



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

---

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**EVALUACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE  
ADAPTACIÓN Y TOLERANCIA A METALES  
PESADOS DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE  
AGUAS Y SEDIMENTOS CONTAMINADOS DE  
ORIGEN ANTROPOGÉNICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

**ALFONSO ALVAREZ VILLA**

**Hermosillo, Sonora**

**Diciembre, 2018**

# 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

# UNIVERSIDAD DE SONORA

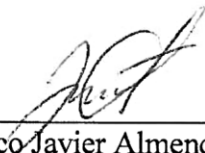
## APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

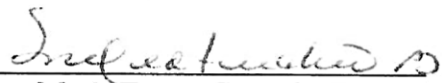
**Alfonso Alvarez Villa**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

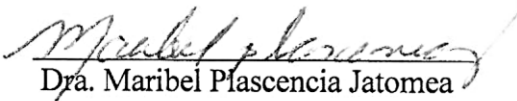
29/11/2018  
Fecha

  
Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia  
Presidente

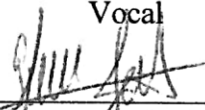
29/11/2018  
Fecha

  
Dra. María Teresa Certucha Barragán  
Secretario

29/11/2018  
Fecha

  
Dra. Maribel Plascencia Jatomea  
Vocal

29/11/2018  
Fecha

  
Dra. Aurora Margarita Pat Espadas  
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

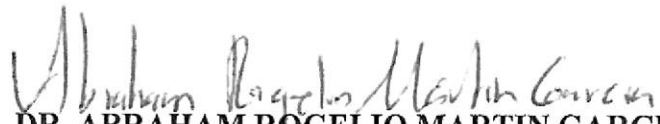
---

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

## AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

Diciembre 3, de 2018

Por la presente se hace constar que el estudiante: **ALFONSO ALVAREZ VILLA**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del Programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

  
**DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCIA**  
**COORDINADOR**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

## RESUMEN

Debido a la presencia de metales pesados en cuerpos de aguas y sedimentos en México, es importante llevar a cabo estudios que permitan su remoción. Los microorganismos metalotolerantes se pueden encontrar en ambientes ácidos con altas concentraciones de metales. Estos tienen propiedades para la biosorción de metales pesados, tales como la composición de sus paredes celulares y la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que se ve aumentada al encontrarse bajo condiciones de estrés debido a la concentración de metales pesados. En muestras de sedimentos del Río San Pedro cercanas a actividades mineras en Cananea Sonora se han encontrado altas concentraciones de metales pesados en condiciones ácidas, principalmente cobre y manganeso, por lo que existe en los sedimentos de esas zonas el potencial de encontrar microorganismos tolerantes a dichos metales con aplicaciones en biorremediación. En el presente estudio se aislaron de sedimentos de tres zonas del Río San Pedro los microorganismos que crecieron en medios de cultivo sólidos concentrados con cobre y manganeso para identificar los tres microorganismos que presentaron mayor tolerancia. Los microorganismos se identificaron como: *Pseudomonas rhodesiae* primer 16S 100% de identidad, *Bacillus cereus* primer 16S 99% de identidad y *Rhodotorula taiwanensis* primer 26S 99% de identidad. A los tres microorganismos se les determinó el rango de tolerancia a cobre y manganeso con base en la concentración mínima inhibitoria (MIC) y se analizó la adaptación a los dos metales para determinar si las condiciones de estrés tienen efecto en el rendimiento de biomasa en medio de cultivo líquido. Se determinaron los parámetros cinéticos de cada microorganismo en cultivos por lote en matraz y biorreactor tipo tanque agitado. El rango de la MIC en medio de cultivo sólido para *Pseudomonas rhodesiae* fue de 600-800 ppm de Cu y 400-600 ppm de Mn, para *Bacillus cereus* fue de <200 ppm de Cu y 400-600 ppm de Mn, para *Rhodotorula taiwanensis* fue de 600-800 ppm de Cu y 800-1000 ppm de Mn. Los tres microorganismos tienen el potencial de utilizarse como biosorbentes de cobre y manganeso debido a la adaptación y tolerancia que presentaron, además con los parámetros cinéticos se puede llevar a cabo el escalamiento de un proceso para la producción masiva de biomasa biosorbente.

## ABSTRACT

The presence of high concentrations of heavy metals in water bodies encourage the study of strategies to achieve metal removal to prevent or mitigate contamination. Metallo-tolerant microorganisms have been considered for their abilities of heavy metals biosorption. This is mainly because they can be found in acidic environments with high concentrations of metals, the composition of their cell walls and the production of extracellular polymeric substances (EPS) under stress conditions promoted by heavy metals concentration. Sediment samples from the San Pedro River taken near to mining activities in Cananea, Sonora, have been analyzed and high concentrations of heavy metals were found in acidic conditions, particularly copper and manganese. Hence, the sediments of these zones are of great interest for the isolation of copper and manganese tolerant microorganisms with applications in bioremediation.

In this study, microorganisms that grew in solid culture media concentrated with copper and manganese were isolated from sediments from three zones of the San Pedro River. The microorganisms were identified as: *Pseudomonas rhodesiae* primer 16S 100% identity, *Bacillus cereus* primer 16S 99% identity and *Rhodotorula taiwanensis* primer 26S 99% identity. The copper and manganese tolerance range was determined for the three microorganisms based on the minimum inhibitory concentration (MIC), in which no visible growth was observed in solid culture medium. The adaptation of microorganisms to the two metals was analyzed to determine if the stress conditions have an effect on the biomass yield in liquid culture medium. The kinetic parameters of growth were determined in batch cultures in a flask and stirred tank type bioreactor. The range of the MIC in solid culture medium for *Pseudomonas rhodesiae* was 600-800 ppm Cu and 400-600 ppm Mn, for *Bacillus cereus* was <200 ppm Cu and 400-600 ppm Mn, for *Rhodotorula taiwanensis* was 600-800 ppm Cu and 800-1000 ppm Mn. The three microorganisms have the potential to be used as copper and manganese biosorbents due to the adaptation and tolerance presented. The kinetic parameters obtained can be used for the scaling of the process for massive production of biosorbent biomass.

---

## DEDICATORIA

A Dios por cuidarme y guiarme en sus caminos.

A mis padres Ana Esther Villa Bon y Alfonso Alvarez Avilés por apoyarme en todo momento de mi vida.

A mis abuelos José Alvarez Coronado, Carmen Avilés López, José Edmundo Villa Villa y Margarita Bon Valenzuela. Gracias por el ejemplo que me han dado y sus enseñanzas.

A mis hermanas Ana Esther Alvarez Villa y Ruth Margarita Alvarez Villa por ser la motivación en todo lo que hago.

A mis sobrinas Ximena, Grethel y Alexa por la alegría que le dan a la familia.

A mi tío José Edmundo Villa Bon por su buen carácter.

A mi familia, gracias a mis cuñados, tíos, primos, y sobrinos por estar presentes a lo largo de mi vida.

A mis amigos por compartir su tiempo y amistad.

---

---

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	IV
ABSTRACT .....	V
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABLAS .....	XIII
NOMENCLATURA.....	XIV
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción .....	1
1.2 Justificación .....	9
1.3 Objetivo General.....	10
1.4 Objetivos Específicos .....	10
CAPÍTULO 2.....	11
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....	11
2.1 Zonas Contaminadas por Metales Pesados en el Estado de Sonora .....	11
2.1.1 Microorganismos aislados de zonas con altas concentraciones de metales.....	13
2.2 Tolerancia a Metales Pesados de Microorganismos Aislados.....	14



---

<b>2.3 Cinéticas de Crecimiento de Microorganismos Tolerantes a Metales Pesados .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Materiales y Equipos.....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Medios de cultivo .....	18
<b>3.2 Metodología.....</b>	<b>20</b>
3.2.1 Muestreo de aguas y sedimentos del Río San Pedro.....	20
3.2.2 Medición del pH en muestras de agua y sedimento.....	22
3.2.3 Medición del potencial de óxido-reducción (ORP).....	23
3.2.4 Preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico.....	26
3.2.5 Cuenta de microorganismos en placa.....	28
3.2.6 Preparación de disoluciones concentradas de cobre o manganeso.....	29
3.2.7 Medios de cultivo sólidos y líquidos enriquecidos con cobre o manganeso.....	31
3.2.8 Aislamiento de microorganismos en medios de cultivo sólidos enriquecidos con cobre o manganeso .....	33
3.2.9 Morfología colonial y microscópica de microorganismos en medios de cultivo sólidos.....	34
3.2.10 Selección de microorganismos tolerantes a cobre y manganeso	35
3.2.11 Identificación de los microorganismos tolerantes a cobre y manganeso.....	35
3.2.12 Concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) en medio de cultivo sólido.....	36
3.2.13 Pruebas de crecimiento en medio líquido de microorganismos a diferentes valores de pH .....	39

---

3.2.14 Crecimiento en medio de cultivo líquido a diferentes concentraciones de cobre o manganeso .....	41
3.2.15 Relación de la densidad óptica a 600 nm y el peso seco de biomasa .....	43
3.2.16 Cinética de crecimiento en biorreactor .....	46
3.2.17 Ajuste a un modelo matemático de los datos de las cinéticas de crecimiento de los microorganismos seleccionados .....	48
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>49</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Muestreo de Agua y Sedimento .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Aislamiento de Microorganismos Metalotolerantes .....</b>	<b>55</b>
4.2.1 Aislamiento en medios de cultivo sólidos enriquecidos con cobre y manganeso .....	55
4.2.2 Selección de microorganismos tolerantes a cobre y manganeso	57
4.2.3 Identificación de los microorganismos seleccionados .....	58
<b>4.3 Tolerancia a Cobre y Manganeso de los Microorganismos .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4 Adaptación y Rendimiento de los Microorganismos en Medio de Cultivo Líquido Enriquecido con Cobre y Manganeso .....</b>	<b>66</b>
<b>4.5 Cinéticas de Crecimiento.....</b>	<b>72</b>
4.5.1 Pruebas de crecimiento a diferentes valores de pH .....	72
4.5.2 Peso seco en función de la densidad óptica a 600 nm.....	73
4.5.3 Parámetros cinéticos en matraz y biorreactor .....	75
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>79</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>79</b>

---

<b>5.1 Conclusiones.....</b>	<b>79</b>
<b>5.2 Recomendaciones.....</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>89</b>

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de la biosorción. Adaptada de (Gaur et al., 2014). .....	4
<b>Figura 2.</b> Ubicación de la cuenca alta del Río San Pedro, Arizona/Sonora. Adaptada de (Kepner et al., 2004). .....	20
<b>Figura 3.</b> Mapa de localización de las estaciones de muestreo (INEGI). .....	21
<b>Figura 4.</b> Diagrama Eh-pH del sistema cobre-agua a 25 °C (Pourbaix, 1974). .....	24
<b>Figura 5.</b> Diagrama Eh-pH del sistema manganeso-agua a 25 °C (Pourbaix, 1974)...	25
<b>Figura 6.</b> Características morfológicas de las colonias de microorganismos (Pérez & Peris, 1997). .....	34
<b>Figura 7.</b> Diagrama Eh-pH del sistema cobre-agua a 25 °C con los puntos de las estaciones de muestreo. ....	51
<b>Figura 8.</b> Diagrama Eh-pH del sistema manganeso-agua a 25 °C con los puntos de las estaciones de muestreo. ....	52
<b>Figura 9.</b> Colonias desarrolladas en medio de cultivo sólido con 200 ppm de Cu y Mn para las tres estaciones de muestreo. ....	56
<b>Figura 10.</b> Vista en el microscopio con lente objetivo de 100 X de los microorganismos: (A) <i>Pseudomonas rhodesiae</i> . (B) <i>Bacillus cereus</i> . (C) <i>Rhodotorula taiwanensis</i> . ....	59
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de crecimiento a diferentes concentraciones de cobre. ....	62
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de crecimiento a diferentes concentraciones de manganeso. ..	62
<b>Figura 13.</b> Rendimiento en peso seco (g/L) de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> a diferentes concentraciones de cobre y manganeso. ....	67
<b>Figura 14.</b> Rendimiento en peso seco (g/L) de <i>Bacillus cereus</i> a diferentes concentraciones de cobre y manganeso. ....	67
<b>Figura 15.</b> Rendimiento en peso seco (g/L) de <i>Rhodotorula taiwanensis</i> a diferentes concentraciones de cobre y manganeso. ....	68
<b>Figura 16.</b> % Transmitancia a las 48 horas de crecimiento a diferentes valores de pH. ....	72
<b>Figura 17.</b> Peso seco (g/L) de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> en función de la DO 600 nm en medio de cultivo LB. ....	73

---

<b>Figura 18.</b> Peso seco (g/L) de <i>Bacillus cereus</i> en función de la DO 600 nm en medio de cultivo LB. ....	74
<b>Figura 19.</b> Peso seco (g/L) de <i>Rhodotorula taiwanensis</i> en función de la DO 600 nm en medio de cultivo YPG.....	74
<b>Figura 20.</b> Cineticas de crecimiento de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> en medio de cultivo LB a pH de 6.0.....	75
<b>Figura 21.</b> Cineticas de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> en medio de cultivo LB a pH de 7.0.....	76
<b>Figura 22.</b> Cineticas de crecimiento de <i>Rhodotorula taiwanensis</i> en medio de cultivo YPG a pH de 5.0. ....	76

---

---

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Población a mediados de 2014 y agua renovable per cápita por entidad federativa. (Comisión Nacional del Agua, 2015).....	2
<b>Tabla 2.</b> Concentración de metales pesados en el agua del Río San Pedro, 2005. (Gómez-Alvarez et al., 2008).....	11
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos aislados de zonas con altas concentraciones de metales..	13
<b>Tabla 4.</b> Tolerancia a concentraciones de metales de microorganismos aislados.....	14
<b>Tabla 5.</b> Parámetros cinéticos de crecimiento en diferentes sistemas.....	15
<b>Tabla 6.</b> Agar para cuenta estándar.....	18
<b>Tabla 7.</b> Agar nutritivo.....	18
<b>Tabla 8.</b> Caldo nutritivo.....	18
<b>Tabla 9.</b> Medio LB.....	19
<b>Tabla 10.</b> Medio YPG.....	19
<b>Tabla 11.</b> Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo.....	21
<b>Tabla 12.</b> Reactivos para disoluciones concentradas de cobre y manganeso.....	29
<b>Tabla 13.</b> Cantidad del volumen de la disolución de metal (2000 ppm) para el medio de cultivo.....	32
<b>Tabla 14.</b> Cantidad del volumen de la disolución de metal (2000 ppm) y de agar para cuenta estándar para el medio de cultivo.....	37
<b>Tabla 15.</b> pH y ORP en muestras de agua y sedimento.....	49
<b>Tabla 16.</b> Unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de sedimento.....	54
<b>Tabla 17.</b> Selección de microorganismos tolerantes a Cu y Mn.....	58
<b>Tabla 18.</b> Análisis de secuenciación.....	58
<b>Tabla 19.</b> UFC/mL a las 48 horas de crecimiento a diferentes concentraciones de cobre y manganeso.....	61
<b>Tabla 20.</b> Rango de la MIC de cobre y manganeso para los microorganismos identificados.....	63
<b>Tabla 21.</b> Parámetros cinéticos de crecimiento en matraz y biorreactor.....	77

---

## NOMENCLATURA

g = gramo

L = Litro

mg = miligramos

mL = mililitros

$\mu$ L = microlitros

ppm = partes por millón (mg/L)

M = Molar (mol/L)

$^{\circ}$ C = grado Celsius

mm = milímetro

$\mu$ m = micrómetro

nm = nanómetro

pH = logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno (en mol/L)

rpm = revoluciones por minuto

mV = milivoltio

---

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad de Sonora por el apoyo y facilidades en cada una de sus áreas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por impulsar y promover la investigación en México.

Al Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química. Por la formación académica y de investigación que me brindo.

A mi comité de tesis, Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia, Dra. María Teresa Certucha Barragán, Dra. Maribel Plascencia Jatomea y Dra. Aurora Margarita Pat Espadas. Por sus consejos y comentarios oportunos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biorremediación, Lupita, Diana, Denise, Fernanda, Paola y Fabián. Por su ayuda y amistad brindada.



## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1 Introducción

La importancia de frenar el daño al medio ambiente, proteger de la polución la calidad de vida de la población y evitar la extinción de los recursos naturales son argumentos incontrovertibles. El compromiso es conciliar las actividades económicas con el medio ambiente para controlar y disminuir el impacto en ambos y; aquí la sustentabilidad como concepto participa en la creación de procesos, valores y creencias. La sustentabilidad requiere integrar tres líneas de interacción: la sociedad, la economía y el medio ambiente (De la Rosa Leal, 2012).

Como principio 1 de la Declaración de la Conferencia de Estocolmo en 1972, se añadió el medio ambiente a la lista de problemas mundiales. Mientras el principio 2 establece: Los recursos naturales de la tierra, incluidos aire, agua, tierra, flora y fauna y especialmente las muestras representativas de ecosistemas deben salvaguardarse apropiadamente para el beneficio de generaciones presentes y futuras mediante una planeación y una administración cuidadosa (Mihelcic & Beth Zimmerman, 2012).

Actualmente la poca disponibilidad de agua apta para el consumo humano y animal, así como su acelerada contaminación, son motivo de preocupación a nivel mundial (Jaramillo Juárez, Rincón Sánchez, & Rico Martínez, 2009). Se considera que un país atraviesa por insuficiencia de agua cuando su suministro anual desciende por debajo de los 1700 metros cúbicos por persona. Cuando el abastecimiento anual de agua desciende por debajo de los 1000 metros cúbicos por persona, se considera que el país sufre de escasez de agua. Se calcula que mil millones de personas enfrentarán escasez

de agua en el año 2025, 20% de la cual estará asociada con efectos directos de cambio en el clima (Mihelcic & Beth Zimmerman, 2012; Vörösmarty, Green, Salisbury, & Lammers, 2000). Anualmente México recibe aproximadamente 1 449 471 millones de metros cúbicos de agua en forma de precipitación. Tomando en cuenta los flujos de salida (exportaciones) y de entrada (importaciones) de agua con los países vecinos, el país anualmente cuenta con 447 260 millones de metros cúbicos de agua dulce renovable. Considerando la población de México el país cuenta con 3736 metros cúbicos de agua renovable por habitante al año (Comisión Nacional del Agua, 2015). En la Tabla 1 se muestran los metros cúbicos de agua renovable por habitante al año por entidad federativa.

**Tabla 1.** Población a mediados de 2014 y agua renovable per cápita por entidad federativa. (Comisión Nacional del Agua, 2015).

<b>Entidad federativa</b>	<b>Población a mediados de 2014 (millones de hab.)</b>	<b>Agua renovable per cápita 2014 (m<sup>3</sup>/habitante/año)</b>
<b>Baja California</b>	3.43	872
<b>Distrito Federal</b>	8.87	54
<b>Sonora</b>	2.89	2432
<b>Tabasco</b>	2.36	13175

Con el fin de hacer frente a la disminución de la disponibilidad del agua en los próximos años. Será necesario realizar acciones para reducir su demanda. Deberán incrementarse significativamente los volúmenes de agua residual tratada y su reusó, que aumenten la disponibilidad y calidad del agua para los usos a los que sean destinados (Comisión Nacional del Agua, 2015).

