | Bacilos Gram + | |  Microscopic image showing Gram-positive bacilli. The field is mostly clear with a few dark, rod-shaped structures. A black arrow points to one of these structures. |
| 69 | Bacilos Gram - | |  Microscopic image showing Gram-negative bacilli. The field is mostly clear with a few small, dark, rod-shaped structures. A black arrow points to one of these structures. |
| 71 | Bacilos Gram + | |  Microscopic image showing Gram-positive bacilli. The field is mostly clear with a few dark, rod-shaped structures. A black arrow points to one of these structures. |

| | | |
|----|----------------|--|
| 73 | Bacilos Gram + |  |
| 74 | Bacilos Gram + |  |
| 77 | Bacilos Gram + |  |
| 78 | Bacilos Gram + |  |

| | | |
|-----------|----------------|--|
| 81 | Bacilos Gram + |  |
| 85 | Bacilos Gram + |  |
| 88 | Bacilos Gram + |  |

| | | |
|----|----------------|--|
| 92 | Bacilos Gram + |  |
| 93 | Bacilos Gram + |  |
| 94 | Bacilos Gram + |  |

7.2 PRUEBAS DE TOLERANCIA A METALES Y METALOIDES

Las 32 cepas se sometieron a distintas concentraciones de plomo, cadmio y arsénico para registrar a que concentración de dichos metales se inhibía su crecimiento. Las pruebas en primera instancia fueron realizadas en un medio rico en nutrientes y por triplicado. Los resultados se muestran en las tablas 6,8 y 10.

7.2.1 PRUEBAS DE TOLERANCIA A PLOMO

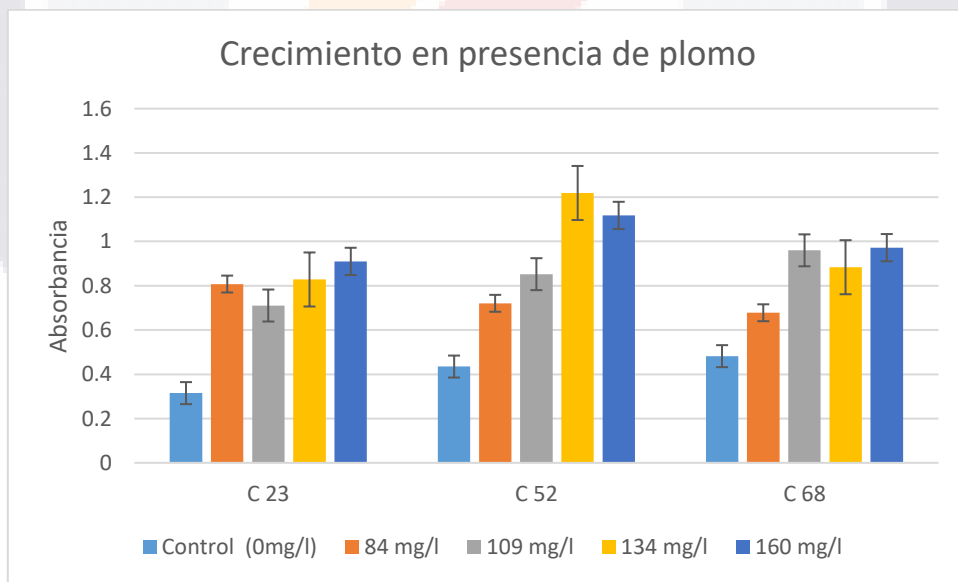
Tabla 6 Pruebas de tolerancia a plomo.

| Colonia/Placa | Pb [16.8 mg/l] | Pb [84mg/l] | Pb [109 mg/l] | Pb [134 mg/l] | Pb [150 mg/l] |
|---------------|----------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| 3 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 5 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 7 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 8 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 9 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 11 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 12 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 20 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 21 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 23 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 26 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 33 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 35 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 46 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 49 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 52 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 54 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 61 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 67 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 68 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 69 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 71 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 73 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 74 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 77 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |

| | | | | | |
|----|----------|----------|----------|----------|---|
| 78 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 81 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 85 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 88 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 92 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 93 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |
| 94 | Positivo | Positivo | Negativo | - | - |

6 cepas crecieron hasta una concentración de 150 mg/l de plomo, de esas solo 3 crecieron a 168 mg/l. La mayor concentración que fue probada fue a 184 mg/l de plomo a la cual ninguna cepa creció. La NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece una concentración máxima de 400 mg/Kg de plomo para suelos de uso agrícola/residencial/comercial por lo que ninguna de las 32 cepas fue capaz de tolerar dicha concentración desarrollándose en un medio nutritivo.

Las cepas 23, 52 y 68 fueron inoculadas posteriormente en caldo nutritivo al que se añadió plomo a concentraciones de 84 mg/l, 109 mg/l, 134 mg/l y 160 mg/l, su crecimiento se determinó por la medida de absorbancia, la cual se muestra en la siguiente gráfica.



Gráfica 1 Registro del crecimiento bacteriano expuesto a Plomo en caldo nutritivo

Análisis de varianza de un factor Cepa 23

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Control | 3 | 0.945 | 0.315 | 0 |
| 84 mg/l | 3 | 2.423 | 0.807666667 | 0.008766 |
| 109 mg/l | 3 | 2.132 | 0.710666667 | 0.023801 |
| 134 mg/l | 3 | 2.485 | 0.828333333 | 0.009306 |
| 160 mg/l | 3 | 2.73 | 0.91 | 0.002275 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 0.658419333 | 4 | 0.164604833 | 18.64197 | 0.000125046 | 3.478049691 |
| Dentro de los grupos | 0.088298 | 10 | 0.0088298 | | | |
| Total | 0.746717333 | 14 | | | | |

Análisis de varianza de un factor Cepa 52

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Control | 3 | 1.305 | 0.435 | 0 |
| 84 mg/l | 3 | 2.162 | 0.720666667 | 0.2237 |
| 109 mg/l | 3 | 2.557 | 0.852333333 | 0.090529 |
| 134 mg/l | 3 | 3.657 | 1.219 | 0.018639 |
| 160 mg/l | 3 | 3.353 | 1.117666667 | 1.73E-05 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 1.184914933 | 4 | 0.296228733 | 4.449402 | 0.025313074 | 3.478049691 |
| Dentro de los grupos | 0.665772 | 10 | 0.0665772 | | | |
| Total | 1.850686933 | 14 | | | | |

Análisis de varianza de un factor Cepa 68

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Control | 3 | 1.446 | 0.482 | 0 |
| 84 mg/l | 3 | 2.034 | 0.678 | 0.031444 |
| 109 mg/l | 3 | 2.879 | 0.959666667 | 0.008772 |
| 134 mg/l | 3 | 2.651 | 0.883666667 | 0.02664 |
| 160 mg/l | 3 | 2.916 | 0.972 | 0.036309 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 0.5338916 | 4 | 0.1334729 | 6.468862 | 0.00775112 | 3.478049691 |
| Dentro de los grupos | 0.206331333 | 10 | 0.020633133 | | | |
| Total | 0.740222933 | 14 | | | | |

La prueba ANOVA realizada a las tres cepas expuestas a plomo demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa en relación a la concentración de plomo y al crecimiento de las bacterias.

7.2.2 PRUEBAS DE TOLERANCIA A CADMIO

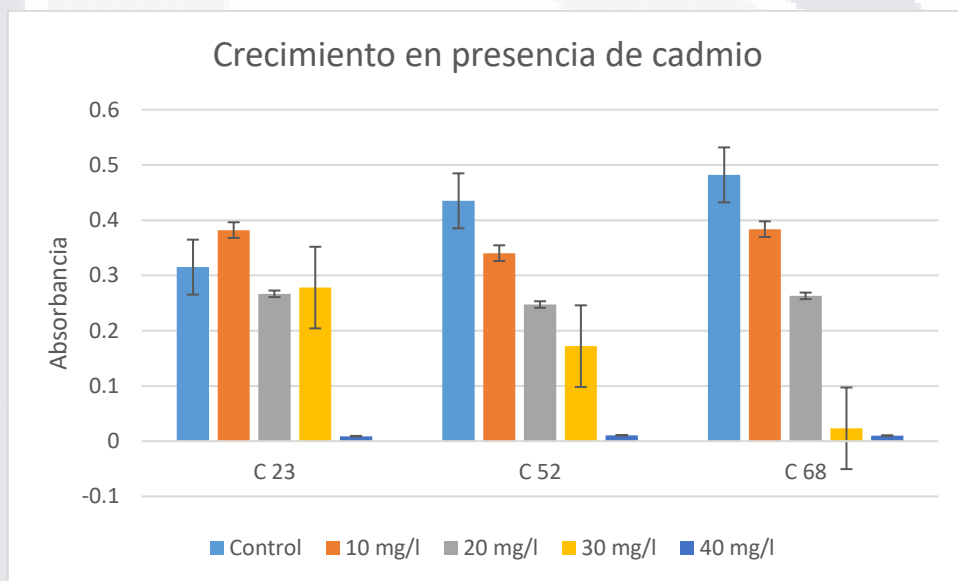
Tabla 7 Pruebas de tolerancia a cadmio

| Colonia/Placa | Cd [7 mg/l] | Cd [15 mg/l] | Cd [40 mg/l] | Cd [50 mg/l] |
|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 3 | Negativo | - | - | - |
| 5 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 7 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 8 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 9 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 11 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 12 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 20 | Negativo | - | Negativo | - |
| 21 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 23 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 26 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 33 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 35 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 46 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 49 | Positivo | Negativo | - | - |
| 52 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 54 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 61 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 67 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 68 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 69 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 71 | Positivo | Negativo | - | - |
| 73 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 74 | Negativo | - | - | - |
| 77 | Positivo | Negativo | - | - |
| 78 | Positivo | Negativo | - | - |
| 81 | Positivo | Negativo | - | - |
| 85 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 88 | Positivo | Negativo | - | - |
| 92 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 93 | Positivo | Negativo | - | - |

| | | | | |
|----|----------|---|---|---|
| 94 | Negativo | - | - | - |
|----|----------|---|---|---|

3 cepas crecieron hasta una concentración de 40mg/l de cadmio, de esas 3 ninguna creció a una concentración de 50mg/l de cadmio. La NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece una concentración máxima de 37 mg/Kg de cadmio para suelos de uso agrícola/residencial/comercial por lo que de las 32 cepas solo 3 son capaces de tolerar dicha concentración en un medio nutritivo.

Las cepas 23, 52 y 68 fueron inoculadas posteriormente en caldo nutritivo al que se añadió cadmio a concentraciones de 10 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l y 40 mg/l, su crecimiento se determinó por la medida de absorbancia, la cual se muestra en la siguiente tabla.



Gráfica 2 Registro del crecimiento bacteriano expuesto a Cadmio en caldo nutritivo.

Análisis de varianza de un factor cepa 23

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Control | 3 | 0.945 | 0.315 | 0 |
| 10 mg/l | 3 | 1.146 | 0.382 | 7.9E-05 |
| 20 mg/l | 3 | 0.8 | 0.266666667 | 0.00049 |
| 30 mg/l | 3 | 0.834 | 0.278 | 0 |
| 40 mg/l | 3 | 0.027 | 0.009 | 0.000001 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 0.2423751 | 4 | 0.060593767 | 531.2136 | 1.34776E-11 | 3.478049691 |
| Dentro de los grupos | 0.0011407 | 10 | 0.000114067 | | | |
| Total | 0.2435157 | 14 | | | | |

Análisis de varianza de un factor cepa 52

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Control | 3 | 1.305 | 0.435 | 0 |
| 10 mg/l | 3 | 1.021 | 0.340333333 | 0.000465 |
| 20 mg/l | 3 | 0.742 | 0.247333333 | 0.000209 |
| 30 mg/l | 3 | 0.516 | 0.172 | 1.16E-33 |
| 40 mg/l | 3 | 0.032 | 0.010666667 | 2.13E-05 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 0.3160729 | 4 | 0.079018233 | 567.6597 | 9.689E-12 | 3.478049691 |
| Dentro de los grupos | 0.001392 | 10 | 0.0001392 | | | |

Total 0.3174649 14

Análisis de varianza de un factor cepa 68

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Control | 3 | 1.446 | 0.482 | 0 |
| 10 mg/l | 3 | 1.151 | 0.383666667 | 0.002234 |
| 20 mg/l | 3 | 0.789 | 0.263 | 0.000247 |
| 30 mg/l | 3 | 0.07 | 0.023333333 | 0.000204 |
| 40 mg/l | 3 | 0.03 | 0.01 | 0.000007 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 0.5378663 | 4 | 0.134466567 | 249.6903 | 5.69648E-10 | 3.478049691 |
| Dentro de los grupos | 0.0053853 | 10 | 0.000538533 | | | |
| Total | 0.5432516 | 14 | | | | |

Las pruebas ANOVA realizadas a las cepas demuestran que hay una diferencia estadísticamente significativa respecto a la concentración de cadmio que fueron expuestas las cepas en relación a su crecimiento.

