



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA  
Y METALURGIA**

**Aislamiento y Caracterización de Hongos  
Metalotolerantes de Jales Abandonados**

**Tesis**

**Que para obtener el título de:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**Presenta**

**MARIA FERNANDA FIGUEROA SANEZ**

**Hermosillo, Sonora**

**Noviembre de 2018**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres, por todo su apoyo, confianza y paciencia que me han dado a lo largo de toda mi vida, a mi hermana por todo su apoyo incondicional.

A mi tía Rita Figueroa por todo su cariño, apoyo brindado a lo largo de toda la carrera y por haber confiado en mí en todo momento y a mi Nina Hilda Sanz por todo su cariño, paciencia y confianza.

A mis compañeros y amigos Itzel Fierro, Selene Sombra, Doria Ochoa y Martín Zamarrón, por todo lo que hemos compartido y las anécdotas a lo largo de todos estos años que hemos estado en la carrera.

A Valeria Lauterio por ser mi compañera de laboratorio, por aguantarme y todo lo que pasamos a lo largo de todo este proceso.

A Fernanda Fimbres por ser una muy buena amiga, por todo su cariño y apoyo incondicional que me ha brindado desde que nos conocimos.

Los quiero mucho!!!!

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a la Universidad de Sonora por aceptarme, en especial al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, por su orientación a lo largo de toda la carrera.

En especial a mi directora de tesis, la Dra. María Teresa Certucha Barragán, por todo su apoyo, asesoría y paciencia a lo largo de todo este trabajo. También al Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia por todo su apoyo, paciencia en la parte experimental.

Le agradezco su colaboración al Instituto de Geología de la UNAM de la Estación Regional del Noroeste. En especial a la Dra. Denisse Archundía por su colaboración con los resultados de Plasma de Acoplamiento Inductivo.

Al Laboratorio de Metrología de la Universidad de Sonora, en especial a la Dra. Kareen K. Encinas Soto, por su colaboración en la realización de los análisis de Espectroscopia absorción atómica.

A la Maestra María Elena Ochoa Landín por sus consejos, por todo su apoyo y comprensión en todo este proceso.

## INDICE DE CONTENIDO

### Contenido

<b>CAPITULO I .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCION Y OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
I.1 Introducción .....	11
I.2 Objetivos.....	14
I.2.1 Objetivo general.....	14
I.2.2 Objetivos específicos.....	14
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>15</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
II.1 Contaminación del Suelo.....	15
II.1.1 Principales fuentes de contaminación del suelo.....	16
II.1.2 Jales Mineros.....	22
II.2 Metales .....	23
II.2.1 Metales Pesados.....	24
II.2.2 Interacción de los Metales Pesados en Suelo.....	25
II.2.2.1 Cobre.....	29
II.3 Microorganismos en el Suelo .....	30
II.4 Microorganismos Metalotolerantes .....	34
II.5 Biología Molecular .....	39
<b>CAPITULO III .....</b>	<b>41</b>
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
III.1 Diagrama Experimental .....	41
III.2 Muestreo.....	42
III.3 Caracterización de las muestras del Jale .....	43
III.3.1 Medición de pH.....	43
III.3.2 Técnica de Sólidos.....	43
III.3.3 Determinación de la concentración de los metales	

presentes en los jales por espectroscopia de absorción atómica.....	45
III.3.4 Determinación de la concentración de los metales presentes en los jales por plasma de acoplamiento inductivo (ICP)....	46
III.4 Aislamiento de Microorganismos Metalotolerantes .....	47
III.4.1 Determinación de la tolerancia del microorganismo al metal.....	47
III.5 Identificación de Hongos Metalotolerantes .....	49
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
IV.1 Caracterización de las muestras del Jale.....	50
IV.1.1 Medición de pH.....	50
IV.1.2 Técnica de Sólidos.....	52
IV.1.3 Concentración de los metales presentes en los jales por espectroscopia de absorción atómica.....	53
IV.1.4 Concentración de los metales presentes en los jales por plasma de acoplamiento inductivo.....	56
IV.2 Aislamiento de Microorganismos Metalotolerantes .....	59
IV.3 Identificación del hongo de color blanco .....	60
<b>CAPITULO V .....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>
ANEXO A.....	62
ANEXO B.....	63
ANEXO C .....	74
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>75</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Solubilidad de metales pesados en función del pH y del Eh. ....	27
<b>Figura 2.</b> Metodología Experimental.....	41
<b>Figura 3.</b> Localización de las estaciones.....	42
<b>Figura 4.</b> Equipo de Espectroscopia de Absorción Atómica .....	46
<b>Figura 5.</b> Técnica por Estría (Rojas-Trivi, 2011).....	48
<b>Figura 6.</b> Técnica de punción central. ....	49
<b>Figura 7.</b> Especiación del cobre en la estación E1. Estimados con el programa Medusa ®.....	54
<b>Figura 8.</b> Especiación del cobre en la estación E4. Estimados con el programa Medusa ®.....	55
<b>Figura 9.</b> Especiación del manganeso en la estación E1. Estimados con el programa Medusa ®. ....	58
<b>Figura 10.</b> Hongo blanco aislado.....	59
<b>Figura 11.</b> Hongo negro aislado .....	59
<b>Figura 12.</b> Especiación del cadmio en la estación E2. Estimados con el programa Medusa ®. ....	63
<b>Figura 13.</b> Especiación del manganeso en la estación E2. Estimados con el programa Medusa ®. ....	64
<b>Figura 14.</b> Especiación del níquel en la estación E2. Estimados con el programa Medusa ®. ....	65
<b>Figura 15.</b> Especiación del plomo en la estación E2. Estimados con el programa Medusa ®. ....	66
<b>Figura 16.</b> Especiación del cadmio en la estación E6. Estimados con el programa Medusa ®. ....	67
<b>Figura 17.</b> Especiación del manganeso en la estación E6. Estimados con el programa Medusa ®. ....	68

<b>Figura 18.</b> Especiación del níquel en la estación E6. Estimados con el programa Medusa ®. ....	69
<b>Figura 19.</b> Especiación del plomo en la estación E6. Estimados con el programa Medusa ®. ....	70
<b>Figura 20.</b> Especiación del cadmio en la estación E1. Estimados con el programa Medusa ®. ....	71
<b>Figura 21.</b> Especiación del cromo en la estación E1. Estimados con el programa Medusa ®. ....	72
<b>Figura 22.</b> Especiación del níquel en la estación E1. Estimados con el programa Medusa ®. ....	73

## INDICE DE TABLAS

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla I.</b> Metales esenciales y metales tóxicos (Morton-Bermea, 2006).....	24
<b>Tabla II.</b> Medición del pH de las estaciones muestreadas. ....	50
<b>Tabla III.</b> Cuantificación de sólidos de las estaciones muestreadas. ....	52
<b>Tabla IV.</b> Concentración de los metales presentes en las estaciones. ....	53
<b>Tabla V.</b> Resultados del análisis de las estaciones E2 y E3 por ICP de la muestra cámara. ....	56
<b>Tabla VI.</b> Resultados del análisis de la estación E1 por ICP de la muestra Ultrasónico Spray.....	56
<b>Tabla VII.</b> Identificación del hongo por alineamiento de secuencia según la página <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> .....	60
<b>Tabla VIII.</b> Límite de detección instrumental de la Cámara del equipo ICP. ....	62
<b>Tabla IX.</b> Límite de detección instrumental del Ultrasónico Spray del equipo ICP.....	62
<b>Tabla X.</b> Límites Máximos Permisibles (LMP) para los constituyentes tóxicos en el extracto PECT según la norma NOM-052-SEMARNAT-2005.....	74

## RESUMEN

En México, las actividades industriales han generado una gran cantidad de contaminantes. Una de las preocupaciones actuales son los jales mineros, estos son residuos que se generan en la recuperación de metales como el cobre (Cu), hierro (Fe), oro (Au), entre otro. En este sentido, los tratamientos biológicos para la remediación de sitios es una excelente opción, por sus bajos costos y aceptable eficiencia de remoción de estos contaminantes. En este trabajo, se aisló un hongo metalotolerante de jales abandonados. La caracterización de las muestras de suelo se realizó por medio de análisis fisicoquímicos como pH, sólidos, concentración de metales por medio de espectroscopia de absorción atómica (AA) y plasma de acoplamiento inductivo (ICP). El aislamiento se llevó a cabo por la técnica de estría y punción central, hasta llegar a la purificación de la cepa para su posterior identificación, esta se realizó utilizando el método de los espaciadores internos transcritos y/o dominios ITs1/ITs4 y el análisis de secuenciación. La estación E4, según los resultados obtenidos de la caracterización de las estaciones, fue la que presentó el pH más ácido, por lo que favoreció el crecimiento de microorganismos acidófilos. Por medio del programa Medusa® y en base a las condiciones fisicoquímicas de los sitios de muestreo, se determinó la biodisponibilidad de los metales en los jales. El resultado de los análisis de secuenciación, se identificó al hongo como *Aspergillus australiensis*. En conclusión, el aislamiento de hongos metalotolerantes, es una alternativa para la biorremediación de sitios contaminados, ya que son microorganismos endógenos, la cual es una ventaja debido a que son resistentes a la presencia de elementos potencialmente tóxicos en el medio.

# CAPITULO I

## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

### I.1 Introducción

La contaminación ambiental se refiere a la presencia de agentes antropogénicos que pueden ser de origen físico, químico o biológico., los cuales pueden afectar gravemente la salud de la población y al medio ambiente, si se encuentran en grandes concentraciones.

La contaminación del suelo, consiste en la introducción de agentes ajenos al suelo, lo que ocasiona un efecto nocivo para los organismos del suelo, sus consumidores, o es susceptible de transmitirse a otros sistemas (Solano, 2005).

En México, como consecuencia del desarrollo industrial, trajo consigo una creciente y preocupante contaminación ambiental, la cual es causada por la industria minera, la cual tiene un alto impacto ambiental, ya que afecta desde el subsuelo hasta la atmosfera, incluyendo suelos y cuerpos de agua. Debido al procesamiento de los recursos minerales, se han generado grandes cantidades de residuos sólidos, líquidos y gaseosos que han ocasionado una gran cantidad de sitios contaminados a lo largo de todo el país (Monge Amaya et al., 2008).

El Estado de Sonora es el principal productor minero en cobre, grafito, wollastonita, carbón antracítico y el único productor de molibdeno (Secretaria de Economía, 2015). Debido a los procesos de obtención de estos materiales, las empresas mineras del estado han tenido un papel fundamental en la contaminación de sitios, uno de los principales problemas ambientales en los últimos años es la contaminación del rio Sonora en el 2014.

En la actualidad, una de las preocupaciones son los jales, los cuales son residuos mineros que se generan durante la recuperación de metales como el cobre (Cu), hierro (Fe), oro (Au), entre otros.

Los tipos de tratamiento, se basan en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamientos (Sepúlveda & Trejo, 2002):

- I. Tratamientos fisicoquímicos. Se utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para controlar la contaminación.
- II. Tratamientos térmicos. Utiliza calor para incrementar la volatilización de ciertas sustancias, también para quemar, descomponer o fundir los contaminantes del suelo.
- III. Tratamientos biológicos (biorremediación). Se utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos como plantas, hongos, bacterias para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.

Una alternativa de remediación de agua y suelo es la biorremediación, la cual se define como el proceso por el cual los microorganismos son estimulados para degradar rápidamente los contaminantes orgánicos presentes que son peligrosos a niveles ambientalmente seguros en suelo, sedimentos, sustancias, materiales y agua subterránea (Pandey y Fulekar, 2012).

**Ventajas de la Biorremediación (Fallis, 2013):**

- Los tratamientos físicos y algunos químicos se basan en transferir la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido, mientras que en la biorremediación se transfiere poca contaminación entre un medio y otro.
- Es una tecnología poco invasiva y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos que sean una amenaza para el medio.

- Es económicamente viable y como es un proceso natural, suele tener muy buena aceptación.

En la biorremediación se utilizan microorganismos resistentes a los metales, ya que tienen sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales y son capaces de sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de estos elementos (Marrero-Coto et al., 2010).

Una de las aplicaciones más importantes es la biosorción, el cual es un proceso que permite la captación activa o pasiva de iones metálicos, debido a la propiedad que poseen diversas biomasas vivas o muertas para enlazar y acumular este tipo de contaminantes por diferentes mecanismos. El propósito de este proceso es la remoción de los metales pesados provenientes de los desechos del sector industrial, usando materiales biológicos como adsorbentes y que sean de bajo costo (Tejada-Tovar et al., 2015).

Debido a la importante aplicación de este tipo de microorganismos, en este trabajo se va a estudiar como aislar hongos de jales abandonados, para conocer cuáles son resistentes a altas concentraciones de metales e identificarlas para su posterior aplicación.

## **I.2 Objetivos**

### **I.2.1 Objetivo General**

Aislar y caracterizar hongos metalotolerantes de jales abandonados.

### **I.2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar los parámetros fisicoquímicos de muestras de suelo de jales abandonados.
- Cuantificar la concentración de los metales pesados en el suelo de jales abandonados.
- Aislar hongos en medio de cultivo con altas concentraciones de metales.
- Caracterizar los hongos resistentes a las altas concentraciones de metales.

## **CAPITULO II**

### **ANTECEDENTES**

#### **II.1 Contaminación del Suelo**

El suelo es una capa delgada que se ha formado muy lentamente, a través de los siglos, con la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, los cambios de temperatura y el viento. Está compuesto por minerales, materia orgánica, microorganismos, animales, aire y agua (Ramírez, 2017).

Las características del suelo son muy importantes, ya que pueden reducir o aumentar la toxicidad de los metales porque tienden a acumularse en la superficie quedando accesibles al consumo de las raíces de los cultivos (Soraya Puga et al., 2006).

El suelo es un elemento filtrante, amortiguador y transformador, que regula los ciclos del agua y los biogeoquímicos. Tiene la propiedad de retener sustancias mecánicamente o fijarlas por adsorción, contribuyendo a la protección de aguas subterráneas y superficiales contra la penetración de agentes nocivos. El suelo, además, promueve fenómenos de evotranspiración o transpiración del aire a través de la superficie (Volke Sepúlveda et al., 2005).

Los suelos se clasifican, en función a su tamaño de partícula, en cuatro principales componentes: arcilla (tamaño de partícula menor a 0.002 mm), limo (0.002-0.05 mm), arena (0.05-2 mm) y grava (partículas mayores a 2 mm). Las cantidades relativas de cada tipo de partícula mineral determinan la textura de un suelo y tienen un impacto directo sobre sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Volke Sepúlveda et al., 2005).

El suelo es alterado como resultado de las actividades mineras. Una de las anomalías biogeoquímicas que se generan al momento de la extracción, es el aumento de las cantidades de microelementos en el suelo convirtiéndolos a

niveles de macroelementos, los cuales afectan negativamente la biota y la calidad del suelo; estos afectan el número, diversidad y actividad de los organismos del suelo, inhibiendo la descomposición de la materia orgánica del suelo (Wong, 2003).

### **II.1.1 Principales fuentes de contaminación del suelo**

Como consecuencia de varios siglos de actividad minera en México y posteriormente, debido a la industria de la química básica, petroquímica y de refinación del petróleo, se han producido grandes cantidades de residuos peligrosos difíciles de cuantificar. Debido a lo anterior, la intensa actividad de otras industrias, junto con accidentes durante el almacenamiento, transporte o trasvase de sustancias (fugas, derrames, incendios) y la disposición clandestina e incontrolada de residuos, contribuyen en gran medida a la contaminación de suelos (Sepúlveda & Trejo, 2002).

Una de las principales fuentes de contaminación, son las que se mencionan a continuación.

***Industria Petroquímica.*** La industria petroquímica en México se ha desarrollado aceleradamente, generando diversos satisfactores económicos. Sin embargo, su expansión y desarrollo también ha dado origen a graves problemas ambientales, derivados de emergencias ambientales, con graves repercusiones a la salud de la población y al equilibrio ecológico de los ecosistemas. Entre las causas que han generado este deterioro ambiental por la contaminación de cuerpos de agua y suelos a lo largo de todo el país, se encuentran las siguientes: 1. Manejo inadecuado y abandono de materiales y residuos peligrosos; 2. Mantenimiento inadecuado o falta de este en instalaciones petroleras; 3. Explosiones en instalaciones de alto riesgo; 4. Fugas en líneas de conducción y 5. Derrames de hidrocarburos (Sepúlveda y Trejo, 2002).