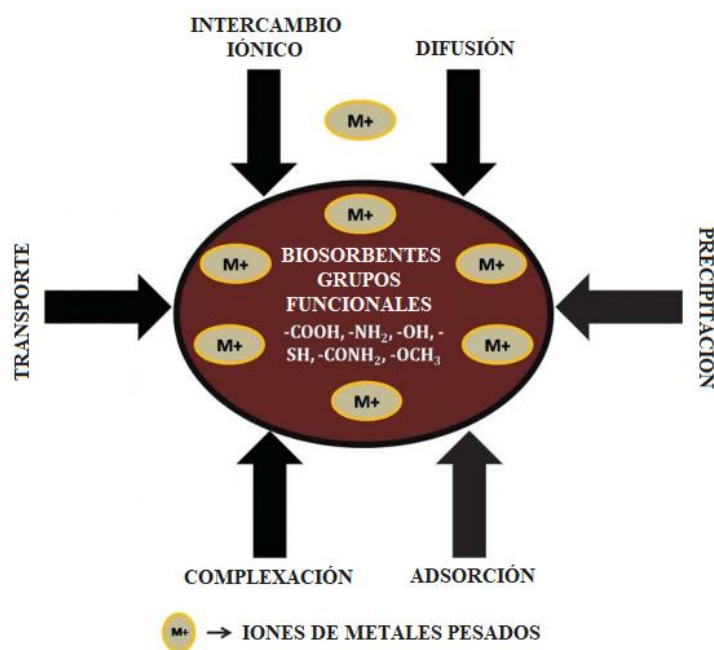
La contaminación del agua representa en la actualidad uno de los principales problemas ambientales a nivel mundial, que limita la disponibilidad de este recurso vital y que amenaza el desarrollo y la persistencia de poblaciones humanas en diferentes regiones del planeta, principalmente en países en vías de desarrollo. Cuando los estudios de evaluación de riesgos determinan que un sitio contaminado es peligroso para la salud

de los seres vivos, entonces se deben reducir las concentraciones de las sustancias tóxicas hasta niveles que no representen un peligro para la salud. A este proceso de limpieza ambiental se le conoce como restauración, remediación o corrección ambiental. En los últimos años, se ha avanzado en la atención a estos problemas utilizando procesos de biorremediación, en los cuales se utilizan bacterias, hongos, algas y otros organismos vivos que capturan, digieren o degradan los contaminantes ambientales (metales pesados, pesticidas, hidrocarburos, etc.) (Jaramillo Juárez et al., 2009).

Los contaminantes metálicos provenientes de los procesos industriales como la minería, el procesamiento de minerales y otras fuentes de aguas residuales, han tenido un impacto significativo en el medio ambiente, la salud pública y la economía (Akhbarizadeh, Shayestefar, & Darezereshki, 2014). La contaminación por metales pesados del agua industrial es un importante problema universal (Ngomsik, Bee, Siaugue, Cabuil, & Cote, 2006). Los metales que tienen densidad mayor a  $5 \text{ g/cm}^3$  se consideran metales pesados o metales de transición. Conforme a la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) el plomo, cadmio, arsénico y mercurio son conocidos por mostrar un perfil de toxicidad tras la exposición (Gaur, Flora, Yadav, & Tiwari, 2014). Metales como el cadmio, cromo, cobre y níquel pueden ser perjudiciales para la fisiología humana y otros sistemas biológicos debido a su biodisponibilidad, bioacumulación, las propiedades no biodegradables, toxicidad y la relación sinérgica y antagónica entre ellos, incluso a bajas concentraciones (Akhbarizadeh et al., 2014).

Por los motivos mencionados anteriormente es necesario el tratamiento de las aguas residuales contaminadas con metales pesados, aplicando procesos de separación para la remoción de los metales tóxicos presentes en el agua. El límite máximo permisible para cobre en agua de ríos para uso en riego agrícola es de 4.0 mg/L promedio mensual y 6.0 mg/L promedio diario (Comisión Nacional del Agua, 2009). La NOM-127-SSA1-1994 establece como límites en el agua para uso y consumo humano 0.30 mg/L de hierro y 0.15 mg/L de manganeso (Secretaría de Salud, 2000).

Las tecnologías convencionales para la remoción de iones metálicos de la solución acuosa incluyen la precipitación química, intercambio iónico, osmosis inversa, tratamiento electroquímico y adsorción (Akhbarizadeh et al., 2014; Fu & Wang, 2011). La biosorción de metales pesados de soluciones acuosas es un proceso relativamente nuevo que ha demostrado ser muy favorable para la remoción de metales pesados de aguas residuales. Las principales ventajas de la biosorción son su alta eficacia para reducir los iones de metales pesados y el uso de biosorbentes de bajo costo (Fu & Wang, 2011). La biosorción es un proceso que utiliza materiales biológicos para la remoción de contaminantes a través de diferentes mecanismos como la adsorción, absorción, formación de complejos de superficie, precipitación y el intercambio iónico (Gaur et al., 2014). Los biosorbentes más comunes pueden derivarse de las siguientes tres fuentes: (1) biomasa muerta, como la corteza, la lignina, camarón, etc.; (2) biomasa de algas; (3) biomasa microbiana, por ejemplo las bacterias, los hongos y las levaduras (Apiratikul & Pavasant, 2008; Fu & Wang, 2011). En la Figura 1 se muestran los diferentes mecanismos de biosorción que pueden ocurrir en materiales biológicos.



**Figura 1.** Mecanismos de la biosorción. Adaptada de (Gaur et al., 2014).

Las bacterias pueden captar metales de soluciones extremadamente diluidas, un procedimiento que solo es interesante si el metal es caro o muy tóxico y debe ser removido (Nies, 1999). Uno de los tipos de biomasa más ubicua disponible para la biorremediación de metales pesados a valores bajos de pH es la levadura. Las levaduras son una fuente de biomasa económica y disponible. Estudios han demostrado que las células de levaduras adaptadas a metales pesados pueden bioacumular cationes de metales pesados en altas concentraciones y removerlos de la suspensión de cultivo durante un largo período (Dönmez & Aksu, 1999).

Las poblaciones microbianas presentan diferentes adaptaciones para sobrevivir en comunidades diversas. Estas adaptaciones, así como las interacciones dentro de la población, contribuyen a la estabilidad de las comunidades. La limitación de nutrientes y la tolerancia ambiental regulan o excluyen la existencia de microorganismos en diferentes ambientes, según la ley del mínimo de Liebig y la ley de la tolerancia de Shelford, respectivamente. Según la ley de Liebig, la producción total de biomasa de cualquier organismo está determinada por el nutriente cuya concentración sea la mínima, en relación con lo que requiere el organismo. Según la ley de la tolerancia de Shelford, la presencia y la abundancia de organismos en un ambiente están determinadas no sólo por los nutrientes sino también por factores fisicoquímicos, tales como temperatura, potencial redox y pH, entre otros. En esencia, la ley de Shelford dice que hay límites para los factores ambientales, por encima y por debajo de los cuales no es posible que los microorganismos sobrevivan (Atlas, Bartha, & Guerrero, 2001).

Adaptar se define, dicho de un ser vivo: Acomodarse a las condiciones de su entorno. Tolerar se define: Resistir, soportar, especialmente un alimento o una medicina (Real Academia Española, 2014). La adaptación microbiana se define como la capacidad de una población microbiana para adecuarse a sí misma a un entorno cambiante, como la presencia de iones de cobre (II) (Dönmez & Aksu, 1999). El concepto de tolerancia comprende los mecanismos por los cuales un organismo o población puede desarrollar resistencia a la exposición a metales pesados y el grado de la actual resistencia (Tyler, Pålsson, Bengtsson, Bååth, & Tranvik, 1989). Las adaptaciones que presentan los

organismos termófilos para sobrevivir a temperaturas elevadas comprenden, entre otras, una gran proporción de lípidos saturados en las membranas, la cual impide la fusión a esas temperaturas. Entre los iones inorgánicos, los metales pesados merecen especial atención. Un mecanismo general de toxicidad de los metales pesados es su unión con los grupos sulfhidrilo (-SH) de proteínas y enzimas microbianas esenciales (Atlas et al., 2001). Estudios realizados sostienen que para los microorganismos acidófilos su crecimiento en altas concentraciones de metales se debe parcialmente a una tolerancia intrínseca como consecuencia del medio ambiente en el que viven (Dopson, Ossandon, Lövgren, & Holmes, 2014).

Las paredes de las bacterias tienen una capa rígida que es la responsable principal de la resistencia de la célula. Esta capa rígida llamada peptidoglucano, es un polisacárido compuesto por dos derivados de azúcares, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, y unos pocos de aminoácidos, L-alanina, D-alanina, D-ácido glutámico y L-lisina o una molécula de estructura similar, el ácido diaminopimélico (Michael T Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015). Los grupos carboxilos del peptidoglucano y grupos fosfatos proporcionan los sitios de unión con el metal en las bacterias gram positivas y gram negativas respectivamente (Gaur et al., 2014; Kotrba, Mackova, & Macek, 2011). Quitinas, glucanos, mananos y proteínas son los componentes de la pared celular de los hongos. A parte de esto también contienen otros polisacáridos, lípidos y pigmentos (melanina) los cuales facilitan la unión de muchos iones metálicos (Gaur et al., 2014; Latgé, 2010). La biosorción de metales pesados en soluciones acuosas por bacterias incluyen *Baccillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. Los hongos y levaduras son factibles de cultivar, para producir altos rendimientos de biomasa y al mismo tiempo se pueden manipular genéticamente y morfológicamente. Fungi biosorbentes incluyen *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc. (Fu & Wang, 2011).

Un numero de microorganismos son capaces de producir polisacáridos y otros biopolímeros que exhiben propiedades de unión con metales (Gutnick & Bach, 2000). Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son productos metabólicos que

contienen polisacáridos de alto peso molecular (10-30 kDa) con composiciones de homopolímeros y heteropolímeros (Prabhakaran, Ashraf, & Aqma, 2016; Singha, 2012). Las EPS de bacterias son químicamente diversas y principalmente son heteropolisacáridos ácidos con grupos funcionales ionizables como hidroxilo, carboxilo, amida, sulfato y fosforilo los cuales muestran una gran afinidad hacia los metales pesados (Bramhachari et al., 2007; Deepika, Raghuram, Kariali, & Bramhachari, 2016). Estudios realizados demostraron que la presencia de arseniato incrementó la producción de EPS en la cepa de *Rhizobium radiobacter* VBCK1062 reteniendo una cantidad muy alta de este. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la capacidad bacteriana para resistir el arsénico se debe a la eficiencia de la bacteria para la transformación y secuestro del arsénico, y contrarrestar diferentes condiciones ambientales de estrés (Deepika et al., 2016).

Desde el punto de vista industrial, la selección de cepas es una etapa obligatoria, incluso en procesos de mejoramiento de cepas, concluyéndose que las cepas nativas, por lo general, son las más apropiadas para procesos a escala comercial (Medrano Roldán & Galán Wong, 2000). Las bacterias útiles en biotecnología de minerales pueden aislarse de medios ambientes naturales que resulten favorables para sus necesidades fisiológicas naturales; por ejemplo, aguas ácidas, manantiales de aguas termales, depósitos de minerales, etc., donde los valores de pH y temperatura se sitúan en los valores máximos para su crecimiento y supervivencia (Agate, Lundgren, & Skyring, 1982). Lobban et al. (1985) y Elder (1988) mencionan que en general, a un pH bajo los metales pueden existir como cationes libres y/o complejos solubles, pero a pH alcalino tienden a precipitar como hidróxidos insolubles, óxidos, carbonatos o fosfatos (Romero Acosta, 1996). Por lo que zonas contaminadas por metales pesados como aguas y sedimentos de ríos cercanos a actividades mineras pueden contener microorganismos tolerantes a altas concentraciones de metales pesados.

Estudios realizados en cultivos de enriquecimiento demuestran que las bacterias resistentes al níquel son poco frecuentes en los suelos y en otros ambientes en los que este metal no se encuentra en cantidades significativas. Las bacterias muy resistentes

al níquel o a otros metales son más frecuentes en aguas residuales de la industria de procesamiento de metales, o en instalaciones mineras donde los metales pesados son extraídos por lixiviación junto con mineral de hierro o de cobre (Michael T. Madigan, Martinko, & Parker, 1998).

En el agua superficial del Río San Pedro, se observaron valores altos de conductividad eléctrica, sulfatos y metales pesados como cadmio, cobre, hierro, manganeso, níquel y zinc, y valores bajos de potencial de hidrógeno (pH) y oxígeno disuelto. El Río San Pedro, presenta serios problemas de contaminación debido a las descargas de aguas ácidas con altos niveles de metales pesados. Adicionalmente, recibe descargas de aguas negras domésticas e industriales provenientes de la ciudad de Cananea, Sonora (Romero Acosta, 1996). Las concentraciones totales de metales detectadas en los sedimentos superficiales del Río San Pedro se encontraron siguiendo el orden de mayor a menor: Fe>Cu>Mn>Zn>Pb>Cd (Gómez-Álvarez et al., 2007). El Río San Pedro mostro significativa contaminación por metales potencialmente tóxicos (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn) en 2005-2006, siendo la mayor contaminación en las estaciones de muestreo ubicadas cerca de la actividad minera y urbana (Gómez-Álvarez et al., 2011).



## 1.2 Justificación

La contaminación del agua por metales pesados es actualmente un serio problema a nivel mundial y especialmente en regiones con escasez de agua como el estado de Sonora. Se ha reportado contaminación de origen antropogénico por metales pesados en el Río San Pedro en corrientes cercanas a Cananea Sonora, metales como cobre y manganeso se encontraron en altas concentraciones.

En el presente estudio se propuso aislar del Río San Pedro microorganismos tolerantes a altas concentraciones de cobre y manganeso e identificar las cepas con mayor tolerancia, ya que el río puede ser la fuente de obtención de microorganismos tolerantes con propiedades para biosorber metales pesados.

Se realizaron estudios de adaptación y tolerancia a cobre y manganeso a los microorganismos seleccionados, con el fin de conocer cómo se adaptan estos microorganismos en presencia de altas concentraciones de cobre y manganeso, así como para establecer los límites a los cuales no les es posible desarrollarse.

Para la formulación de un biosorbente de metales pesados a base de biomasa de microorganismos se requiere reproducir masivamente en biorreactores. Por lo anterior, se estudiaron las cinéticas de crecimiento en un biorreactor tipo tanque agitado de los microorganismos identificados, para determinar el tiempo y rendimiento de producción de la biomasa de cada cepa.

Derivado de este estudio fue posible obtener aislados nativos identificados de microorganismos tolerantes a cobre y manganeso con potencial para su aplicación en la biorremediación de aguas y sedimentos contaminados por cobre y manganeso. También se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento que tienen aplicación en el escalamiento de procesos a nivel planta.

### **1.3 Objetivo General**

Evaluar las cinéticas de adaptación y tolerancia a metales pesados de microorganismos aislados de aguas y sedimentos contaminados de origen antropogénico.

### **1.4 Objetivos Específicos**

- Aislar e identificar microorganismos tolerantes a cobre y manganeso provenientes de aguas y sedimentos contaminados con metales pesados.
- Determinar el nivel de tolerancia a cobre y manganeso de los microorganismos a partir de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en medio de cultivo sólido.
- Evaluar la adaptación y rendimiento de los microorganismos ante diferentes concentraciones de cobre y manganeso en sistema en lote.
- Estudiar la cinética de crecimiento de los microorganismos en un biorreactor tipo tanque agitado.

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

#### 2.1 Zonas Contaminadas por Metales Pesados en el Estado de Sonora

Se presenta la revisión de la literatura en orden a los objetivos planteados, mostrando las investigaciones y avances en el área de remoción de metales utilizando biosorbentes para hacer énfasis en microorganismos tolerantes a altas concentraciones de metales. Gómez-Álvarez et al. (2008), mostraron resultados de altos niveles de metales pesados (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, y Zn), conductividad eléctrica, sulfatos y bajos niveles de pH en muestras colectadas en el Río San Pedro, en Cananea Sonora durante el periodo de los años 1993-2005. En la Tabla 2 se muestran las concentraciones de metales pesados determinadas en el río en el año 2005, en puntos de muestreo cercanos a Cananea Sonora.

**Tabla 2.** Concentración de metales pesados en el agua del Río San Pedro, 2005. (Gómez-Alvarez et al., 2008).

pH	Cd (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)	Zn (mg/L)
3.94	0.03	6.60	9.51	6.30	2.42
7.72	0.02	0.83	5.62	2.67	1.10

El Río San Pedro, en Arizona y Sonora México, es un área que ha experimentado rápidos cambios en el uso y la cobertura de la tierra, y que posteriormente enfrentó grandes crisis ambientales relacionadas con los recursos hídricos (Kepner, Semmens, Bassett, Mouat, & Goodrich, 2004). Estudios realizados por (Gómez-Álvarez et al., 2007), determinaron las concentraciones totales de cobre y manganeso en muestras de sedimento del Río San Pedro colectadas cercanas a Cananea, Sonora. La primera estación de muestreo de sedimento resulto con pH de 3.26, Eh de 0.545 V, 700.90 mg Kg<sup>-1</sup> de Cu y 113.85 mg Kg<sup>-1</sup> de Mn. Para otra estación de muestreo de sedimento resulto con pH de 6.91, Eh de 0.410 V, 512.66 mg Kg<sup>-1</sup> de Cu y 472.19 mg Kg<sup>-1</sup> de Mn.

Sedimentos provenientes de los arroyos Mexicana y Jaralito cercanos a Cananea Sonora, mostraron altas concentraciones de Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, y Zn, indicando el origen antropogénico de estos metales (Aguilar-Hinojosa et al., 2016).

### 2.1.1 Microorganismos aislados de zonas con altas concentraciones de metales

Diversos autores han realizado aislamientos de microorganismos tolerantes a metales pesados, en la Tabla 3 se incluyen aquellos que aislaron microorganismos de zonas con altos contenidos de metales pesados y los medios de cultivo empleados.

**Tabla 3.** Microorganismos aislados de zonas con altas concentraciones de metales.

<b>Microorganismo</b>	<b>Origen</b>	<b>Metal tolerante/ Medio de cultivo de aislamiento</b>	<b>Referencias</b>
<b><i>Escherichia coli</i>, <i>Burkholderia cepacia</i></b>	Río San Pedro	Cu/ Agar nutritivo Caldo nutritivo	(Monge-Amaya, Valenzuela-García, Acedo- Félix, Certucha-Barragán, & Almendáriz-Tapia, 2008)
<b><i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Alternaria</i>, <i>Geotrichum</i>, <i>Fusarium</i></b>	Río en Marruecos	Pb, Cr, Cu, Zn, Cd/ Agar PDA Agar MEA	(Ezzouhri, Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009)
<b><i>Bacillus cereus</i> RC-1</b>	Suelo contaminado por cadmio en China	Cd/ NB (Caldo)	(Huang et al., 2013)
<b><i>Rhizobium</i> <i>halophytocola</i></b>	Suelos de la industria del hierro en India	Mn, Ni, Pb, Fe/ Agar nutritivo	(Gupta, Kumar, & Mittal, 2016)

## 2.2 Tolerancia a Metales Pesados de Microorganismos Aislados

En cuanto a investigaciones sobre el aislamiento de microorganismos tolerantes a metales pesados y determinación de la concentración mínima inhibitoria se muestra la información obtenida en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Tolerancia a concentraciones de metales de microorganismos aislados.

<b>Microorganismo</b>	<b>Metal tolerante</b>	<b>Concentración mínima inhibitoria (MIC) (ppm)</b>	<b>Referencias</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (S7)	Cu, Cr, Cd, Hg	101, 77, 168, 10	(Hassen, Saidi, Cherif, & Boudabous, 1998)
<i>Pseudomonas</i> spp y <i>E. coli</i> .	Cd, Zn, Cu, Ni, Pb	200, 400, 400, 800, 1600	(Ansari & Malik, 2007)
<i>Streptomyces</i> sp. UTMC 2241	Ni, Cd, Zn, Cu	264, 1034, 4575, 444	(Hamedi, Dehghani, & Mohammadian, 2015)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Pb, As, Cu, Cd	6008, 2022, 1334, 1573	(Ilyas, Rehman, Coelho, & Sheehan, 2016)
<i>Rhizobium radiobacter</i>	As(V), Cu, Pb, Cr, Ni, Cd	749.2, 95.3, 37.2, 5.1, 4.6, 4.4	(Deepika et al., 2016)
Levadura aislada (ES10.4)	Pb, Cu, Hg, Cd	3522, 826, 300, 33	(Irawati, Wijaya, Christian, & Djojo, 2016)

## 2.3 Cinéticas de Crecimiento de Microorganismos Tolerantes a Metales Pesados

Para la producción a gran escala y económica de biomasa biosorbente de metales pesados, se realizan cinéticas de crecimiento en diferentes sistemas como en matraz y biorreactor para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de los microorganismos estudiados. En la Tabla 5 se muestran investigaciones realizadas en cinéticas de crecimiento de microorganismos tolerantes a metales pesados en relación con el sistema de crecimiento, medio de cultivo y condiciones de operación.