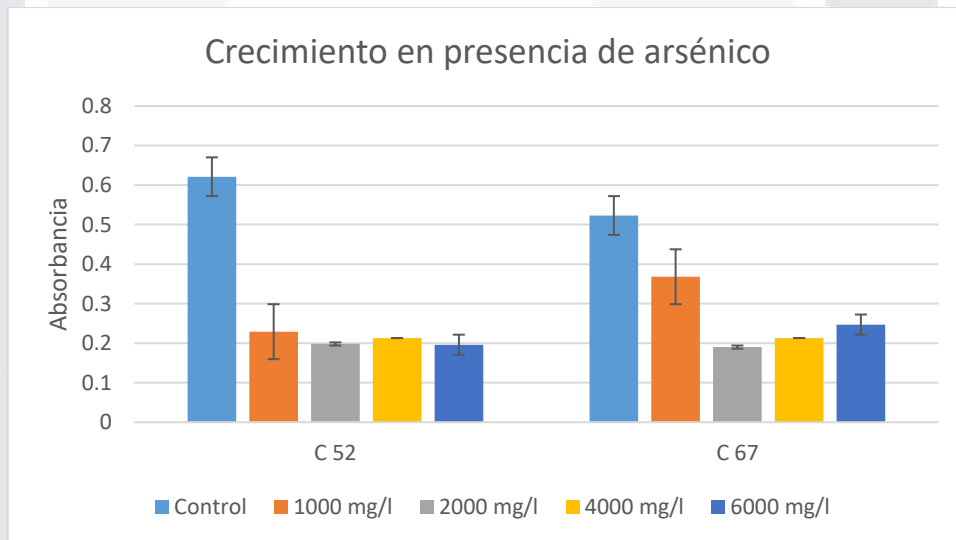
7.2.3 PRUEBAS DE TOLERANCIA A ARSÉNICO

Tabla 8 Prueba de tolerancia a arsénico

| Colonia/Placa | As [1000mg/l] | As [2000mg/l] | As [4000mg/l] | As [6000mg/l] |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 3 | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - |
| 7 | Negativo | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - |
| 11 | Positivo | Negativo | - | - |
| 12 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 20 | Negativo | - | - | - |
| 21 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 23 | Positivo | Negativo | - | - |
| 26 | - | - | - | - |
| 33 | - | - | - | - |
| 35 | - | - | - | - |
| 46 | Negativo | - | - | - |
| 49 | Positivo | Positivo | Negativo | - |
| 52 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| 54 | - | - | - | - |
| 61 | - | - | - | - |
| 67 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| 68 | Positivo | Negativo | - | - |
| 69 | Negativo | - | - | - |
| 71 | - | - | - | - |
| 73 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 74 | - | - | - | - |
| 77 | - | - | - | - |
| 78 | - | - | - | - |
| 81 | - | - | - | - |
| 85 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 88 | Negativo | - | - | - |

| | | | | |
|-----------|----------|----------|----------|----------|
| 92 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 93 | - | - | - | - |
| 94 | Positivo | Positivo | Negativo | - |

Las cepas fueron expuestas a distintas concentraciones de arsénico en medio líquido, al momento de exponerlas a una concentración de 1000 mg/l 17 cepas habían tolerado y crecido en el medio expuestas a arsénico, sin embargo, de las 17 cepas fueron las cepas 52 y 67 las que se pudo observar cierto desarrollo a una concentración de 6000 mg/l de arsénico, una concentración bastante elevada respecto a la concentración máxima permitida en suelos de uso doméstico, comercial y agrícola, aun así, las muestras de suelo donde fueron aisladas presentaron el doble de concentración de arsénico.



Gráfica 3 Registro del crecimiento bacteriano expuesto a Arsénico en caldo nutritivo.

Análisis de varianza de un factor cepa 52

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| control | 3 | 1.863 | 0.621 | 0 |
| 1000 mg/l | 3 | 0.687 | 0.229 | 0.005439 |
| 2000 mg/l | 3 | 0.54 | 0.18 | 0.001093 |
| 4000 mg/l | 2 | 0.426 | 0.213 | 0.0008 |
| 6000 mg/l | 1 | 0.196 | 0.196 | 0 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 0.392354667 | 4 | 0.098088667 | 49.52544 | 3.2172E-05 | 4.120311727 |
| Dentro de los grupos | 0.013864 | 7 | 0.001980571 | | | |
| Total | 0.406218667 | 11 | | | | |

Análisis de varianza de un factor cepa 67

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| control | 3 | 1.569 | 0.523 | 0 |
| 1000 mg/l | 3 | 1.104 | 0.368 | 0.005679 |
| 2000 mg/l | 3 | 0.571 | 0.1903333333 | 4.13E-05 |
| 4000 mg/l | 1 | 0.213 | 0.213 | 0 |
| 6000 mg/l | 1 | 0.247 | 0.247 | 0 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 0.194679515 | 4 | 0.048669879 | 25.52467 | 0.00065552 | 4.53367695 |
| Dentro de los grupos | 0.011440667 | 6 | 0.001906778 | | | |
| Total | 0.206120182 | 10 | | | | |

Los análisis ANOVA indican que hay diferencias significativas respecto al crecimiento de las cepas expuestas a arsénico a distintas concentraciones.

7.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS TOLERANTES.

Las cepas 23, 52, 67 y 68 mostraron la mayor resistencia a plomo, cadmio y arsénico, como parte de su identificación se realizaron tinción Gram dando los siguientes resultados

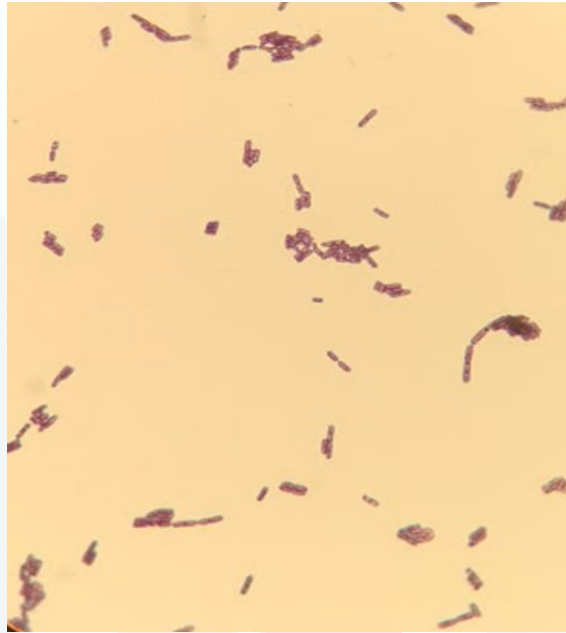


Figura 12 Cepa 23 bacilos Gram positivos. Vistos desde el objetivo 100x

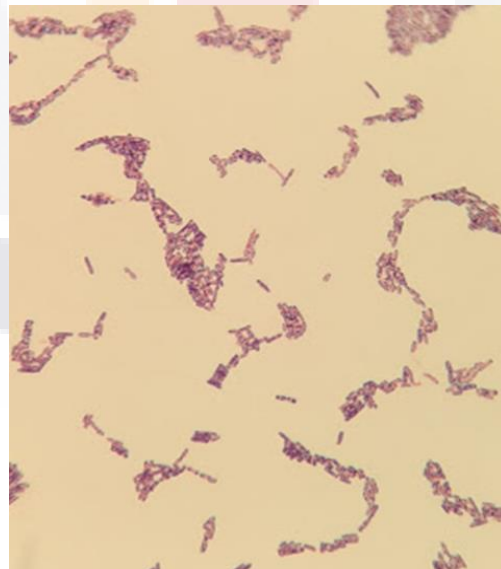


Figura 13 Cepa 52 bacilos Gram positivos. Vistos desde el objetivo 100x



Figura 14 Cepa 67 bacilos Gram positivos. Visto desde el objetivo 100x



Figura 15 Cepa 68 bacilos Gram positivos. Vistos desde el objetivo 100x.

La identificación por espectrometría de masas Maldi-Tof dio los siguientes resultados

Tabla 9 Identificación por Maldi-Tof

| ID | Resultado | 1° Match | Score | 2° Match | Score | Color |
|------|-----------|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|----------------|
| C 23 | (++)A | <i>Bacillus cereus</i> | 2.076 | <i>Bacillus cereus</i> | 1.992 | Verde/Verde |
| C 52 | (+)B | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 1.943 | <i>Bacillus cereus</i> | 1.908 | Verde/Amarillo |
| C 67 | (++)A | <i>Bacillus cereus</i> | 2.101 | <i>Bacillus cereus</i> | 1.959 | Verde/Verde |
| C 68 | (+)B | <i>Bacillus cereus</i> | 1.995 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 1.994 | Verde/Amarillo |

Los resultados se interpretan según los parámetros mostrados en la tabla 13. Significado de los valores obtenidos y la tabla 14. Significado de las categorías de consistencia.

Tabla 10 Significado de los valores obtenidos.

| Rango | Descripción | Símbolo | Color |
|-------------|--|---------|----------|
| 2.300-3.000 | Altamente probable la identificación de especies | (+++) | Verde |
| 2.000-2.299 | Identificación segura del género, probable identificación de especie | (++) | Verde |
| 1.700-1.999 | Probable identificación del género | (+) | Amarillo |
| 0.000-1.699 | Identificación no confiable | (-) | Rojo |

Tabla 11 Significado de las categorías de consistencia.

| Categoría | Descripción |
|-----------|---|
| A | Consistencia de especie: El mejor “match” fue clasificado en verde. El segundo mejor “match” coincide con el primero. Si el segundo match se marca amarillo, al menos es el mismo género que el primero. |
| B | Consistencia de género: El mejor “match” se marca como verde o amarillo. El segundo mejor “match” obtiene verde o amarillo hay coincidencias con el primero, no hay consistencia con la especie. |
| C | No consistencia: No hay consistencia ni en el género ni en la especie. |

Por los resultados obtenidos se puede asegurar que las cepas 23 y 67 son bacterias del género *Bacillus* y probable especie *Bacillus cereus*, mientras que las cepas 52 y 68 son bacterias del género *Bacillus* aunque no hay seguridad en su especie.