**Agroquímicos.** El uso excesivo de agroquímicos, así como el inadecuado manejo y disposición de sus envases, ha sido un problema generalizado en México. Los plaguicidas son el nombre genérico que recibe cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se utiliza para controlar plagas que atacan los cultivos o insectos que son vectores de enfermedades. Según su composición química se clasifican en: insecticidas (organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos), herbicidas (dinitrofenoles y triazinas) y fungicidas (fenoles y compuestos de cobre y azufre). Todas estas sustancias son compuestos químicos tóxicos y por su aplicación en tierras de cultivo, evidentemente son compuestos que se encuentran como contaminantes de grandes extensiones de suelos en todo el país (Sepúlveda y Trejo, 2002).

**Estaciones de servicio.** Los productos combustibles como gasolina, diesel, combustóleo, gasóleo, gas avión y gas LP, son producidos y distribuidos en México por PEMEX. La distribución al menudeo de gasolina y diesel, se lleva a cabo en estaciones de servicio (gasolinerías). Uno de los riesgos ambientales que involucra el manejo de estas estaciones, son los derrames o fugas de combustibles, que provocan la contaminación de los sitios en donde se encuentran los tanques de almacenamiento (Sepúlveda y Trejo, 2002).

**Ferrocarriles.** La empresa de Ferrocarriles Nacionales, ha contribuido a la contaminación de aguas y suelos, que se ha caracterizado por la generación de aceites gastados. La principal razón por la que esta empresa ha provocado la contaminación de suelos es por el almacenamiento inadecuado de residuos y combustibles como creosota y aceites gastados (Sepúlveda y Trejo, 2002).

**Disposición de residuos peligrosos.** Debido al creciente volumen de residuos peligrosos generados en nuestro país y a las capacidades existentes para su manejo, frecuentemente se presenta la disposición clandestina de estos en diversos sitios (tiraderos municipales, terrenos baldíos, patios de empresas, drenajes), ocasionando así un aumento de sitios contaminados con sustancias peligrosas de naturaleza tanto orgánica como inorgánica. Dentro de los

residuos peligrosos encontrados con mayor frecuencia en tiraderos clandestinos se encuentran los desechos provenientes de la industria minera (jales, metales y escorias de fundición) y petroquímica (hidrocarburos y químicos), además de aceites gastados provenientes de talleres mecánicos (Sepúlveda y Trejo, 2002).

**Agricultura.** La agricultura moderna ha multiplicado los impactos negativos sobre el ambiente. La destrucción y salinización del suelo, la contaminación por plaguicidas y fertilizantes, la deforestación o la pérdida de la biodiversidad genética (Echarri Prim, 1998).

Los principales impactos negativos son:

- Erosión del suelo: El mal uso de la tierra, la tala de bosques, los cultivos en laderas muy pronunciadas, la escasa utilización de técnicas de conservación del suelo y de fertilizantes orgánicos, facilitan la erosión.
- Salinización y anegamiento de suelos muy irrigados: cuando los suelos regados no tienen un drenaje suficientemente bueno se encharcan con el agua y cuando el agua se evapora, las sales que contiene el suelo son arrastradas a la superficie, lo que ocasiona que los suelos tengan una baja productividad.
- Uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas: los fertilizantes y pesticidas deben ser usados en las cantidades adecuadas para que no causen problema, el uso excesivo provoca contaminación de las aguas cuando estos productos son arrastrados por la lluvia. Esta contaminación provoca eutrofización de las aguas, mortandad en los peces y otros seres vivos y daños en la salud humana.
- Agotamiento de acuíferos: En las zonas secas y soleadas se obtienen excelentes rendimientos agrícolas con el riego. La desventaja son que

los acuíferos han tardado en formarse decenas de años y cuando se les quita agua en mayor cantidad que la que se les llega se van vaciando. Por este motivo las fuentes que surgían se secan, desaparecen humedales tradicionales en esa zona, y si están cerca del mar el agua salada va penetrando en la bolsa de agua, salinizándola, hasta hacerla inútil para sus usos agrícolas o para el consumo humano.

- Pérdida de diversidad genética: en la agricultura y ganadería tradicionales había un gran aislamiento geográfico entre los agricultores y ganadería tradicionales había un gran aislamiento geográfico entre los agricultores y ganaderos de unas regiones y otras y por eso, a lo largo de los siglos, fueron surgiendo miles de variedades de cada planta o animal domesticado.

Esto supone una gran riqueza genética que aprovechaban los que hacían la selección de nuevas variedades. Su trabajo consiste, en gran parte en cruzar unas variedades con otras para obtener combinaciones genéticas que unan ventajas de todas ellas.

En la actualidad cuando una variedad es muy ventajosa, la adoptan los grandes cultivadores de todo el mundo, porque así pueden competir económicamente en el mercado mundial. El resultado es que muchas variedades tradicionales dejan de cultivarse y se pierden si no son recogidas en bancos de semillas o instituciones especiales. Por otra parte, la destrucción de bosques, pantanos, etc., para dedicar esos terrenos a la agricultura provoca la desaparición de un gran número de ecosistemas. También la agricultura moderna ha introducido el monocultivo, práctica en la que enormes extensiones de terreno se cultivan con una sola variedad de planta. Esto supone un

empobrecimiento radical del ecosistema, con la consiguiente pérdida de hábitats y de especies.

- Deforestación: la agricultura moderna no es la principal responsable de esta deforestación, porque sus aumentos de producción se han basado mucho más en obtener mejores rendimientos por hectárea cultivada que en poner nuevas tierras en cultivo. La principal causa de destrucción del bosque es la agricultura de subsistencia de muchas poblaciones pobres de los países tropicales. Estos agricultores queman los bosques y la superficie así conseguida, gracias al abono de las cenizas, les permite obtener unas pocas cosechas, hasta que el terreno se empobrece tanto en nutrientes que se hace improductivo y deben acudir a otro lugar para quemar de nuevo otra porción de selva y repetir el proceso.
- Consumo de combustibles fósiles y liberación de gases invernadero: La agricultura moderna gasta una gran cantidad de CO<sub>2</sub>, con el consiguiente efecto invernadero. A la vez la quema de bosques y de pastizales es responsable muy principal del aumento de CO<sub>2</sub> y de óxidos de nitrógeno en la atmósfera.

**Industria Minera.** La minería es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, que contribuye en gran medida con el desarrollo económico del país, suministrando insumos a una serie de industrias (construcción, metalúrgica, siderúrgica, química y electrónica). La industria minera nacional es mayoritariamente metálica, y se dedica principalmente a la producción de cobre, zinc, plata y plomo.

La extracción de minerales y metales es una actividad importante en los países industrializados y en vías de desarrollo. En el siglo pasado, gran parte de la

minería se concentró en la extracción de metales tales como oro, plata, hierro, cobre, plomo, zinc, cromo, mercurio y otros que son necesarios para el desarrollo económico o industrial de la sociedad. Por lo tanto, la disposición de los desechos generados en la actividad minera implica un riesgo significativo para el ambiente. Debido al desarrollo y modernización en los procesos de extracción y procesamiento de los recursos minerales, así como a la generación de grandes cantidades de residuos provenientes de sus procesos, la industria minera en México ha generado por décadas una gran cantidad de desechos y sitios contaminados a lo largo de todo el país. La producción minera en México, se concentra en doce entidades: Chihuahua, Michoacán, Zacatecas, Durango, , Coahuila, Guanajuato, San Luis Potosí, Hidalgo, Sinaloa, Colima , Jalisco y Sonora (Sepúlveda y Trejo, 2002).

El enriquecimiento de minerales consiste en su separación de la ganga terrosa que los acompaña. Los procesos para su recuperación se dividen en pirometalurgia (proceso en seco y a través de calor) e hidrometalurgia (proceso húmedo). Los primeros, incluyen operaciones como calcinación, tostación, fusión, volatilización, electrólisis ígnea y metalotermia; mientras los procesos hidrometalúrgicos abarcan operaciones como lixiviación, purificación y/o concentración y flotación/precipitación. La flotación de minerales es el principal proceso para su concentración y busca enriquecer las especies minerales útiles de una mena mediante la eliminación de las especies o materiales sin valor; es una de las técnicas más antiguas para la recuperación de metales, superado únicamente por la fundición de yacimientos de alta ley. Durante el proceso, diversos reactivos químicos, como surfactantes catiónicos y xantatos, producen espumas que reducen la tensión superficial haciendo flotar algunos minerales, cuyas superficies son acondicionadas a formas hidrofóbicas. (Volke Sepúlveda et al., 2005). Los residuos que se generan en el procesos de recuperación y de concentración de minerales de plomo (Pb), plata (Ag), zinc (Zn), cobre (Cu), generalmente contienen sulfuros metálicos residuales como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ),

galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), y arsenopirita (FeAsS), que son la fuente de Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT). (Romero y Ruiz, 2010).

Como en ningún proceso de concentración se logra una recuperación de 100%, los desechos mineros (colas o jales) siempre contienen residuos del mineral, permitiendo su eventual recuperación a futuro. Sin embargo, era común que muchas empresas descartaran sus desechos en ríos o los dispusieran en grandes pilas (Volke Sepúlveda et al., 2005). Una de las mayores fuentes de contaminación de la industria minera son los Jales Mineros.

### **II.1.2 Jales Mineros**

Los residuos mineros, conocidos también como colas (tailings), relaves o jales mineros, son el producto de la trituración y molienda del mineral una vez que se han recuperado los metales comerciales mediante procesos físicos y químicos. La composición de estos jales mineros puede ser muy diversa en su naturaleza tanto química como mineralógica (Medel Reyes et al., 2008).

Los elementos presentes en los jales que pueden ocasionar problemas por su alta toxicidad con el arsénico, cadmio, cobre, plomo, mercurio, cromo, selenio y zinc. Algunos otros como el Fe y el Mn aunque representan un riesgo menor, se considera que podrían tener efectos adversos a la salud. Estos elementos potencialmente tóxicos que pueden estar presentes en presas de jales mineros, representan un riesgo ambiental por la posibilidad de lixiviación e incorporación a cuerpos de agua, así como la movilización a otros ecosistemas por dispersión eólica o hídrica (Medel Reyes et al., 2008).

En el 2010, Romero & Ruiz, realizaron un estudio geoquímico y mineralógico en jales de dos zonas mineras localizadas al sur y centro de México. Identificaron la composición mineralógica de los jales estudiados, los cuales contienen

elementos potencialmente tóxicos (EPT) como arsénico (140-3627 mg/kg), cadmio (0.5-434 mg/kg), plomo (148-10900 mg/kg), cobre (0.002-1.55%), zinc (0.021-3.86%) y hierro (2.4-35.7%). Por otro lado, las concentraciones totales de los otros EPT como bario, cromo, mercurio, plata, plomo, selenio, berilio, talio, níquel y vanadio son bajas e inferiores a las concentraciones totales que podrían representar un riesgo para el ambiente y la salud de acuerdo a la NOM-147.

Los jales mineros tienen las siguientes características: bajo pH, bajo contenido de materia orgánica, ausencia de estructura de suelo, baja retención de agua y concentraciones variables de metales pesados.

## **II.2 Metales**

Los metales son sustancias con características de brillo y que son buenos conductores de calor y electricidad; con excepción del mercurio, todos los metales son sólidos a temperatura ambiente. Son más o menos maleables (formación de láminas) y dúctiles (formación de alambres). La mayoría posee propiedades de dureza, con excepción de los alcalinos, que son muy suaves. Químicamente, estos tienden a perder electrones para formar iones positivos (cationes) (Volke Sepúlveda et al., 2005).

Un no metal es un elemento que no exhibe las características de un metal. La mayoría de los no metales son gases o sólidos. Los metaloides o semi metales son elementos que presentan propiedades de ambos grupos. En muchos aspectos, los metaloides se comportan como no metales, química y físicamente. Sin embargo, en su propiedad física más importante, la conductividad eléctrica, se parecen a los metales. Los metaloides tienden a ser semiconductores, pero conducen la electricidad en menor grado que los metales (Volke Sepúlveda et al., 2005).

En la Tabla I. Se muestran los principales elementos considerados como esenciales y tóxicos. El que un elemento sea considerado esencial o no depende de su participación en las reacciones bioquímicas. En este caso, el término esencial se aplica cuando un déficit medible en la dieta reduce el crecimiento y la vitalidad en un grado reproducible. Si aplicamos esta definición es posible que elementos reconocidos como tóxicos como As, Cd, Pb, sean necesarios en cantidades mínimas para el funcionamiento del metabolismo. Los elementos traza ocupan el 0.012% del peso del cuerpo (8.6 g), pero esta fracción tiene una función muy importante (Morton-Bermea., 2006).

Tabla I. Metales esenciales y metales tóxicos (Morton-Bermea, 2006).

<b>Metales esenciales</b>	<b>Metales tóxicos</b>
Zinc	Cadmio
Hierro	Níquel
Manganeso	Plomo
Cobre	Aluminio
Cobalto	Arsénico
	Mercurio

### II.2.1 Metales Pesados

En este grupo de metales pertenecen aquellos cuya densidad en forma elemental es igual o superior a  $5 \text{ g/cm}^3$  o que tienen un número atómico mayor a 20 (excluyendo los metales alcalinos y alcalinotérreos). Los metales pesados se han agrupado en oligoelementos o micronutrientes, también denominados *elementos traza*, los cuales son necesarios en pequeñas cantidades para el organismo, ya que intervienen en algunas funciones bioquímicas; entre ellos están: arsénico (As), boro (B), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn) (Tirado et al., 2015).

Los metales que se consideran tóxicos también pueden ser esenciales, debido a su participación en las reacciones bioquímicas por ejemplo: el cobre (Cu), hierro (Fe), cobalto (Co), zinc (Zn) y los metales tóxicos que no son esenciales

como el cadmio (Cd), plomo (Pb) y el arsénico (As).

### **II.2.2 Interacción de los Metales Pesados en Suelo**

La movilidad de un metal depende no sólo de su especiación química, sino de una serie de parámetros del suelo tales como pH, materia orgánica, carbonatos, minerales de la arcilla, etc. En general, la movilidad de los metales pesados es muy baja, quedando acumulados en los primeros centímetros del suelo, siendo lixiviados a los horizontes inferiores en muy pequeñas cantidades. La disponibilidad de un elemento depende también de las características del suelo en donde se encuentra. Los parámetros anteriores se describen a continuación (Galán Huertos y Romero Baena, 2008).

- pH: La mayoría de los metales tienden a estar disponibles a pH ácido porque son menos fuertemente adsorbidos, excepto As, Mo, Se y Cr, que son más móviles a pH alcalino.
- Textura: Los suelos arcillosos retienen más metales por adsorción o en el complejo de cambio de los minerales de la arcilla. Por el contrario, los suelos arenosos carecen de la capacidad de fijación y puede contaminarse el nivel freático.
- Mineralogía de arcillas: Cada mineral de la arcilla tiene unos determinados valores de superficie específica y de descompensación eléctrica. Cuanto mayor es la superficie activa de un filosilicato, mayores son sus posibilidades de adsorber metales. Este poder de adsorción será máximo en el punto de carga cero superficial. El punto de carga cero (PZC) se define como el valor del pH en el cual la carga neta total (externa e interna) de las partículas sobre la superficie del material adsorbente es neutra, es decir, el número de sitios positivos y negativos es igual (Amaringo Villa & Hormaza Anaguano, 2013).

- **Materia orgánica:** Reacciona con los metales formando complejos de cambio o quelatos. La adsorción puede ser muy fuerte que queden estabilizados, como el caso del Cu, o formen quelatos también muy estables, como con el Pb y Zn. En muchos casos se forman complejos organometálicos lo que facilita la solubilidad del metal, la disponibilidad y dispersión porque pueden degradarse por los organismos del suelo. Esto conduce a una persistencia de la toxicidad.
- **Capacidad de cambio:** El poder de intercambio catiónico depende del tipo de minerales de la arcilla, de la materia orgánica, de la valencia y del radio iónico hidratado del metal. A mayor tamaño y menor valencia, menos frecuentemente quedan retenidos.
- **Condiciones redox:** El potencial de oxidación-reducción es responsable de que el metal se encuentre en estado oxidado o reducido. Los diagramas Eh-pH se utilizan para mostrar la estabilidad de los compuestos metálicos y proporcionan un método fácil para predecir el comportamiento de los metales pesados frente a un cambio de las condiciones ambientales.