**Tabla 5.** Parámetros cinéticos de crecimiento en diferentes sistemas.

Microorganismo	Sistema de crecimiento y medio de cultivo	Condiciones de operación T (°C), rpm, pH	Parámetros obtenidos	Referencias
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Matraz agitado de 250 mL con 100 mL de YPG	25, 150, 3-5	$\mu_{\max}=0.291 \text{ h}^{-1}$ $X_{\max}=9.6 \text{ g/L}$	(Dönmez & Aksu, 1999)
<i>Rhodotorula sp.</i> Y11	Matraz agitado de 500 mL con 100 mL de YPD	28, 150, 5.8	$\mu_{\max}=0.359 \text{ h}^{-1}$ $X_{\max}=15.75 \text{ g/L}$	(Li, Yuan, & Hu, 2008)
<i>Rhodotorula rubra</i> ICCF 209	Tanque agitado mecánicamente de 3.7 L con 2 L de medio MS3	30, 600, 6	$\mu_{\max}=0.18 \text{ h}^{-1}$ $X_{\max}=4.39 \text{ g/L}$	(Ungureanu, Ferdes, & Ana, 2012)

La información referente a cinéticas de crecimiento en diferentes sistemas para la producción de biomasa de microorganismos tolerantes a metales pesados es útil para estimar el comportamiento de los microorganismos seleccionados en el presente estudio.

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales y Equipos

##### Materiales

- Tubos de ensayo con rosca estériles de 10 mL
- Puntas estériles de 1000  $\mu$ L
- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL
- Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca
- Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.
- Asas de Drigalski de vidrio estériles
- Agitador magnético
- Varilla magnética
- Matraz aforado de 1000 mL
- Frasco con tapa de 1000 mL
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz aforado (Volumen del medio de cultivo)
- Tapones de algodón
- Papel aluminio
- Placas de Petri
- Vaso de precipitado
- Tubos de ensayo de 16 X 160 mm
- Probeta
- Asa bacteriológica
- Embudo



- Pipeta volumétrica de 10 mL
- Crisol Gooch
- Adaptador con alargadera tipo Walter
- Matraz kitasato de 500 mL
- Desecador de vidrio
- Pinza
- Microtubos para centrífuga Eppendorf de 1.5 mL
- Filtros Whatman de microfibra de vidrio GF/A de 1.6  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 24 mm de diámetro

#### Equipos

- Medidor de pH Thermo Scientific Orion 266S
- Medidor de ORP HANNA instruments HI98121
- Agitador vórtex
- Campana de flujo laminar LABCONCO Purifier Logic+
- Incubadora Thermo Scientific LINDBERG BLUE M
- Micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$
- Autoclave con termómetro y manómetro
- Balanza analítica OHAUS ADVENTURER AR2140
- Placa de calentamiento con agitación
- Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis
- Incubadora con agitación CScientific CVP-500
- Bomba de vacío
- Horno de secado Thermo Scientific PRECISION
- Centrífuga Eppendorf 5424
- Microscopio invertido ZEISS Axio Vert.A1
- Biorreactor Applikon Biotechnology de 3 L (Volumen de operación máximo 2.4 L y mínimo 0.9 L) con ez-Control para el control preciso de pH, temperatura, oxígeno disuelto, espuma y agitación.

### 3.1.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo y materiales utilizados se esterilizaron en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar triptona-extracto de levadura (agar para cuenta estándar)

**Tabla 6.** Agar para cuenta estándar.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
<b>Extracto de levadura</b>	2.5 g
<b>Triptona</b>	5.0 g
<b>Dextrosa</b>	1.0 g
<b>Agar</b>	15.0 g
<b>Agua</b>	1.0 L

Agar nutritivo

**Tabla 7.** Agar nutritivo.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
<b>Extracto de res</b>	3.0 g
<b>Peptona</b>	5.0 g
<b>Agar</b>	15.0 g
<b>Agua</b>	1.0 L

Caldo nutritivo

**Tabla 8.** Caldo nutritivo.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
<b>Extracto de res</b>	3.0 g
<b>Peptona</b>	5.0 g
<b>Agua</b>	1.0 L

Medio LB

**Tabla 9.** Medio LB.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
<b>Extracto de levadura</b>	5.0 g
<b>Peptona</b>	10.0 g
<b>Cloruro de sodio</b>	10.0 g
<b>Agua</b>	1.0 L

Medio YPG

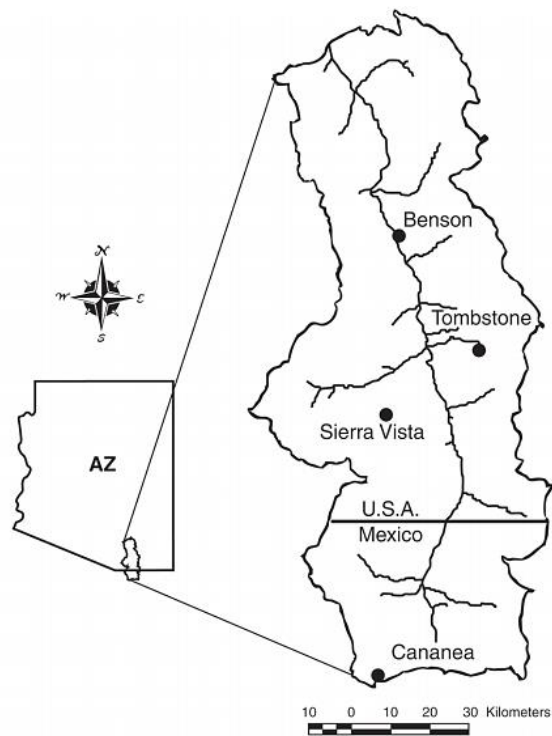
**Tabla 10.** Medio YPG.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
<b>Extracto de levadura</b>	3.0 g
<b>Peptona</b>	5.0 g
<b>Glucosa</b>	10.0 g
<b>Agua</b>	1.0 L

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Muestreo de aguas y sedimentos del Río San Pedro

El muestreo de aguas y sedimentos se realizó en tres zonas del Río San Pedro cercanas a la ciudad de Cananea, Sonora ( $30^{\circ}59'35''\text{N}$   $110^{\circ}18'02''\text{O}$ ) y la mina Buena Vista del Cobre en Cananea, Sonora. En la Figura 2 se muestra la cuenca alta del Río San Pedro, en donde se encuentra Cananea, Sonora. El muestreo del agua se llevó a cabo en botellas estériles de 500 mL. Para los sedimentos se tomó muestra con 10 cm de profundidad y se colocaron en recipientes estériles de 500 mL. A las muestras de agua y sedimento del río se les determinó el pH y ORP. Las muestras se conservaron en hielo para su traslado al Laboratorio de Biorremediación en la Universidad de Sonora.



**Figura 2.** Ubicación de la cuenca alta del Río San Pedro, Arizona/Sonora. Adaptada de (Kepner et al., 2004).

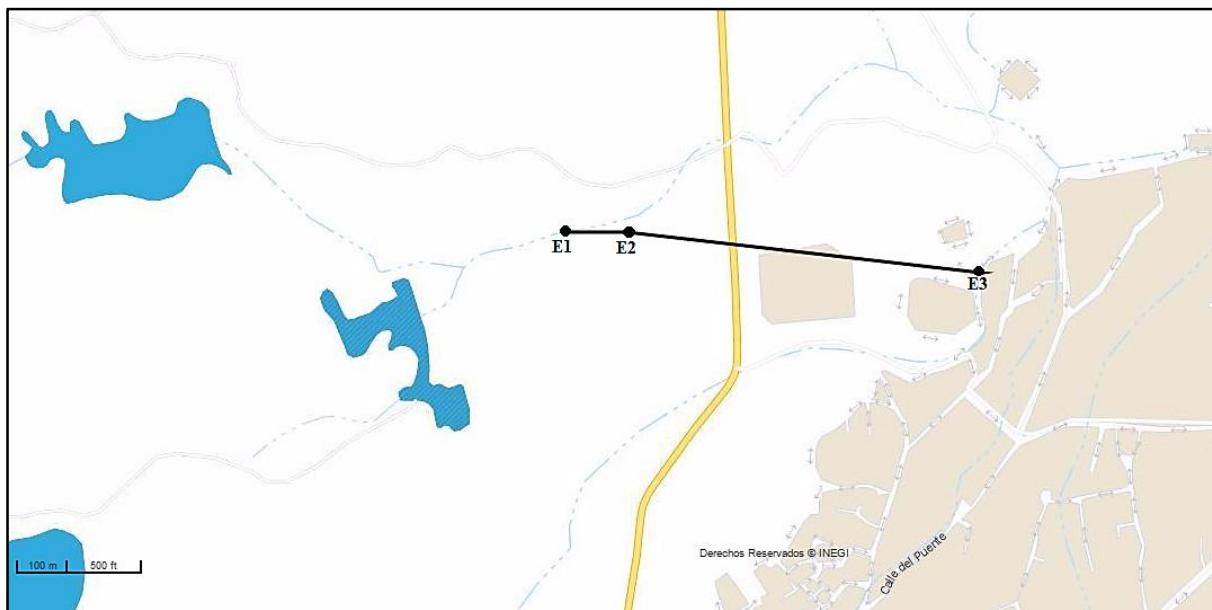
El muestreo de agua y sedimento se realizó en corrientes del río cercanas a actividades mineras, se seleccionaron tres zonas a las cuales se les nombró estación 1 (E1), estación 2 (E2) y estación 3 (E3). En la Tabla 11 se muestran las coordenadas geográficas de las estaciones.

**Tabla 11.** Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo.

Estación	Notación decimal	Notación sexagesimal
1	30.994125-110.313232	30°59'38.85000" N 110°18'47.63520" W
2	30.994099-110.311935	30°59'38.75640" N 110°18'42.96600" W
3	30.993440-110.305182	30°59'36.38400" N 110°18'18.65520" W

Fuente: INEGI

En la Figura 3 se observan las corrientes en donde se localizan las estaciones de muestreo.



**Figura 3.** Mapa de localización de las estaciones de muestreo (INEGI).

### 3.2.2 Medición del pH en muestras de agua y sedimento

La determinación del pH medido en agua y sedimento se realizó a través del método descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. El método electrométrico para la determinación del pH en muestras de suelo para en una solución de agua pura. La evaluación electrométrica del pH se basa en la determinación de la actividad del ion hidrogeno mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensitiva al ion hidrogeno. En el caso de los sedimentos el pH se midió potenciométricamente en la suspensión sobrenadante de una mezcla de relación sedimento: agua 1:2.

#### Procedimiento

1. Se pesó 10 g de sedimento en un frasco de vidrio de boca ancha.
2. Se adicionó 20 mL de agua destilada al frasco conteniendo el sedimento.
3. Con una varilla de vidrio, se agitó manualmente la mezcla de sedimento: agua.
4. Se dejó reposar durante 15 minutos.
5. Se calibró el medidor de pH con las soluciones reguladoras pH 4.00 y 7.00 o 7.00 y 10.00 según el sedimento, enjuagando con agua destilada los electrodos antes de iniciar las lecturas de las muestras.
6. Se agitó nuevamente la suspensión para introducir el electrodo en la suspensión.
7. Se registró el pH al momento en que la lectura se haya estabilizado.

### 3.2.3 Medición del potencial de óxido-reducción (ORP)

El potencial de óxido-reducción, o potencial redox ( $E_h$ ), mide las propiedades oxidantes o reductoras del suelo en un momento dado (Vega de Kuyper, 2007). Los valores medidos de ORP con frecuencia se normalizan con respecto al electrodo estándar de hidrógeno (SHE),  $E_h$  (James, Copeland, & Lytle, 2004). Las reacciones de óxido-reducción son aquellas en las cuales hay transferencia de electrones de un donante (el agente reductor) a un aceptador (el agente oxidante). Los agentes reductores difieren en su tendencia a perder electrones y los agentes oxidantes en ganarlos (León & Arregocés, 1981).

El potencial redox del sistema representa su habilidad para cambiar electrones:  $E_h > 0$  (potencial alto), aquí el sistema tiende a quitar electrones de la especie;  $E_h < 0$  (potencial bajo), el sistema suministra electrones a la especie. Quizás los factores más importantes que gobiernan la solubilidad de un elemento en el agua es la relación entre la concentración de iones hidrógeno (expresado como pH) y el potencial de oxidación ( $E_h$ ) (Gómez Álvarez, Valenzuela G., & Meza Figueroa, 2011). La relación entre el pH y  $E_h$  se representa en diagramas de Pourbaix o diagramas  $E_h$ -pH.

#### Procedimiento

1. Se tomaron las muestras de agua y sedimento en dilución a las que se les midió el pH para realizar la medición del ORP.
2. Se introdujo el medidor de ORP en la muestra hasta que se estabilizó la lectura.

Con los valores de pH y ORP obtenidos se colocaron en los diagramas de Pourbaix los puntos en los que encuentran el cobre y manganeso en solución acuosa para las zonas de muestreo seleccionadas. En la Figura 4 y Figura 5, se muestran los diagramas de Pourbaix para cobre y manganeso respectivamente en solución acuosa a 25 °C.

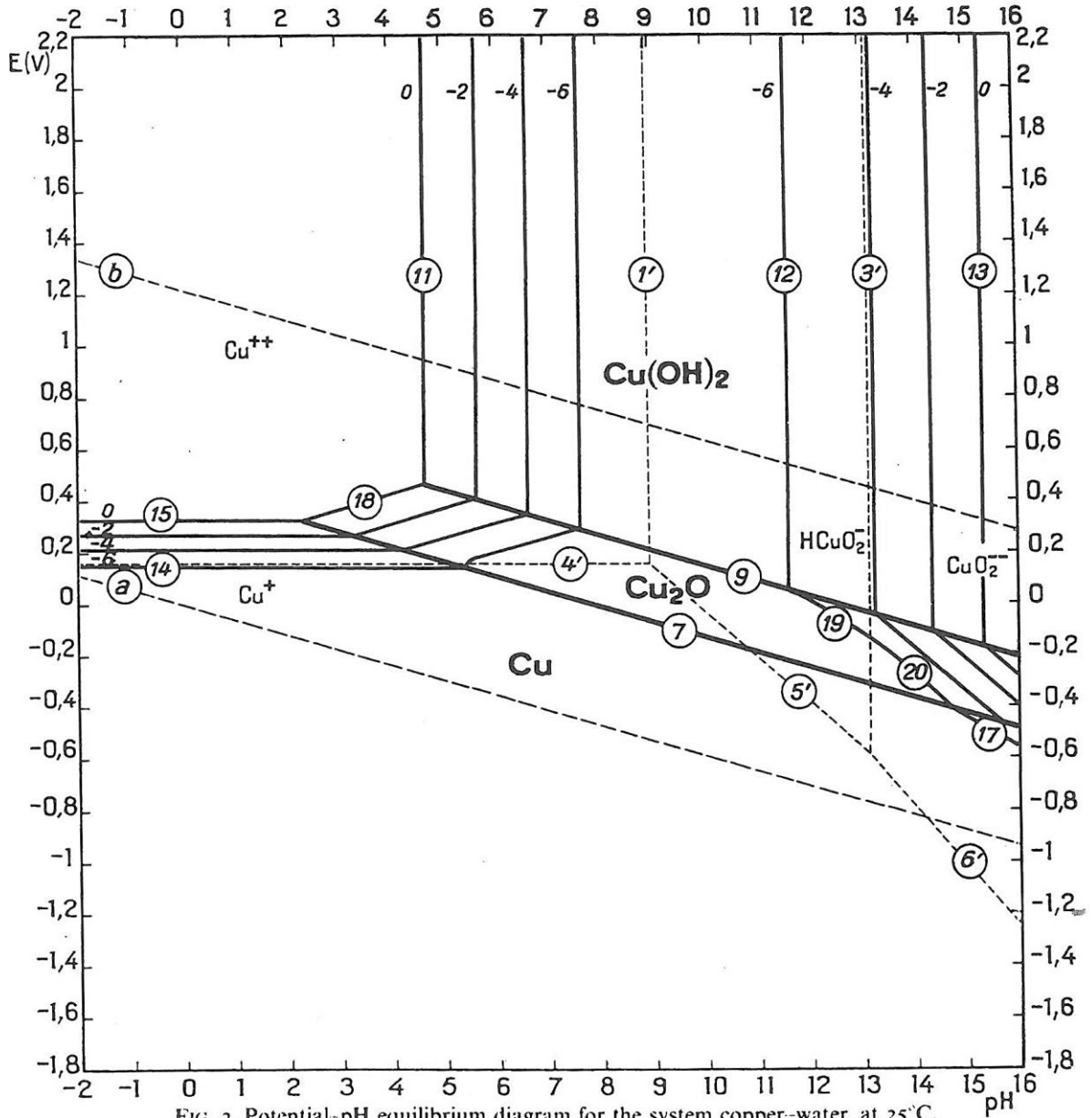


FIG. 2. Potential-pH equilibrium diagram for the system copper-water, at 25°C. [Considering the solid substances Cu,  $\text{Cu}_2\text{O}$  and  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .  $\text{CuO}$  is not considered.]

Figura 4. Diagrama Eh-pH del sistema cobre-agua a 25 °C (Pourbaix, 1974).



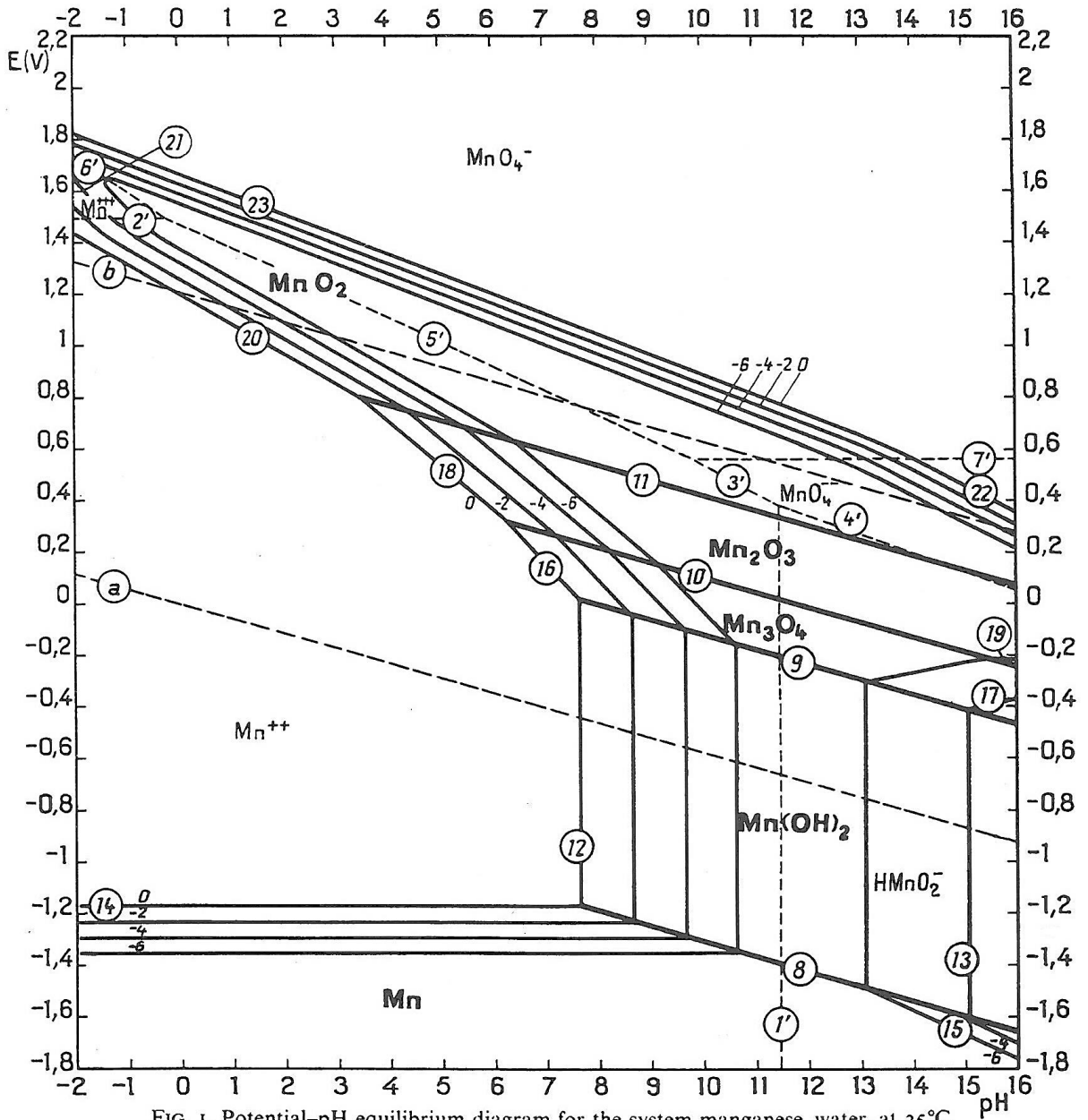


FIG. 1. Potential-pH equilibrium diagram for the system manganese-water, at 25°C.  
[Considering  $\beta$ -MnO<sub>2</sub> (pyrolusite).]