La identificación bioquímica realizada en el equipo BD Phoenix™ M50 marco los siguientes resultados mostrados en la tabla 15

Tabla 12 Identificación bioquímica.

| Prueba | Cepa 23 | Cepa 52 | Cepa 67 | Cepa 68 |
|----------------------------|--|--|--|--|
| Identificación | <i>B. cereus</i> variedad <i>thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> variedad <i>thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> variedad <i>thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> variedad <i>thuringiensis</i> |
| Movilidad | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + |
| Voges Proskauer | + | + | + | + |
| Reducción de nitrato | + | + | + | + |
| Hidrólisis de almidón | + | + | + | + |
| Hidrólisis de caseína | + | + | + | + |
| L-leucina | + | + | + | + |
| L-fenilalanina | + | + | + | + |
| Ac. Piroglutámico | Negativo | + | + | + |
| Metionina | + | + | + | + |
| Ac. 3metilglutárico | + | + | + | + |
| Colistina | + | + | + | + |
| D-fructosa | + | + | + | + |
| Ac. D-glucónico | + | + | + | + |
| Manitol | + | + | + | + |
| Ac. Iminodiacético | + | + | + | + |
| Ac. Cetoglutárico | + | + | + | + |
| Ac. 3metiladípico | + | + | + | + |
| Polixin B | + | + | + | + |
| Timidina | + | + | + | + |
| 4-metilumbiferol | + | + | + | + |
| 4-metilumbiferol fosfato | + | + | + | + |
| p-nitrofenil-a-D-glucosido | + | + | + | + |
| Dextrosa | + | + | + | + |
| D-trealosa | + | + | + | + |
| Maltosa | + | + | + | + |
| Maltotriosa | + | + | + | + |
| N-acetil-glucosamina | + | + | + | + |
| L-isoleucina | Negativo | Negativo | + | Negativo |
| L-prolina-p-nitroanilido | Negativo | Negativo | + | Negativo |
| Sucrosa | Negativo | Negativo | + | Negativo |
| p-nitrofenil fosfato | Negativo | Negativo | Negativo | + |

Por las diferencias metabólicas que presentan se puede decir que se tratan de cepas distintas, aunque pertenezcan al mismo género o especie.

La identificación molecular de las bacterias se realizó por medio de la secuenciación *Illumina* del genoma de las bacterias, se realizó un análisis meta genómico y las secuencias obtenidas se compararon por medio de una prueba BLAST en un banco de genes para encontrar las especies con las cuales había un mayor alineamiento.

Cepa 23

```
>c23_contig_1      length      712297      coverage      56.4      normalized_cov      0.99
TGATGCCAATCATGGATAACAATCAAATGCCGAATATGATGCCAATTATGGATAACAATC
AACCACCGAATATGATGCCATATCAAATGCCGTATCAACAGCCTATGATGCCGCCGAATC
CATATTATCAACAACCAAATCCATATCAAATGCCATATCAGCAAGGGGCGCCGTTTGGAC
CGCAATATACGTCTATGCCAAACACGAATATGATGCCAATGGATAATAATATGCCGCCGC
TTGTGCAGGGTGAGGAAGATTGTGGATGCGGAGGAGAAAGTAGACTATATAGTCCACAAC
CAGGCGTCCGCAATATGCGAATCCTTTATATTATCAACCAACTCAATCTGCATATGCAC
CACAGCCAGGAACGATGTATTATCAACCAGATCCACCAAATGTATTTGGAGAGCCCATTT
CAGAAGAAGAGGCCGAAGAAGAAGTTTTAAAAGGCGGGAGTATTTCCGCCTTTTTTGCAT
GCGTGTTAATTAAGGAAATGAAGGTTTTTTATGAAGTGCTAGAAAATTCCCAGTGAAATA
TTAACAGTGTA AAAACCTCTCTGTTACTCATCATAAGAGGGAGCTTTTCAGAAGAGAAG
CTCATTCTAACAGAGGGGGTTTTTGTATTGAATACGAAAGTAAAAGTGATTGCTGCTTCT
TTGTTAGTTACCAGTGCATTAGCTGCATGTGGTACACCAAAGATAACAATGCAATGGAT
GGACGTA ACTACAATTACGAGCGTACATCTTATAATGATACACACCAGTATCGTGATAAT
GTAACGCGTAATGATCGCTATACAGATTATGTAACATATAGAAATGGTCGTAACGATACA
GGATATAACAATTATTACCGAGATGTAAATTACAACGGTCAAATTGCTAATCCACATCCA
ACACGTAATATTACAATGAATAATTCATACATTAACAATGATGGTAAAACAGCAGAAAAA
ATTACAAATCGTGTGAAACGTATGAATAACGTGGACCGTGTGTCTACAGTTGTATATGGA
AACGATGTGGCGATTGCGGTAAAACCGCGTAATACAGTGACAAATGAAACGGCGATGGCG
AACGAAATTCGTCAAGCTGTTGTAATGAAGTTGGAAACAGAAATGTCTATGTTTCTGTA
AGAAATGATATGTTTACTCGTGTGATGCAATGAGCACACGCCTACGTAACGGTACAGTT
```

Resultado del BLAST.

| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|-------------------------------------|--|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis HD-771, complete genome | Bacillus thuringiensis... | 1849 | 1849 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5886036 | CP003752.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis strain L-7601 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis | 1844 | 1844 | 100% | 0.0 | 99.90% | 5790408 | CP020002.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus cereus G9842, complete genome | Bacillus cereus G9842 | 1844 | 1844 | 100% | 0.0 | 99.90% | 5387334 | CP001186.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis strain FDAARGOS_796 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis | 1838 | 1838 | 100% | 0.0 | 99.80% | 5415637 | CP053972.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain BGSC 4Q7rifR chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis... | 1838 | 1838 | 100% | 0.0 | 99.80% | 4865236 | CP051858.1 |

Figura 16 Especies con mayor coincidencia de la cepa 23.

Bacillus thuringiensis HU-7/1, complete genome

Sequence ID: [CP003752.1](#) Length: 5886036 Number of Matches: 1

Range 1: 5259517 to 5260517 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|-----------------|--|-----------------|------------|-----------|
| 1849 bits(1001) | 0.0 | 1001/1001(100%) | 0/1001(0%) | Plus/Plus |
| Query 100 | AGCCTATGATGCGCGCCGAATCCATATTTATCAACAACCAAAATCCATATCAAAATGCCATATC | | | 159 |
| Sbjct 5259517 | AGCCTATGATGCGCGCCGAATCCATATTTATCAACAACCAAAATCCATATCAAAATGCCATATC | | | 5259576 |
| Query 160 | AGCAAGGGGCGCGTTTGGACCCGCAATACGCTCTATGCCAAACACGAAATATGATGCCAA | | | 219 |
| Sbjct 5259577 | AGCAAGGGGCGCGTTTGGACCCGCAATACGCTCTATGCCAAACACGAAATATGATGCCAA | | | 5259636 |
| Query 220 | TGGATAATAATATGCCGCCGCTTGTGCAGGGTGAGGAAGATTGTGGATGCGGAGGAGAAA | | | 279 |
| Sbjct 5259637 | TGGATAATAATATGCCGCCGCTTGTGCAGGGTGAGGAAGATTGTGGATGCGGAGGAGAAA | | | 5259696 |
| Query 280 | GTAGACTATATAGTCCACAACCCAGGGGTCGCAATATGCGAATCCCTTTATATTATCAAC | | | 339 |
| Sbjct 5259697 | GTAGACTATATAGTCCACAACCCAGGGGTCGCAATATGCGAATCCCTTTATATTATCAAC | | | 5259756 |
| Query 340 | CAACTCAATCTGCATATGCACCCACAGCCAGGAACGATGTAATTATCAACCAGATCCACCAA | | | 399 |
| Sbjct 5259757 | CAACTCAATCTGCATATGCACCCACAGCCAGGAACGATGTAATTATCAACCAGATCCACCAA | | | 5259816 |
| Query 400 | ATGTATTTGGAGAGCCCAATTTAGAAAGAGAGGCCGGAAGAAGATTAAAAAGGCGGGA | | | 459 |
| Sbjct 5259817 | ATGTATTTGGAGAGCCCAATTTAGAAAGAGAGGCCGGAAGAAGATTAAAAAGGCGGGA | | | 5259876 |
| Query 460 | GTATTTCCGCCCTTTTTGTCATGCGTGTAAATTAAGGAAATGAAGGTTTTTATGAAATGTC | | | 519 |
| Sbjct 5259877 | GTATTTCCGCCCTTTTTGTCATGCGTGTAAATTAAGGAAATGAAGGTTTTTATGAAATGTC | | | 5259936 |
| Query 520 | TAGAAAATCCCAGTGAAATATTAACAGTGTAAAAACCCCTCTCTGTACTCATCATAGA | | | 579 |
| Sbjct 5259937 | TAGAAAATCCCAGTGAAATATTAACAGTGTAAAAACCCCTCTCTGTACTCATCATAGA | | | 5259996 |
| Query 580 | GGGAGCTTTTCAGAAGAGAAAGCTCATTTAACAAGAGGGGGTTTTTGTATGAATACGAAA | | | 639 |
| Sbjct 5259997 | GGGAGCTTTTCAGAAGAGAAAGCTCATTTAACAAGAGGGGGTTTTTGTATGAATACGAAA | | | 5260056 |
| Query 640 | GTAAGTGTATGCTGCTTCTTTGTAGTTACCAAGTGCATTAGCTGCATGTGATACACCA | | | 699 |
| Sbjct 5260057 | GTAAGTGTATGCTGCTTCTTTGTAGTTACCAAGTGCATTAGCTGCATGTGATACACCA | | | 5260116 |
| Query 700 | AAAGATAACAATGCAATGGATGGACGTAAC TACAATACGAGCGTACATCTTATAATGAT | | | 759 |
| Sbjct 5260117 | AAAGATAACAATGCAATGGATGGACGTAAC TACAATACGAGCGTACATCTTATAATGAT | | | 5260176 |
| Query 760 | ACACACCAAGTATCGTGATAATGTAACGCGTAATGATCGCTATACAGATTATGTAACATAT | | | 819 |
| Sbjct 5260177 | ACACACCAAGTATCGTGATAATGTAACGCGTAATGATCGCTATACAGATTATGTAACATAT | | | 5260236 |
| Query 820 | AGAAATGGTCGTAACGATACAGGATATAACAATTTATACCAGATGTAAATACAACGGT | | | 879 |
| Sbjct 5260237 | AGAAATGGTCGTAACGATACAGGATATAACAATTTATACCAGATGTAAATACAACGGT | | | 5260296 |
| Query 880 | CAAAATGCTAATCCACATCCAACAGCTAATATTACAATGAATAATTATACATTAACAAT | | | 939 |
| Sbjct 5260297 | CAAAATGCTAATCCACATCCAACAGCTAATATTACAATGAATAATTATACATTAACAAT | | | 5260356 |
| Query 940 | GATGGTAAAACAGCAGAAAAAATACAAATCGTGTGAACGATGAATAACGTTGGACCGT | | | 999 |
| Sbjct 5260357 | GATGGTAAAACAGCAGAAAAAATACAAATCGTGTGAACGATGAATAACGTTGGACCGT | | | 5260416 |
| Query 1000 | GTGTCTACAGTGTATATGGAAACGATGTGGCGATTGCGGTAAAACCGCGTAATACAGTG | | | 1059 |
| Sbjct 5260417 | GTGTCTACAGTGTATATGGAAACGATGTGGCGATTGCGGTAAAACCGCGTAATACAGTG | | | 5260476 |
| Query 1060 | ACAAATGAAACGGCGATGGCGAACGAAATTCGTCAAGCTGT 1100 | | | |
| Sbjct 5260477 | ACAAATGAAACGGCGATGGCGAACGAAATTCGTCAAGCTGT 5260517 | | | |

Figura 17 Alineamiento de la secuencia de la cepa 23.

Una vez revisados los datos obtenidos respecto a la identificación de la cepa 23 se observa que hay coincidencia del análisis microscópico el cual indica que se trata de un bacilo Gram positivo, el resultado de la microscopia de masas MALDI-TOF donde aseguraba consistencia en el género de la bacteria como *Bacillus* probable especie *B. cereus*, las pruebas bioquímicas y la prueba BLAST, se puede determinar que la cepa 23 se trata de una cepa de *Bacillus thuringiensis*.