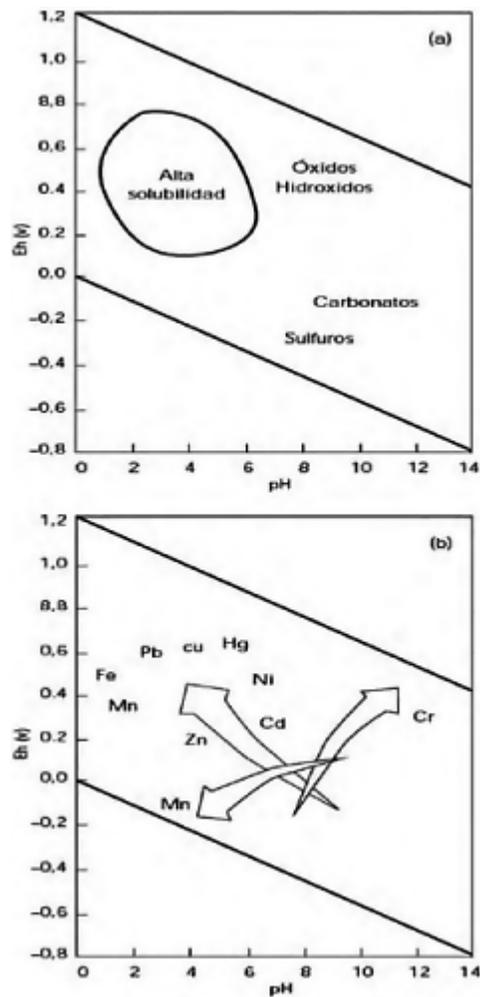


Figura 1. Solubilidad de metales pesados en función del pH y del Eh (en ausencia de materia orgánica disuelta o sólida) (a) Los principales minerales controlan la solubilidad de los metales pesados; (b) tendencia del incremento de la solubilidad (Galán Huertos & Romero Baena, 2008).

- Carbonatos: La presencia de carbonatos garantiza el mantenimiento de los altos pH, y en estas condiciones tienden a precipitar los metales pesados. El Cd y otros metales tienden a quedar adsorbidos por los carbonatos.

- Óxidos e hidróxidos de Fe y Mn. Tienen un importante papel en la retención de metales pesados y en su inmovilización. Se encuentran finamente diseminados en la masa del suelo por lo que son muy activos. Por su baja cristalinidad y pequeño tamaño de partícula, tienen una alta capacidad sorcitiva (absorción y adsorción) para metales divalentes, especialmente Cu y Pb, y en menor extensión Zn, Co, Cr, Mo, Ni y también As.
- Salinidad: El aumento de la salinidad puede incrementar la movilización de metales y su retención por dos mecanismos. Primeramente, los cationes Na y K pueden reemplazar a metales pesados en lugares de intercambio catiónico. En una segunda fase, los aniones cloruro y sulfato pueden formar compuestos más estables con metales tales como Pb, Zn, Cu, Cd y Hg. Por otra parte, las sales normalmente dan un pH alcalino.

La Especiación (partitioning) tiene como finalidad conocer la distribución de los elementos trazas existentes en una muestra sólida entre fracciones de distinta naturaleza. Existen tres tipos de especiación, la especiación química, funcional y operacional. La especiación química distingue el grado de oxidación del elemento, por ejemplo una especiación de As puede conducir a conocer su grado de oxidación,  $As^{+3}$  o  $As^{+5}$ . La especiación funcional determina la forma molecular en la que se encuentra el elemento, por ejemplo conocer su forma molecular como arseniato, sulfoarseniuro, etc. La especiación operacional determina si esta soluble, asociado a la materia orgánica o a oxi-hidróxidos de hierro (Galán Huertos y Romero Baena, 2008).

Los parámetros antes mencionados y la especiación del metal, son factores importantes que determinan la Biodisponibilidad de un metal, la cual se define como el grado en el que las sustancias químicas presentes en el suelo, pueden ser absorbidas o metabolizadas por receptores humanos o naturales, o también que puedan estar disponibles para interactuar con los sistemas biológicos. Una

fracción pequeña de una sustancia potencialmente contaminante de un medio es biodisponible. La biodisponibilidad de un elemento es función de la forma química en que se encuentra en el medio; y la capacidad de los organismos para absorberlo o ingerirlo. Estos elementos pueden ser acumulados en el organismo en concentración, cuando pasa esto, el compuesto puede almacenarse, transformarse, ser asimilado o degradado dentro del organismo, dependiendo del medio ambiente y el organismo (Segovia Caqueo, 2014).

### **II.2.2.1 Cobre**

Cobre (Cu) es el primer elemento en el grupo IB en la tabla periódica; el cual tiene un número atómico de 29, y un peso atómico de 63.54, y valencias de 1<sup>+</sup> y 2<sup>+</sup>. La abundancia promedio del Cu en la corteza terrestre es 68 ppm, en suelos es de 9 a 33 ppm; en las corrientes es de 4 a 12 µg/L; y en las aguas subterráneas es < 0.1 mg<sup>-L</sup>. El cobre se encuentra en su estado nativo, pero también se encuentra en muchos minerales, los más importantes son los que contienen compuestos de sulfuro (ej. calcopirita), pero también los que contienen óxidos y carbonatos. Es ampliamente utilizado en el cableado eléctrico, en los techos, diversas aleaciones, pigmentos, utensilios de cocina, tuberías y en la industria química. Las sales de cobre se utilizan en el suministro de agua para controlar crecimientos biológicos en depósitos y tuberías de distribución, también para catalizar la reacción de oxidación del manganeso. El cobre forma una serie de complejos en aguas naturales con ligandos inorgánicos y orgánicos. Entre las especies acuosas comunes son  $Cu^{2+}$ ,  $Cu(OH)_2$ , y  $CuHCO_3^+$ . La corrosión de las aleaciones que contienen cobre en los accesorios de las tuberías puede introducir cantidades mensurables de cobre en el agua en un sistema de tuberías (APHA/AWWA/WEF, 2012).

El cobre se considera un elemento traza esencial para las plantas y los animales. Algunos compuestos son tóxicos por ingestión o inhalación. La

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura recomendó que el nivel máximo para las aguas de riego sea 200 µg/L. Bajo la regla del plomo-cobre, el nivel de acción del percentil 90 del agua potable de la EPA de E.U es 1.3 mg/L (APHA/AWWA/WEF, 2012).

Los niveles altos de cobre pueden ser dañinos. Respirar altos niveles de cobre puede causar irritación en la nariz y garganta. La ingestión de altos niveles puede causar náuseas, vómitos y diarrea. Dosis muy altas de cobre pueden causar daños al hígado y riñones, e incluso puede causar la muerte (ATSDR, 2004).

Los microorganismos, su principal utilización es para reducir o eliminar el riesgo para el medio ambiente a través de la acumulación, degradación o transformación de productos químicos tóxicos y de otros desechos peligrosos. La ventaja de la utilización de microorganismos es la eliminación del contaminante mientras que las metodologías físicas o químicas solo cambian el sitio del contaminante, requiriendo confinarlo posteriormente (Bautista Hernández, 2008).

### **II.3 Microorganismos en el Suelo**

En el suelo se pueden encontrar una gran cantidad de organismos diferentes, de tamaño y funciones muy variable. Los cuales son fundamentales para el desarrollo de la vida en el planeta, que juegan un papel relevante en la formación y en la estructura del suelo y en la movilización de los nutrientes. A escala microscópica se encuentran bacterias, algas, protozoos y hongos, muchos de ellos realizan su ciclo biológico completo en el suelo, mientras que otros solo son habitantes ocasionales, o en determinadas fases (Soil y Es, 2012).

Cada tipo de organismo realiza una función específica. Las algas, son fotosintéticas, otros, como las cianobacterias, son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. Sin embargo, la mayoría de los organismos del suelo utilizan la materia orgánica o la mineral como fuente de nutrientes y energía. Muchos están especializados en romper la materia orgánica de plantas y animales, dando sustancias simples, inorgánicas, que pueden ser devueltas a la atmósfera o arrastradas con las aguas de drenaje o ser incorporadas al stock de reserva mineral o al complejo arcillo-húmico. Otros organismos establecen relaciones simbióticas con otros organismos vivos, como *Rhizobium*, cianobacterias, micorrizas, etc. (Soil y Es, 2012)

En el 2004, Sosa-escalante et al., clasificaron la biomasa microbiana del suelo de la siguiente forma:

**Bacterias:** poseen una gran variedad de funciones en el suelo. La descomposición de animales, plantas y residuos microbianos es llevada a cabo por bacterias heterótrofas. Estas bacterias tienden a ser los miembros más abundantes de la comunidad microbiana del suelo y su selectividad de los substratos varía grandemente de una especie de bacteria a otra. Las bacterias quimioautótrofas del suelo, juegan un papel importante en los ciclos de nutrimentos. La composición de la población bacteriana del suelo frecuentemente puede indicar las condiciones físicas y químicas del mismo. La presencia activa de una bacteria como *Clostridium*, es indicativa de condiciones anaeróbicas, ya sea en el suelo en su totalidad o bien en los micrositios. Ejemplos: *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*.

**Actinomicetos:** son saprófitos de vida libre, capaces de descomponer una gran cantidad de substratos carbonados. Es debido a su habilidad para degradar compuestos altamente recalcitrantes tales como quitina, celulosa y hemicelulosa, en condiciones particulares de valores altos de pH del suelo, lo que hace que los actinomicetos sean altamente especializados. Entre los actinomicetos del suelo se encuentran especies patógenas, como es el caso de

*Streptomyces scabies*. Muchos de los actinomicetos del suelo producen antibióticos como la estreptomicina y generalmente no constituyen una parte importante de la comunidad de microorganismos del suelo, sólo en condiciones severas y de gran estrés este grupo predomina en el suelo. Ejemplo: *Streptomyces*.

**Algas:** La población de algas del suelo, se ve restringida su distribución y actividad a las partes del suelo en las que penetra la luz solar. Por lo tanto la superficie del suelo y las grietas del mismo son las zonas de mayor actividad de las algas.

En general, en suelos de climas templados, las algas verdes son las más abundantes. En suelos tropicales sin embargo, las algas verde-azules son las más numerosas y de mayor importancia ecológica.

Debido a que las algas son fotoautótrofas, no dependen de materia orgánica preformada en el suelo, por lo que son de una importancia fundamental como colonizadores primarios de áreas desiertas expuestas a la luz solar. El papel de las algas como colonizadores, se ve reforzado por la producción de ácidos carbónicos como resultado de su metabolismo, lo cual acelera el intemperismo de los minerales y la formación de suelo, particularmente durante sus primeras etapas. Ejemplos: *Chlorella*, *Clamydomonas*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Pinnularia*, *Navicula*, *Heterothrix* *Heterococcus*.

**Protozoarios:** se restringen a ocupar los primeros 15 a 20 cm del suelo, debido a la gran cantidad de presas microbianas posibles de ser consumidas. Las actividades alimenticias de los protozoarios no se basan únicamente en la depredación de microorganismos, ya que pueden involucrarse en la descomposición primaria de la materia orgánica del suelo. Los protozoarios toman y procesan partículas orgánicas finas, tal como ocurre en el tracto digestivo de muchos animales, y juegan un papel importante en la descomposición de residuos celulolíticos. Ejemplos: *Cillia*, *Amoeba*,

*Paramecium, Flagellata.*

**Virus:** El suelo no es el hábitat natural de los virus y la única actividad que realizan es sobrevivir, comúnmente se encuentran recluidos en los espacios porosos pequeños. Los virus son parásitos obligados que requieren de la presencia de un hospedero para reproducirse. Aunado a lo anterior, el aporte en biomasa a la cantidad de biomasa total del suelo es insignificante.

**Hongos:** Son los dominantes en la microbiota del suelo. Los hongos poseen un amplio rango de funciones en el suelo, incluyendo su papel como simbioses de plantas, patógenos de plantas y animales, oligótrofos, e incluso carnívoros, sin embargo su papel más importante en el suelo desde el punto de vista ecológico, es la descomposición de la materia orgánica desde los azúcares simples y aminoácidos hasta polímeros muy resistentes como la lignina y complejos de ácidos húmicos del suelo. Gracias a su gran tolerancia a la acidez, comparado con las bacterias heterótrofas, la descomposición de la materia orgánica en suelos ácidos es en su mayoría realizada por hongos. El papel de los hongos como simbioses, específicamente en micorrizas, es de gran importancia para el desarrollo de plantas, por su papel en la toma de nutrimentos, resistencia a enfermedades y relaciones hídricas favorables. Ejemplos: *Glomus, Fusarium, Gigaspora, Trichoderma, Pythium, Penicillium.*

El género *Aspergillus* es un hongo filamentoso saprofito que desempeña un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde sobrevive y se desarrolla sobre esta materia en descomposición. Es uno de los hongos más abundantes en la naturaleza. Se puede encontrar en cualquier ambiente, incluido el hospitalario: suelo, vegetación en descomposición, material de construcción, polvo doméstico, etc. Se reproduce por esporas cuya germinación produce hifas (Buendía, 2011).

En el 2018, Villalba-Villalba et al., aislaron un hongo filamentoso de unas muestras de suelo de una mina activa ubicada en el estado de Sonora, el hongo

aislado fue *Aspergillus Niger* Tiegh, el cual tuvo índices de tolerancia promedio de 0.89, 1.03, 1.05, 0.94, 0.88, 0.87 y 1.27 a 1mM de las sales de Cd, Hg, Pb, Ag, Cu, Zn y Cr después de siete días de crecimiento a 28 °C. La concentración mínima inhibitoria (CMI) indico que el mercurio, el cobre y la plata fueron los más tóxicos para *A. niger*, ya que el CMI fue de 5 y 10 mM de cada sal metálica.

#### **II.4 Microorganismos Metalotolerantes**

Dentro de la diversidad de microorganismos, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a los metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos (Vullo, 2003).

Los microorganismos influyen directamente en el destino de los metales en el medio ambiente y puede proporcionar la clave para disminuir la contaminación ya existente. En respuesta a la presencia de los metales en el medio ambiente, los microorganismos han desarrollado mecanismos ingeniosos de resistencia al metal y detoxificación. Algunos mecanismos de resistencia son plásmidos codificados y tienden a ser específicos para un determinado metal. Otros son generales que confiere resistencia a una variedad de metales (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

Muchos microorganismos producen polisacáridos extra celulares que se unen fuertemente a los metales, estas se les conoce como las sustancias poliméricas extracelulares (EPSs). Estas sustancias movilizan o inmovilizan los metales tóxicos y los procesos son importantes en el ciclo del metal. Los exopolímeros

microbianos son particularmente eficientes en el enlace de metales pesados, como plomo, cadmio, uranio y cobre. La interacción con los iones metálicos es generalmente considerada como una consecuencia directa por la presencia y la carga funcional negativa de los grupos presentes en el exopolímero. Estos grupos incluyen, fosfato, hidroxilo, succinil y ácido urónico (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

Otro exopolímero son los sideróforos, los cuales son pequeñas moléculas de péptidos no ribosomales muchas de ellas, de alta afinidad por el hierro que actúan de manera específica como agentes quelantes para secuestrar hierro en presencia de otros metales y reducirlo a hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ), una forma mucho más soluble y aprovechable para su nutrición. Los sideróforos bacterianos han despertado gran interés en los últimos años debido al potencial que tienen para el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas y por constituir un mecanismo de promoción de crecimiento en rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Aguado-Santacruz et al., 2012; Gomathy y Sabarinathan, 2010).