Figura 5. Diagrama Eh-pH del sistema manganeso-agua a 25 °C (Pourbaix, 1974).

### 3.2.4 Preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico

Para la preparación y dilución de muestras se siguió la metodología de la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. La dilución primaria tiene por objeto obtener una distribución lo más uniforme de los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis. La preparación de diluciones decimales adicionales, si son necesarias, tiene como objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir después la incubación, la observación de la prueba en el caso de tubos o matraces y la cuenta de colonias en el caso de placas.

#### Reactivos

- Solución de hidróxido de sodio 1M (4.0 g de NaOH en 100 mL de agua).
- Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada). 34 g/L de fosfato de sodio monobásico.

Se disolvió el fosfato en 500 mL de agua y ajustó el pH a 7.2 con solución de hidróxido de sodio 1M. Se aforó a un litro de agua y esterilizó durante 15 minutos a  $121 \pm 1.0$  °C. Se conservó en refrigeración. Se tomó 1.25 mL de solución concentrada y se llevó a un litro con agua (solución de trabajo). Se distribuyó en porciones de 9 mL y se esterilizó durante 15 minutos a  $121 \pm 1.0$  °C.

- Agua peptonada. 1 g/L de peptona y 8.5 g/L de cloruro de sodio.

Se ajustó el pH a  $7 \pm 0.1$  con solución de hidróxido de sodio 1M. Se distribuyó en porciones de 9 mL y se esterilizó durante 15 minutos a  $121 \pm 1.0$  °C.

Todo el material se esterilizó durante 15 minutos como mínimo a  $121 \pm 1.0$  °C.

#### Procedimiento

##### Preparación de la dilución primaria

1. Para muestras líquidas (agua)

Se agitó la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Se tomó 1 mL de la muestra y se diluyó con 9 mL de diluyente.

## 2. A partir de muestras sólidas o semisólidas (sedimento)

Se pesó una cantidad de 1 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado. Se adicionó un volumen de 9 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra. Se permitió que las partículas grandes se sedimenten, y se transfirió la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.

### Preparación de las diluciones decimales adicionales

Se transfirió 1 mL de la dilución primaria en otro recipiente con 9 mL del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Para la técnica de cuenta en placa, se consideró las diluciones en las que se puedan contar 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de bacterias aerobias en placa. Las diluciones de la muestra se prepararon inmediatamente antes del análisis y éstas se usaron para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 minutos posteriores a su preparación.

### 3.2.5 Cuenta de microorganismos en placa

La técnica para la cuenta se obtuvo de la NOM-092-SSA1-1994. El fundamento de la técnica consistió en contar las colonias, que se desarrollaron en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. Para fines de esta norma se entiende por: Unidades formadoras de colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

#### Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra se siguió la metodología descrita en preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico en el punto anterior.

#### Procedimiento

1. La prueba se realizó para tres diluciones para inocular por duplicado.
2. Se tomó 1 mL de las diluciones de las muestras preparadas para inocular en las placas de Petri y se agregaron de 12 a 15 mL del medio agar para cuenta estándar. Se mezcló hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio.
3. Se incubaron las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) a 30 °C durante 48 horas.
4. En la lectura se seleccionaron aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

#### Expresión de resultados

Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, se multiplicó por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra.

### 3.2.6 Preparación de disoluciones concentradas de cobre o manganeso

Con el propósito de obtener disoluciones concentradas de metal que puedan ser utilizadas para preparar medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos, se calculó la cantidad de sal que debe tener la disolución en base a la siguiente metodología. En la Tabla 12 se muestra la información de los reactivos utilizados.

**Tabla 12.** Reactivos para disoluciones concentradas de cobre y manganeso.

Fórmula	Nombre	CAS	PM (g/mol)	R <sub>M/PM</sub> (gmetal/gsal)
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado	7758-99-8	249.68	0.25448
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso monohidratado	10034-96-5	169.00	0.32502

Masa atómica del cobre y manganeso:

$$M_{Cu} = 63.54 \frac{g}{mol} \quad M_{Mn} = 54.93 \frac{g}{mol}$$

Procedimiento

Para la preparación de las disoluciones concentradas primeramente se estableció el volumen (V) de la disolución a 1 litro y la concentración del metal (C) a 2000 ppm. Utilizando la Ec. (1), se calculó la cantidad de sal requerida para pesar y obtener una disolución con la concentración de metal establecida.

$$m_{sal} = \frac{(V) * (C)}{(R_{M/PM}) * (1000)} \quad (1)$$

*V* = Volumen de la disolución (L)

*C* = Concentración de metal ppm (mg/L)

*R<sub>M/PM</sub>* = Relación entre el peso del metal y el peso de la sal  $\left(\frac{g \text{ metal}}{g \text{ sal}}\right)$

*m<sub>sal</sub>* = Cantidad de sal requerida para tener la concentración *C* de metal (g)

Al tener el valor de la cantidad de sal a pesar, se realizó el siguiente procedimiento.

1. Se pesó la cantidad de sal requerida en la balanza analítica.
2. Se agregó a un matraz aforado, agua destilada hasta aproximadamente la mitad de la capacidad del matraz.
3. Se agregó la sal al matraz y se colocó el matraz en la placa con agitación hasta que se disolvió.
4. Se aforo con agua destilada el matraz volumétrico.

### 3.2.7 Medios de cultivo sólidos y líquidos enriquecidos con cobre o manganeso

Con el propósito de aislar microorganismos que se desarrollen en medios de cultivo enriquecidos con altas concentraciones de metal y determinar la tolerancia para crecer en el medio, se llevó a cabo la preparación de medios de cultivo enriquecidos con sales. A continuación, se presenta la metodología de preparación.

#### Reactivos

- Agua destilada
- Medio de cultivo sólido o líquido
- Disolución de 2000 ppm Cu
- Disolución de 2000 ppm Mn
- NaOH 1M

Las disoluciones se preparan previamente con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

#### Procedimiento

Primeramente, se calculó cuanto volumen de la disolución de 2000 ppm de metal se añadió en el matraz de preparación del medio de cultivo, en la Tabla 13 se muestra la cantidad de volumen de la disolución de metal requerida para añadir al medio de cultivo, para diferentes volúmenes de medio de cultivo y concentraciones (ppm) de metal en el medio.

**Tabla 13.** Cantidad del volumen de la disolución de metal (2000 ppm) para el medio de cultivo.

Volumen del medio de cultivo (mL)	V (mL) 100 ppm	V (mL) 200 ppm	V (mL) 300 ppm	V (mL) 400 ppm	V (mL) 500 ppm	V (mL) 600 ppm	V (mL) 700 ppm	V (mL) 800 ppm	V (mL) 900 ppm	V (mL) 1000 ppm
<b>100</b>	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
<b>250</b>	12.5	25	37.5	50	62.5	75	87.5	100	112.5	125
<b>400</b>	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
<b>500</b>	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250

Al tener el valor del volumen de la disolución concentrada de metal que se agregaría al medio de cultivo, se preparó el medio de cultivo sólido en base al siguiente procedimiento.

1. Se pesó el agar o el medio de cultivo conforme al volumen del medio de cultivo seleccionado. Para el aislamiento de microorganismos de muestras de sedimento se utilizó agar nutritivo con pH de 7.0. Para las pruebas de tolerancia a cobre y manganeso en medio sólido se utilizó agar para cuenta estándar con pH de 6.0 y para las pruebas de adaptación y rendimiento en medio líquido se utilizó medio LB y YPG con pH de 6.0.
2. Se agregó al matraz aforado agua destilada hasta un nivel por debajo de la mitad de la capacidad. Esto con el fin de disolver el medio de cultivo y que se cuente con espacio para el volumen de la disolución concentrada de metal.
3. Se agregó al matraz aforado el medio de cultivo que se pesó y el volumen de la disolución concentrada de metal.
4. Se colocó en agitación y se ajustó el pH de la disolución al valor establecido agregando NaOH 1M.
5. Se aforo con agua destilada el matraz y se esterilizo el medio de cultivo en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.



### 3.2.8 Aislamiento de microorganismos en medios de cultivo sólidos enriquecidos con cobre o manganeso

Con el propósito de aislar los microorganismos metalotolerantes presentes en las muestras y determinar las concentraciones de cobre y manganeso a las cuáles los microorganismos presentes se pueden desarrollar, se realizó el siguiente procedimiento.

#### Reactivos

- Solución salina estéril de NaCl al 0.9 % (P/V)
- Placas de Petri con agar nutritivo enriquecidas con cobre o manganeso

#### Procedimiento

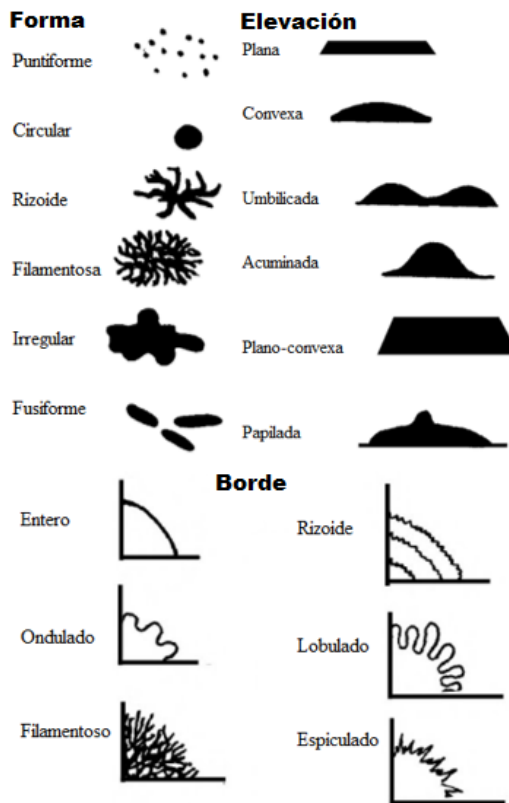
Para la siembra de las muestras de sedimento, se agregaron a un tubo de ensayo con rosca estéril de 10 mL un volumen de 9 mL de solución salina estéril utilizando la micropipeta y una punta estéril. Se tomó 1 gramo de muestra de sedimento y se agregó al tubo, se colocó el tubo en el agitador vórtex durante 1 minuto. Cada paso se realizó dentro de la campana de flujo laminar. Al tener las muestras de sedimento disueltas en la solución salina, se prosiguió a realizar las siembras de las diluciones en los medios de cultivo sólidos enriquecidos con metales, con la secuencia que se muestra a continuación. Cada prueba se realizó por duplicado para cada concentración de cobre y manganeso (0, 200, 500, 800, 1000 ppm).

1. Se tomaron 100  $\mu$ L de muestra de sedimento disuelto en solución salina estéril, utilizando la micropipeta de 100-1000  $\mu$ L con puntas estériles. Se tomó una placa de Petri con medio de cultivo y se vaciaron los 100  $\mu$ L en el centro de la placa.
2. Con un asa de Drigalski de vidrio estéril se esparció la muestra por toda la superficie de la placa de Petri. Se colocaron las placas inoculadas dentro de la incubadora a 30 °C.
3. Se observó la morfología colonial en las placas a las 24 y 48 horas para seleccionar las colonias que se desarrollaron a las más altas concentraciones de cobre y manganeso.

### 3.2.9 Morfología colonial y microscópica de microorganismos en medios de cultivo sólidos

Los medios sólidos aportan la visualización de la morfología colonial como primer paso en la identificación, así como la posibilidad de detectar cultivos mixtos (Prats, 2006).

Para aislar los microorganismos de las muestras de sedimento con características diferentes se observó la morfología colonial y microscópica en medios de cultivo sólidos. Las características morfológicas que se observaron de las colonias son las representadas en la Figura 6.



**Figura 6.** Características morfológicas de las colonias de microorganismos (Pérez & Peris, 1997).

Se observó el color, forma, elevación y borde de las colonias desarrolladas. Con el uso del microscopio se observó la tinción de Gram y la forma del microorganismo.

### 3.2.10 Selección de microorganismos tolerantes a cobre y manganeso

Para la selección del microorganismo que presentó mayor tolerancia a cobre y manganeso de cada estación de muestreo se realizaron las siguientes dos pruebas al grupo de microorganismos aislados.

- Con un asa bacteriológica se tomó una colonia aislada en agar para inocular en placas de Petri las cuales contenían agar para cuenta estándar con pH de 6.0 enriquecidas con 500 ppm de cobre y 500 ppm de manganeso respectivamente. Se incubaron las placas a 30 °C durante 48 horas para observar si se presentó el desarrollo de colonias. La prueba se realizó por duplicado para cada microorganismo.
- En cuatro tubos de ensayo de 16 X 160 mm conteniendo 15 mL de caldo nutritivo con pH de 6.0 fueron inoculados tres tubos tomando con un asa bacteriológica una colonia aislada en agar del microorganismo a estudiar y un tubo no se inoculó ya que se utilizó como blanco. Se puso un tapón de algodón a cada tubo y se colocaron los tubos en la incubadora a 30 °C para tomar muestra a las 48 horas de crecimiento, tomando 500 µL para leer el porcentaje de transmitancia a 600 nm en el espectrofotómetro. La prueba se realizó para cada microorganismo aislado.

### 3.2.11 Identificación de los microorganismos tolerantes a cobre y manganeso

El microorganismo que se seleccionó de cada zona de muestreo para su identificación fue el que presentó mayor tolerancia a cobre y manganeso, así como crecimiento en medio de cultivo líquido. Por lo que los microorganismos seleccionados y aislados se conservaron en placas de Petri con agar para cuenta estándar por duplicado en refrigeración.

Las muestras fueron enviadas al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional donde se les realizaron los análisis de secuenciación.

### 3.2.12 Concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) en medio de cultivo sólido

La concentración mínima inhibitoria (MIC) es definida como la concentración más baja que no causa crecimiento visible (Deepika et al., 2016). Para establecer los niveles de tolerancia a cobre y manganeso de los microorganismos aislados se evaluó la MIC y las Unidades formadoras de colonias (UFC) durante un tiempo establecido. La técnica desarrollada se describe en la siguiente metodología.

#### Reactivos

- Agar triptona-extracto de levadura (agar para cuenta estándar)
- Agua destilada
- Disolución de 2000 ppm Cu
- Disolución de 2000 ppm Mn
- NaOH 1M
- Solución con microorganismos

Las disoluciones se preparan previamente con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

#### Procedimiento

Se calculó cuanto volumen de disolución concentrada de cobre o manganeso a 2000 ppm es necesario añadir al medio de cultivo para obtener la concentración final deseada. En la Tabla 14 se muestra la cantidad en mililitros de disolución concentrada de cobre o manganeso a 2000 ppm requerida para obtener la concentración final deseada a un volumen de medio de cultivo establecido y la cantidad de medio de cultivo para pesar respecto al volumen del medio.

**Tabla 14.** Cantidad del volumen de la disolución de metal (2000 ppm) y de agar para cuenta estándar para el medio de cultivo.

Volumen del medio de cultivo (mL)	Agar para cuenta estándar (g)	V (mL) para 200 ppm	V (mL) para 400 ppm	V (mL) para 600 ppm	V (mL) para 800 ppm	V (mL) para 1000 ppm
100	2.35	10	20	30	40	50
250	5.875	25	50	75	100	125
500	11.75	50	100	150	200	250
1000	23.5	100	200	300	400	500

Al tener el valor del volumen de la disolución concentrada de metal que se agregó al medio de cultivo, se preparó el medio de cultivo sólido en base al siguiente procedimiento.

1. La prueba se llevó a cabo por duplicado para 5 diferentes concentraciones de metal (200, 400, 600, 800 y 1000 ppm) y concentración con cero ppm de metal.
2. El procedimiento que se muestra a continuación es para 100 mL de medio de cultivo sólido el cual es útil para el vaciado de 6 placas de Petri. Se agregaron 40 mL de agua destilada a un vaso de precipitado y se colocó en la placa con agitación, se agregó la cantidad de agar para cuenta estándar (2.35 g para 100 mL de medio) y se encendió el calentamiento de la placa para que se disolviera el agar.
3. Se agregó el volumen indicado en la Tabla 13, de disolución concentrada de metal para obtener la concentración establecida de metal a excepción del medio con concentración cero de metal el cual se afora directamente con agua destilada.
4. Se ajustó el pH a 6.0 con NaOH 1M y se agregó la solución a un matraz aforado de 100 mL para aforar con agua destilada.

5. Se vació el medio de cultivo preparado en un matraz de 125 mL y se tapó el matraz con papel aluminio. Se realizó este procedimiento para cada medio de cultivo sólido con diferentes concentraciones de metal restantes.

Se esterilizaron los matraces con medio de cultivo sólido en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### Inoculación

6. Siguiendo la metodología de la técnica preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico, dentro de la campana de flujo laminar se tomaron 100 µL respectivamente de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , y  $10^{-4}$  del medio con el microorganismo a estudiar con 24 horas de crecimiento a 30 °C en medio de cultivo líquido LB con pH de 6.0. Se agregaron los 100 µL de cada muestra en una placa de Petri con medio de cultivo sólido y se esparció el medio sobre la superficie de la placa con un asa de Drigalski estéril.
7. Se colocaron las placas de Petri inoculadas en la incubadora a 30 °C durante 48 horas.
8. Se calcularon las UFC en la dilución donde el recuento en placa se encontró en el rango de 25-250 colonias (UFC contables) y una dilución superior donde el recuento en placa se encontró superior a 250 colonias (UFC incontables).
9. En la concentración mínima de metal donde no se presentó crecimiento visible se determinó el rango de la MIC en medio de cultivo sólido.

### 3.2.13 Pruebas de crecimiento en medio líquido de microorganismos a diferentes valores de pH

Cada especie tiene un cierto rango de pH para su crecimiento y un valor óptimo de pH. Los acidófilos tienen su óptimo de crecimiento entre pH 0 y 5.5; los neutrófilos, entre pH de 5.5 y 8; y los alcalófilos prefieren el rango de pH entre 8 y 11.5. En general, los diferentes grupos microbianos tienen preferencias de pH características. Aunque frecuentemente los microorganismos pueden crecer en amplios intervalos de pH, con valores lejanos de sus óptimos, existen límites para esta tolerancia (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

Con el fin de determinar cómo influye el pH en el crecimiento de los microorganismos, se realizó la prueba a valores de pH de 7, 6, 5, 4, 3 y 2. Por lo que se estableció a siguiente metodología.