Cepa 52

```
>c52_contig_1      length      651381      coverage    49.7      normalized_cov    0.98
GCAATATAAAATGCACACTGGAAGTGAATCAATAAAACAAAGGACACTATTGAAATTC
TAGTGAAGGTTTCGACGGTTAGAGCTACCGTCTCTTCTGAAGTCTTACAAGATATAAATAT
TGGAGATACCATTACTATTTATGGGGCATCCTTTATGAGTAATATGGCAAGCGGTGATTT
ATCTGCTAAAGCTCCAATCATCGAAAAGTTGGCAAGTAAGACAGTGACTGCTAATACAAG
TGTAGATAAATCGAGGTCTGCATCAGAAGTCGATAAAAAAGAACAACATGTTCTAGATCA
ACACCAAAAACGTTTCAGGTAAAGTAACTGAAAAAACAGAAGACGGATTGGTGGTTTCTGG
TGAAAAGTCAAGTGATAACGCTATCGTTTCTTCCCCTGAGGTACTAAAAAATATTCAAAT
TGGGGATACCGTTACCGTTTATGCTCCTGTTTTTATAGGCTCAATACCAGGTGATCCAGC
TACAGCTAAATATGTAATTGTTCAAAAAGAAAATGAAGAAAACGTTCTAGAAAAACAATA
TAAAATGCACACTGGAAGTGAATCAATAAAACAAAGGAAACAATCCAAATTTCTAGTGA
GGGCTGTCTGTTACTGCTGTTGTTTCTTCTAAAGTACTTGAGGATATTCAAGTTGGGGA
TACCGTTACTATTTATGGTGCGGATTTTATGAGTAATATGGCAAGTGGTGATTTATCTGC
TAAAGCTCCAATCATTGAAAAGCTGGCAAGATAAGCAAAAGGAATCCAATGGGAAAATCC
CAATACTACTAAGTAGATAGATGCTATTGCTCTAACATCTATAATTGTGTTAATTATTTA
AAACTGATATAAATTTGCTTTGTCTAAAGTTAAAAACAAGAAGCTCCTTAATTATAAGAA
GTTTCTTGTTTTTTGTATAAGTGAATGTGATATATAATTATTAATAAGAAATATGTTATT
TCTCATGAATCTATTAATTAAGAATAATTTGATGGATATTTTATTCTAAACTAAATTTTT
GCAGATTTATAGTACTAAATACATGTAATCTTGCGTGAACGTATAGGTTTAAATACTACG
TTACCCCTCCCTTCAAAAATATTATGTATGAAATAAGAGAATCTTTCCCGATTTTTGCTG
TTCGAAAGATGTCGGGTGCTTTTTATTAAAACCAATAAATGATAAAAATATAAAGGATAA
```

| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|-------------------------------------|---|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis strain HD12 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis | 1849 | 3454 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5776895 | CP014847.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis serovar tenebrionis strain NB125 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis serovar ten... | 1849 | 3564 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5605440 | CP114392.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis serovar tenebrionis strain NB176-1 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis serovar ten... | 1849 | 3564 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5606443 | CP114399.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis serovar tenebrionis strain NB-176 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis serovar ten... | 1849 | 3564 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5428075 | CP114406.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis serovar morrisoni strain BGSC 4AA1, complete genome | Bacillus thuringiensis serovar mor... | 1849 | 3454 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5652292 | CP010577.1 |

Figura 18 Especies con mayor coincidencia de la cepa 52.

Bacillus thuringiensis strain HD12 chromosome, complete genome

Sequence ID: [CP014847.1](#) Length: 5776895 Number of Matches: 4

Range 1: 3978169 to 3979169 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|-----------------|--------|---|------------|-----------|
| 1849 bits(1001) | 0.0 | 1001/1001(100%) | 0/1001(0%) | Plus/Plus |
| Query 188 | | AGTC TTACAAGATAAAAATATTTGGAGATACCAT TACTATTTATGGGGCATCCCTTTATGAG | | 159 |
| Sbjct 3978169 | | AGTC TTACAAGATAAAAATATTTGGAGATACCAT TACTATTTATGGGGCATCCCTTTATGAG | | 3978228 |
| Query 168 | | TAATATGGCAAGCGGTGATTTATCTGCTAAAGCTCCAATCATCGAAAAGTTGGCAAGTAA | | 219 |
| Sbjct 3978229 | | TAATATGGCAAGCGGTGATTTATCTGCTAAAGCTCCAATCATCGAAAAGTTGGCAAGTAA | | 3978288 |
| Query 228 | | GACAGTGACTGCTAATACAAGTGTAGATAAATCGAGGCTGCATCAGAACTCGATAAAAA | | 279 |
| Sbjct 3978289 | | GACAGTGACTGCTAATACAAGTGTAGATAAATCGAGGCTGCATCAGAACTCGATAAAAA | | 3978348 |
| Query 288 | | AGAACAAACATGTTCTAGATCAACACCAAAAAACGTT CAGGTAAGTAAC TGA AAAAACAGAG | | 339 |
| Sbjct 3978349 | | AGAACAAACATGTTCTAGATCAACACCAAAAAACGTT CAGGTAAGTAAC TGA AAAAACAGAG | | 3978408 |
| Query 348 | | AGACGGATTGGTGGTTCTGGTGAAAAGTCAAGTGTATACGCTATCGTTCTTCCCTCGA | | 399 |
| Sbjct 3978489 | | AGACGGATTGGTGGTTCTGGTGAAAAGTCAAGTGTATACGCTATCGTTCTTCCCTCGA | | 3978468 |
| Query 488 | | GGTACTAAAAAATAATCAAATGGGGATACCGTTACCGTTTATGCTCCTGTTTTATAGG | | 459 |
| Sbjct 3978469 | | GGTACTAAAAAATAATCAAATGGGGATACCGTTACCGTTTATGCTCCTGTTTTATAGG | | 3978528 |
| Query 468 | | CTCAATACCAGGTGATCCAGCTACAGCTAAAATATGTAATTGTT Caaaaagaaaatgaaga | | 519 |
| Sbjct 3978529 | | CTCAATACCAGGTGATCCAGCTACAGCTAAAATATGTAATTGTT CAAAAAGAAAA TGAAGA | | 3978588 |
| Query 528 | | aaacgttcttagaaaaacaatataaaaaTGACACACTGGAAGTGTAAATCAATAAAAACAAGGA | | 579 |
| Sbjct 3978589 | | AAACGTTCTAGAAAAACAATATAAAATGACACACTGGAAGTGTAAATCAATAAAAACAAGGA | | 3978648 |
| Query 588 | | AACAATCCAAATTTCTAGTGAGGGCCTGCTGT TACTGCTGTTGTTCTTCTAAAGTACT | | 639 |
| Sbjct 3978649 | | AACAATCCAAATTTCTAGTGAGGGCCTGCTGT TACTGCTGTTGTTCTTCTAAAGTACT | | 3978708 |
| Query 648 | | TGAGGATATTC AAGTTGGGGATACCGTTACTATTTATGGTGCGGATTTTATGAGTAAAT | | 699 |
| Sbjct 3978789 | | TGAGGATATTC AAGTTGGGGATACCGTTACTATTTATGGTGCGGATTTTATGAGTAAAT | | 3978768 |
| Query 788 | | GGCAAGTGGTGATTTATCTGCTAAAGCTCCAATCATGAAAAGCTGGCAAGATAAGCAAA | | 759 |
| Sbjct 3978769 | | GGCAAGTGGTGATTTATCTGCTAAAGCTCCAATCATGAAAAGCTGGCAAGATAAGCAAA | | 3978828 |
| Query 768 | | AGGAATCCAATGGGAAAAATCCCAATACTACTAAGTAGATAGATGCTATTGCTCTAACATC | | 819 |
| Sbjct 3978829 | | AGGAATCCAATGGGAAAAATCCCAATACTACTAAGTAGATAGATGCTATTGCTCTAACATC | | 3978888 |
| Query 828 | | TATAATTTGTTAAATTTAAAAC TGATAAAAAT TGCTTTGCTAAAGTTAAAAACAA | | 879 |
| Sbjct 3978889 | | TATAATTTGTTAAATTTAAAAC TGATAAAAAT TGCTTTGCTAAAGTTAAAAACAA | | 3978948 |
| Query 888 | | GAAGCTCCTAATTATAAGAAGTTCTTGT TTTTGTATAAAGTGAATGTGATATATAATT | | 939 |
| Sbjct 3978949 | | GAAGCTCCTAATTATAAGAAGTTCTTGT TTTTGTATAAAGTGAATGTGATATATAATT | | 3979008 |
| Query 948 | | ATTAATAATAGAATATGTTATTTCTCATGAATCTATTAATTAAGAATAATTTGATGGAT | | 999 |
| Sbjct 3979089 | | ATTAATAATAGAATATGTTATTTCTCATGAATCTATTAATTAAGAATAATTTGATGGAT | | 3979068 |
| Query 1008 | | TTTATTTCTAAACTAAATTTTGCAGATTTATAGTACTAAAACATGTAATCTTGCGTGAA | | 1059 |
| Sbjct 3979069 | | TTTATTTCTAAACTAAATTTTGCAGATTTATAGTACTAAAACATGTAATCTTGCGTGAA | | 3979128 |
| Query 1068 | | CGTATAGGTTTAAATACTACGTTACCCCTCCCTTCAAAAAAT 1108 | | |
| Sbjct 3979129 | | CGTATAGGTTTAAATACTACGTTACCCCTCCCTTCAAAAAAT 3979169 | | |

Figura 19 Alineamiento de la secuencia de la cepa 52.

Una vez revisados los datos obtenidos respecto a la identificación de la cepa 52 se observa que hay coincidencia del análisis microscópico el cual indica que se trata de un bacilo Gram positivo, el resultado de la microscopia de masas MALDI-TOF donde aseguraba consistencia en el género de la bacteria como *Bacillus* probable especie *B. cereus*, las pruebas bioquímicas y la prueba BLAST, se puede determinar que la cepa 52 se trata de una cepa de *Bacillus thuringiensis*.

Cepa 67

```
>c67_contig_1      length      686978      coverage      65.2      normalized_cov      0.98
AACTCGCTCTTTTTTGTATGTACAATAATTCATTACTATTCTAATTCAATTGAAACAT
TTTTTTGTGGTACAAATGTAGAAATGCATGTTTATAAATAAGCTGTTGCTTACCTTCTG
TTTCCAGTAGGACTGTAAAATTATCAAATCCTTTAATTAGTCCACGAAGCTGGAAACCAT
TTAATAAGTACAGCGTAACAAACGTATTTTCTTTACGGAGTTGATTTAAAAACTGATCTT
GAATATTGATTGATTGCTTCATGTCGAATCCTCCTCTTTTTCTCTACTTACTATTATTCG
ACTTTACTTGTAACTTTCCTTCTATGTATCGTAAAATTTCTGACGTTTTTTTACCCTGCTG
TAACATCAAACCACGTGACATCCATTTTATTACGGAACCACGTTAATTGACGCTTTGTCAT
AACGACGCGAATTCGTCTTTAATTGTGATACCGCATCTTCTAAAGAGGCTCGATTCTCAA
ATAATCATAGATTTCTTTATATCCAATCGTTGAATAGATTGACAATCTCGTATCCCTC
TATTATACAGCCCTTCTACTTCCCTAATAGGCCTTGTTCCATCATCAAATCCACTCGTA
AGTTAATGCGATCGTATAGCATTTCTCGATCCATTGTCAAGCCAATTAATGAAACATCAT
AGAGTAACTCTTTTTCTTGTCTCAATTTGGTCACTCATTTTTTCCACCCGTCGTGTGGA
AAATTTCTAACGCCGAATGACACGTCGTACATTATTTGCATGAATACGCTCTGCACTTT
CTGGATCTACTTCTTGCAATTTTTTATGTACATATCCACACCGCGTTCTAAAGCTAACT
TTTCCATTTGCTCTCGGTATATCACATCACCAGCATCATCTGTAAACTGATAATCAAATA
AAACAGATTGTATATAAAGACCGGTTCCACCAACTATAATTGGTAAGTTACCACGTTCTG
TAATTTCTTGAATATGCTTGCGAACACGTTCTTGAAATTCGCGACAGAAAATGAATCTT
CCGGATTTTTTATATCGACCATATAATGTGGAATCCCGTCCATCTCTGCTTTTGTACCT
TTGCAGTTCCAATATCCATCGTTTCGATAGATCTGCATGGAATCACCCTAATAATTTTAC
CGTTCAACGCTTTGGCAAGATCGATACTTAACTTCGTCTTTCCAACAGCAGTTGGTCCAA
```

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Bacillus cereus strain ZB201708 chromosome, complete genome | Bacillus cereus | 1849 | 1849 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5466652 | CP030982.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain HD12 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis | 1849 | 1849 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5776895 | CP014847.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar tenebrionis strain NB125 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis ... | 1849 | 1849 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5605440 | CP114392.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar tenebrionis strain NB176-1 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis ... | 1849 | 1849 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5606443 | CP114399.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar tenebrionis strain NB-176 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis ... | 1849 | 1849 | 100% | 0.0 | 100.00% | 5428075 | CP114406.1 |

Figura 20 Especies con mayor coincidencia de la cepa 67.