Por ejemplo, la producción del sideróforo decrece la toxicidad del cobre para la cianobacteria *Anabaena sp.*, pero aumenta la toxicidad del cobre a *Bacillus megaterium*. Se sabe que la presencia de metales distintos al hierro estimula la formación de sideróforos en varias bacterias y hongos (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

En 1995, Miller definió a los biosurfactantes como una clase de compuestos que son producidos por algunos microorganismos que en varios casos son excretados. Recientemente, los biosurfactantes han sido investigados por su capacidad de formar complejos con los metales como cadmio, plomo y zinc. El complejo biosurfactante puede aumentar la solubilidad aparente de los metales, este no es tóxico para las células. Existen evidencias que el producto biosurfactante puede ser aislada de ambientes contaminados o no contaminados (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

Mecanismos de resistencia dependientes del metal:

Las Metalotioneínas (MTs) constituyen una familia de metaloproteína ricas en cisteína, generalmente de bajo peso molecular. Las MTs tienen la capacidad de unirse a metales pesados tanto fisiológicos (zinc y cobre) como xenobióticos (como cadmio, mercurio y plata), a través de los grupos tiol(-SH) de sus residuos de cisteína. Su producción es inducida por la presencia de metales, y su función principal es la detoxificación. Las metalotioneínas son como proteínas aisladas de *Cyanobacterias*, *Syneococcus spp* así como *E. Coli* y *Pseudomonas putida*. Las MTs tienen gran afinidad por metales como el cadmio, zinc, plata, mercurio y cobre. Estas se encuentran en muchos microorganismos, plantas, algas, levaduras y algunos hongos (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

Metilación de metales: La metilación de los metales se considera un mecanismo de resistencia dependiente del metal porque solo participan ciertos metales. Se conoce que la metilación de metales elimina cantidades significativas de metales de aguas superficiales, aguas residuales y suelos contaminados (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

Mecanismos de Biosorción: Los mecanismos de biosorción pueden dividirse en: dependiente del metabolismo y no dependiente del metabolismo. El transporte del metal a través de la membrana celular produce acumulación intracelular, que es dependiente del metabolismo de la célula. A menudo se asocia con un sistema de defensa activo del microorganismo, que reacciona en presencia del metal tóxico. Durante la biosorción no dependiente del metabolismo, la captación del metal es por interacción físico-química entre el metal y los grupos funcionales presentes en la superficie de la célula microbiana (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

La pared celular de la biomasa microbiana esta compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas y lípidos, los cuales tienen abundantes grupos de unión

a metales tales como grupos carboxilo, sulfatos, fosfato y amino. Este tipo de biosorción no dependiente del metabolismo es relativamente rápido y puede ser reversible (Ercole et al., 1995; Gomathy y Sabarinathan, 2010; Kuyucak y Volesky, 1988).

Procesos extracelulares: Los ácidos orgánicos o inorgánicos producidos por microorganismos, incluidos *Thiobacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium* y *Aspergillus*, son capaces de extraer metales de sustratos sólidos. Los metales tóxicos se pueden movilizar en condiciones anaeróbicas ya que se precipitan conjuntamente con óxidos de hierro. Este puede ser un proceso importante, ya que la co-precipitación de metales tóxicos con hierro férrico es un tratamiento ampliamente utilizado para flujos de desechos de alto contenido de metal (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

Acumulación intracelular: La concentración de metales dentro de las células bacterianas y otras células microbianas puede ser el resultado de la interacción con los ligandos de superficie seguida de un transporte lento hacia la célula. Esta puede ser una forma importante de detoxificación o un medio para incorporar metales específicos en enzimas (ej. Cu y Zn). La asimilación bacteriana de metales puede ser importante en la detoxificación, la función enzimática y las características físicas de la célula. Se cree que los ligandos extracelulares o ligados a la pared celular unen metales tóxicos. Estos ligandos transportan los metales complejos a través de la pared celular en un paso de transporte lento. Los metales se liberan dentro de la célula, se incorporan en las vías bioquímicas o quedan atrapados en una forma inactiva por complejación con otro ligando de alta afinidad (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

Intercambio iónico: Las paredes celulares de microorganismos contienen polisacáridos e intercambian iones de metal bivalente con los contra iones de los polisacáridos. Por ejemplo, los alginatos de algas marinas se presentan como sales de potasio ( $K^+$ ), sodio ( $Na^+$ ), calcio ( $Ca^+$ ) y magnesio ( $Mg^{2+}$ ). Estos iones pueden intercambiarse con iones como cobre ( $Cu^{2+}$ ), cadmio ( $Cd^{2+}$ ) y

zinc ( $Zn^{2+}$ ), lo que resulta en la biosorción de los metales pesados. La eliminación del metal de la solución también puede tener lugar mediante la formación de complejos en la superficie celular después de la interacción entre el metal y los grupos activos (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

**Precipitación:** La precipitación puede ser dependiente del metabolismo celular o independiente de él. En el primer caso, la eliminación del metal de la solución a menudo se asocia con el sistema de defensa activo de los microorganismos. Reaccionan en presencia de compuestos productores de metales tóxicos, que favorecen el proceso de precipitación. En el caso de la precipitación independiente, puede ser una consecuencia de la interacción química entre el metal y la superficie de la célula (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

**Complejación:** La eliminación del metal de la solución también puede tener lugar mediante la formación de complejos en la superficie celular después de la interacción entre el metal y los grupos activos. Se descubrió que la complejación es el único mecanismo responsable del calcio, magnesio, cadmio, zinc, cobre y mercurio por *Pseudomonas Syringae*. Los microorganismos también pueden producir ácidos orgánicos (por ejem. Ácidos cítrico, oxálico, gluónico, fumárico, láctico y málico), que pueden quelar metales tóxicos dando como resultado la formación de moléculas metalo-orgánicas. Estos ácidos orgánicos ayudan en la solubilización de compuestos metálicos y su lixiviación de sus superficies. Los metales pueden ser biosorbidos o complejados por grupos carboxilo encontrados en polisacáridos microbianos y otros polímeros (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

**Transformación y volatilización de metales:** Los experimentos de cultivo puro han demostrado que muchas bacterias y varios hongos tienen la capacidad de metilar mercurio. Sin embargo, las bacterias sulfato reductoras (SRB) son las más significativas. La metilación del arsénico por hongos se ha estudiado ampliamente como resultado del envenenamiento humano por transformaciones fúngicas de arsénico en pinturas. El trabajo más reciente se

ha ocupado de la transformación y la movilización en sedimentos y suelos. La importancia de la biometilación no puede ser exagerada debido a las posibles consecuencias para la salud de las altas tasas de metilación (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

## **II.5 Biología Molecular**

La biorremediación tiene una gran aceptación como una estrategia bastante efectiva para la recuperación de suelos contaminados, sin embargo la falta de información sobre los factores que rigen el funcionamiento metabólico de las comunidades microbianas en los ambientes contaminados, hace que los procesos de biorremediación no tengan resultados predecibles, por esto las técnicas moleculares que se basan en el estudio del ADN permiten la identificación de numerosos genes catabólicos y con esto se abran nuevas oportunidades en el desarrollo de los procesos de biorremediación (Morelli et al., 2015).

Ante la inminente necesidad de la identificación de microorganismos en muestras ambientales para entender las comunidades microbianas en sistemas biológicos con usos específicos en el tratamiento biológico y biorremediación se utilizan las técnicas de biología molecular que permiten estudiar la diversidad taxonómica y estructura espacial de comunidades microbianas, ya que brindan la posibilidad de identificar poblaciones microbianas específicas en su hábitat natural (sin necesidad de cultivarlas) generando resultados confiables y en corto tiempo.

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están

integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Alejos Velázquez et al, 2014).

Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Alejos Velázquez et al., 2014). Otra de las técnicas utilizadas es la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE), la Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) y la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), las cuales son utilizadas con fines taxonómicos (Cárdenas et al., 2003).

Este conocimiento es útil en Ingeniería, ya que al conocerse los cambios generados en la composición microbiana se pueden deducir los parámetros de funcionamiento del sistema. Por lo tanto estas técnicas generan información taxonómica y filogenética relativamente precisa sobre los microorganismos predominantes en el sistema (Cárdenas et al., 2003).

La técnica FISH puede complementar las otras si se desea estudiar un microorganismo en particular, ya que se basa en la detección y localización de secuencias específicas de ADN o ARN en estructuras biológicas situadas sobre un portaobjetos. Al ser una técnica exclusivamente taxonómica, se ha implementado para conocer la presencia de un determinado microorganismo (Cárdenas et al., 2003).

## CAPITULO III METODOLOGIA

### III.1 Diagrama Experimental

En la Figura 2 se presenta el diagrama general de la experimentación.

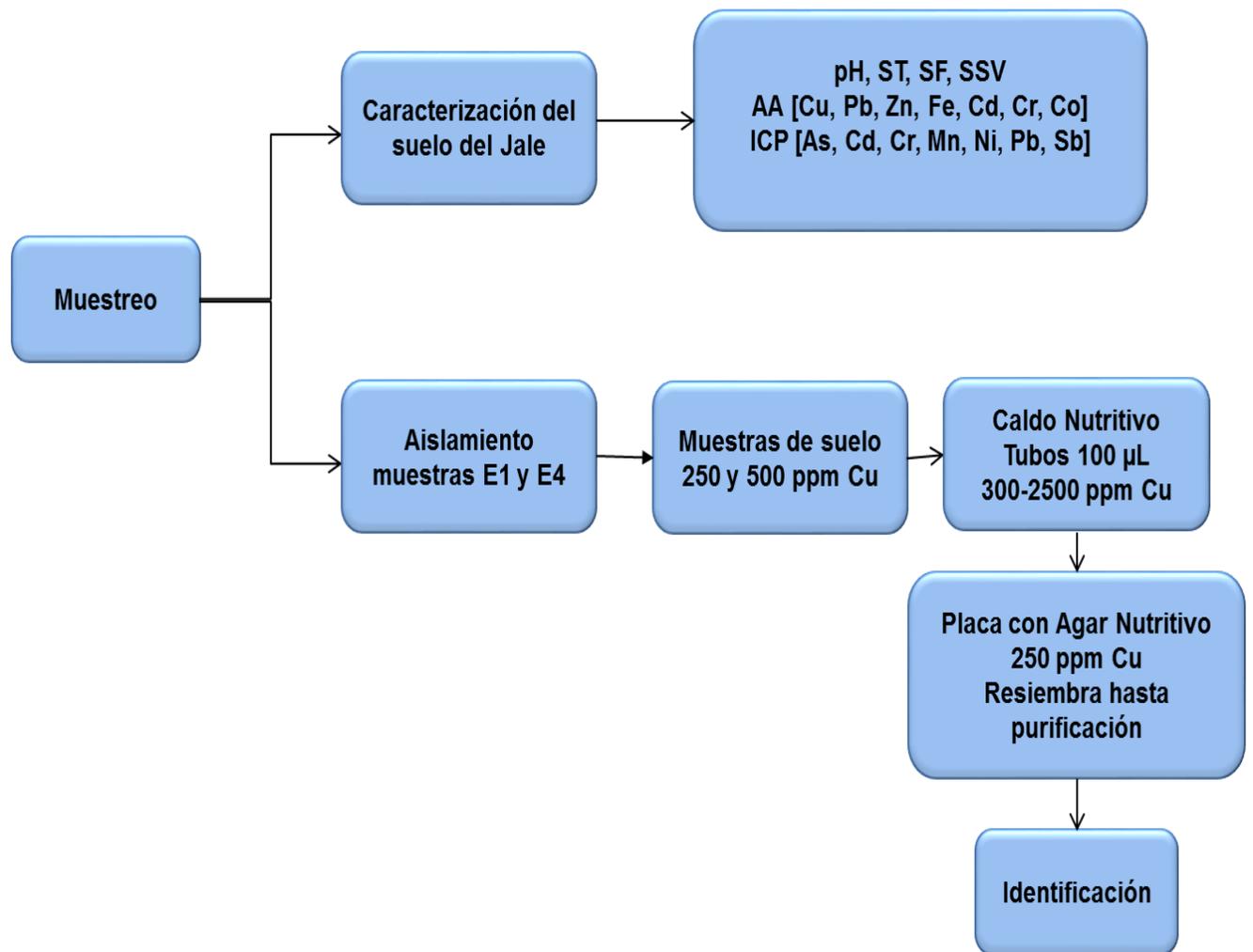


Figura 2. Metodología Experimental

### III.2 Muestreo

Se recolectaron cinco muestras de suelo de un jale abandonado en Nacozari de García, Sonora; en bolsas microbiológicamente estériles para su transporte al laboratorio de Biorremediación de la Universidad de Sonora para su posterior análisis.

Las muestras se nombraron como estación E<sub>1</sub> localizada en N 30° 21.335', W 109° 41.054', E<sub>2</sub> localizada en N 30° 21.335', W 109° 41.054', E<sub>4</sub> localizada en N 30° 21.409', W 109° 40.976', E<sub>5</sub> localizada en N 30° 21.409', W 109° 40.956', E<sub>6</sub> localizada en N 30° 21.409', W 109° 40.956'.



Figura 3. Localización de las estaciones Fuente: Google Earth.

### **III.3 Caracterización de las muestras del Jale**

Para la caracterización de los suelos de los jales, se determinó el pH, sólidos suspendidos totales (ST), sólidos fijos (SF) y sólidos suspendidos volátiles (SSV), la concentración de los metales presentes en los suelos se hizo por espectrofotometría de absorción atómica (AA) y plasma de acoplamiento inductivo ICP. A continuación se describe la metodología que se utilizó.

#### **III.3.1 Medición de pH**

El pH del suelo puede afectar considerablemente la actividad microbiana. El crecimiento de muchos microorganismos normalmente es máximo dentro de un intervalo de pH entre 6 y 8, se observó que algunos hongos tienen regiones de crecimiento óptimo a un pH menor que 5 (Eweis et al., 1999).

Se realizó la medición del pH con un potenciómetro Cole Parmer Digi-Sense. Modelo 5938-10. Para disolución de cada muestra se pesó 0.5 gramos y se agregaron 10 mL de agua destilada y agitando para homogenizar.

#### **III.3.2 Técnica de Sólidos**

Los sólidos totales, son el residuo que queda en el recipiente después de la evaporación de una muestra y su posterior secado en un horno a una temperatura definida. Estos sólidos totales incluyen a los sólidos totales suspendidos, los cuales son la porción de sólidos totales retenidos por un filtro y también incluyen a los sólidos totales disueltos, los cuales es la porción que pasa a través de un filtro.

Los sólidos fijos, es el residuo de sólidos totales, suspendidos o disueltos después del calentamiento a sequedad durante un tiempo específico a una temperatura determinada. La pérdida de peso en la ignición se denomina sólidos volátiles, estos es una forma indirecta de medir la cantidad de materia

orgánica o biomasa siguiendo el protocolo descrito en (APHA/AWWA/WEF, 2012).

El crisol debidamente limpio se introduce a la mufla a una temperatura de 550°C por media hora, posteriormente se deja enfriar en el desecador para después registrar el peso como “peso crisol”. Se pesa 1 gramo de muestra y se anota como “peso muestra”, que en este caso es suelo. Posteriormente se colocan los crisoles en el horno a una temperatura de 100°C por 24 horas aproximadamente, se deja enfriar en el desecador y el peso se anota como “peso a 100°C”, el último paso es colocarlo a la mufla a 550°C por 1 hora y anotar el peso como “peso a 550°C”. Cada muestra se hizo por triplicado.

Las ecuaciones 1,2 y 3 muestran como calcular los sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos fijos y sólidos suspendidos volátiles respectivamente.

*Sólidos suspendidos totales:*

$$\frac{\text{Peso a } 100^{\circ}\text{C} - \text{Peso del Crisol}}{\text{Peso de la muestra}} = \frac{gST}{g} \quad \text{Ec. 1}$$

*Sólidos Suspendidos Fijos:*

$$\frac{\text{Peso a } 550^{\circ}\text{C} - \text{Peso del Crisol}}{\text{Peso muestra}} = \frac{gSF}{g} \quad \text{Ec. 2}$$

*Sólidos Suspendidos Volátiles:*

$$ST - SF = \frac{gSSV}{g} \quad \text{Ec. 3}$$

### **III.3.3 Determinación de la concentración de los metales presentes en los suelos por espectroscopia de absorción atómica (AA)**

La espectroscopia de absorción atómica (AA), tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. Esta radiación es absorbida selectivamente por átomos que tengan niveles energéticos cuya diferencia en energía corresponda en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la Ley de Beer, que relaciona esta pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos absorbentes (Rocha Castro, 2000).

Es una técnica para determinar la concentración de un elemento metálico presente en la muestra, para esto se realizó la digestión ácida de los suelos:

- 1.- Se pesan 0.5 gramos de muestra de suelo y se le agrega 15 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado o agua regia, después  $\text{KClO}_3$ , cuando la muestra ya no tenga vapores, y se llevan a resequedad.
- 2.- La muestra se recoge con 20 mL de  $\text{HNO}_3$  y se deja en la plancha por 10 minutos.
- 3.- Se le agrega agua destilada hasta llegar a un volumen de 50 mL y se deja de 5-10 minutos en la estufa, se dejan enfriar para aforar.