#### Reactivos

- Medio de cultivo LB
- Agua destilada
- NaOH 1M
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M

#### Procedimiento

1. Se añadieron 200 mL de medio de cultivo LB a un vaso de precipitado de 250 mL. Se colocó en la placa de calentamiento con agitación y se reguló el pH con NaOH 1M o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M hasta ajustarlo al valor establecido de pH. Se realizó este procedimiento para cada valor de pH.
2. Se midieron 15 mL con una probeta para añadirlos a un tubo de ensayo de 16 X 160 mm. Se llenaron cuatro tubos para cada valor de pH, tres tubos fueron inoculados con el microorganismo a estudiar y un tubo se utilizó como blanco para la medición de la densidad óptica. Se puso un tapón de algodón a cada tubo.

3. Se esterilizaron los tubos con solución en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### Inoculación

4. Dentro de la campana de flujo laminar con un asa bacteriológica se tomó una colonia aislada en agar del microorganismo a estudiar, para inocular cada tubo tomando una colonia a excepción de los tubos para blancos ya que se utilizaron para la lectura de la densidad óptica.

Se colocaron los tubos en la incubadora a 30 °C para tomar muestra de cada tubo a las 24 y 48 horas de crecimiento, tomando 500 µL para leer su densidad óptica y transmitancia a 600 nm en el espectrofotómetro.



### 3.2.14 Crecimiento en medio de cultivo líquido a diferentes concentraciones de cobre o manganeso

Para determinar cómo influye en el crecimiento de los microorganismos identificados la presencia de cobre o manganeso a diferentes concentraciones en medio de cultivo líquido, se estableció la siguiente metodología.

#### Reactivos

- Medio de cultivo LB (para el crecimiento de bacterias)
- Medio de cultivo YPG (para el crecimiento de levaduras)
- Agua destilada
- Disolución de 2000 ppm Cu
- Disolución de 2000 ppm Mn
- NaOH 1M
- Placas de Petri con colonias aisladas en agar para cuenta estándar con 48 horas de crecimiento de los microorganismos identificados.

Las disoluciones se preparan previamente con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

#### Procedimiento

Utilizando la Tabla 13 se obtuvo la cantidad en mililitros de disolución concentrada de cobre o manganeso a 2000 ppm requerida para obtener la concentración final deseada a un volumen de medio de cultivo establecido. Para cada uno de los microorganismos identificados el estudio se llevó a cabo por duplicado en matraces de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y se dejó un tercer matraz sin inocular con medio de cultivo con la concentración de metal establecida como blanco para la medición de la densidad óptica, se realizó el siguiente procedimiento para la inoculación e incubación.

1. La prueba de crecimiento en medio de cultivo líquido se realizó para diferentes concentraciones de cobre (50, 100, 200 y 400 ppm) o manganeso (100 ppm).
2. Se ajustó el pH del medio de cultivo a 6.0 con NaOH 1M.

3. Se agregó a la solución con medio de cultivo el volumen indicado en la Tabla 13, de disolución concentrada de metal para obtener la concentración establecida de metal. Se añadió la solución a un matraz aforado y se aforo con agua destilada.
4. Se distribuyó el medio de cultivo agregando 100 mL en matraces de 500 mL y se les colocó un tapón de algodón a cada matraz.
5. Se esterilizaron los matraces con medio de cultivo líquido en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
6. Dentro de la campana de flujo laminar con un asa bacteriológica se tomó una colonia aislada en agar del microorganismo a estudiar, para inocular cada matraz a excepción de los matraces para blancos ya que se utilizaron para la lectura de la densidad óptica.
7. Se colocaron los matraces en la incubadora con agitación a 30 °C y 150 rpm para tomar muestra de cada matraz a las 24 y 48 horas de crecimiento, tomando 500 µL de muestra para leer su densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro.

### 3.2.15 Relación de la densidad óptica a 600 nm y el peso seco de biomasa

Una de las mejores formas de medir el crecimiento de los organismos filamentosos es por el peso seco. En este procedimiento se extraen los hongos del medio de crecimiento, se filtran para eliminar el material extraño y se secan en un desecador para luego pesarlos. En el caso de las bacterias se sigue el mismo procedimiento básico. Estimación de la cantidad de bacterias por la turbidez (turbidimetría). La cantidad de luz que llega a la célula fotoeléctrica en el espectrofotómetro es inversamente proporcional al número de bacterias en condiciones estandarizadas. Cuanto menor es la cantidad de luz transmitida mayor es la cantidad de bacterias en la muestra (Tortora, Funke, & Case, 2007).

La técnica consiste en medir la cantidad de biomasa en peso seco de un determinado volumen de muestra a diferentes valores de densidad óptica a 600 nm y determinar la relación lineal de los dos parámetros.

#### Reactivos

- 500 mL de medio de cultivo con biomasa
- 500 mL de medio de cultivo sin biomasa

#### Procedimiento

Dependiendo del tamaño del microorganismo se seleccionó la técnica adecuada, ya sea por filtración o centrifugación. Para levaduras y bacterias del género *Bacillus* se realizó la técnica utilizando filtros Whatman de microfibra de vidrio GF/A de 1.6  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 24 mm de diámetro. Para bacterias del género *Pseudomonas* se realizó la técnica por medio de centrifugación utilizando microtubos para centrífuga Eppendorf de 1.5 mL. La metodología realizada para las técnicas por filtración y centrifugación se describe a continuación.

1. La prueba se realizó por triplicado para 5 valores diferentes de densidad óptica entre 0.1 y 0.9 a 600 nm.
2. Se colocaron los filtros o microtubos en el horno de secado durante media hora a 100 °C. Al terminar se anotó el peso de cada filtro o microtubo y se colocaron dentro del desecador de vidrio.
3. Se agregaron 200 mL de medio de cultivo sin biomasa a un vaso de precipitado de 500 mL, se colocó un agitador magnético en el vaso y se puso con agitación en la placa de calentamiento con agitación. Se agregaron 10 mL de medio de cultivo con biomasa del microorganismo a determinar el peso seco.
4. Se tomó 1 mL del vaso con la micropipeta para determinar su densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro.
5. Para la técnica de filtrado, se colocó el Crisol Gooch y el adaptador con alargadera tipo Walter en el matraz kitasato y se conectó la manguera de la bomba de vacío al matraz.
6. Se tomó un filtro del desecador de vidrio y se colocó en el Crisol Gooch.
7. Se encendió la bomba de vacío.
8. Se tomaron 10 mL del vaso con la pipeta volumétrica para agregarlos lentamente al filtro.
9. Se tomó el filtro con una pinza para colocarlo en el horno de secado a 100 °C durante 1 hora. Al terminar el secado se pesó el filtro.
10. Para la técnica por centrifugación, se agregó con la micropipeta 1 mL del vaso al microtubo y se centrifugo a 10000 rpm durante 10 minutos. Se vació el sobrenadante del microtubo y se añadió 1 mL más al microtubo, se centrifugo a 10000 rpm durante 10 minutos. Se vació el sobrenadante y se colocó el microtubo en el horno de secado a 80 °C durante 6 horas. Al terminar el secado se pesó el microtubo.
11. Se agregó nuevamente 10 mL de medio de cultivo con biomasa al vaso de precipitado de 500 mL con el fin de aumentar la concentración de biomasa en la muestra y la densidad óptica.
12. Se tomó 1 mL con la micropipeta para determinar su densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro.

13. Se realizó la técnica de filtrado o centrifugación de la muestra.
14. El procedimiento anterior se realizó hasta obtener muestras con lecturas de densidad óptica a 600 nm dentro de un rango de 0.1 a 0.9.
15. Al tener el peso de los filtros o microtubos con muestra seca a diferentes densidades ópticas, se les restó el peso de los filtros o microtubos secos sin muestra. Este peso representa la cantidad de peso seco de biomasa en 10 mL de muestra, esto para la técnica de filtración. Para la técnica por centrifugación el peso obtenido representa la cantidad de peso seco de biomasa en 2 mL de muestra.
16. Se dividió el peso seco de la muestra en gramos entre el volumen de la muestra. Se convirtieron los datos de concentración calculados a unidades de g/L.

Se graficaron los valores de densidad óptica a 600 nm contra su respectivo valor de concentración de peso seco de biomasa en g/L.

### 3.2.16 Cinética de crecimiento en biorreactor

El objetivo general de la ingeniería bioquímica es hacer practicables, en la situación económica del momento procesos que se han mostrado realizables en el laboratorio o en experiencias de investigación (Atkinson, 1986). Para establecer la producción de biomasa a nivel laboratorio de los microorganismos identificados, se estudiaron las cinéticas de crecimiento por lote en matraz y biorreactor de cada microorganismo. Se estableció la siguiente metodología para el estudio de las cinéticas de crecimiento.

#### Reactivos

- Medio de cultivo LB (para el crecimiento de bacterias)
- Medio de cultivo YPG (para el crecimiento de levaduras)
- NaOH 4M
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M
- Antiespumante

#### Procedimiento

Para la toma de muestra de las cinéticas, se realizó por duplicado tomando con la micropipeta 500 µL de muestra para leer su densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro y se conservó medio de cultivo sin inocular para utilizarlo como blanco. De ser necesario se diluyó la muestra en 1:5 o 1:10 partes para realizar la lectura en el espectrofotómetro. Se tomó muestra de las cinéticas hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento.

El pH para cada cinética de crecimiento se estableció en base a los resultados obtenidos en las pruebas de crecimiento en medio líquido de microorganismos a diferentes valores de pH. Seleccionando el valor de pH en el que se presentó mayor crecimiento para cada microorganismo identificado. Se realizó la esterilización de los medios de cultivo, materiales y el biorreactor en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

1. El cultivo por lote en matraz se realizó por duplicado. El proceso arranco tomando con un asa bacteriológica una colonia aislada en agar para cuenta estándar del microorganismo a estudiar para inocular en un matraz Erlenmeyer de 1 litro con 200 mL de medio de cultivo, se colocó el matraz en la incubadora con agitación a 30 °C y 150 rpm.
2. El cultivo por lote en biorreactor fue llevado a cabo con un volumen de operación de 2000 mL. Se agregaron al biorreactor 1800 mL de medio de cultivo y se inoculó con 200 mL de medio con 24 horas de crecimiento del cultivo por lote en matraz. Las condiciones de operación fueron 30 °C, 2 L/min de aire (1 vvm) y 600 rpm. El control de pH se realizó con la adición de NaOH 4M y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M, para el control de la formación de espuma se utilizó antiespumante de emulsión de silicón al 20 %.

Los datos obtenidos de densidad óptica a 600 nm de las cinéticas de crecimiento se convirtieron a unidades de peso seco de biomasa por volumen de medio de cultivo (g/L), utilizando las ecuaciones obtenidas en las pruebas de relación de la densidad óptica a 600 nm y el peso seco de biomasa para cada microorganismo identificado.

### 3.2.17 Ajuste a un modelo matemático de los datos de las cinéticas de crecimiento de los microorganismos seleccionados

Los datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento por lote en matraz y biorreactor de los microorganismos seleccionados se ajustaron a un modelo logístico de Verhulst-Pearl, mediante la Ec. (2) utilizando el programa de computadora OriginPro 9.1 seleccionando la opción de ajuste Slogistic1. Con los resultados del ajuste matemático se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos de los microorganismos estudiados.

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 + e^{-\mu_{max}(t-t_m)}} \quad (2)$$

Donde:

$$X(t) = \text{Concentración de microorganismos en el tiempo } t \left( \frac{\text{Peso seco } g}{L} \right)$$

$$t = \text{Tiempo (h)}$$

$$X_{max} = \text{Concentración máxima de microorganismos} \left( \frac{\text{Peso seco } g}{L} \right)$$

$$\mu_{max} = \text{Velocidad específica de crecimiento máxima (h}^{-1}\text{)}$$

$$t_m = \text{Tiempo a la mitad de la concentración máxima de microorganismos (h)}$$

En la Ec. (3) se despejó la Ec. (2) en función del tiempo de crecimiento, la cual es de utilidad para determinar el tiempo en el que se alcanza una concentración específica de microorganismos o la concentración máxima de microorganismos.

$$t = t_m - \frac{\ln\left(\frac{X_{max}-X(t)}{X(t)}\right)}{\mu_{max}} \quad (3)$$



## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Muestreo de Agua y Sedimento

Los resultados de los análisis de pH y ORP de las muestras de agua y sedimento para cada estación de muestreo se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15.** pH y ORP en muestras de agua y sedimento.

Estación	Muestra de agua		Muestra de sedimento	
	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)
1	6.31	274	6.00	345
2	2.44	528	2.92	507
3	2.43	539	2.77	509

En la muestra de sedimento de la estación E1 se registró un pH de 6.00 lo que indica que posiblemente las corrientes no provienen de drenajes ácidos de la mina. Para las muestras de sedimento de las estaciones E2 y E3 se registraron pH de 2.92 y 2.77 respectivamente, las condiciones ácidas del sedimento indican que las corrientes probablemente provienen de drenajes ácidos de la mina ya que las estaciones se encuentran cercanas a un dique de contención el cual recupera desechos ácidos. Los valores de ORP obtenidos en las muestras de sedimento para las tres estaciones de muestreo se encuentran dentro de un rango de 300-500 mV, lo que indica la presencia de compuestos químicos altamente oxidantes.

Las corrientes de drenaje ácido de minas se caracterizan frecuentemente por valores de pH bajos (aproximadamente 3) y concentraciones elevadas de sulfato, hierro y otros metales y metaloides cuando los minerales de sulfuro como la pirita son expuestos tanto

al aire como al agua, causando que dichos cuerpos de agua sean dañinos o letales para la mayoría de las formas de vida (Deive & Sanromán, 2017). Un ión metálico puede reaccionar con una molécula de agua en la esfera de coordinación liberando un protón con lo cual la solución se torna ácida (Gómez Álvarez et al., 2011). La acidificación del suelo puede, al menos temporalmente, reforzar la solubilidad y (probablemente) la disponibilidad de los depósitos de metales pesados (Tyler et al., 1989).

Varios factores abióticos y bióticos pueden afectar la especiación química del metal en el suelo y por lo tanto afectar la biodisponibilidad y la toxicidad de los metales en las poblaciones microbianas. Estos factores incluyen la química del metal, la sorción a los minerales de arcilla y la materia orgánica, el pH, el potencial redox y los microorganismos presentes (Gomathy & Sabarinathan, 2010). La solubilidad de los metales y la estabilidad de los minerales que contienen metales son controladas en una gran amplitud por el potencial de oxidación/reducción y el pH. La forma del metal, y por lo tanto su toxicidad, está altamente influenciada por las condiciones del medio ambiente como el pH, potencial redox (Eh) y la disponibilidad de los iones o ligandos complejantes (Gómez Álvarez et al., 2011). Determinar los valores de pH y ORP en muestras de agua y sedimento es de suma importancia para el aislamiento de microorganismos metalotolerantes, ya que proporcionarían información de las especies químicas que predominan en forma soluble e insoluble así como el rango de concentraciones en el que se mantienen disueltos los iones metálicos. Lo cual representa la base para encontrar ambientes con presencia de microorganismos metalotolerantes.

Para determinar en qué especies químicas se encuentran el cobre y manganeso en solución acuosa a 25 °C, se colocaron los valores de pH y ORP de las estaciones en los diagramas de Pourbaix para cobre y manganeso respectivamente. En las Figuras 7 y 8 se muestran los diagramas Pourbaix con los puntos de cada estación de muestreo.

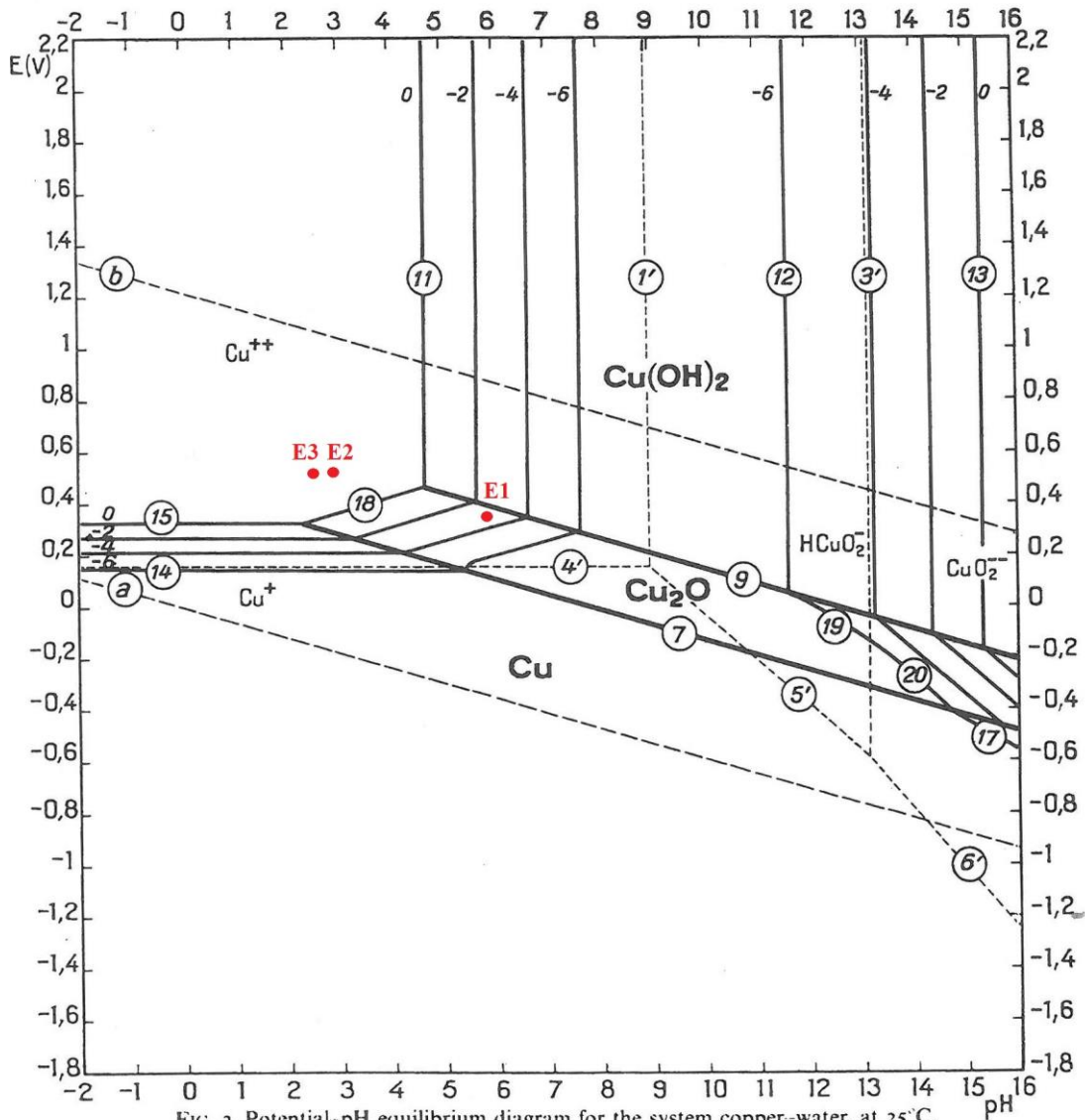


FIG. 2. Potential-pH equilibrium diagram for the system copper-water, at 25°C. [Considering the solid substances Cu,  $\text{Cu}_2\text{O}$  and  $\text{Cu(OH)}_2$ .  $\text{CuO}$  is not considered.]