Bacillus cereus strain ZB201708 chromosome, complete genome

Sequence ID: [CP030982.1](#) Length: 5466652 Number of Matches: 1

Range 1: 3577337 to 3578337 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|-----------------|--------|---|------------|-----------|
| 1849 bits(1001) | O.0 | 1001/1001(100%) | 0/1001(0%) | Plus/Plus |
| Query 108 | | T AAGCTGTTGCTTACCTTCTGTTCCAGTAGGACTGTAAAATTATCAAATCCTTTAAATTA | | 159 |
| Sbjct 3577337 | | T AAGCTGTTGCTTACCTTCTGTTCCAGTAGGACTGTAAAATTATCAAATCCTTTAAATTA | | 3577396 |
| Query 168 | | G TCCACGAAGCTGGAAAACCATTTAATAAGTACAGCGTAACAAACGTATTTCTTTACGGA | | 219 |
| Sbjct 3577397 | | G TCCACGAAGCTGGAAAACCATTTAATAAGTACAGCGTAACAAACGTATTTCTTTACGGA | | 3577456 |
| Query 228 | | G TTGATTTAAAAACTGATCTTGAATATTGATTGATTGCTTCATGTCGAATCCCTCTTT | | 279 |
| Sbjct 3577457 | | G TTGATTTAAAAACTGATCTTGAATATTGATTGATTGCTTCATGTCGAATCCCTCTTT | | 3577516 |
| Query 288 | | T TCTCTACTTACTATTATTTCGACTTTACTTGTAACCTTTCCTTCTATGATCGTAAAAATTT | | 339 |
| Sbjct 3577517 | | T TCTCTACTTACTATTATTTCGACTTTACTTGTAACCTTTCCTTCTATGATCGTAAAAATTT | | 3577576 |
| Query 348 | | C T GACGTTTTTTCACCGTCTGTAAACATCAAACCACGTGACATCCATTTTATTACGGAACC | | 399 |
| Sbjct 3577577 | | C T GACGTTTTTTCACCGTCTGTAAACATCAAACCACGTGACATCCATTTTATTACGGAACC | | 3577636 |
| Query 408 | | A CGTTAATTGACGCTTTGCATAACGACGCGAATTCGTCCTTAAATGATACCGCATCTT | | 459 |
| Sbjct 3577637 | | A CGTTAATTGACGCTTTGCATAACGACGCGAATTCGTCCTTAAATGATACCGCATCTT | | 3577696 |
| Query 468 | | C TAAAGAGGCTCGATTCTCAAAATAATCATAGATTTCTTTATATCCAATCGCTTGAATAG | | 519 |
| Sbjct 3577697 | | C TAAAGAGGCTCGATTCTCAAAATAATCATAGATTTCTTTATATCCAATCGCTTGAATAG | | 3577756 |
| Query 528 | | A TTGACAACTCTCGTATCCCTCTATATACAGCCCTTCTACTTCCTCTAATAGGCCCTTGT | | 579 |
| Sbjct 3577757 | | A TTGACAACTCTCGTATCCCTCTATATACAGCCCTTCTACTTCCTCTAATAGGCCCTTGT | | 3577816 |
| Query 588 | | C CATCATCAAATCCACTCGTAAAGTAAATGCGATCGTATAGCATTTCTCGATCCATTGTCA | | 639 |
| Sbjct 3577817 | | C CATCATCAAATCCACTCGTAAAGTAAATGCGATCGTATAGCATTTCTCGATCCATTGTCA | | 3577876 |
| Query 648 | | A GCCAATTAAATGAAACATCATAGAGTAACTCTTTTCTTGTTCCTCAATTTGGTCACTCA | | 699 |
| Sbjct 3577877 | | A GCCAATTAAATGAAACATCATAGAGTAACTCTTTTCTTGTTCCTCAATTTGGTCACTCA | | 3577936 |
| Query 708 | | T TTTTTCACCCGTCGTGTGGAAAAATTTCTAACGCCCGAATGACACGTCGTACATTATTTG | | 759 |
| Sbjct 3577937 | | T TTTTTCACCCGTCGTGTGGAAAAATTTCTAACGCCCGAATGACACGTCGTACATTATTTG | | 3577996 |
| Query 768 | | C ATGAATACGCTCTGCACTTTCTGGATCTACTTCTTGCAATTTTTATGTACATATCCA | | 819 |
| Sbjct 3577997 | | C ATGAATACGCTCTGCACTTTCTGGATCTACTTCTTGCAATTTTTATGTACATATCCA | | 3578056 |
| Query 828 | | C ACCCGGTTCTAAAGCTAACTTTTCCATTTGCTCTCGGTATATCACATCACCAGCATCAT | | 879 |
| Sbjct 3578057 | | C ACCCGGTTCTAAAGCTAACTTTTCCATTTGCTCTCGGTATATCACATCACCAGCATCAT | | 3578116 |
| Query 888 | | C TGTAAACTGATAAATCAAATAAAACAGATTGTATATAAGACCGGTTCCACCAACTATAA | | 939 |
| Sbjct 3578117 | | C TGTAAACTGATAAATCAAATAAAACAGATTGTATATAAGACCGGTTCCACCAACTATAA | | 3578176 |
| Query 948 | | T TGGTAAGTTACCACGTTCTGTAATTTCTTGAATATGCTTGCGAACACGTTCTTGAAAT | | 999 |
| Sbjct 3578177 | | T TGGTAAGTTACCACGTTCTGTAATTTCTTGAATATGCTTGCGAACACGTTCTTGAAAT | | 3578236 |
| Query 1008 | | C CGCGACAGAAAATGAATCTTCCGGATTTTATATCGACCATATAATGTGGAAATTCGGT | | 1059 |
| Sbjct 3578237 | | C CGCGACAGAAAATGAATCTTCCGGATTTTATATCGACCATATAATGTGGAAATTCGGT | | 3578296 |
| Query 1068 | | C CATCTCTGCTTTTGTACCTTTGCAGTTCCAAATATCCATC 1108 | | |
| Sbjct 3578297 | | C CATCTCTGCTTTTGTACCTTTGCAGTTCCAAATATCCATC 3578337 | | |

Figura 21 Alineamiento de la secuencia de la cepa 52.

Una vez revisados los datos obtenidos respecto a la identificación de la cepa 67 se observa que hay coincidencia del análisis microscópico el cual indica que se trata de un bacilo Gram positivo, el resultado de la microscopia de masas MALDI-TOF donde aseguraba consistencia en el género de la bacteria como *Bacillus* probable especie *B. cereus*, las pruebas bioquímicas y la prueba BLAST, se puede determinar que la cepa 67 se trata de una cepa de *Bacillus cereus*.

Cepa 68

```
>c68_contig_1      length      970560      coverage    38.7      normalized_cov    0.72
CAATTACTCTTTTTATATGTACGTCTTAATATTTTAGTCTCGTTCAAGTAAGGAAAGAAA
CGACTGTAATACCGGGGAAATCCATCTGGATTTATGATAGATTACATGACTTTGAATAAT
GGTTGGAGTTTCGATAGGCTGAAAACATAGTTGTTCTTTTTGGCAACTTTCTTGTACAAC
GATATAAGGAAGAATTGAAATGCCTAATTCACACATAACGGATTGTTAATGACTTCAAC
ATTGGAAGTTTCAAATGTTTTAGCTGGAATATTTCCACTTTGACGTAAAAAACGATCTAC
CATTGGCCTATAGCCGCAGCTTTGTTCTGTAAAAATGAACTGGGTGTCCTGTAATAACTG
GAATGGATTTGCGTGTGCAGCGGAATAAGCTGGTAAAATCCATCCAAATGTTTCATTACT
AAAAGTACGCGTAATAAAATCATTATGTTCTATACTTTCTCCAATTATGAAGACAACGTC
TGTTTCACCTTCACGTAATTTTTGTAATGCTTGTTCAATTTGTGTTTGTTCAGTACGAT
ATTTACTTTTCGGATTTTTCTGTTTGTAAAGTACGTAATAATTGTGGTAATCGGTATACCGC
TAATGATTCATTAGATGTAATACTTAATGTACCTTCTAAATAATCTGTATTTTGGGGGAT
TTCTTGCGCTTTTTTCATATATTGCAAGTAATTCATAATGCATAAGGATGAAATTGATGACC
TGCTTTTGTAAAGTAGCACTTTTTTCCCTAACCGATCGAAAAGAGGAATATGTAAATCGTT
CTCTAAAGCTTTCATATGTGCTGTAACAGTAGATTGCGCATAACCTAGCGCATGAGCAGC
TTTAGAAAAATTACCATACTTCACAATGGCGCAAATGTTTTAACATGTCTCATTCCAT
AAGCGATCCCTCTTTTATTATCATGATTTGTGAATGATTATATCATGTATTTAATTTTC
CAAATGATTAATTCGATATAAAATAAAATTGTGGAAATATTCATTCAAGTGATATTGGA
GGAGAAAAGATGATCAAAAAGGGCTATCATGTAGCTGTTGTTGGGGCTACAGGTGCGGTA
GGGCAAAAATATTGAACTGTTAGAGAATGAAATGAAGTTTAATATAGTTGAAGTTACA
TTGCTTTCATCAAAACGATCCGCCGGTAAGAAAGTAAGATTCAAAGGACGAGAGATAATT
```

| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|-------------------------------------|--|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus cereus strain JHU chromosome, complete genome | Bacillus cereus | 1844 | 1844 | 100% | 0.0 | 99.90% | 5323903 | CP046511.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus sp. CR71 chromosome | Bacillus sp. CR71 | 1844 | 1844 | 100% | 0.0 | 99.90% | 5914775 | CP031748.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus sp. E25 chromosome | Bacillus sp. E25 | 1844 | 1844 | 100% | 0.0 | 99.90% | 5915788 | CP031749.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus cereus strain ZB201708 chromosome, complete genome | Bacillus cereus | 1844 | 1844 | 100% | 0.0 | 99.90% | 5466652 | CP030982.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis serovar alesti strain BGSC 4C1, complete genome | Bacillus thuringiensis s... | 1844 | 1844 | 100% | 0.0 | 99.90% | 5400819 | CP015176.1 |

Figura 22 Especies con mayor coincidencia de la cepa 68.