Las muestras líquidas se llevaron a leer en el equipo *Perkin Elmer precisely AAAnalyst 400 Atomic Absorption Spectrometer*. Siguiendo el protocolo recomendado por (Hayat et al., 2002).



Figura 4. Equipo de Espectroscopia de Absorción Atómica

### **III.3.4 Determinación de la concentración de los metales presentes en los jales por plasma de acoplamiento inductivo (ICP)**

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP), es también conocido como espectrometría de emisión atómica (ICP-AES) o espectrometría de emisión óptica (ICP-OES), se basa en la medición a una longitud de onda, que es altamente selectiva para un elemento específico (Wiel, 2003). El análisis de ultrasónico spray se utiliza cuando la concentración es demasiado baja del elemento a analizar en la cámara, por lo tanto se eleva el límite de detección instrumental.

La preparación de las muestras de sedimentos del jale, se realizó mediante una extracción previa con agua acidificada a pH 5.5, el agua acidificada es  $\text{H}_2\text{O} + \text{HNO}_3$  (PECT). Posteriormente la mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, se centrifugó y por último se utilizó un filtro con una porosidad de  $0.45 \mu\text{m}$  como lo indica la NOM-053-SEMARNAT-1993.

Los metales a determinar por este método son: arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), manganeso (Mn), níquel (Ni), plomo (Pb) y estaño (Sb).

### **III.4 Aislamiento de Microorganismos Metalotolerantes**

Para el aislamiento de los microorganismos presentes en las muestras de los jales, se utilizó un medio general como es el caldo nutritivo.

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL, se prepararon 100 mL de caldo nutritivo se esterilizó en autoclave y se agregaron 10 g de sedimento a cada matraz, se añadió 250 y 500 ppm de Cu respectivamente para cada matraz, el pH se ajustó entre 5 y 6 para evitar la precipitación del metal. Posteriormente se incubó en una incubadora *Shaker Incubator CVP-500 CScientific*® a 100 rpm y 30°C por 36 horas. Estas pruebas se realizaron por duplicado con su respectivo blanco.

#### **III.4.1 Determinación de la tolerancia del microorganismo al metal.**

Los microorganismos tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del metal, para determinar la tolerancia se utilizó la técnica reportada por Gómez D'Angelo et al; 2001.

La preparación de los tubos consistió en tener un volumen final de 5 mL, que contenía medio de cultivo y una concentración específica del metal, que fue desde 300 a 2500 ppm de Cu, estas pruebas se realizaron por duplicado con su respectivo blanco. Se seleccionó el tubo que contenía una concentración de 1200 ppm, para posteriormente sembrar en placa.

Para pasar de los tubos a las placas, se le agregó 100 µL del tubo 1200 ppm Cu, se distribuyó con la espátula de Drigalski o con varilla de vidrio estéril en forma de L, se colocaron las placas en una incubadora estacionaria *Thermo Scientific™ Lindberg/Blue M™, Modelo GI200A-1* a una temperatura de 30 °C por 48 horas.

La resiembra de las placas se hizo por la técnica de estría como se muestra en la Figura 3, que consiste en obtener colonias separadas a partir de un inóculo.

Esta técnica consiste en tomar una caja petri en la palma de la mano y ligeramente inclinada; con la mano contraria, se manipula el asa previamente esterilizada por flameado directo a la llama de un mechero y con ella se recoge el material del cultivo, para después colocarlo en un área periférica de la caja haciendo movimientos circulares para homogenizar el inóculo. El asa debe ser nuevamente flameada en el mechero y enfriar en un lado del agar. Posteriormente se hace una estría empezando por la primera y arrastrando los microorganismos hacia el extremo contrario del agar procurando que las estrías queden con una buena distancia de separación entre cada una de ellas (Rojas-Trivi, 2011).

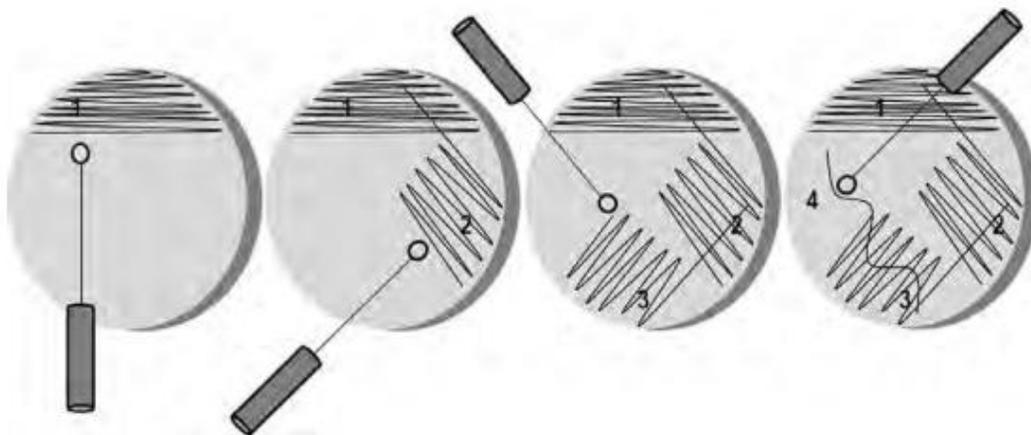


Figura 5. Técnica por Estría (Rojas-Trivi, 2011).

En el aislamiento, cuando hay presencia de hongos se utilizó la técnica de punción central, la cual consiste en cortar un trozo del hongo previamente seleccionado con todo y agar, el cual se pica en el centro del medio de cultivo con asa estéril, se incuba de 24 a 48 horas a una temperatura de 30°C (Rozo, 2009). En la Figura 4 se muestra el diagrama de la técnica de punción central. Se hicieron resiembras hasta obtener un cultivo puro.

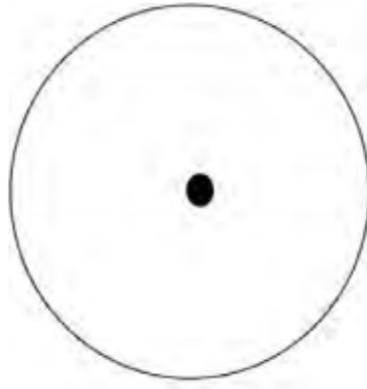


Figura 6. Técnica de punción central.

### **III.5 Identificación de Hongos Metalotolerantes**

Una vez aislado el hongo se preparó una placa Petri para su envío al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional Unidad Reynosa Tamaulipas. La identificación del hongo se realizó utilizando el método de los espaciadores internos transcritos y/o dominios ITS1/ITS4 y el análisis de secuenciación se realizó con el alineamiento de secuencia según la página electrónica: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

## CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1 Caracterización de las muestras del Jale

#### IV.1.1 Medición de pH

El pH es un factor importante en la biodisponibilidad de los metales pesados, a un pH bajo, por lo general, los metales son móviles en forma de especies iónicas libres o como órgano-metales solubles. Mientras que a un pH alcalino forman carbonatos o fosfatos que por lo regular son minerales insolubles (Covarrubias et al., 2015).

En la Tabla II se muestran los resultados de la medición del pH del suelo de los Jales. De acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000, esta establece que un suelo ácido es aquel con pH menor a 7.0 originado por la presencia de iones activos de hidrógeno y/o aluminio. El valor del pH disminuye a medida que aumenta la actividad de esos dos iones. Los resultados muestran que todas las muestras del suelo de los jales presentaron valores de pH ácidos, y se puede observar que el suelo más ácido es el de la estación E4.

Tabla II. Medición del pH de las estaciones muestreadas.

Muestra	pH
E <sub>1</sub>	3.11
E <sub>2</sub>	2.35
E <sub>4</sub>	2.01
E <sub>5</sub>	3.34
E <sub>6</sub>	3.23

Generalmente, la mayoría de las bacterias pueden crecer dentro de un margen de pH de su medio, manteniendo al mismo tiempo su pH interno óptimo prácticamente constante. Respecto al margen normal de pH en donde se

desarrolla el crecimiento de las bacterias, las cuales se pueden clasificar en:

-Neutrófilas: pH óptimo en torno a la neutralidad, valores entre pH 5.5 y 8.

-Acidófilas: crecimiento normal entre pH 0 y 5.

-Alcalófilas: crecimiento pH 8.5 y 11.5. (Iáñez, 2005)

La mayoría de los hongos tienen un rango muy amplio de tolerancia al pH. Los cuales pueden desarrollarse en medios relativamente ácidos, así como en medios bastante alcalinos. El rango de pH para la gran mayoría de los hongos varía de 2.0 a 9.0, pero casi todos crecen mejor en un pH ácido. El pH óptimo se encuentra alrededor de 5.6 (García Cortés, 1995).

La mayoría de los metales están disponibles en fase soluble a pH ácidos, para la remoción de estos metales del medio contaminado utilizando biomasa viva, se deben utilizar microorganismos acidófilos, para que no afecte su crecimiento y por lo tanto, los microorganismos capten el metal a estas condiciones. Uno de estos microorganismos es *Thiobacillus ferroxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*, se utilizan en la biolixiviación para la solubilización de Cu. Las bacterias del género *Thiobacillus* son microorganismos acidófilos, es decir, requieren un pH de 2.5 para crecer en condiciones óptimas, lo cual es adecuado para mantener a los metales en solución (Madigan, Martinko, & Parker, 2003; Vullo, 2003).

En el 2002, Díaz *et al.*, aislaron dos hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros de una mina de Zimapán, Hidalgo, los cuales identificaron a *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*, estos se desarrollan a 500 ppm de plomo y zinc, por otro lado, se encontró que son tolerantes a 200 ppm de cobre y plata, pero no crecen en presencia de cadmio, arsénico y mercurio. En el 2018, Villalba-Villalba *et al.*, aislaron *Aspergillus niger* a partir de desechos mineros, el cual es tolerante a varios metales pesados. En la literatura se han reportado gran variedad de hongos como bioadsorbentes naturales de diferentes metales. En este trabajo se aisló *Aspergillus australiensis* de jales mineros abandonados de Nacoziari para su posterior aplicación en la

biorremediación de los jales mencionados

#### IV.1.2 Técnica de Sólidos

La determinación de la biomasa es una de las variables más importantes de un bioproceso, ya que nos lleva a la comprensión de la eficiencia del proceso. Es una variable clave para establecer tasas de producción, de consumo de nutrientes y el cálculo de los balances de masa de un proceso biológico (Arnáiz et al., 2000).

Los métodos gravimétricos determinan la cantidad total de biomasa presente en una muestra, la cual puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen, ya sea como sólidos suspendidos totales (SST) o sólidos suspendidos volátiles (SSV). La determinación de la biomasa incluye tanto microorganismos muertos, material inerte, polímeros extracelulares como materia orgánica adsorbida (Arnáiz et al., 2000).

En la Tabla III se muestran los resultados de los sólidos

Tabla III. Cuantificación de sólidos de las estaciones muestreadas.

Muestra	ST (g/g)	SF (g/g)	SSV (g/g)
E <sub>1</sub>	0.8188	0.7962	0.0226
E <sub>2</sub>	0.9403	0.9186	0.0216
E <sub>4</sub>	0.8833	0.8559	0.0274
E <sub>5</sub>	0.8774	0.857	0.0204
E <sub>6</sub>	0.9656	0.9433	0.0225

Los resultados de la Tabla III nos muestran que la estación E4 es la que tiene mayor cantidad de materia orgánica, lo que indica que el pH es un factor importante en el crecimiento de biomasa en los suelos, ya que esta estación coincide con la que tiene el pH más ácido.

### IV.1.3 Concentración de los metales presentes en los jales por espectroscopia de absorción atómica (AA)

Los resultados de la concentración de los diferentes metales presentes de las estaciones se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Concentración de los metales presentes en las estaciones.

	Cu (ppm)	Pb (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cd (ppm)	Cr (ppm)	Co (ppm)
E <sub>1</sub>	5.82	0.0	3.57	4.98	0.033	0.916	0.179
E <sub>2</sub>	1.5	0.0	0.89	1.88	0.019	1.055	0.027
E <sub>4</sub>	5.70	0.0	2.75	4.24	0.033	1.201	0.0173
E <sub>5</sub>	5.50	0.0	1.39	3.76	0.029	0.978	0.085
E <sub>6</sub>	3.80	0.0	0.18	2.86	0.049	1.227	0.0142

Las muestras E<sub>1</sub> y E<sub>4</sub> fueron las seleccionadas, ya que son las que contienen una mayor concentración de cobre. De acuerdo a la concentración obtenida de cobre, se realizó el diagrama de especiación en base al programa Medusa®. El análisis de las Figuras 7 y 8, nos muestran que a un pH aproximadamente menor de 6, el cobre esta soluble como ión Cu<sup>2+</sup> y por lo tanto, a valores mayores de pH 6, precipita como hidróxidos de cobre. De acuerdo a los pH registrados en la Tabla II de las estaciones muestreadas nos indica que el cobre presente está en la forma soluble por lo que se encuentra biodisponible y puede ingresar a las cadenas tróficas.

$$[\text{Cu}^{2+}]_{\text{TOT}} = 91.60 \mu\text{M}$$

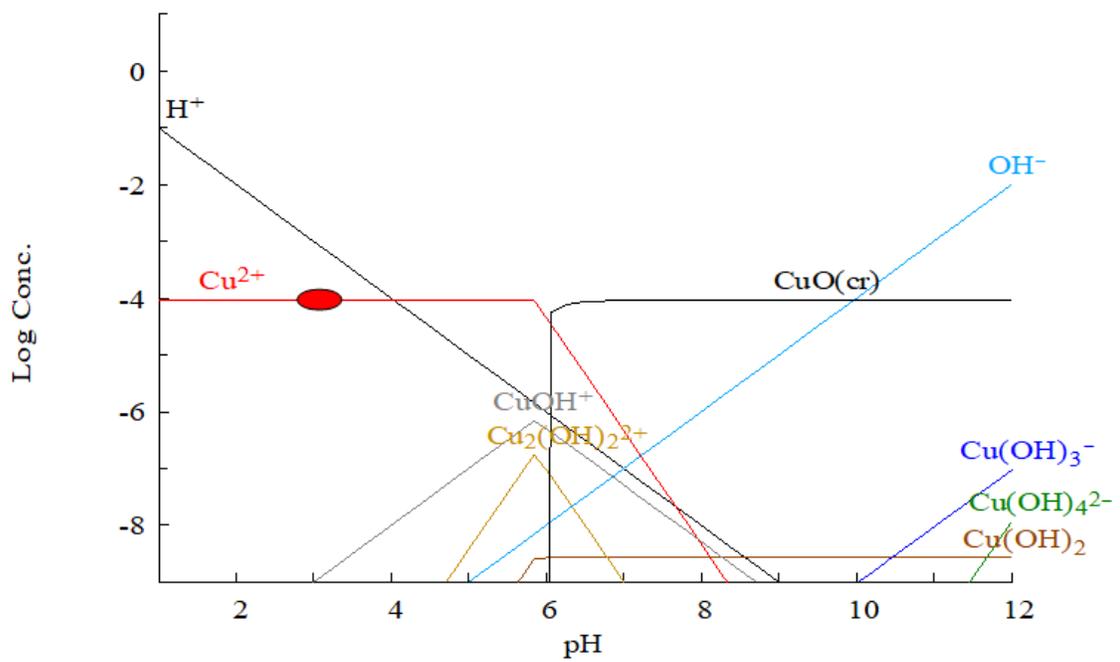


Figura 7. Especiación del cobre en la estación E1 a una concentración de  $91.60 \mu\text{M}$  ( $5.82 \text{ mg/L}$ ). Estimados con el programa Medusa  $\text{\textcircled{R}}$ . El ovalo rojo indica el pH del sitio de muestreo.

$$[\text{Cu}^{2+}]_{\text{TOT}} = 89.71 \mu\text{M}$$

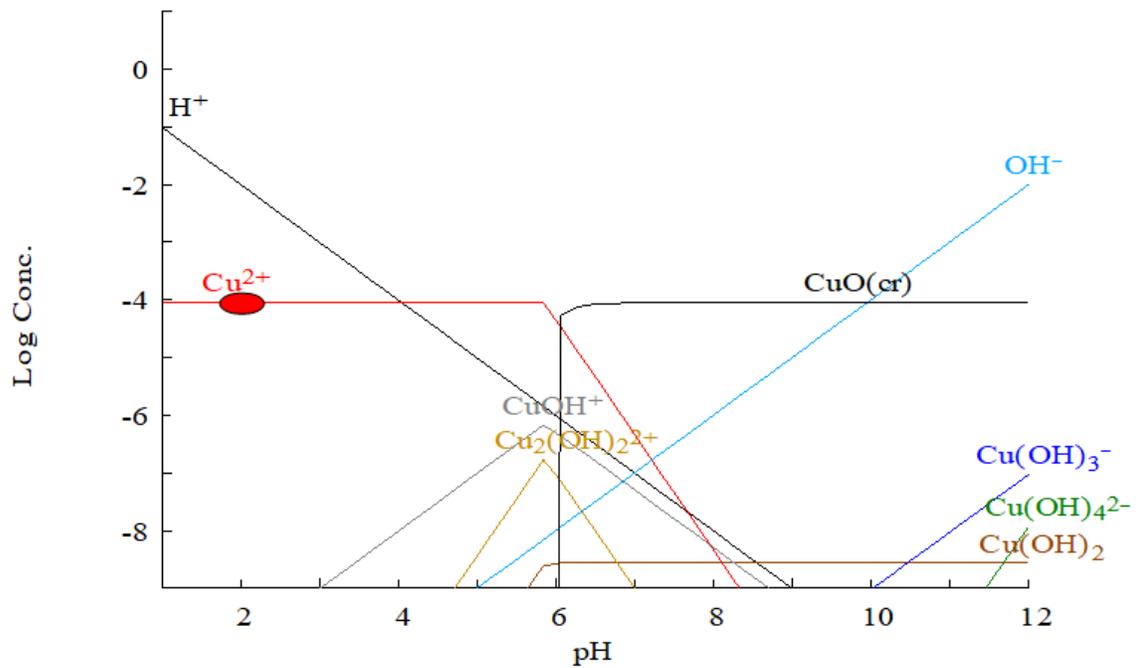


Figura 8. Especiación del cobre en la estación E4 a una concentración de 89.71  $\mu\text{M}$  (5.70 mg/L). Estimados con el programa Medusa <sup>®</sup>. El ovalo rojo indica el pH del sitio del muestreo.