**Figura 7.** Diagrama Eh-pH del sistema cobre-agua a 25 °C con los puntos de las estaciones de muestreo.

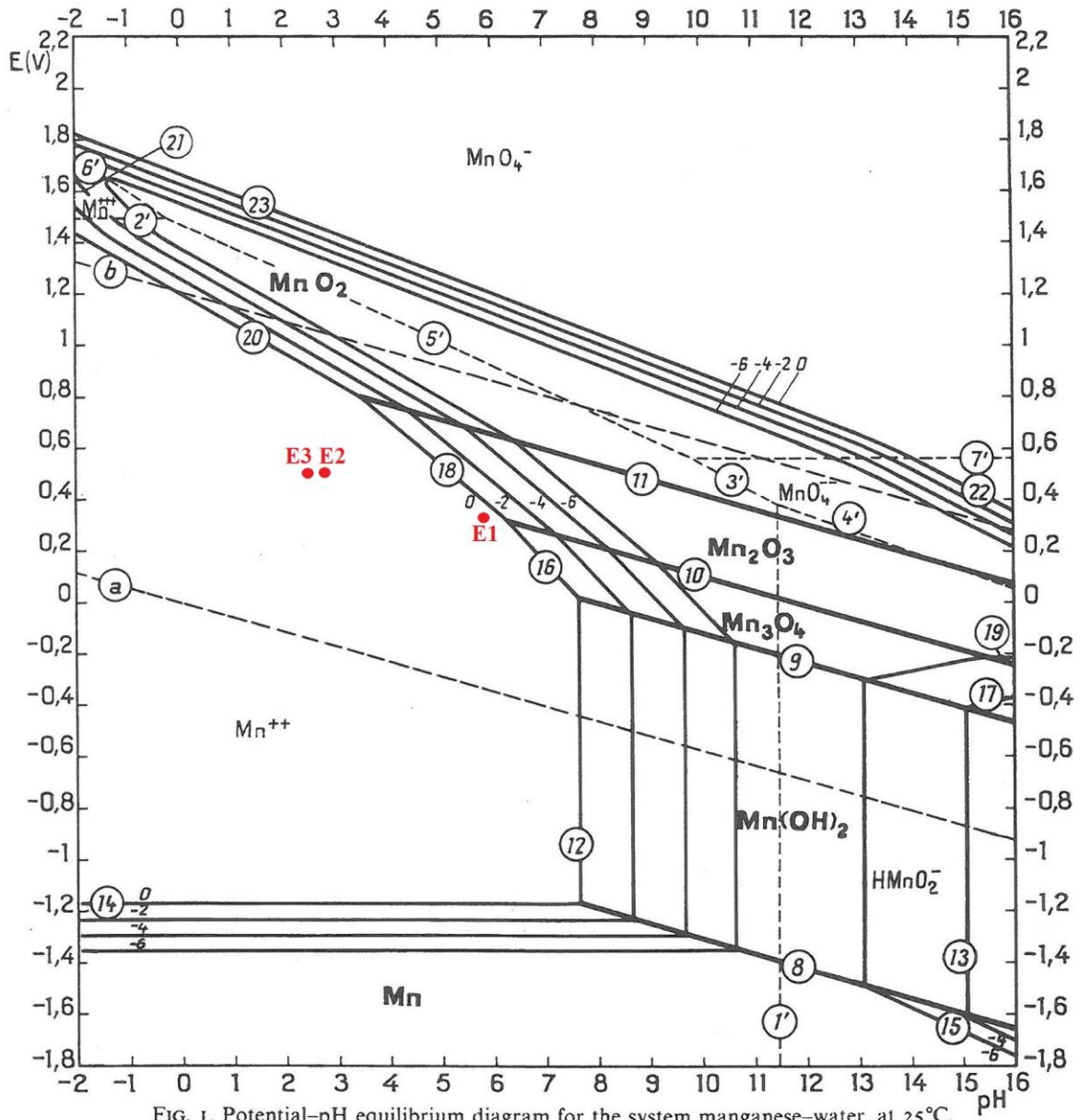


FIG. 1. Potential-pH equilibrium diagram for the system manganese-water, at 25°C. [Considering  $\beta$ - $MnO_2$  (pyrolusite).]

Figura 8. Diagrama Eh-pH del sistema manganeso-agua a 25 °C con los puntos de las estaciones de muestreo.

Al ubicar los datos de pH y ORP de las estaciones de muestreo en los diagramas de Pourbaix, se determinó que para la estación E1 la especie química que predomina para cobre es como ion  $\text{Cu}^{++}$  y se puede encontrar en concentraciones por debajo de las 635 ppm si se sobrepasa la concentración se encontrará como  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Para el manganeso en la estación E1 se determinó que la especie química que predomina es como ion  $\text{Mn}^{++}$  sin embargo se encuentra cerca del límite que tiende a la formación de  $\text{Mn}_2\text{O}_3$ . Para las estaciones E2 y E3 las especies químicas que predominan son como iones  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ . Lo anterior indica que las condiciones altamente ácidas y oxidantes favorecen la solubilidad en agua de los dos metales.

Estudios realizados en el Río San Pedro determinaron que predomina un ambiente oxidante ( $\text{Eh} > 0$ ) en el agua y sedimento, característico de un intemperismo árido en todas las estaciones de muestreo por lo que, la movilidad del cobre en la solución acuosa es en la forma oxidada  $\text{Cu}^{+2}$ . Bajo condiciones oxidantes y ácidas el  $\text{Cu}^{+2}$  es soluble, y su solubilidad es limitada a pH altos debido a la baja solubilidad de los carbonatos, óxidos e hidróxido de cobre. Los compuestos inorgánicos de cobre que pueden ser estables en las condiciones oxidantes y que posiblemente se encuentren presentes en el sedimento son óxidos (abswurmbachita y probablemente cuprita y tenorita) y sulfatos (schulenbergita y posiblemente calcantita, calcocianita, dolerofanita, langita y melanterita) (Gómez Álvarez et al., 2011).

La solubilidad del manganeso se ve fuertemente afectada por cambios menores en Eh o pH, en sistemas donde los óxidos son los sólidos predominantes. El manganeso en los estados +2, +3 y +4 puede formar óxidos o hidróxidos, y el manganeso divalente forma carbonato y sulfuro. Todos estos compuestos tienen una baja solubilidad en algunas condiciones. El comportamiento químico del manganeso está más influenciado por la formación de iones complejos. Por ejemplo, el manganeso divalente puede formar complejos o pares de iones con bicarbonato, sulfato o hidróxido (Hem, 1963a).

Por lo tanto, el cobre y manganeso presentes en muestras de sedimentos del río cercanas a zonas con actividades mineras se pueden encontrar principalmente como una mezcla de iones y compuestos insolubles, aumentando la concentración de iones a

condiciones oxidantes y conforme se reduce el pH. Esta información es útil para determinar las características del medio ambiente de los microorganismos en zonas con altas concentraciones de cobre y manganeso, así como para analizar en qué zonas es más probable encontrar microorganismos metalotolerantes.

En cuanto a la cantidad de microorganismos presentes por gramo de muestra de sedimento se muestran los resultados obtenidos en la Tabla 16 en base a la cuenta de las unidades formadoras de colonias.

**Tabla 16.** Unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de sedimento.

Estación	Conteo de colonias para 1 mL	UFC/g
1	76 y 70 (Dilución $10^{-2}$ )	$7.3 \pm 0.3 \times 10^3$
2	87 y 75 (Dilución $10^{-1}$ )	$8.1 \pm 0.6 \times 10^2$
3	95 y 71 (Dilución $10^{-1}$ )	$8.3 \pm 1.2 \times 10^2$

Las UFC obtenidas para las muestras de sedimento indican que las condiciones ácidas y oxidantes repercuten en la disminución de los microorganismos presentes, ya que se obtuvieron cuentas de  $7.3 \pm 0.3 \times 10^3$  UFC/g para la estación E1,  $8.1 \pm 0.6 \times 10^2$  UFC/g para la estación E2 y  $8.3 \pm 1.2 \times 10^2$  UFC/g para la estación E3. En relaves junto al Río San Pedro en el Área Nacional de Conservación del Río San Pedro determinaron el número de bacterias heterotróficas en los relaves a granel y el promedio obtenido fue de  $2.1 \pm 0.9 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de suelo seco (Rosario et al., 2007). Por lo tanto, la concentración de microorganismos en sedimentos del Río San Pedro se encuentra dentro de un rango aproximado de  $10^3$  a  $10^5$  UFC por gramo de sedimento.

La concentración de microorganismos en sedimentos de las tres zonas de muestreo decreció conforme disminuyó el pH, lo que indica el impacto de los ambientes ácidos con altas concentraciones de iones metálicos en la ecología microbiana.

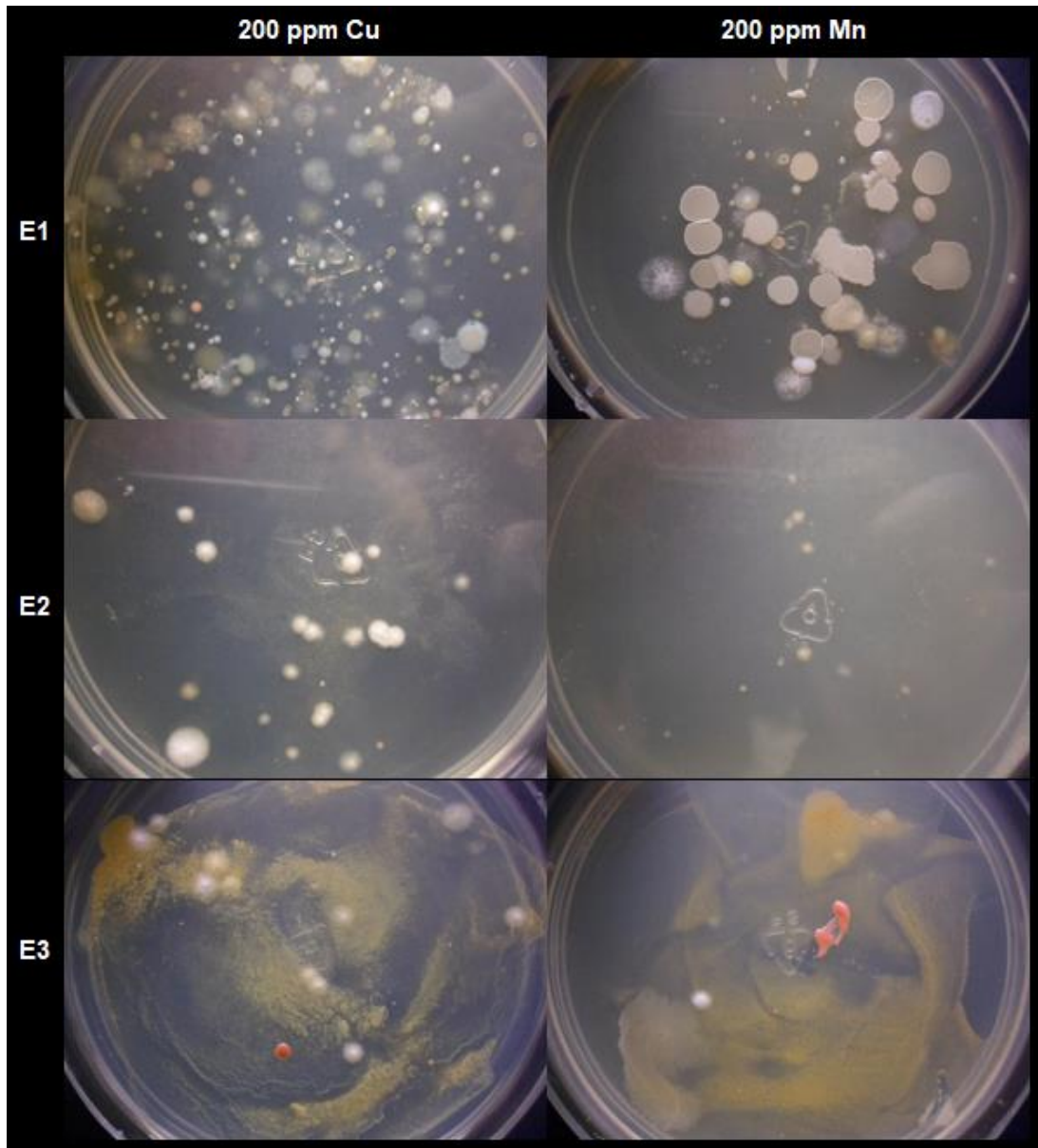
## 4.2 Aislamiento de Microorganismos Metalotolerantes

### 4.2.1 Aislamiento en medios de cultivo sólidos enriquecidos con cobre y manganeso

En el presente estudio se estableció como límite superior un pH de 7.0 en los medios de cultivos enriquecidos con metales para el aislamiento de microorganismos, ya que a valores de pH superiores tiende a la formación de precipitados y por consecuencia bajas concentraciones de iones metálicos, además que a condiciones neutras se desarrollan una amplia gama de microorganismos. En general, los iones metálicos libres se consideran las especies metálicas más tóxicas (Di Toro et al., 2001; Mangold, Potrykus, Björn, Lövgren, & Dopson, 2013). La acidificación del medio debe darse para mantener el ion metálico en solución (Nies, 1999). Debido a que el hierro y el manganeso tienen baja solubilidad en sistemas oxidantes a niveles de pH cercanos o poco superiores a la neutralidad, pequeños cambios en Eh o pH y formación de complejos, pueden ser muy importantes para que los metales estén disponibles para las plantas y los animales (Hem, 1972).

En estudios realizados se encontró que el nivel crítico para el pH fue de aproximadamente 5.5, por encima de este nivel de pH se removieron cantidades apreciables de cobre de la solución mediante el hidróxido férrico precipitado (Hem, 1963b). El Mn (II) es rápidamente adsorbido sobre la superficie del oxihidróxido férrico precipitado recientemente a valores de pH cercano al valor neutro; sin embargo, se requiere que el pH sea mayor de 8.5 para la precipitación y oxidación del Mn como hidróxido (Foos, 1997; Gómez Álvarez et al., 2011). A valores neutros y altos de pH, el manganeso se precipita como hidróxidos  $MnO(OH)_2$  y  $MnO(OH)_3$ , pero tan pronto como el pH disminuye, transita nuevamente a la solución como compuesto catiónico  $Mn^{2+}$  (Chanturia, Medyanik, Shadrinova, & Mishurina, 2016). Por lo que a pH cercano al neutro la solubilidad de los iones de cobre y manganeso se ve ampliamente reducida debido a la formación de precipitados.

El aislamiento en medio de cultivo sólido de los microorganismos presentes en las muestras de sedimento se realizó para concentraciones de cobre y manganeso de 0, 200, 500, 800, 1000 ppm individualmente para cada metal. En la Figura 9 se observa el desarrollo de colonias en 200 ppm de Cu y Mn en las tres estaciones de muestreo.



**Figura 9.** Colonias desarrolladas en medio de cultivo sólido con 200 ppm de Cu y Mn para las tres estaciones de muestreo.



Se observó como la concentración de cobre y manganeso repercutió en el desarrollo de las colonias ya que conforme se aumentó la concentración de metal disminuyó considerablemente el desarrollo de las colonias. De las tres estaciones de muestreo en total se aislaron siete microorganismos con morfología colonial y microscópica diferentes.

#### **4.2.2 Selección de microorganismos tolerantes a cobre y manganeso**

Para seleccionar los microorganismos tolerantes a cobre y manganeso se estableció el pH en 6.0 en los medios de cultivo enriquecidos con los dos metales. Esto se realizó con el fin de aumentar la concentración de iones metálicos respecto al pH neutro, además de evitar que un pH más ácido represente un factor de inhibición del crecimiento de los microorganismos. Uno de los principales factores a considerar en el crecimiento fue la influencia de la concentración de cobre o manganeso en el medio de cultivo.

A valores de pH más altos ( $\text{pH} > 5.5$  para el cobre (II)), los iones metálicos precipitaron debido a las altas concentraciones de iones hidroxilo en el medio (Dursun, Uslu, Cuci, & Aksu, 2003). Por ejemplo, una muestra de agua que contenga más de 1.0 ppm de actividad de manganeso y una actividad de 100 ppm de especies de  $\text{HCO}_3^-$ , tendería a precipitar  $\text{MnCO}_3$  si el pH fuera elevado por encima de 7 (Hem, 1963a). La mezcla de los compuestos metálicos solubles e insolubles del medio de cultivo sólido puede representar una aproximación a muestras de sedimentos con altas concentraciones de metales pesados.

De los siete microorganismos aislados se seleccionó, de cada estación de muestreo, el microorganismo que presentó mayor tolerancia a cobre y manganeso en medio de cultivo sólido. Otro parámetro que se tomó en cuenta para la selección fue el desarrollo del microorganismo en medio de cultivo líquido. En la Tabla 17 se muestran los resultados de la morfología vista en el microscopio, crecimiento en medio de cultivo sólido (500 ppm Cu y Mn) y crecimiento en medio de cultivo líquido para los siete microorganismos.

**Tabla 17.** Selección de microorganismos tolerantes a Cu y Mn.

Microorganismo/ Estación	Morfología vista en el microscopio	Cultivo en medio sólido		Cultivo en medio líquido
		500 ppm Cu (48 horas)	500 ppm Mn (48 horas)	% Transmitancia <sub>600nm</sub> 0 ppm Cu y Mn (48 horas)
<b>1.0/E1</b>	<b>Bacilos</b>	+	+	<b>48.91±2.62</b>
2.0/E1	Bacilos	-	+	77.57±1.64
3.0/E1	Estafilococos	+	+	78.18±2.36
4.0/E1	Cocos	+	+	84.72±0.84
<b>5.0/E2</b>	<b>Bacilos</b>	-	+	<b>36.98±8.24</b>
<b>6.0/E3</b>	<b>Levaduras</b>	+	+	<b>78.17±1.47</b>
7.0/E3	Streptobacilos	-	+	70.93±4.30

+: Crecimiento positivo, -: Crecimiento negativo

Se seleccionaron los microorganismos 1.0, 5.0 y 6.0 para su identificación y propagación en biorreactor.

#### 4.2.3 Identificación de los microorganismos seleccionados

Los análisis de secuenciación se realizaron en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional unidad Reynosa Tamaulipas. Los tres microorganismos se identificaron como: *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus*, y *Rhodotorula taiwanensis*. Los resultados de los análisis de secuenciación se muestran en la Tabla 18.

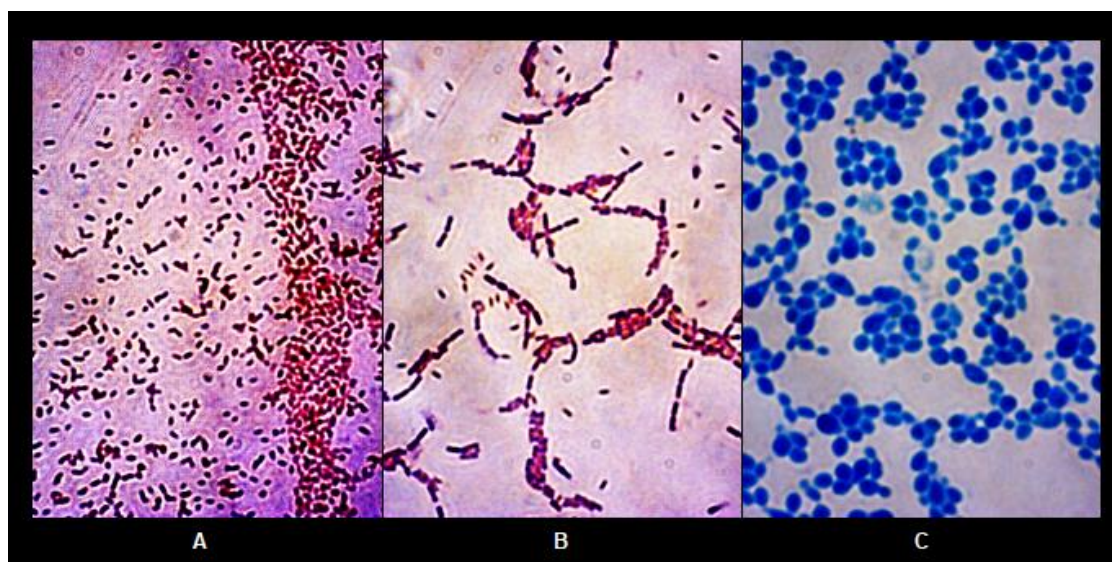
**Tabla 18.** Análisis de secuenciación.