Bacillus cereus strain JHU chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP046511.1](#) Length: 5323903 Number of Matches: 1

Range 1: 3725364 to 3726364 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | |
|----------------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------|
| 1844 bits(998) | D.D | 1000/1001(99%) | 0/1001(0%) | Plus/Minus | | |
| Query 188 | GATTACATGAC | TTTGAATAATGGT | TGGAGT | TTTCGATAGGC | TGAAAAACATAGTTGTTCTTT | 159 |
| Sbjct 3726364 | GATTACATGAC | TTTGAATAATGGT | TGGAGT | TTTCGATAGGC | TGAAAAACATAGTTGTTCTTT | 3726385 |
| Query 168 | TTGGCAACT | TTTCTGTACAACGAT | ATAAGGAAGAAT | TGAAATGCC | TAATTCACACATAAC | 219 |
| Sbjct 3726384 | TTGGCAACT | TTTCTGTACAACGAT | ATAAGGAAGAAT | TGAAATGCC | TAATTCACACATAAC | 3726245 |
| Query 228 | GGATGTGTTAATGAC | TTCAACATGGAA | TTTCAAATGTT | TAGCTGGAATA | TTTCCACT | 279 |
| Sbjct 3726244 | GGATGTGTTAATGAC | TTCAACATGGAA | TTTCAAATGTT | TAGCTGGAATA | TTTCCACT | 3726185 |
| Query 288 | TTGACGTAAAAAACGAT | CTACCATTGGCCT | ATAGCCG | CAGCTTTGTTCTGT | AAAAATGAA | 339 |
| Sbjct 3726184 | TTGACGTAAAAAACGAT | CTACCATTGGCCT | ATAGCCG | CAGCTTTGTTCTGT | AAAAATGAA | 3726125 |
| Query 348 | CTGGGTGTCCTGTAATAAC | TGGAATGGATTGCGT | GTGCAGCGGAATAAGCT | GGTAAAAAT | | 399 |
| Sbjct 3726124 | CTGGGTGTCCTGTAATAAC | TGGAATGGATTGCGT | GTGCAGCGGAATAAGCT | GGTAAAAAT | | 3726865 |
| Query 488 | CCATCCAAATGTTTCATT | TACTAAAAAGTACGCGT | AATAAAAAATCATTATGTTCT | TATACTTTTC | | 459 |
| Sbjct 3726864 | CCATCCAAATGTTTCATT | TACTAAAAAGTACGCGT | AATAAAAAATCATTATGTTCT | TATACTTTTC | | 3726885 |
| Query 468 | TCCAATTAAGAAGCAACG | CTGTTTCCACCTT | CACGTAATTTTGT | AATGCTTGTTCATT | | 519 |
| Sbjct 3726884 | TCCAATTAAGAAGCAACG | CTGTTTCCACCTT | CACGTAATTTTGT | AATGCTTGTTCATT | | 3725945 |
| Query 528 | TGTGTTTGTTC | CAAGTACGATAAT | TACTTT | CGGATTTTCTGTT | TGTAAGTACGTAATAA | 579 |
| Sbjct 3725944 | TGTGTTTGTTC | CAAGTACGATAAT | TACTTT | CGGATTTTCTGTT | TGTAAGTACGTAATAA | 3725885 |
| Query 588 | TTTGGTAATCGGTATACCG | CTAATGATTCATTAGAT | GTAACTTAATGT | ACCTTCTAA | | 639 |
| Sbjct 3725884 | TTTGGTAATCGGTATACCG | CTAATGATTCATTAGAT | GTAACTTAATGT | ACCTTCTAA | | 3725825 |
| Query 648 | ATAACTGTATTTTGGGGG | ATTTCTTGCCTTTT | CATATATTGCAAGT | AATTTCTAATGC | | 699 |
| Sbjct 3725824 | ATAACTGTATTTTGGGGG | ATTTCTTGCCTTTT | CATATATTGCAAGT | AATTTCTAATGC | | 3725765 |
| Query 708 | ATAAGGATGAAATGATGAC | CTGCTTTTGT | AAGTAGCAC | TTTTTCCCTAACCGATCGAA | | 759 |
| Sbjct 3725764 | ATAAGGATGAAATGATGAC | CTGCTTTTGT | AAGTAGCAC | TTTTTCCCTAACCGATCGAA | | 3725785 |
| Query 768 | AAGAGGAATATGTAATCG | TTCTCTAAABCTTT | CATATGTGCT | GTAAACAGTAGATTGCGC | | 819 |
| Sbjct 3725784 | AAGAGGAATATGTAATCG | TTCTCTAAABCTTT | CATATGTGCT | GTAAACAGTAGATTGCGC | | 3725645 |
| Query 828 | ATAAACCAGCGCATGAGC | AGCTTTAGAAAAAT | TACCATACTTC | CAATGGCGCAAAAATGT | | 879 |
| Sbjct 3725644 | ATAAACCAGCGCATGAGC | AGCTTTAGAAAAAT | TACCATACTTC | CAATGGCGCAAAAATGT | | 3725585 |
| Query 888 | TTTAACATGCTCATT | TCCATAAGCGATCCCT | CTTTTATTATCATGAT | TGTGAATGATT | | 939 |
| Sbjct 3725584 | TTTAACATGCTCATT | TCCATAAGCGATCCCT | CTTTTATTATCATGAT | TGTGAATGATT | | 3725525 |
| Query 948 | ATATCATGTATTTTAA | TTTCCAAATGATTAA | ATTCGGTATAAAA | AAAAATGTGGAAAT | | 999 |
| Sbjct 3725524 | ATATCATGTATTTTAA | TTTCCAAATGATTAA | ATTCGGTATAAAA | AAAAATGTGGAAAT | | 3725465 |
| Query 1008 | ATTCAATCAAGTGATAT | TGGAGGAGAAAAGATGAT | CAAAAAGGGCTATCAT | GATGCTGTT | | 1059 |
| Sbjct 3725464 | ATTCAATCAAGTGATAT | TGGAGGAGAAAAGATGAT | CAAAAAGGGCTATCAT | GATGCTGTT | | 3725485 |
| Query 1068 | GTTGGGGCTACAGGTG | CGGTAGGGCAAAAAAT | TATTGAAC | 1188 | | |
| Sbjct 3725484 | GTTGGGGCTACAGGTG | CGGTAGGGCAAAAAAT | TATTGAAC | 1188 | | 3725364 |

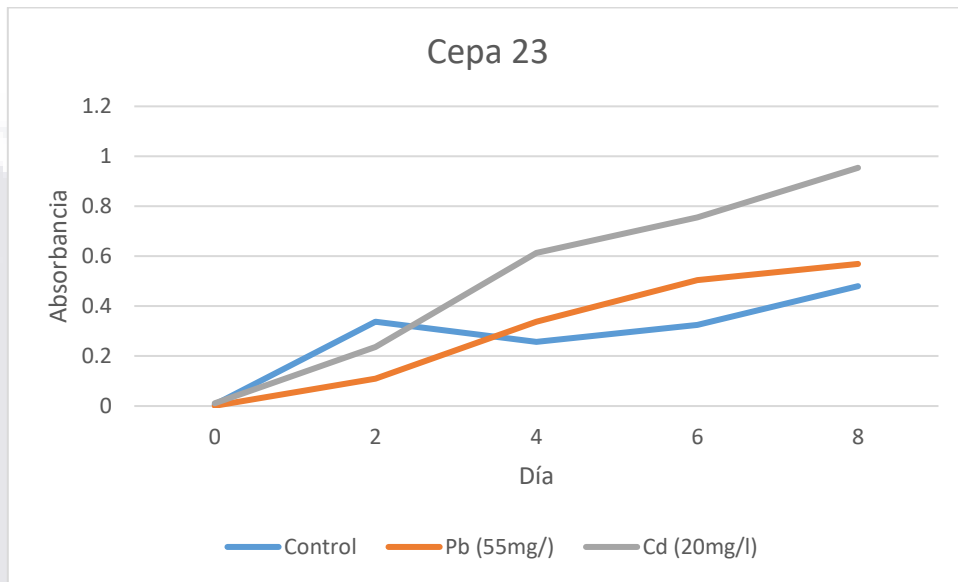
Figura 23 Alineamiento de la secuencia de la cepa 52.

Una vez revisados los datos obtenidos respecto a la identificación de la cepa 68 se observa que hay coincidencia del análisis microscópico el cual indica que se trata de un bacilo Gram positivo, el resultado de la microscopia de masas MALDI-TOF donde aseguraba consistencia en el género de la bacteria como *Bacillus* probable especie *B. cereus*, las pruebas bioquímicas y la prueba BLAST, se puede determinar que la cepa 68 se trata de una cepa de *Bacillus cereus*.

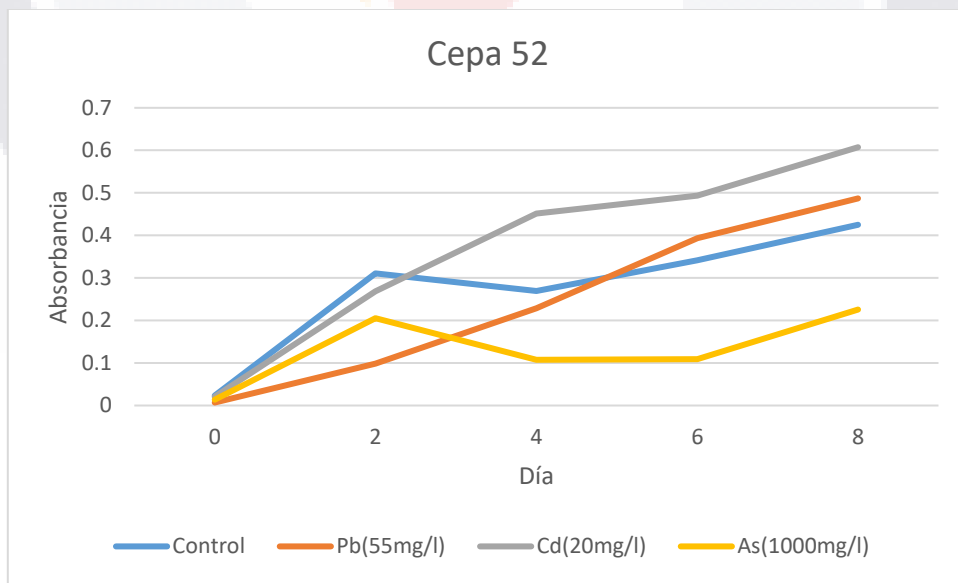
7.4 REMOCIÓN DE METALES DEL MEDIO

7.4.1 CURVAS DE CRECIMIENTO

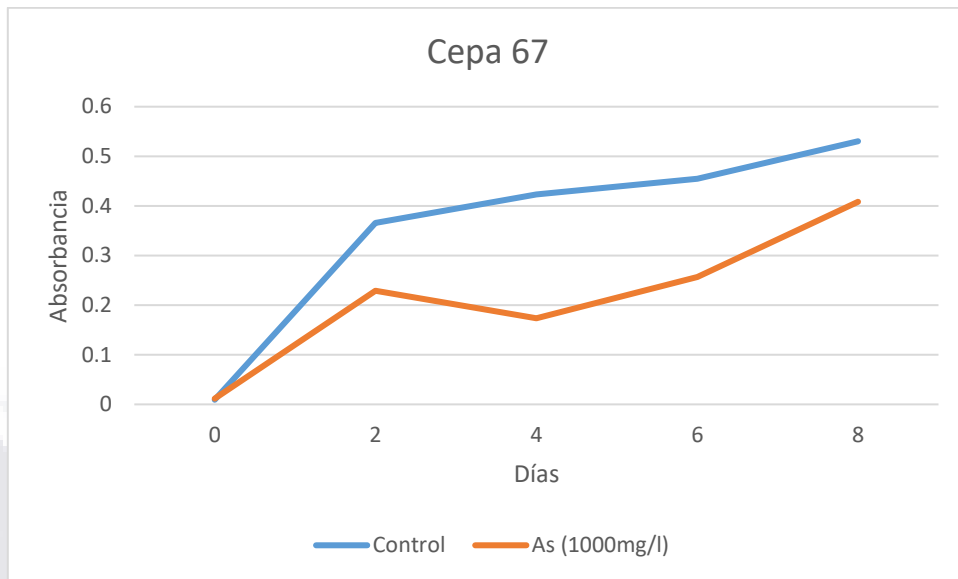
Pasado el tiempo de incubación se obtuvieron las curvas de crecimiento pertenecientes a cada cepa y a los metales que fueron expuestas respectivamente.