#### IV.1.4 Concentración de los metales presentes en los jales por plasma de acoplamiento inductivo (ICP)

La extracción previa con agua acidificada a pH 5.5 (PECT), se hizo con el propósito de simular que ocurriría si llueve en el sitio de la localización de las muestras, en conclusión este análisis se hizo para conocer la concentración disponible o móvil del metal en esas circunstancias.

El término < LOD que aparece en las Tablas V y VI, se refiere a que el equipo no detectó la concentración del metal debido a que está por debajo del límite de detección instrumental.

Tabla V. Resultados del análisis de las estaciones E2 y E3 por ICP de la muestra cámara.

Muestra	As (mg/l)	Cd (mg/l)	Cr (mg/l)	Mn (mg/l)	Ni (mg/l)	Pb (mg/l)	Sb (mg/l)
E2	<LOD	0.135	<LOD	56.155	0.216	0.013	<LOD
E6	<LOD	0.339	<LOD	152.774	0.213	0.032	<LOD

Tabla VI. Resultados del análisis de la estación E1 por ICP de la muestra ultrasónico spray.

Muestra	As (mg/l)	Cd (mg/l)	Cr (mg/l)	Mn (mg/l)	Ni (mg/l)	Pb (mg/l)	Sb (mg/l)
E1	<LOD	0.201	0.041	232.725	0.350	<LOD	<LOD

Según la NOM-052-SEMARNAT-2005, las concentraciones de arsénico, cadmio, cromo y plomo se encuentran por debajo de los límites máximos permisibles (LMP) para los constituyentes tóxicos en el extracto (PECT). Como

se muestra en las Tablas V y VI. En el Anexo C se encuentra la Tabla de los límites máximos permisibles de la norma antes mencionada.

Las Tablas IV, V y VI se muestran los valores de las concentraciones de los distintos metales analizados por AA e ICP, en donde se observa que las concentraciones de Cd, Cr, Pb son similares en las estaciones E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>6</sub>. Estos resultados no muestran una diferencia significativa, ya que eso depende del límite de detección de cada equipo, estos dos análisis detectaron metales por debajo de la norma, los cuales son considerados que no son contaminantes, por lo que se no representa un gran riesgo para la salud.

Además se realizó el análisis de especiación en base al programa Medusa®, de acuerdo a la concentración encontrada y al pH al cual de extracción. En donde se observa que los metales cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo se encuentran como iones Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, los cuales se pueden encontrar en fase soluble.

En la Figura 9 se muestra el diagrama de la especiación del manganeso, donde se indica que esta soluble como Mn<sup>2+</sup> a un pH aproximadamente menor a 8.2 y precipita como hidróxidos de manganeso a valores mayores del pH antes mencionado. Los diagramas de especiación de Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, se encuentran en el Anexo B.

$$[\text{Mn}^{2+}]_{\text{TOT}} = 4.24 \text{ mM}$$

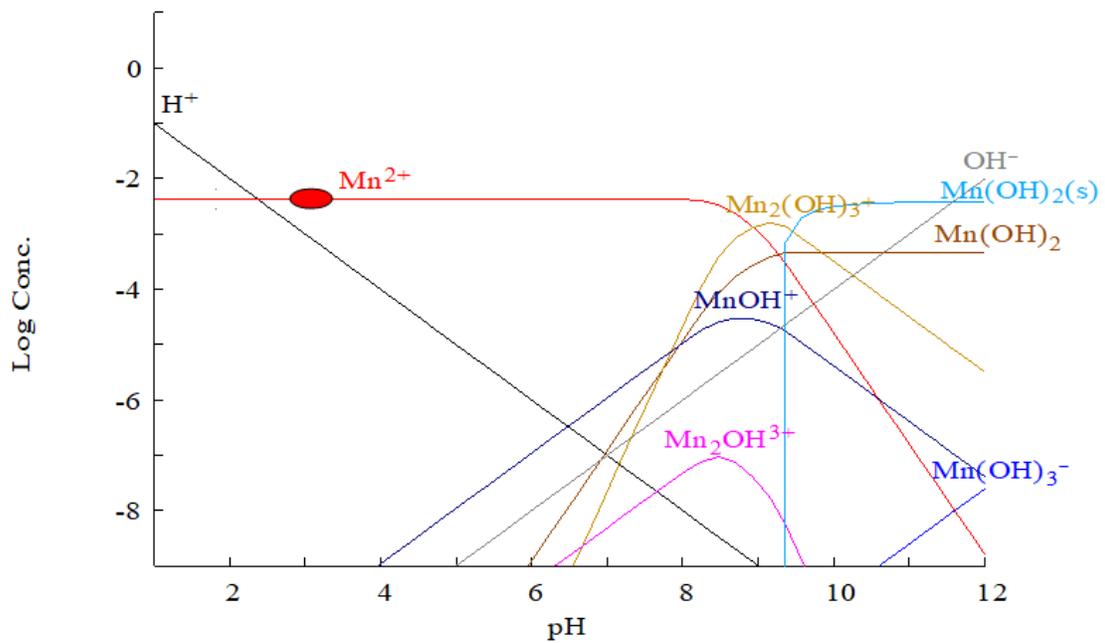


Figura 9. Especiación del manganeso en la estación E1 a una concentración de 4.24 mM (232.725 mg/L). Estimados con el programa Medusa®. El ovalo rojo indica el pH del sitio de muestreo.

## IV.2 Aislamiento de Microorganismos Metalotolerantes

Se aislaron dos microorganismos, las características macroscópicas de las colonias aisladas fueron las siguientes: forma filamentosa, borde filamentosa, colonia elevada, superficie algodonosa, consistencia dura. En la Figura 10 se muestra la colonia del hongo aislado de color blanco y en la Figura 11 se observa el hongo de color negro.



Figura 10. Hongo blanco aislado.



Figura 11. Hongo negro aislado

### IV.3 Identificación del hongo de color blanco

En la Tabla VII se muestran los resultados de la identificación de los hongos seleccionados.

Tabla VII. Identificación del hongo por alineamiento de secuencia según la página <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Primers	GenBank/GB	Nombre	Score	Identidad (%)
ITs	NR_137484.1	<i>Aspergillus australensis</i>	1310	99%
	EF669953.1	<i>Aspergillus australensis</i>	1310	99%
	NR_137483.1	<i>Aspergillus neoglaber</i>	1314	98%

En diferentes investigaciones, se ha demostrado que el género *Aspergillus* muestran tolerancia y resistencia a altas concentraciones de metales pesados en el medio ambiente. En particular se han identificado que algunas cepas de este género poseen rasgos de resistencia a una variedad de metales pesados como el plomo (Pb), cobalto (Co), cadmio (Cd) y zinc (Zn) (Iram et al., 2013) entre otros. Por lo anterior, el *Aspergillus australiensis* puede ser utilizado como bioadsorbente para la remediación de suelos contaminados con metales potencialmente tóxicos.

## CAPITULO V CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que el suelo tiene un pH ácido, el cual favorece el desarrollo de microorganismos acidófilos. La utilización de estos microorganismos es una excelente opción para la remediación de estos sitios, lo cual se puede hacer *in situ*. En este trabajo se aisló *Aspergillus australiensis*, el cual pudiera ser utilizado como bioadsorbente para su aplicación en la biosorción de metales pesados como el cobre.

Por otro lado, los diagramas de especiación realizados en base a las concentraciones de metales encontradas, muestran que los metales a pH ácido se encuentran biodisponibles por lo que pueden ingresar a las cadenas tróficas.

En conclusión el aislamiento de hongos metalotolerantes, es una excelente alternativa para la biorremediación de sitios contaminados, ya que son microorganismos endógenos, la cual es una ventaja debido a que son resistentes a la presencia de elementos potencialmente tóxicos en el medio.

## ANEXOS

### ANEXO A

Tabla VIII. Límite de detección instrumental de la Cámara del equipo ICP.

Elemento	Límite de detección instrumental (mg/l)
As	0.005
Cd	0.003
Cr	0.000
Mn	0.001
Ni	0.001
Pb	0.007
Sb	0.007

Tabla IX. Límite de detección instrumental del Ultrasónico Spray del equipo ICP.

Elemento	Límite de detección instrumental (mg/l)
As	0.0019
Cd	0.0010
Cr	0.0010
Mn	0.0003
Ni	0.0005
Pb	0.0014
Sb	0.0006

## ANEXO B

Diagramas de especiación de los metales As, Cd, Cr, Pb y Sb analizados mediante ICP.

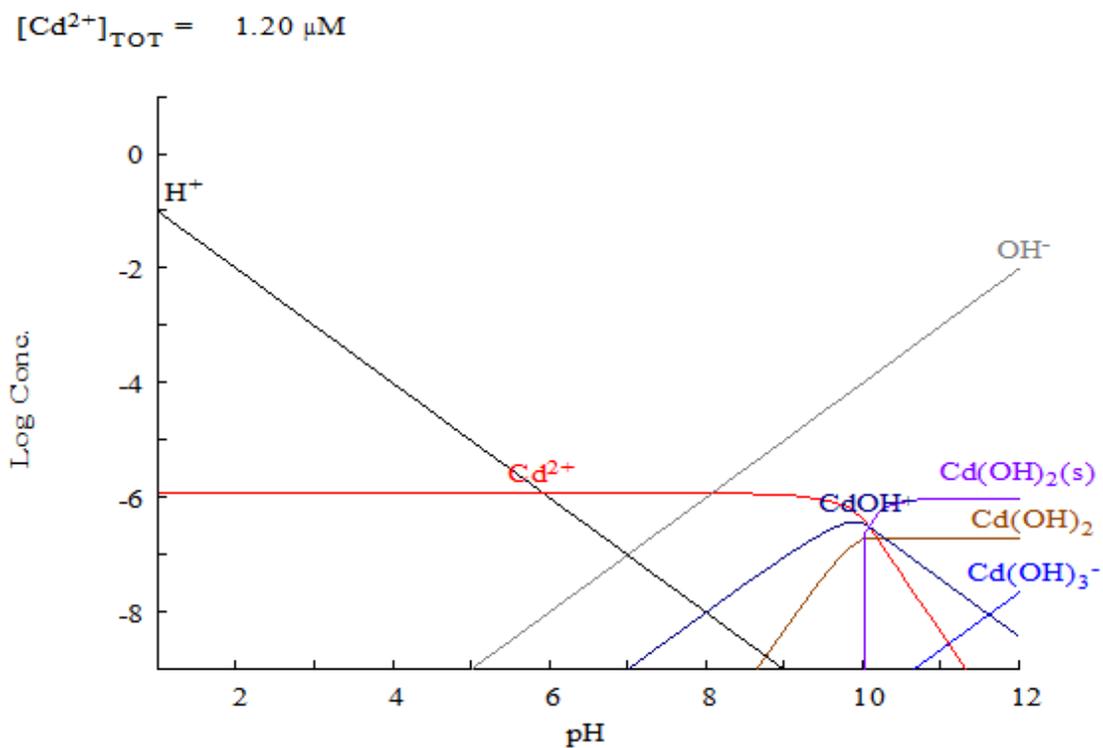


Figura 12. Especiación del cadmio en la estación E2 a una concentración de  $1.20 \mu M$  ( $0.135 \text{ mg/L}$ ). Estimados con el programa Medusa®.

$$[\text{Mn}^{2+}]_{\text{TOT}} = 1.02 \text{ mM}$$

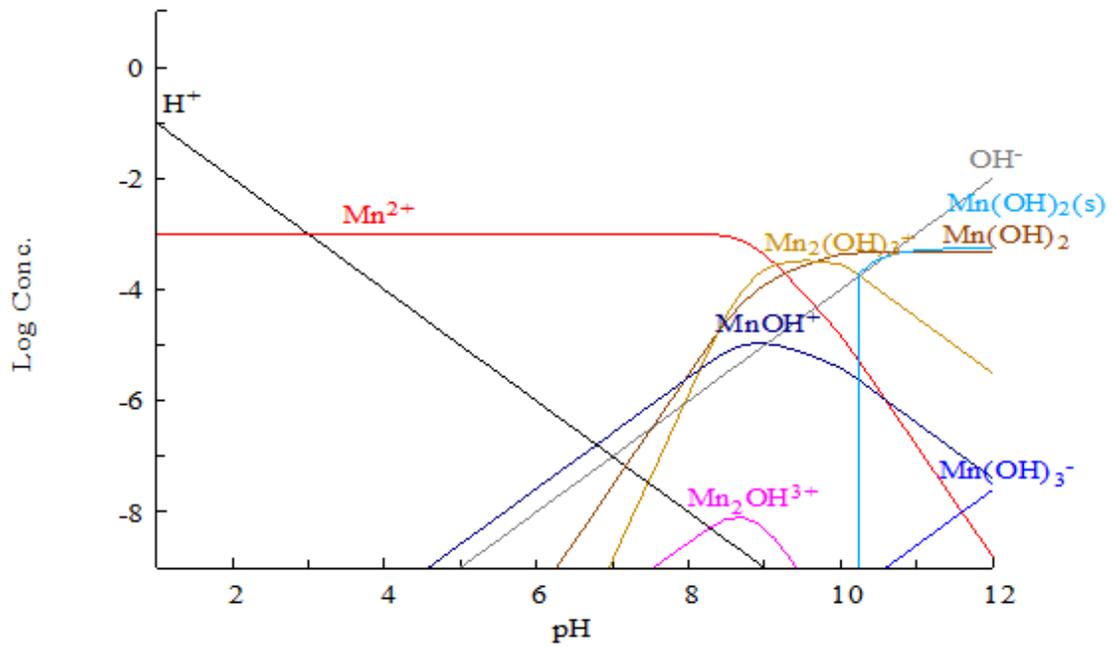


Figura 13. Especiación del manganeso en la estación E2 a una concentración de 1.02 mM (56.155 mg/L). Estimados con el programa Medusa®.