Primers	GenBank/GB	Nombre	Score	Identidad (%)
16s	KX245365.1	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	1640	100%
	LT629801.1	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	1640	100%
	KT695839.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	1640	100%
16s	KJ943979.1	<i>Bacillus sp.</i>	2362	99%
	JX077093.1	<i>Bacillus cereus</i>	2362	99%
	JX077092.1	<i>Bacillus cereus</i>	2362	99%
	KY109163.1	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	1092	99%

26s	KR136237.1	<i>Rhodotorula sp.</i>	1090	99%
	JQ514557.1	<i>Rhodotorula sp.</i>	1085	99%

Las colonias presentaron las siguientes características macroscópicas: *Pseudomonas rhodesiae* presentó forma de colonias grandes, borde circular, elevación plana, superficie mucosa, consistencia viscosa y color beige/blanco. *Bacillus cereus* presentó forma de colonias pequeñas, borde irregular, elevación plana, superficie mucosa, consistencia viscosa y color beige/blanco. *Rhodotorula taiwanensis* presentó forma de colonias pequeñas y agrupadas, borde irregular, elevación plana, superficie mucosa, consistencia viscosa y color anaranjado.

Se observaron en el microscopio con lente objetivo de 100 X los tres microorganismos, lo cuales se muestran en la Figura 10.



**Figura 10.** Vista en el microscopio con lente objetivo de 100 X de los microorganismos: (A) *Pseudomonas rhodesiae*. (B) *Bacillus cereus*. (C) *Rhodotorula taiwanensis*.

En los ecosistemas ambientales, existe una intrincada interacción entre los contaminantes de metales pesados y los microorganismos nativos (Monachese, Burton, & Reid, 2012). Especies bacterianas y fúngicas fueron identificadas en tres sitios mineros en el suroeste de Nigeria. El análisis de la diversidad microbiana mostró la presencia de

cinco bacterias heterótrofas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella edwardsii*, *Pseudomonas pseudomallei* y *Klebsiella pneumoniae*) (O. Oladipo, Olayinka, & Awotoye, 2014). El aislamiento de *Pseudomonas rhodesiae* corrobora que este género puede encontrarse en zonas mineras con altas concentraciones de metales pesados.

El género *Bacillus* son gram positivas, aeróbicas, formadoras de esporas y morfología de varilla. Las bacterias gram positivas tienen una mayor capacidad para unir metales que las bacterias gram negativas debido a las diferencias estructurales de la pared celular (Matyar, Kaya, & Dinçer, 2008; Çolak, Atar, Yazıcıoğlu, & Olgun, 2011). En estudios realizados, se ha demostrado que las células de *Bacillus cereus* contienen principalmente grupos funcionales carboxilo, hidroxilo, fosfato, amino y amida (Pan, Liu, & Tang, 2007). La especie de *Bacillus cereus* puede ser utilizada en procesos de biosorción de metales principalmente por la composición de su pared celular.

Estudios realizados muestran que la sorción y remoción del uranio se ve favorecida en presencia de carbonatos y que la cepa de levadura *Rhodotorula mucigilans* BII-R8 puede tolerar altas concentraciones de este radionúclido (Lopez-Fernandez, Romero-González, Günther, Solari, & Merroun, 2018). Una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* resistente a metales fue aislada de un agua residual industrial, se estudió que muestra amplia tolerancia a un grupo de metales pesados, en particular cadmio y arsénico (Ilyas et al., 2016). *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11, una levadura pigmentada aislada de una planta de filtración de una mina de cobre en la provincia de Tucumán, Argentina, tolera altas concentraciones del metal pesado Cu (II) (Irazusta, Nieto-Peñalver, Cabral, Amoroso, & de Figueroa, 2013). *Rhodotorula taiwanensis* tiene potencial de tratar aguas y sedimentos contaminados con altas concentraciones de cobre y manganeso ya que este género de levadura ha sido estudiado en diversos procesos de remoción de metales.

### 4.3 Tolerancia a Cobre y Manganeso de los Microorganismos

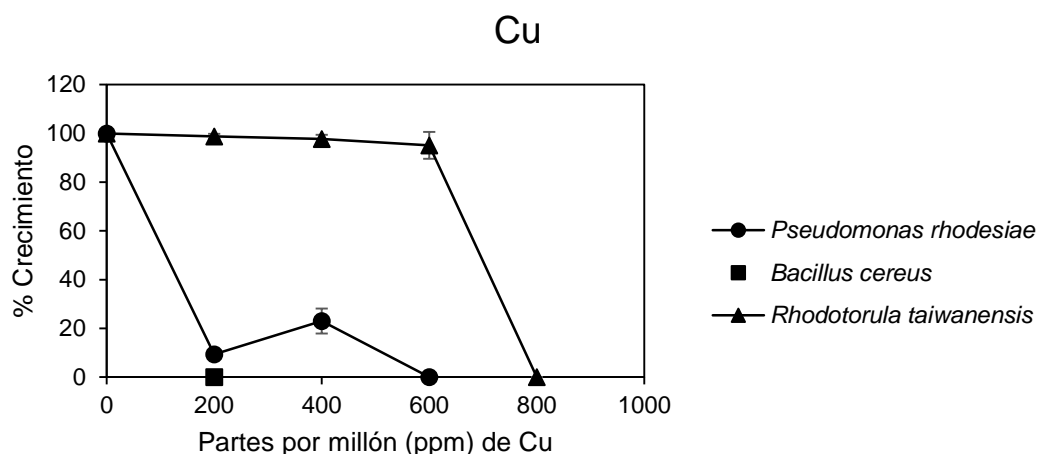
Se determinó el rango de la MIC de cobre y manganeso en medio de cultivo sólido para los tres microorganismos identificados en base a la tolerancia que presentaron estos microorganismos a las diferentes concentraciones de cobre y manganeso. En la Tabla 19 se muestran los resultados de la variación del crecimiento a las 48 horas de las UFC/mL conforme se aumenta la concentración de cobre y manganeso en el medio de cultivo sólido.

**Tabla 19.** UFC/mL a las 48 horas de crecimiento a diferentes concentraciones de cobre y manganeso.

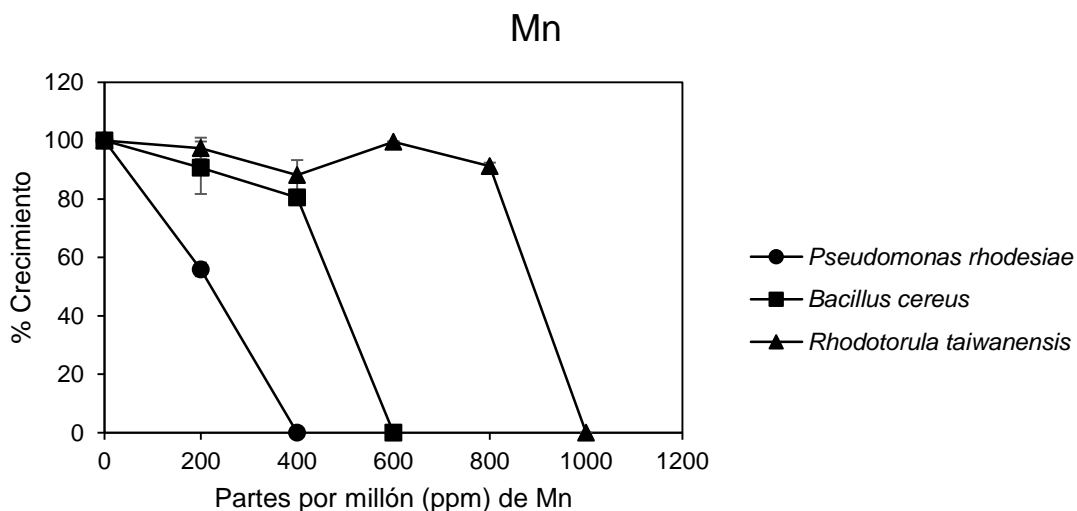
Microorganismo	ppm de metal	Conteo de colonias	Conteo de colonias	UFC/mL
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>		Dilución 10 <sup>-1</sup>	Dilución 10 <sup>-2</sup>	
	0	>250	118 y 95	1.07X10 <sup>5</sup> ±1.15X10 <sup>4</sup>
	200 Cu	>250	12 y 8	1.00X10 <sup>4</sup> ±2.00X10 <sup>3</sup>
	400 Cu	>250	19 y 30	2.45X10 <sup>4</sup> ±5.50X10 <sup>3</sup>
	600 Cu	>250	0	0
	<b>800 Cu</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	200 Mn	>250	62 y 57	5.95X10 <sup>4</sup> ±2.50X10 <sup>3</sup>
	400 Mn	>250	0	0
<b>600 Mn</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Bacillus cereus</i>		Dilución 10 <sup>-1</sup>	Dilución 10 <sup>-2</sup>	
	0	>250	149 y 184	1.67X10 <sup>5</sup> ±1.75X10 <sup>4</sup>
	<b>200 Cu</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	200 Mn	>250	136 y 166	1.51X10 <sup>5</sup> ±1.50X10 <sup>4</sup>
	400 Mn	>250	137 y 131	1.34X10 <sup>5</sup> ±3.00X10 <sup>3</sup>
<b>600 Mn</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>		Dilución 10 <sup>-3</sup>	Dilución 10 <sup>-4</sup>	
	0	>250	242 y 249	2.46X10 <sup>7</sup> ±3.50X10 <sup>5</sup>
	200 Cu	>250	240 y 245	2.43X10 <sup>7</sup> ±2.50X10 <sup>5</sup>
	400 Cu	>250	244 y 236	2.40X10 <sup>7</sup> ±4.00X10 <sup>5</sup>
	600 Cu	>250	247 y 220	2.34X10 <sup>7</sup> ±1.35X10 <sup>6</sup>
	<b>800 Cu</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	200 Mn	>250	248 y 230	2.39X10 <sup>7</sup> ±9.00X10 <sup>5</sup>
	400 Mn	>250	204 y 229	2.17X10 <sup>7</sup> ±1.25X10 <sup>6</sup>
	600 Mn	>250	244 y 245	2.45X10 <sup>7</sup> ±5.00X10 <sup>4</sup>
	800 Mn	>250	227 y 221	2.24X10 <sup>7</sup> ±3.00X10 <sup>5</sup>
<b>1000 Mn</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

>250, Cuenta por arriba de 250 colonias.

Se calculó el porcentaje de crecimiento con los resultados de la dilución que fue posible realizar del conteo de colonias dentro del rango de 25-250. El porcentaje de crecimiento se obtuvo de la relación del crecimiento en presencia de cobre o manganeso entre el crecimiento presentado en el medio de cultivo sin cobre y manganeso con valor del 100% de crecimiento. En las Figuras 11 y 12 se presentan las gráficas del porcentaje de crecimiento a diferentes concentraciones de cobre y manganeso respectivamente.



**Figura 11.** Porcentaje de crecimiento a diferentes concentraciones de cobre.



**Figura 12.** Porcentaje de crecimiento a diferentes concentraciones de manganeso.

Representar los resultados como el porcentaje de crecimiento del microorganismo en función de la concentración del metal en el medio de cultivo sólido aporta una idea de cómo la concentración del metal afecta el número de la población microbiana o si solo se reduce el crecimiento hasta alcanzar la concentración mínima inhibitoria. En el presente estudio se observó que conforme se aumentó la concentración de cobre y manganeso disminuyó el porcentaje de crecimiento de *Pseudomonas rhodesiae* y *Bacillus cereus* hasta alcanzar la concentración que inhibió totalmente el crecimiento. Respecto a *Rhodotorula taiwanensis* el aumento de la concentración de cobre y manganeso no disminuyó significativamente el porcentaje de crecimiento, indicando que el número de microorganismos se vio afectado hasta alcanzar la concentración que inhibió totalmente el crecimiento. La toxicidad de los metales para los organismos se produce como resultado de la reacción del ion metálico libre con los sitios de unión fisiológicamente activos en el sitio de acción. Esto se representa como la formación de un complejo ligando metal-biótico. La mortalidad ocurre cuando el complejo ligando metal-biótico alcanza una concentración crítica (Di Toro et al., 2001).

El rango de la MIC fue determinado con la dilución de UFC incontables ya que la concentración de microorganismos es mayor con respecto a la dilución de UFC contables y se puede aproximar mejor a la concentración de inhibición del crecimiento. Los resultados de los rangos en donde se encuentra la MIC para cobre y manganeso se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Rango de la MIC de cobre y manganeso para los microorganismos identificados.

<b>Microorganismo</b>	<b>MIC de Cu (ppm)</b>	<b>MIC de Mn (ppm)</b>
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	600-800	400-600
<i>Bacillus cereus</i>	<200	400-600
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	600-800	800-1000

Las concentraciones mínimas inhibitorias para cobre y manganeso de *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis* obtenidas en el presente estudio pueden ser representadas como el grado de toxicidad de cobre y manganeso a la

ecología microbiana presente en sedimentos con altas concentraciones de metales pesados. Para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de metales pesados, la mayoría de los estudios han utilizado el medio que mejor favorece el crecimiento del microorganismo o grupo de microorganismos. Los metales y diversos componentes de los medios de cultivo podrían interactuar, lo que complicaría la interpretación de los datos. La prueba de toxicidad en medios sólidos podría ser útil en la evaluación de toxicidad de metales en lodos de aguas residuales y suelos contaminados, donde las condiciones de difusión, complejación y disponibilidad de metales fueron diferentes de las observadas en medios líquidos (Hassen et al., 1998). El cobalto, cobre, manganeso, níquel y zinc en cantidades traza son esenciales para el crecimiento de microorganismos, pero a altas concentraciones tienen efectos nocivos en diversos organismos y en la salud humana (Filali et al., 2000; Issazadeh, Jahanpour, Pourghorbanali, Raeisi, & Faekhondeh, 2013).

La toxicidad de cualquier metal dado es específica del organismo, ya que depende de la absorción y de los procesos biológicos inhibidos (Mangold et al., 2013). Con base en los resultados obtenidos se observa que la concentración mínima inhibitoria para cobre y manganeso son específicas para cada microorganismo y dependientes del metal ya que para *Pseudomonas rhodesiae* el valor de la concentración de cobre es mayor que la de manganeso a diferencia de *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis* los cuales presentaron una mayor concentración para manganeso que para cobre. *Pseudomonas rhodesiae* y *Rhodotorula taiwanensis* presentaron la mayor tolerancia a cobre ya que se desarrollaron a la concentración de 600 ppm. *Bacillus cereus* no presentó tolerancia a 200 ppm de cobre lo que indica el grado de toxicidad del metal. Los tres microorganismos presentaron tolerancia al manganeso, siendo *Rhodotorula taiwanensis* la que presentó la mayor tolerancia a manganeso, desarrollándose a la concentración de 800 ppm. *Pseudomonas rhodesiae* y *Bacillus cereus* se desarrollaron a 400 ppm de manganeso.

En presencia de cobre (sulfato de cobre), la MIC de *Aspergillus niger* fue entre 5 y 10 mM (Villalba-Villalba, Cruz-Campas, & Azuara-Gómez, 2018). Con base en los resultados proporcionados en el estudio anterior, la MIC para cobre de *Aspergillus niger*



en unidades de ppm fue entre 318 ppm y 635 ppm. La adición de 300 mg L<sup>-1</sup> de concentración de cobre (II) tuvo efectos tóxicos significativos sobre *Schizosaccharomyces pombe* (Dönmez & Aksu, 1999). Los rangos en donde se encuentran las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas en el presente estudio establecen los límites de tolerancia a cobre y manganeso de *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis*. Esta información podría ser de utilidad para el tratamiento de aguas y sedimentos con concentraciones de metales pesados dentro del rango de tolerancia del microorganismo.

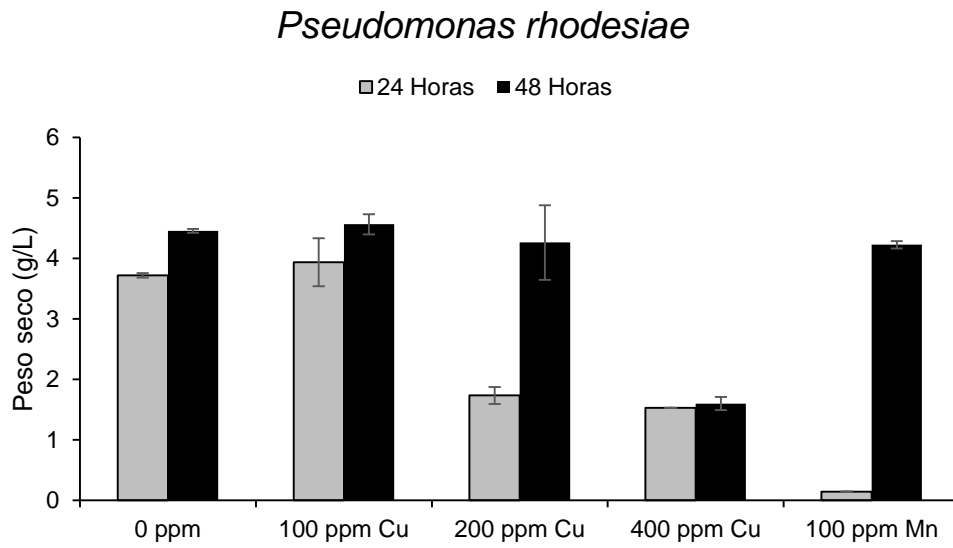
Los microorganismos extremófilos pueden sobrevivir en lugares que carecen de nutrientes y pueden colonizar ambientes que son tóxicos para casi cualquier otra forma de vida. Los extremófilos se clasifican según las condiciones en que crecen, los metalófilos son aquellos que sobreviven bajo concentraciones extremadamente altas de metales pesados (Deive & Sanromán, 2017). Por lo que los microorganismos extremófilos *Pseudomonas rhodesiae* y *Rhodotorula taiwanensis* se pueden clasificar como microorganismos metalófilos a cobre y manganeso, y el extremófilo *Bacillus cereus* se puede clasificar como microorganismo metalófilo a manganeso. Los microorganismos aislados del Río San Pedro en el presente estudio tienen el potencial de utilizarse como biosorbentes de cobre y manganeso debido a la tolerancia que presentaron hacia estos metales. El orden de tolerancia a cobre y manganeso de mayor a menor fue de *Rhodotorula taiwanensis*, *Pseudomonas rhodesiae* y *Bacillus cereus*.

#### 4.4 Adaptación y Rendimiento de los Microorganismos en Medio de Cultivo Líquido Enriquecido con Cobre y Manganeseo

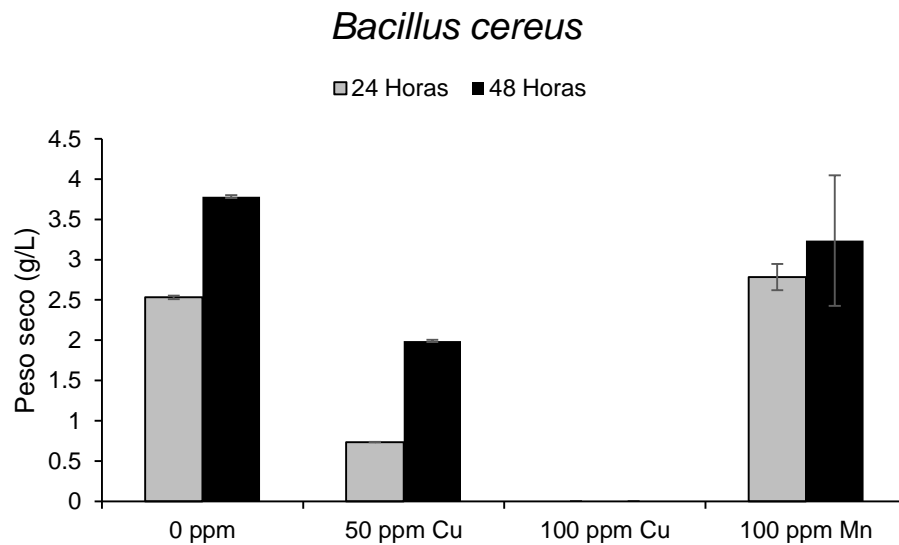
Experimentalmente se determinó que en los medios de cultivo líquidos LB y YPG a pH de 6.0 el cobre y manganeseo no se solubilizaron totalmente a concentraciones superiores de 500 ppm de cobre y 200 ppm de manganeseo, ya que se observó la presencia de precipitados. Esta condición dificulta la medición y exactitud de la densidad óptica para el análisis del crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, para mantener soluble el cobre o manganeseo en el medio de cultivo se establecieron como máximas concentraciones solubles 400 ppm de cobre y 100 ppm de manganeseo a pH de 6.0. Las pruebas de rendimiento de biomasa a diferentes concentraciones de cobre y manganeseo se realizaron a concentraciones menores a las establecidas, ya que los componentes del medio de cultivo pueden repercutir en la solubilidad de los metales.