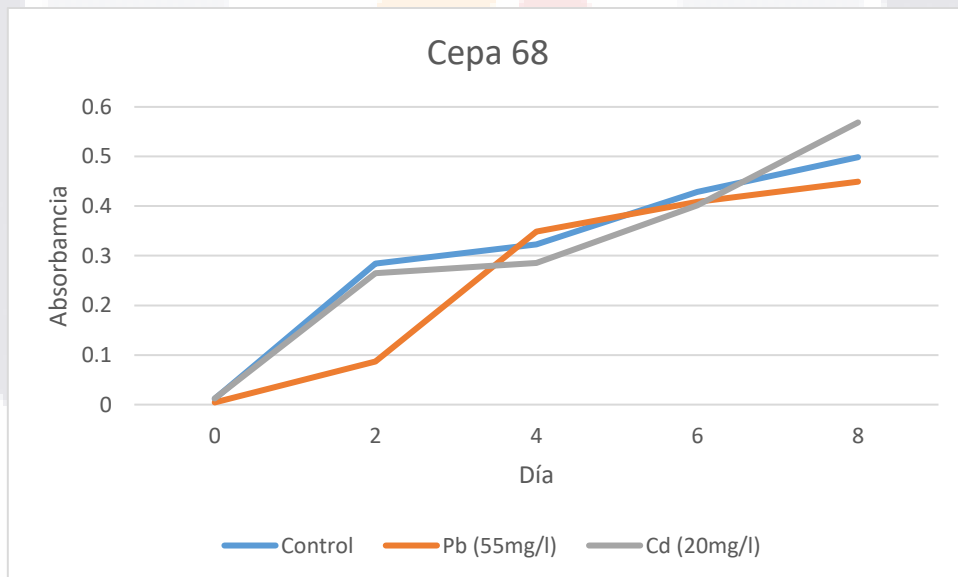
Gráfica 4 Curva del crecimiento de la cepa 23.



Gráfica 5 Curva del crecimiento de la cepa 52.



Gráfica 6 Curva del crecimiento de la cepa 67.



Gráfica 7 Curva del crecimiento de la cepa 68.

Observando las curvas de crecimiento, se aprecia que están parecidas unas de otras donde la presencia de plomo y cadmio promueve un mayor crecimiento de las bacterias respecto a los grupos control, no así las bacterias expuestas a arsénico presentan un menor crecimiento que los controles esto puede deberse a que el arsénico se encontraba en una concentración mucho mayor que la del plomo y el cadmio y a que los efectos tóxicos del arsénico inhibieran el desarrollo óptimo de las bacterias, respecto al plomo y cadmio al encontrarse en menor cantidad puede que el estrés causado sobre las bacterias sea menor y que este a su vez promueva el crecimiento

de las bacterias como respuesta a su presencia y de esta forma las bacterias puedan mitigarlo o reducirlo del medio de cultivo.

7.4.2 RENDIMIENTO DE REMOCIÓN DE METALES

Tabla 13 Controles de calidad en la lectura de plomo.

| Parámetros de calidad | Valores (mg/l) |
|--------------------------|----------------|
| Estándar Pb (4mg/l) | 3.281 |
| Fortificado Pb (4 mg/l) | 10.58 |
| Blanco HNO3 | ND |
| Control de medio | ND |
| Cepa 23 | ND |
| Cepa 52 | ND |
| Cepa 68 | ND |
| Blanco Pb D0 | 56.0667 |
| Blanco Pb D4 | 32.6 |
| Blanco Pb D8 | 47.6 |
| *Curva (4mg/l) a las 12m | 4.282 |
| *Curva (4mg/l) a las 24m | 4.287 |
| *Curva (4mg/l) a las 36m | 4.321 |

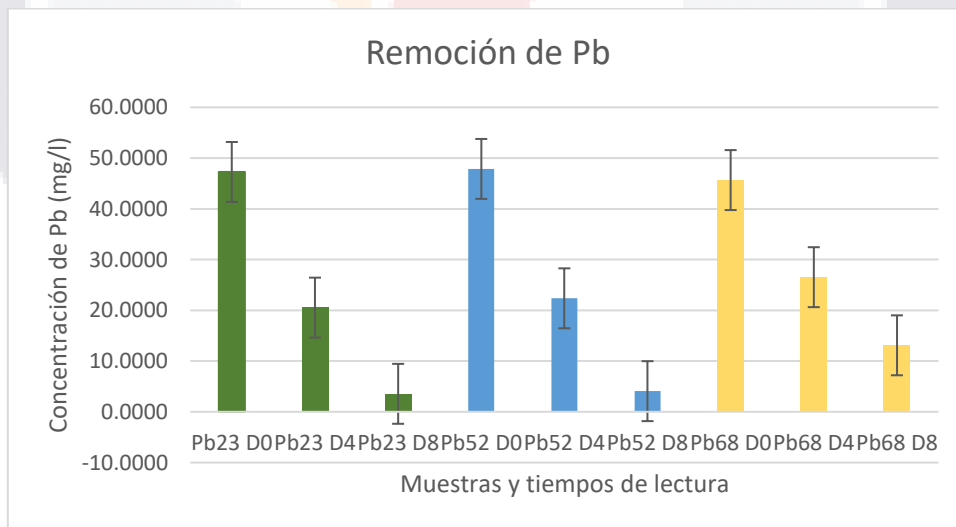


Figura 24 Remoción de plomo durante los 8 días.

Tabla 14 Porcentaje de remoción de plomo.

| Muestra | % Remoción |
|---------|------------|
|---------|------------|

| | |
|---------|----------------|
| Cepa 23 | 92.4965 |
| Cepa 52 | 91.4903 |
| Cepa 68 | 71.3066 |

Las 3 cepas presentaron la capacidad de resistir y remover el plomo del medio en que crecieron siendo la cepa 23 la que presento un mayor porcentaje de remoción.

Tabla 15 Controles de calidad en la lectura de cadmio.

| Parámetros de calidad | Valores (mg/l) |
|----------------------------|----------------|
| Estándar Cd (0.25 mg/l) | 0.224 |
| Fortificado Cd (0.25 mg/l) | 0.231 |
| Blanco HNO3 | ND |
| Control de medio | ND |
| Cepa 23 | ND |
| Cepa 52 | ND |
| Cepa 68 | ND |
| Blanco Cd D0 | 21.5167 |
| Blanco Cd D4 | 21.7333 |
| Blanco Cd D8 | 21.65 |
| *Curva (0.5mg/l) a las 12m | 0.551 |
| *Curva (0.5mg/l) a las 24m | 0.553 |
| *Curva (0.5mg/l) a las 36m | 0.558 |

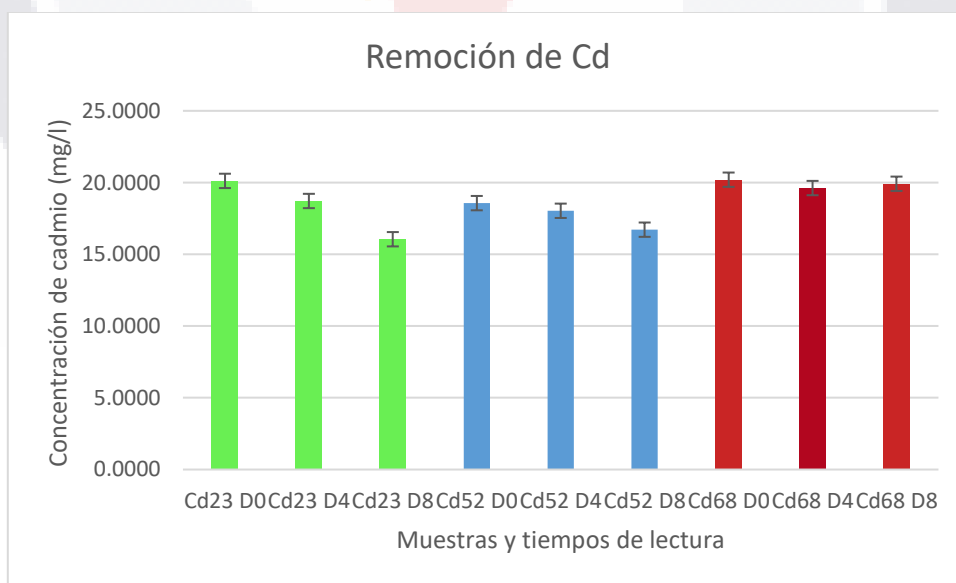


Figura 25 Remoción de cadmio durante los 8 días.

Tabla 16 Porcentaje de remoción de cadmio.

| Muestra | % Remoción |
|---------|------------|
| Cepa 23 | 20.2154 |
| Cepa 52 | 9.9641 |
| Cepa 68 | 1.4026 |

Las 3 cepas fueron capaces de tolerar y remover el cadmio del medio, el comportamiento fue similar al presentado en presencia de plomo siendo la cepa 23 la que removió una mayor cantidad de cadmio y la 68 la que removió menos, en general la remoción de cadmio fue en un porcentaje mejor en comparación al plomo.

| Parámetros de calidad | Valores (mg/l) |
|--------------------------|----------------|
| Estándar As (20 µg/l) | 0.224 |
| Fortificado As (20 µg/l) | ND |
| Blanco HNO3 | ND |
| Control de medio | ND |
| Cepa 52 | ND |
| Cepa 67 | ND |
| Blanco As D0 | 1090.6667 |
| Blanco As D4 | 1268.0000 |
| Blanco As D8 | 2120.0000 |

| Muestra | R1 (mg/l) | R2 (mg/l) | R3 (mg/l) | Promedio (mg/l) | Prom*V. dilución (mg/l) |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|-------------------------|
| As 52 D0 | 21 | 26.5 | | 23.7500 | 950.0000 |
| As 52 D4 | 30.6 | 14 | 42.4 | 29.0000 | 1160.0000 |
| As 52 D8 | 24.8 | 163 | 23.1 | 70.3000 | 2812.0000 |
| As 67 D0 | 31.8 | 14.5 | 16.7 | 21.0000 | 840.0000 |
| As 67 D4 | 16.8 | 232.5 | 85 | 111.4333 | 4457.3333 |
| As 67 D8 | 50.4 | 26.8 | 15.8 | 31.0000 | 1240.0000 |

El análisis de arsénico después de los 8 días demostró un comportamiento atípico debido a que la concentración de arsénico aumento caso contrario a lo que se esperaba, esto puede deberse principalmente a contaminación en los materiales utilizados, a la sensibilidad del equipo puesto que solo lee hasta 50 µl y la concentración

utilizada fue de 1000 mg al momento de diluir se utilizan volúmenes muy pequeños lo que facilita un error en la lectura.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha encontrado que en las zonas cercanas a las minas de Concepción del Oro en Zacatecas presentan importantes concentraciones de metales entre los que se encuentran plomo, cadmio y arsénico, los tres de importancia debido a su toxicidad y los efectos adversos que pueden ocasionar a la salud de los seres vivos y ecosistemas, fue posible realizar el aislamiento de 32 distintas colonias bacterianas a partir de muestras de suelo previamente recolectadas, estas mismas colonias fueron expuestas a diferentes concentraciones de los metales antes mencionados para verificar si tenían la capacidad de tolerar la presencia de dichos metales, la concentración máxima en que se podían desarrollar y su capacidad de remover los metales del medio.

Respecto al plomo las 32 cepas aisladas toleraron hasta una concentración de 84 mg/l, solo tres, las cepas: 23, 52 y 68 toleraron hasta 134mg/l. teniendo en cuenta que la normativa oficial marca una concentración máxima permisible para plomo de 400mg/kg en suelos de uso comercial, domiciliario y agrícola estas colonias resisten menos de la mitad de dicha concentración límite, sin embargo, las tres cepas fueron capaces de reducir significativamente la concentración de plomo, al menos un 70%, presente en el medio de cultivo en un plazo de 8 días, que fue el tiempo que duro el experimento, lo cual nos dice sobre la adaptación de las bacterias a este medio adverso y que son capaces de llevar a cabo sus funciones biológicas sin problemas a una concentración reducida de plomo.

Respecto al cadmio la tolerancia fue mucho menor siendo lo máximo una concentración de 40mg/l apenas rebasando los 37mg/kg que marca la normativa como valor máximo permisible, nuevamente se observó que las cepas más tolerantes a cadmio tienen la capacidad de removerlo del medio, aunque en una menor proporción en comparación al plomo ya que el mayor porcentaje de remoción fue del 20%, no obstante también es significativo que pueden removerlo ya que indica la presencia de los mecanismos adecuados para dicho fin y no solo para tolerarlo.

Y en arsénico dos cepas fueron capaces de tolerar hasta 6000mg/ de arsénico muy por encima de los 23mg/kg que marca la norma como concentración máxima permisible, esto nos indica que las bacterias aisladas de estos suelos tienen una mayor adaptación para resistir al arsénico.