$$[\text{Ni}^{2+}]_{\text{TOT}} = 3.68 \mu\text{M}$$

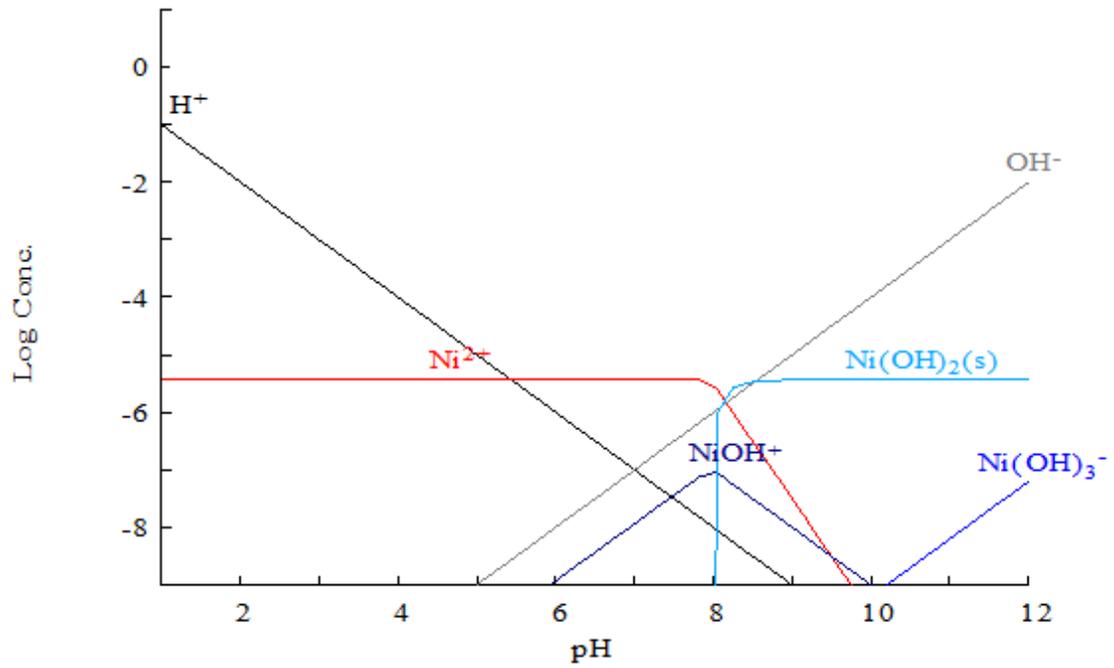


Figura 14. Especiación del níquel en la estación E2 a una concentración de 3.68  $\mu\text{M}$  (0.216 mg/L). Estimados con el programa Medusa  $\text{\textcircled{R}}$ .

$$[\text{Pb}^{2+}]_{\text{TOT}} = 62.74 \text{ nM}$$

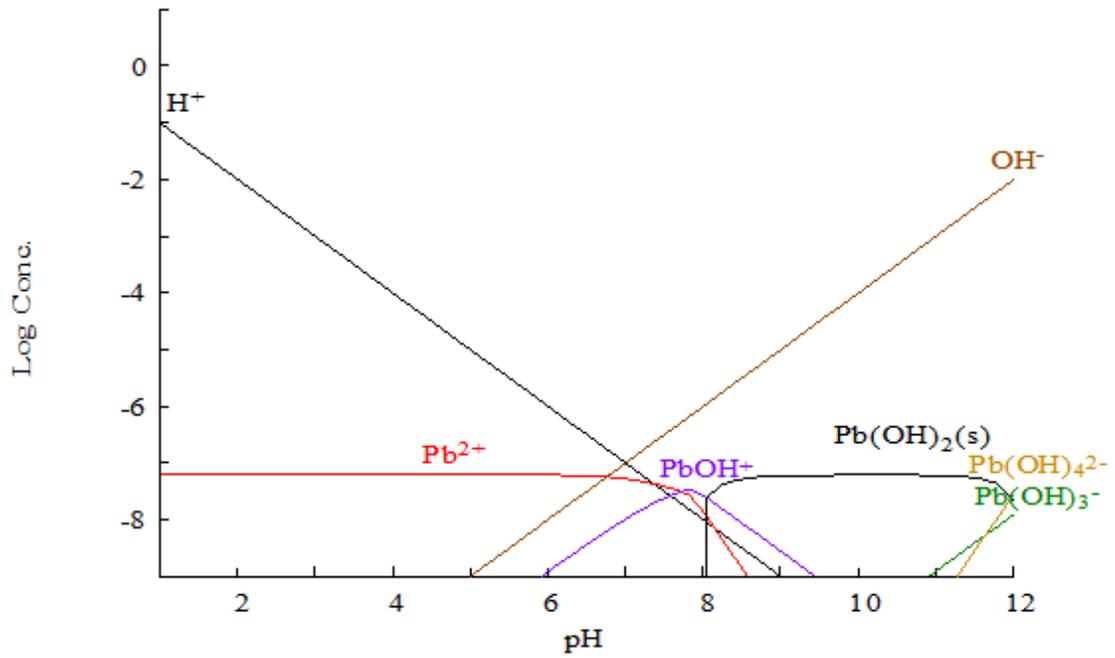


Figura 15. Especiación del plomo en la estación E2 a una concentración de 62.74 nM (0.013 mg/L). Estimados con el programa Medusa ®.

$$[\text{Cd}^{2+}]_{\text{TOT}} = 3.02 \mu\text{M}$$

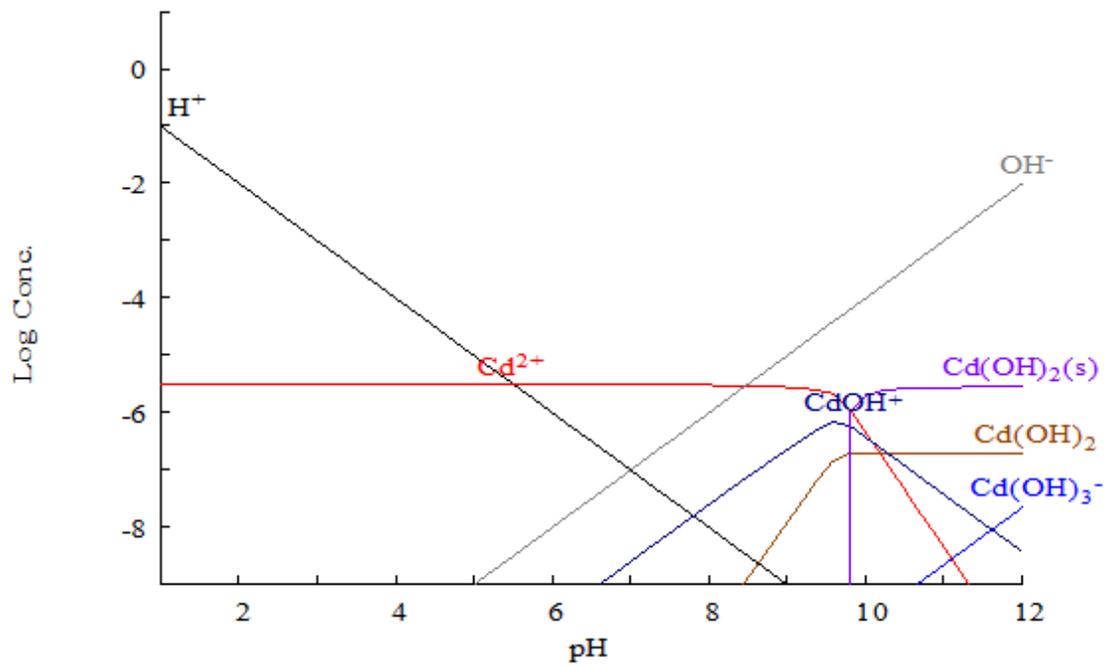


Figura 16. Especiación del cadmio en la estación E6 a una concentración de  $3.02 \mu\text{M}$  ( $0.339 \text{ mg/L}$ ). Estimados con el programa Medusa ®.

$[\text{Mn}^{2+}]_{\text{TOT}} = 2.78 \text{ mM}$

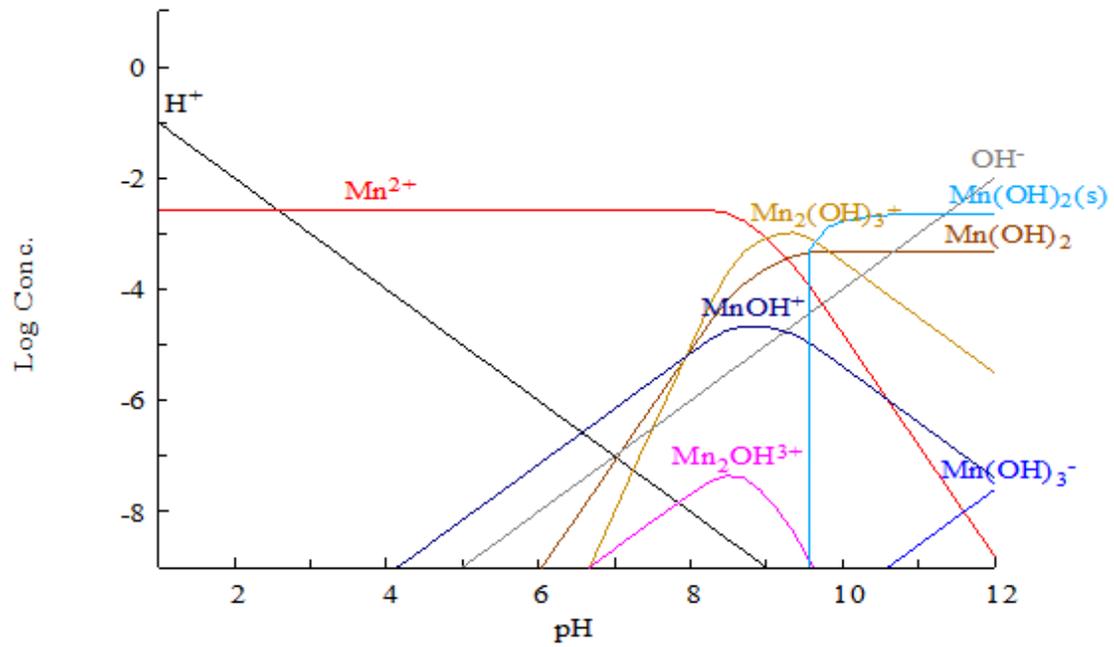


Figura 17. Especiación del manganeso en la estación E6 a una concentración de 2.78 mM (152.774 mg/L). Estimados con el programa Medusa ®.

$$[\text{Ni}^{2+}]_{\text{TOT}} = 3.63 \mu\text{M}$$

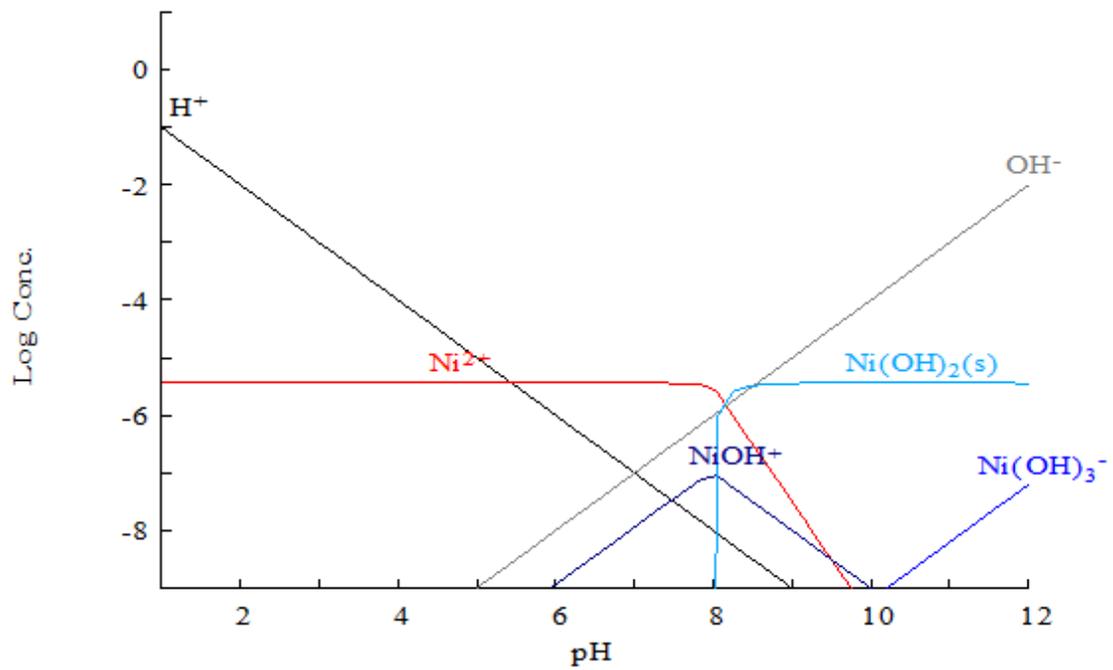


Figura 18. Especiación del níquel en la estación E6 a una concentración de 3.63 μM (0.213 mg/L). Estimados con el programa Medusa ®.

$$[\text{Pb}^{2+}]_{\text{TOT}} = 0.15 \mu\text{M}$$

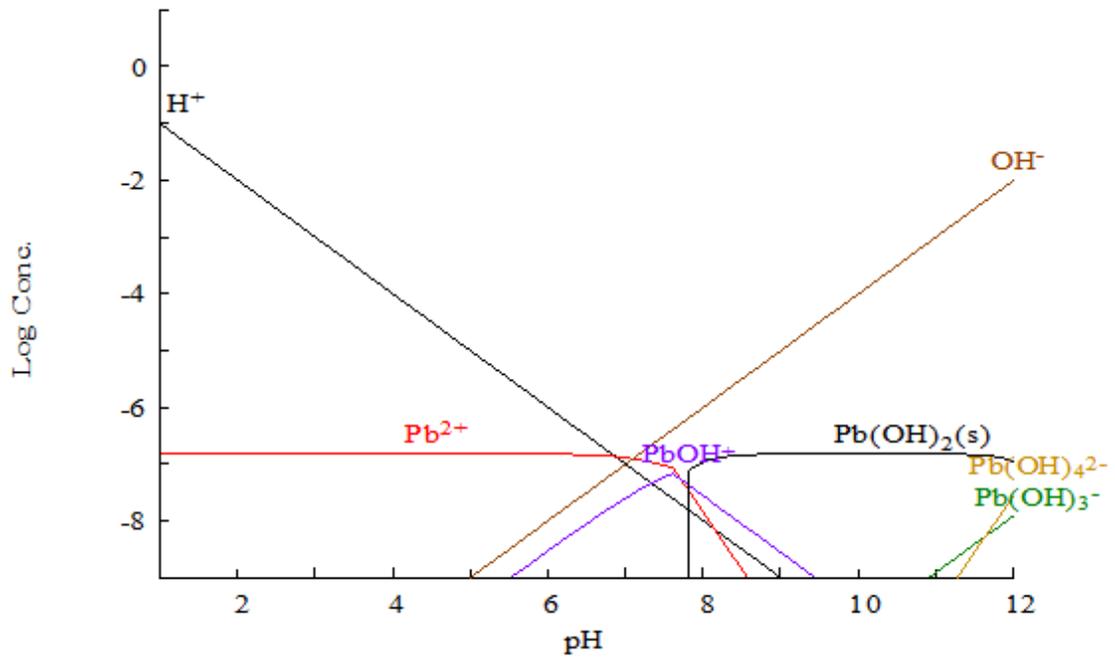


Figura 19. Especiación del plomo en la estación E6 a una concentración de 0.15  $\mu\text{M}$  (0.032 mg/L). Estimados con el programa Medusa ®.