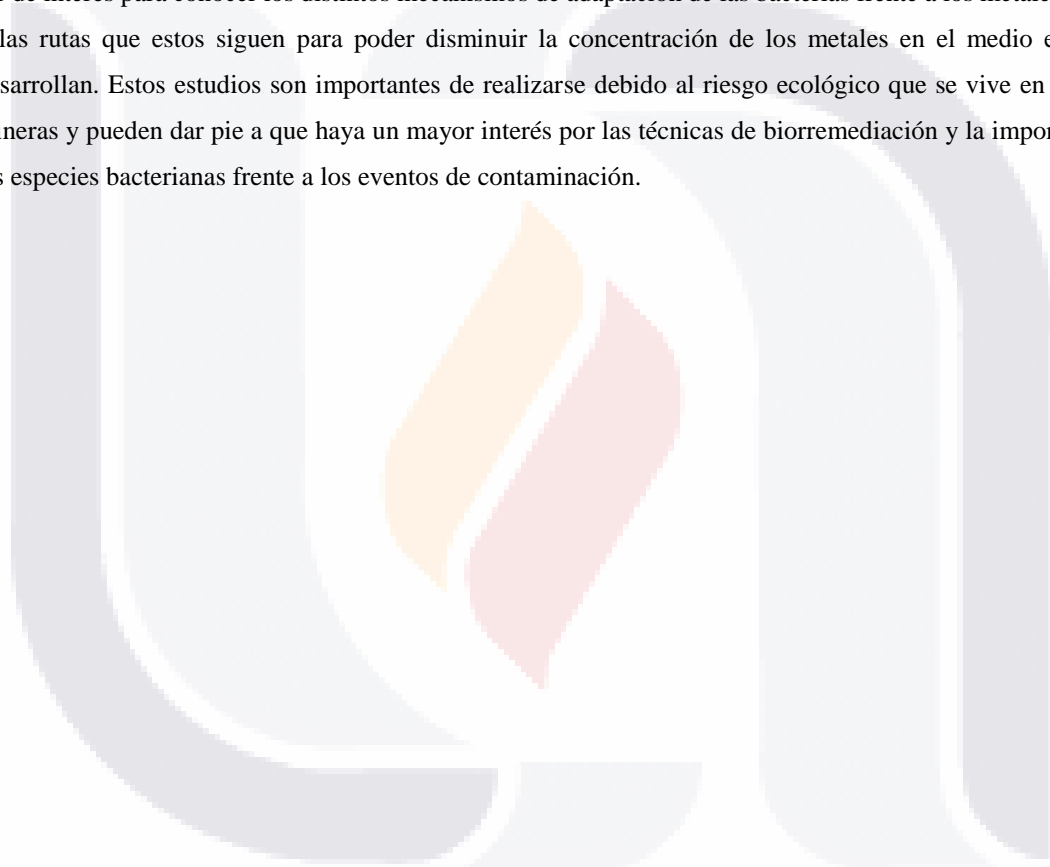
De todas las cepas resalta la 52 ya que tolero a plomo, cadmio y arsénico en las concentraciones más elevadas y mostro la habilidad para removerlos del medio. La cepa 23 fue la que presento los mayores porcentajes de remoción de plomo y de cadmio mientras que la cepa 68 fue la que menor porcentaje de remoción presento.

La identificación de las cepas tolerantes nos ha permitido encontrar que las bacterias pertenecen al género *Bacillus* es cual se encuentra ampliamente distribuido en suelos, mientras que las especies encontradas son cepas distintas pertenecientes a las especies *B. cereus* y *B. thuringiensis*.

Concluido el trabajo se comprueba la hipótesis planteada al inicio sobre que las condiciones de contaminación en los suelos de Concepción del Oro promueven el desarrollo de microorganismos tolerantes a altas concentraciones de metales, pero además de que estos poseen los mecanismos suficientes para reducir la concentración de los metales del medio en que se desarrollan, la mayor adaptación parece ser el arsénico ya que fue el elemento que pudieron tolerar a una mayor concentración mientras que el plomo es el metal que fue removido con mayor éxito.

9. CONCLUSIONES

Los microorganismos aislados de Concepción del Oro parecen tener las adaptaciones suficientes para poder tolerar y desarrollarse en ambientes altamente contaminados por metales y metaloides, esto se comprueba con el presente trabajo y el realizado por otros compañeros del laboratorio que han aislado hongos a partir de las mismas muestras de suelo. Concluido el trabajo se han encontrado 4 especies de *Bacillus* cuyo estudio puede ser de interés para conocer los distintos mecanismos de adaptación de las bacterias frente a los metales pesados y las rutas que estos siguen para poder disminuir la concentración de los metales en el medio en que se desarrollan. Estos estudios son importantes de realizarse debido al riesgo ecológico que se vive en las zonas mineras y pueden dar pie a que haya un mayor interés por las técnicas de biorremediación y la importancia de las especies bacterianas frente a los eventos de contaminación.



10. REFERENCIAS

- 1- Abraham Covarrubias, S., & Peña Cabriales, J. (2017). CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR METALES PESADOS EN MÉXICO: PROBLEMÁTICA Y ESTRATEGIAS DE FITORREMEDIACIÓN. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(esp01), 7–21. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.esp01.01>
- 2- Ahemad, M. (2019). Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 1365–1377. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.020>
- 3- Alkorta, I., Epelde, L., & Garbisu, C. (2017). Environmental parameters altered by climate change affect the activity of soil microorganisms involved in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 364(19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx200>
- 4- Almeida, E. O., Escalona, F. J., Bluhm, J., Valle, S., Huerta, J., & Reveles, S. (2019). Análisis geoestadístico de la distribución de metales pesados a partir de muestras de sedimento en las cartas Zacatecas y Guadalupe, escala 1:50,000, México. *GEOS*, 39(1), 1–21.
- 5- Alown, F., Alsharidah, A., & Shamsah, S. (2021). Genotypic characterization of soil bacteria in the Umm Al-Namil Island, Kuwait. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(7), 3847–3854. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.060>
- 6- Audu, K. E., Adeniji, S. E., & Obidah, J. S. (2020). Bioremediation of toxic metals in mining site of Zamfara metropolis using resident bacteria (*Pantoea agglomerans*): An optimization approach. *Heliyon*, 6(8), e04704. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04704>
- 7- Beattie, R. E., Henke, W., Campa, M. F., Hazen, T. C., McAliley, L. R., & Campbell, J. H. (2018). Variation in microbial community structure correlates with heavy-metal contamination in soils decades after mining ceased. *Soil Biology and Biochemistry*, 126, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.011>
- 8- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- 9- Burbano-Orjuela, H. (2016). El suelo y su relación con los servicios ecosistémicos y la seguridad alimentaria. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(2), 117–124. <https://doi.org/10.22267/rcia.163302.58>.
- 10- CAMIMEX. (2020). Importancia de la minería en México.

- 11- El-Meihy, R. M., Abou-Aly, H. E., Tewfike, T. A., El-Alkshar, E. A. & Youssef, A. M. (2019). Characterization and identification of cadmium-tolerant bacteria isolated from contaminated regions in Egypt. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101299. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101299>
- 12- Farjana, S. H., Huda, N., Parvez Mahmud, M., & Saidur, R. (2019). A review on the impact of mining and mineral processing industries through life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production*, 231, 1200–1217. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.264>
- 13- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- 14- Guzmán, C. (2022, 26 febrero). *Tipos de contaminación*. CEUPE.mx. <https://ceupe.mx/blog/tipos-de-contaminacion.html>
- 15- Islam, K., Vilaysouk, X., & Murakami, S. (2020). Integrating remote sensing and life cycle assessment to quantify the environmental impacts of copper-silver-gold mining: A case study from Laos. *Resources, Conservation and Recycling*, 154, 104630. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104630>
- 16- Jiang, L., Liu, X., Yin, H., Liang, Y., Liu, H., Miao, B., Peng, Q., Meng, D., Wang, S., Yang, J., & Guo, Z. (2020). The utilization of biomineralization technique based on microbial induced phosphate precipitation in remediation of potentially toxic ions contaminated soil: A mini review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 110009. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110009>
- 17- Jiménez Ballesta, R. (2017a). Capítulo 1. Introducción a la contaminación de suelos [Libro electrónico]. En *Introducción a la contaminación de suelos* (pp. 4–21). Mundi-Prensa.
- 18- Jiménez Ballesta, R. (2017b). Capítulo 3. Contaminación de suelos por metales pesados [Libro electrónico]. En J. Navarro Pedreño, I. Gómez Lucas, & M. B. Almendro Candel (Eds.), *Introducción a la contaminación de suelos* (pp. 39–71). Mundi-Prensa.
- 19- México Minero | ¿Qué es la minería? (2018). mexicominero.org. <https://mexicominero.org/ciencia/que-es-la-mineria/>
- 20- Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico. (s. f.). *Metales pesados*. miteco.gob.es. https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/metales_pesados.aspx
- 21- Mirzaei, N., Kafilzadeh, F., & Kargar, M. (2008). Isolation and Identification of Mercury Resistant Bacteria from Kor River, Iran. *Journal of Biological Sciences*, 8(5), 935–939. <https://doi.org/10.3923/jbs.2008.935.939>
- 22- Niane, B., Devarajan, N., Poté, J., & Moritz, R. (2019). Quantification and characterization of mercury resistant bacteria in sediments contaminated by artisanal small-scale gold mining activities, Kedougou region, Senegal. *Journal of Geochemical Exploration*, 205, 106353. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2019.106353>
- 23- Qin, G., Niu, Z., Yu, J., Li, Z., Ma, J., & Xiang, P. (2021). Soil heavy metal pollution and food safety in China: Effects, sources and removing technology. *Chemosphere*, 267, 129205. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129205>

- 24- Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K. H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International*, 125, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>
- 25- Rebello, S., Sivaprasad, M., Anoopkumar, A., Jayakrishnan, L., Aneesh, E. M., Narisetty, V., Sindhu, R., Binod, P., Pugazhendhi, A., & Pandey, A. (2021). Cleaner technologies to combat heavy metal toxicity. *Journal of Environmental Management*, 296, 113231. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113231>
- 26- Sandeep, G., Vijayalatha, K. R., & Anitha, T. (2019). Heavy metals and its impact in vegetable crops. *International Journal of Chemical Studies*, 7(1), 1612–1621.
- 27- Secretaría de Economía. (2022). *Minería| Secretaría de Economía| Gobierno| gob.mx*. www.gob.mx. <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>
- 28- SEMARNAT. (2019). SEMARNAT.gob.mx. http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/approot/compendio_2019/RECUADROS_INT_GLOS/D1_GLOS_SA_MBIENTAL.htm
- 29- Servicio Geológico Mexicano. (2020). Panorama minero del estado de Zacatecas.
- 30- Tang, J., Zhang, J., Ren, L., Zhou, Y., Gao, J., Luo, L., Yang, Y., Peng, Q., Huang, H., & Chen, A. (2019). Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. *Journal of Environmental Management*, 242, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.061>
- 31- Taslima, K., Al-Emran, M., Rahman, M. S., Hasan, J., Ferdous, Z., Rohani, M. F., & Shahjahan, M. (2022). Impacts of heavy metals on early development, growth and reproduction of fish – A review. *Toxicology Reports*, 9, 858–868. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.04.013>
- 32- Yang, P., & van Elsas, J. D. (2018). Mechanisms and ecological implications of the movement of bacteria in soil. *Applied Soil Ecology*, 129, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.04.014>
- 33- Yin, K., Wang, Q., Lv, M., & Chen, L. (2019). Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 360, 1553–1563. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>
- 34- Zaynab, M., Al-Yahyai, R., Ameen, A., Sharif, Y., Ali, L., Fatima, M., Khan, K. A., & Li, S. (2022). Health and environmental effects of heavy metals. *Journal of King Saud University - Science*, 34(1), 101653. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101653>
- 35- Zhu H, Guo J, Chen M, Feng G, Yao Q (2012) Burkholderia dabaoshanensis sp. nov., a Heavy-Metal-Tolerant Bacteria Isolated from Dabaoshan Mining Area Soil in China. *PLoS ONE* 7(12): e50225. doi:10.1371/journal.pone.0050225