$$[\text{Cd}^{2+}]_{\text{TOT}} = 1.79 \mu\text{M}$$

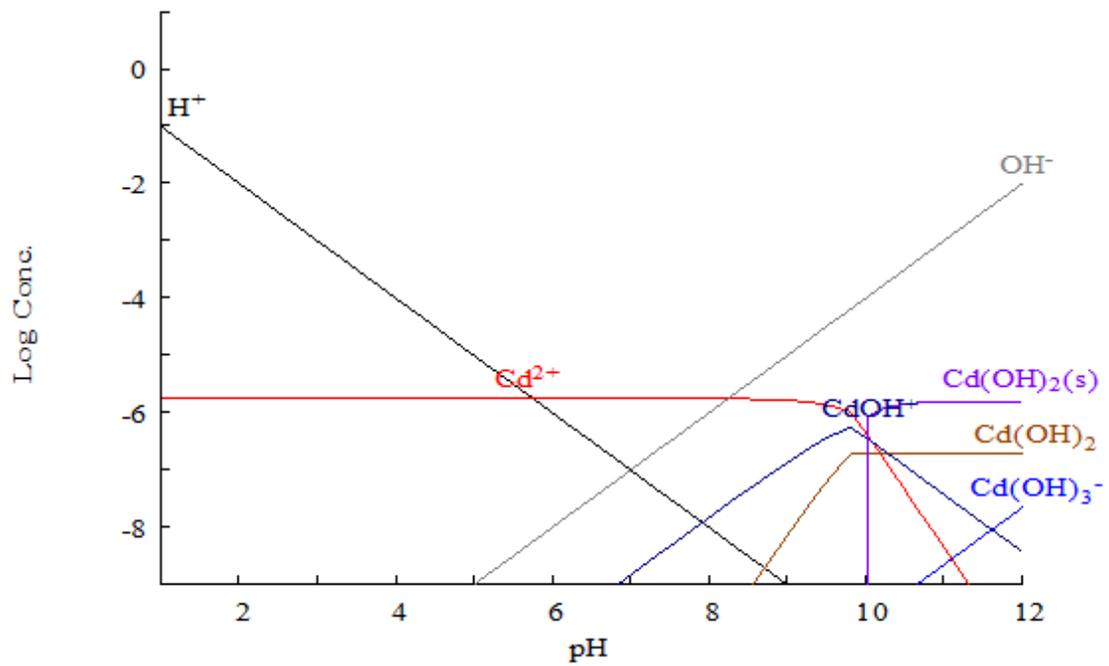


Figura 20. Especiación del cadmio en la estación E1 a una concentración de 1.79  $\mu\text{M}$  (0.201 mg/L). Estimados con el programa Medusa  $\text{\textcircled{R}}$ .

$$[\text{Cr}^{2+}]_{\text{TOT}} = 0.79 \mu\text{M}$$

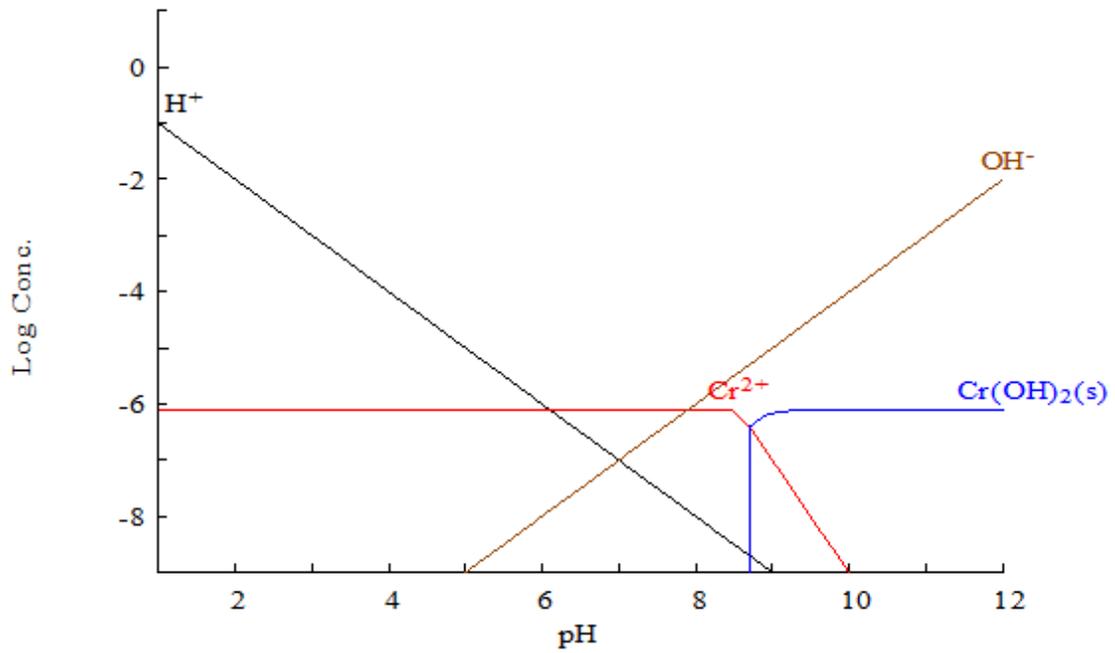


Figura 21. Especiación del cromo en la estación E1 a una concentración de  $0.79 \mu\text{M}$  ( $0.041 \text{ mg/L}$ ). Estimados con el programa Medusa  $\text{\textcircled{R}}$ .

$$[\text{Ni}^{2+}]_{\text{TOT}} = 5.96 \mu\text{M}$$

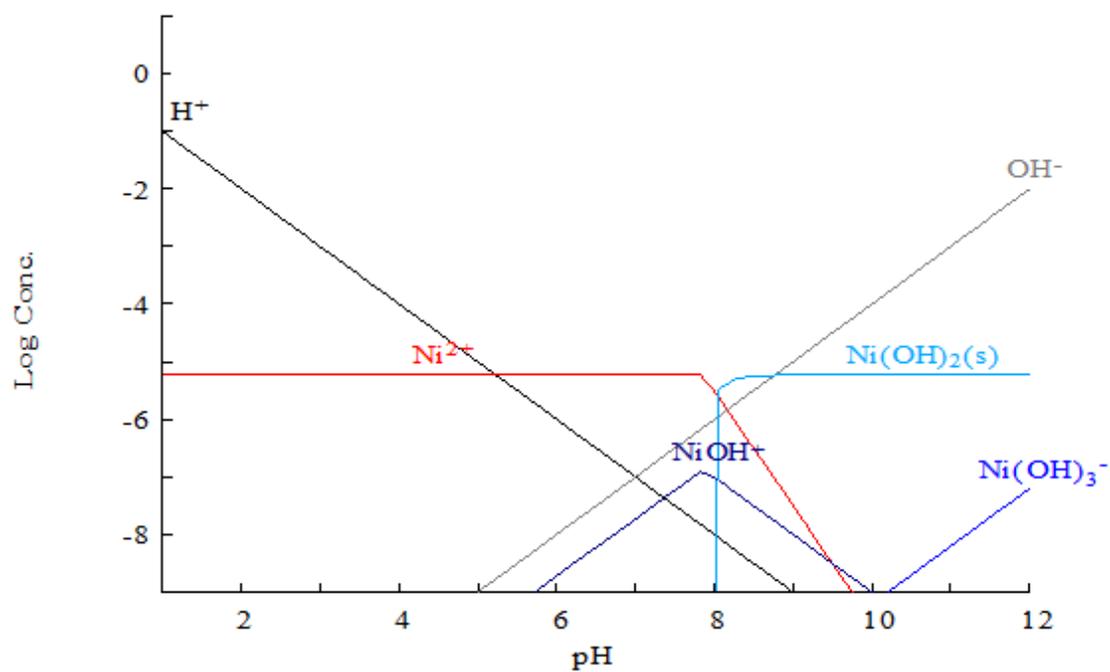


Figura 22. Especiación del níquel en la estación E1 a una concentración de 5.96  $\mu\text{M}$  (0.350 mg/L). Estimados con el programa Medusa  $\text{\textcircled{R}}$ .

## ANEXO C

Tabla X. Límites Máximos Permisibles (LMP) para los constituyentes tóxicos en el extracto PECT según la norma NOM-052-SEMARNAT-2005.

No. CAS <sup>1</sup>	Contaminante	LMP <sup>2</sup> (mg/L)
<b>CONSTITUYENTES INORGANICOS (METALES)</b>		
7440-38-2	Arsénico	5.0
7440-39-3	Bario	100.0
7440-43-9	Cadmio	1.0
7440-47-3	Cromo	5.0
7439-97-6	Mercurio	0.2
7440-22-4	Plata	5.0
7439-92-1	Plomo	5.0
7782-49-2	Selenio	1.0

## BIBLIOGRAFIA

Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 9–21.

Alejos Velázquez, L. P., Aragón Martínez, M. del C., & Cornejo Romero, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1–26).

Amaringo Villa, F. A., & Hormaza Anaguano, A. (2013). Determinación del punto de carga cero y punto isoeléctrico de dos residuos agrícolas y su aplicación en la remoción de colorantes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*.

APHA/AWWA/WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods*, 541. <https://doi.org/ISBN 9780875532356>

Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Tecnología Del Agua*, 45–52.

ATSDR. (2004). Copper ToxFAQs. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, (September), 1–2. Retrieved from <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts132.pdf>

Bautista Hernández, D. A. (2008). *Bioadsorción de metales pesados mediante el uso de biomasa bacteriana aislada de jales mineros*. Retrieved from [https://repositorio.itesm.mx/bitstream/handle/11285/569087/DocsTec\\_6999.pdf?sequence=1](https://repositorio.itesm.mx/bitstream/handle/11285/569087/DocsTec_6999.pdf?sequence=1)

Buendía, B. (2011). ¿ Qué debemos saber sobre Aspergillus ?, 142–144. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-que-debemos-saber-sobre-aspergillus-S0213005X0172592X?redirectNew=true>

Cárdenas, L., Sastoque, A., & Peña, M. (2003). Métodos moleculares en muestras ambientales: una alternativa para establecer la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y la operación del sistema. *Métodos Moleculares En Muestras Ambientales*, 76–83. Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/agua2003/sato.pdf>

Covarrubias, S. A., García Berumen, J. A., & Peña Cabriales, J. J. (2015). Microorganisms role in the bioremediation of contaminated soils with heavy metals. *Acta Universitaria*, 25(NE-3), 40–45. <https://doi.org/10.15174/au.2015.907>

Echarri Prim, L. (1998). Impactos ambientales de la agricultura oderna. In *Ciencias de la tierra y medio ambiente*. Retrieved from <http://www4.tecnun.es/asignaturas/Ecologia/Hipertexto/06Recursos/121ImpactAmbAgr.htm#POBLACION>

Ercole, C., Veglio, F., Toro, L., Ficara, G., & Lepidi, A. (1995). Immobilization of microbial cells for metal adsorption and desorption. In *Minerals Bioprocessing II* (pp. 181–188). Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0042112549&partnerID=tZOtx3y1>

Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P. Y., & Schoroeder, E. D. (1999). *Principios de Biorrecuperación; Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos.*

Fallis, a. . (2013). Biorremediación de suelos contaminados en Colombia. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Galán Huertos, E., & Romero Baena, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla*, 10, 48–60. <https://doi.org/10.1520/C0033-03>

García Cortés, V. (1995). *Introducción a la microbiología* (2nd ed.). Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=K\\_ETVnqnMZIC&lpg=PA96&ots=Zhthw niLTI&dq=crecimiento de hongos segun el pH&hl=es&pg=PA96#v=onepage&q=crecimiento de hongos segun el pH&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=K_ETVnqnMZIC&lpg=PA96&ots=Zhthw niLTI&dq=crecimiento de hongos segun el pH&hl=es&pg=PA96#v=onepage&q=crecimiento de hongos segun el pH&f=false)

Gomathy, M., & Sabarinathan, K. G. (2010). Microbial Mechanisms of Heavy Metal Tolerance- a Review. *Agricultural Reviews*, 31(2), 133–138.

Hayat, S., Ahmad, I., Azam, Z. M., Ahmad, A., Inam, A., & Samiullah, L. (2002). Effect of long-term application of oil refinery wastewater on soil health with special reference to microbiological characteristics. *Bioresource Technology*, 84(2), 159–163. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00027-5)

láñez, E. (2005). Introducción: Efecto de los factores ambientales sobre los procariotas. University of Granada. Retrieved from [https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#\\_Toc59451642](https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#_Toc59451642)

Iram, S., Zaman, A., Iqbal, Z., & Shabbir, R. (2013). Heavy Metal Tolerance of Fungus Isolated from Soil Contaminated with Sewage and Industrial Wastewater. *Pol J Environ Stud*, 22(3), 691–697. Retrieved from <http://www.pjoes.com/pdf/22.3/Pol.J.Environ.Stud.Vol.22.No.3.691-697.pdf>

Kuyucak, N., & Volesky, B. (1988). Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnology Letters*, 10(2), 137–142. <https://doi.org/10.1007/BF01024641>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms, 10th Edition. Cell* (Vol. 2).

Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41(1), 67–78. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=53990538&lang=es&site=ehost-live>

Medel Reyes, A., Ramos Gomez, S., Avelar González, F. J., Mora Tovar, L. A. G., & Rodríguez Valadez, F. (2008). Caracterización de Jales Mineros y Evaluación de su Peligrosidad con Base en su Potencial de Lixiviación. *Conciencia Tecnológica*, 35(1), 32–35. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/944/94403504.pdf>

Monge Amaya, O., Valenzuela García, J. L., Acedo Felix, E., Certucha Barragán, M. T., & Almendáriz Tapia, F. J. (2008). Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita), 24(3), 107–115.

Morelli, I. S., Coppotelli, B. M., Madueño, L., & Panno, M. T. Del. (2015). La biorremediación en la era post-genómica, 26–34. Retrieved from <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v14n1/morelli.pdf>

Morton-Bermea., O. (2006). Contenido De Metales Pesados En Suelos Superficiales De La Ciudad De Mexico. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 9(1), 45–47.

Pandey, B., & Fulekar, M. H. (2012). Bioremediation technology: A new horizon for environmental clean-up. *Biology and Medicine*, 4(1), 51–59.

Ramírez, E. H. (2017). *Biorremediación de Suelos Agrícolas en México*.

Rocha Castro, E. (2000). Espectrometría de absorción atómica. *Facultad de Ciencias Químicas*, 123–203.

Rojas-trivi, A. (2011). Conceptos y práctica de microbiología general.

Romero, F. M., & Ru??z, M. G. (2010). Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de M??xico. *Boletín de La Sociedad Geologica Mexicana*, 62(1), 43–53.

Rozo, J. A. (2009). Sistemas De Siembra Para Hongos Y Bacterias Objetivo General, 7. Retrieved from [http://www.academia.edu/25707996/SISTEMAS\\_DE\\_SIEMBRA\\_PARA\\_HONGOS\\_Y\\_BACTERIAS\\_OBJETIVO\\_GENERAL](http://www.academia.edu/25707996/SISTEMAS_DE_SIEMBRA_PARA_HONGOS_Y_BACTERIAS_OBJETIVO_GENERAL)

Secretaria de Economia, E. de S. (2015). Sonora en la Minería. Retrieved from <http://www.economiasonora.gob.mx/portal/minero>

Segovia Caqueo, M. E. (2014). Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad de elementos traza en suelos contaminados y plantas. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/138279/Bioaccesibilidad-y-biodisponibilidad-de-elementos-traza-en-suelos-contaminados-y-plantas.pdf?sequence=1>

Sepúlveda, T. V., & Trejo, J. V. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Jiménez Editores. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Soil, B., & Es, E. N. V. (2012). Microorganismos del suelo y biofertilización. *Vida Sana*, 1/43. Retrieved from [http://cultivos-tradicionales.com/upload/file/dossier-5\\_microorganismos-del-suelo-y-biofertilizacion-2.pdf](http://cultivos-tradicionales.com/upload/file/dossier-5_microorganismos-del-suelo-y-biofertilizacion-2.pdf)

Solano, A. M. (2005). *Estudio de la movilización de metales pesados. Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del Cinc*. Retrieved from <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/190>

Soraya Puga, Manuel Sosa, Toutcha Lebgue, Cesar Quintana, A. C. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162006000100020&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162006000100020&script=sci_arttext)

Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á., & Garcés-Jaraba, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*, 18(34), 109–123.

Tirado, L., González-Martínez, F., Martínez, L., Wilches, L., & Celedón-Suárez, J. (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. *Rev. Nac. Odontol.*, 85. <https://doi.org/10.16925/od.v11i21.895>

Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo, J. a., & de la Rosa Pérez, D. a. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Vullo, D. (2003). Interacción En Beneficio Del Medio Ambiente. *Química Viva*, 2, 93–104.

Wiel, H. J. Van De. (2003). Determination of elements by ICP-AES and ICP-MS. *National Institute of Public Health and the Environment ( RIVM )*, (September), 1–37.

Wong, M. . (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50(6), 775–780. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00232-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00232-1)