La introducción de otros aniones en el sistema de manganeseo-agua agrega nuevos sólidos y complejos del soluto (Hem, 1972). Los aniones presentes en el agua natural afectan el comportamiento del manganeseo de varias maneras. Por ejemplo, compuestos de baja solubilidad pueden formarse cuando el manganeseo se combina con carbonato, y los iones complejos formados por manganeseo y ciertos aniones pueden aumentar la solubilidad del manganeseo. Las tasas de oxidación del manganeseo incrementan al aumentar el pH y disminuyen por la presencia de  $\text{SO}_4^{2-}$  o  $\text{HCO}_3^-$  (Hem, 1963b). Por lo anterior, para el análisis del crecimiento de microorganismos en medios de cultivo líquidos enriquecidos con metales, hay que realizar previamente pruebas de solubilidad de metales en base a la formación de precipitados, ya que además del pH y ORP la solubilidad de los metales depende de la composición del medio de cultivo.

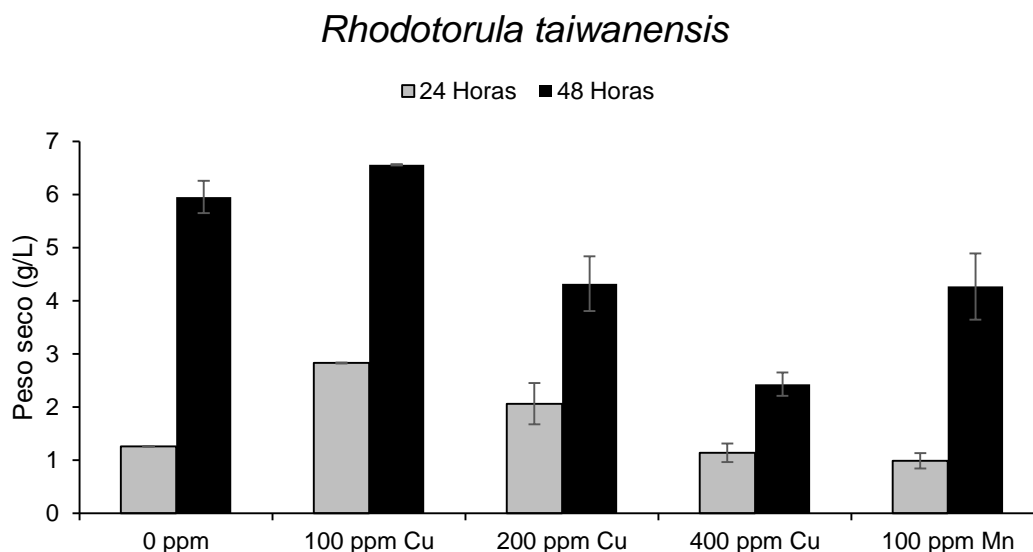
Se evaluó el rendimiento de biomasa en medio de cultivo líquido a diferentes concentraciones de cobre y manganeseo. En las Figuras 13, 14 y 15 se muestran los resultados obtenidos para los tres microorganismos seleccionados.



**Figura 13.** Rendimiento en peso seco (g/L) de *Pseudomonas rhodesiae* a diferentes concentraciones de cobre y manganeso.



**Figura 14.** Rendimiento en peso seco (g/L) de *Bacillus cereus* a diferentes concentraciones de cobre y manganeso.



**Figura 15.** Rendimiento en peso seco (g/L) de *Rhodotorula taiwanensis* a diferentes concentraciones de cobre y manganeso.

En este estudio se consideró que el microorganismo presentó adaptación a la presencia de cobre y manganeso en el medio de cultivo cuando a las 24 horas de crecimiento el rendimiento de biomasa disminuyó respecto al rendimiento de biomasa en el medio de cultivo sin cobre y manganeso. Se infiere que se alargó la fase de adaptación (fase lag) y como consecuencia el tiempo en alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Además, se consideró que el microorganismo presentó inhibición de crecimiento cuando después de 48 horas de crecimiento el rendimiento de biomasa en el medio de cultivo con cobre o manganeso fue considerablemente menor al rendimiento de biomasa en el medio de cultivo sin cobre y manganeso.

Con los resultados de la Figura 13 se determinó que *Pseudomonas rhodesiae* a 100 ppm de cobre no presentó adaptación e inhibición del crecimiento, a 200 ppm de cobre presentó adaptación mas no se inhibió el crecimiento, a 400 ppm de cobre se presentó adaptación e inhibición del crecimiento y a 100 ppm de manganeso se presentó adaptación mas no se inhibió el crecimiento. En la Figura 14 se muestra que para *Bacillus cereus* a 50 ppm de cobre se presentó adaptación e inhibición del crecimiento, a 100

ppm de cobre se inhibió totalmente el crecimiento y a 100 ppm de manganeso no se presentó adaptación e inhibición del crecimiento. En la Figura 15 se muestra que para *Rhodotorula taiwanensis* a 100 ppm de cobre no se presentó adaptación e inhibición del crecimiento. A 200, 400 ppm de cobre y 100 ppm de manganeso no se presentó adaptación más sí se inhibió el crecimiento.

Estudios realizados demostraron que para *Aspergillus niger*, el patrón de crecimiento del hongo sugiere el desarrollo de tolerancia y adaptación a la presencia de los metales evaluados. Con 1 mM de cada sal metálica, el crecimiento del hongo inició a las 24 h posteriores a la incubación, mientras que, a partir de 5 mM, el crecimiento del hongo inició a las 72 h, lo que implica un alargamiento de la fase de latencia (Villalba-Villalba et al., 2018). Estudios en los que utilizaron *Pseudomonas fluorescens* y *Klebsiella pneumoniae*, determinaron que estas dos cepas podrían crecer a concentraciones superiores (500  $\mu$ M) de mercurio, con una fase lag corta que indica que no hay ningún efecto sobre las propiedades de crecimiento (Filali et al., 2000). Las concentraciones de metal que no presentaron efecto en la adaptación y la inhibición del crecimiento fueron 100 ppm de cobre para *Pseudomonas rhodesiae*, 100 ppm de manganeso para *Bacillus cereus* y 100 ppm de cobre para *Rhodotorula taiwanensis*.

En el presente estudio se determinó que la adaptación que presentaron los microorganismos debido a la concentración de cobre y manganeso en el medio de cultivo líquido influyó en el tiempo en el que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento ya que se alargó la fase de adaptación (fase lag). Un aumento en la concentración de cobre (II) causó un aumento de la fase lag y una disminución en el crecimiento microbiano (Dönmez & Aksu, 1999). La duración de la fase lag da una indicación de la velocidad de adaptación o aclimatación de los aislamientos en medios ricos en metales pesados. Los resultados de la duración de la fase lag indican la tolerancia al metal y la adaptación de los aislamientos (O. G. Oladipo et al., 2018). Los mecanismos de adaptación de los microorganismos del suelo incluyen un plan metabólico conocido como respuesta al estrés. El objetivo biológico de la respuesta al estrés es proteger los componentes celulares contra factores ambientales potencialmente peligrosos y reparar el daño que

ocurre en condiciones de estrés (Świąciło & Zych-Wężyk, 2013). Las respuestas de estrés microbiano inducidas por cambios en la actividad metabólica de las células conducen a la represión de la síntesis de la mayoría de las proteínas que son encontradas en condiciones fisiológicas normales, y a la síntesis de proteínas específicas para la supervivencia celular en el nuevo ambiente (Prabhakaran et al., 2016; Świąciło & Zych-Wężyk, 2013). Por lo que dos posibles señales de estrés microbiano causado por metales pesados en cinéticas de crecimiento son una fase de adaptación (fase lag) mayor y la inhibición del crecimiento respecto al medio de cultivo sin metales pesados.

Se observó que la inhibición del crecimiento repercutió ampliamente en la producción de biomasa principalmente a 400 ppm de cobre para *Pseudomonas rhodesiae*, 50 ppm de cobre para *Bacillus cereus* y 400 ppm de cobre para *Rhodotorula taiwanensis*. Sin embargo, diversos estudios realizados han demostrado que ciertos microorganismos aumentan la producción de EPS al encontrarse bajo condiciones de estrés debido a la presencia de metales pesados. Determinar las concentraciones de metales pesados en las que se inhibe el crecimiento en medio de cultivo líquido pueden ser útiles para la producción de EPS por microorganismos metalotolerantes. La producción de EPS se incrementa en las llamadas condiciones estresantes impuestas por las limitaciones de nutrientes y las sustancias tóxicas, incluidos los metales pesados (Pal & Paul, 2008). Los EPS actúan como una capa protectora contra el estrés de los metales pesados mediante la unión de iones metálicos o retrasando su difusión dentro de la biopelícula (Pal & Paul, 2008; Prabhakaran et al., 2016).

Estudios realizados informan sobre una cepa autóctona de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L capaz de sobrevivir al estrés causado por la presencia de metales pesados. La presencia de diferentes metales no afectó la producción de biomasa, pero mejoró la producción de EPS (Garza Gonzalez et al., 2016). La capacidad de las levaduras pigmentadas para responder a factores de estrés a través de la sobreproducción de significantes metabolitos es de importancia biotecnológica tanto en la biorremediación como en la producción de carotenoides a nivel industrial (Irazusta et al., 2013).

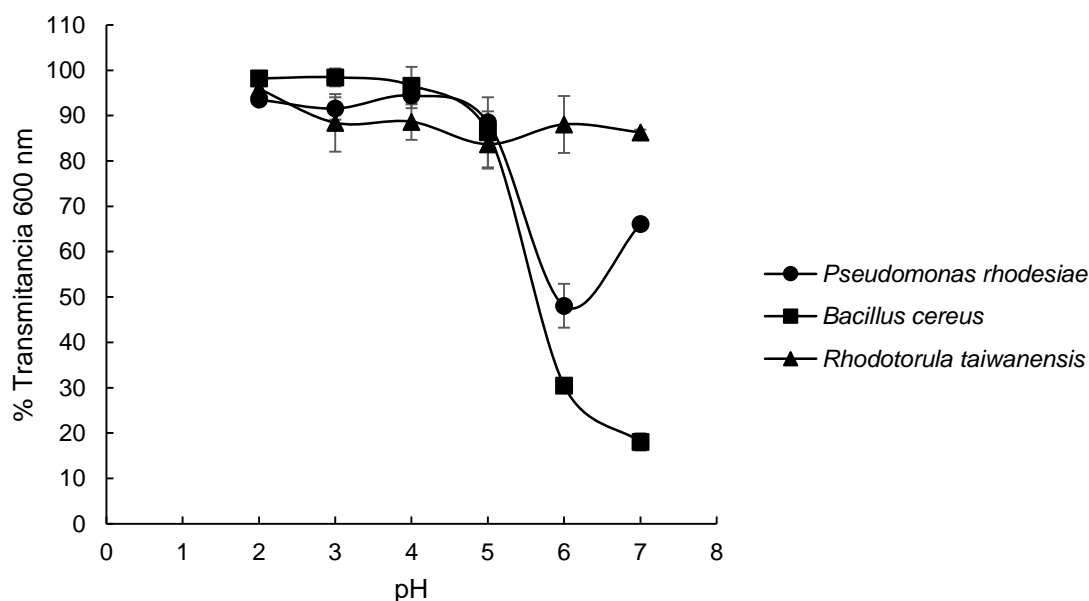
Los microorganismos *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis* tienen el potencial de ser utilizados para la producción de biomasa bajo condiciones de estrés causado por la magnitud de la concentración de cobre y manganeso en el medio de cultivo. Además, los tres microorganismos podrían ser utilizados como biosorbentes a base de biomasa viva en el tratamiento de aguas contaminadas con cobre y manganeso con concentraciones dentro del rango de tolerancia de cada microorganismo.

Se propone la elaboración de un biosorbente de metales pesados a base de biomasa muerta de *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis* ya sea un producto formado por una especie de microorganismo o mezcla de especies de microorganismos, debido a las ventajas que presenta la biomasa muerta para ser comercializada y reutilizada. Estudios realizados muestran que el uso de células microbianas muertas en la biosorción es más ventajoso para el tratamiento del agua debido a que los organismos muertos no se ven afectados por los desechos tóxicos, no requieren un suministro continuo de nutrientes y pueden regenerarse y reutilizarse para muchos ciclos (Aksu, 2005; Çolak et al., 2011). Estudios realizados demostraron que la bioacumulación de Cd (II) por *Bacillus cereus* RC-1 depende en gran medida de la biosorción extracelular en lugar de la acumulación intracelular. Con base en los estudios anteriores, la biomasa muerta parece ser un biosorbente más eficiente para la remoción de Cd (II) de la solución acuosa (Huang et al., 2013). En el presente estudio los rendimientos de biomasa obtenidos en los medios de cultivo líquidos enriquecidos con cobre y manganeso pueden ser de utilidad en el desarrollo de un proceso para la producción de un biosorbente de metales pesados a base de microorganismos metalotolerantes.

## 4.5 Cinéticas de Crecimiento

### 4.5.1 Pruebas de crecimiento a diferentes valores de pH

Para conocer el valor de pH en el cual se promueve un mayor crecimiento de microorganismos, se midió el porcentaje de transmitancia a las 48 horas de crecimiento en medio de cultivo líquido a diferentes valores de pH para cada uno de los tres microorganismos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.



**Figura 16.** % Transmitancia a las 48 horas de crecimiento a diferentes valores de pH.

Cada especie microbiana se caracteriza por valores de pH mínimo y máximo que definen los límites del rango de valores de pH dentro del cual es posible el crecimiento. El valor de pH óptimo para cualquier especie es aquel en el que la tasa de crecimiento es más rápida. Los valores mínimo y máximo que limitan el crecimiento generalmente difieren en solo tres o cuatro unidades de pH (Gaudy & Gaudy, 1981). Con los resultados mostrados en la Figura 16 se determinó que los valores de pH donde se presentó mayor

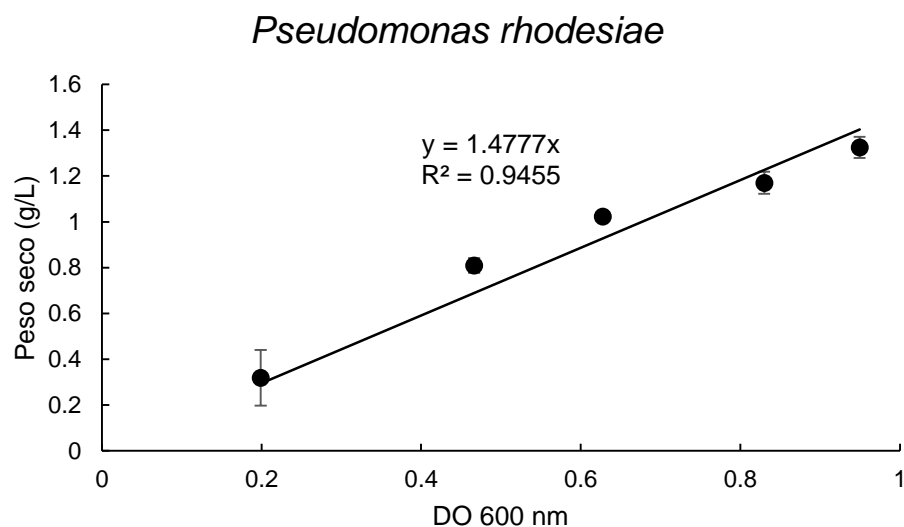


crecimiento fueron de 6.0 para *Pseudomonas rhodesiae*, 7.0 para *Bacillus cereus* y 5.0 para *Rhodotorula taiwanensis*. Se observó que para pH por debajo de 4.0 se limita el crecimiento de los tres microorganismos y que cada microorganismo cuenta con un pH específico en el cual se produce el máximo crecimiento.

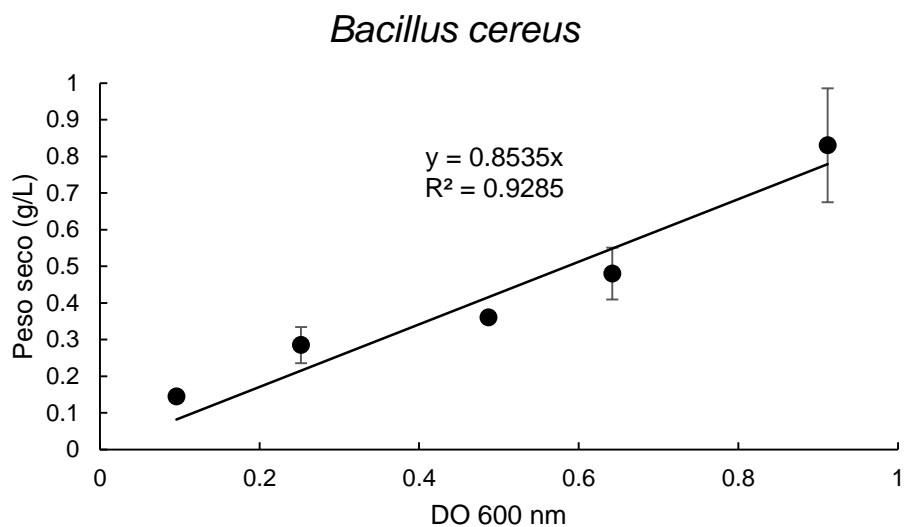
La mayoría de las levaduras son relativamente tolerantes con una amplia gama de valores de pH; El pH óptimo para el crecimiento varía de 4.5 a 6.5 para la mayoría de las especies (Prescott, Dunn, & Reed, 1982). *Rhodotorula taiwanensis* fue el microorganismo que se desarrolló en el pH más ácido dentro de un rango de 4.0-6.0.

#### 4.5.2 Peso seco en función de la densidad óptica a 600 nm

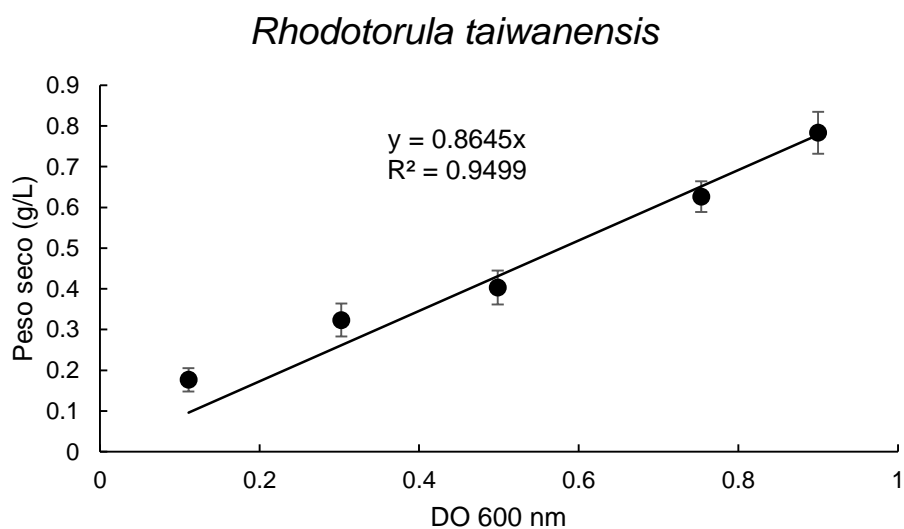
Para determinar el peso seco de biomasa contenida en el medio de cultivo líquido en función de la densidad óptica a 600 nm, se graficaron los datos experimentales de peso seco y densidad óptica para obtener una ecuación lineal que permita la conversión de las dos unidades. En las Figuras 17, 18 y 19 se muestran los ajustes lineales y las ecuaciones obtenidas para los tres microorganismos seleccionados.



**Figura 17.** Peso seco (g/L) de *Pseudomonas rhodesiae* en función de la DO 600 nm en medio de cultivo LB.



**Figura 18.** Peso seco (g/L) de *Bacillus cereus* en función de la DO 600 nm en medio de cultivo LB.

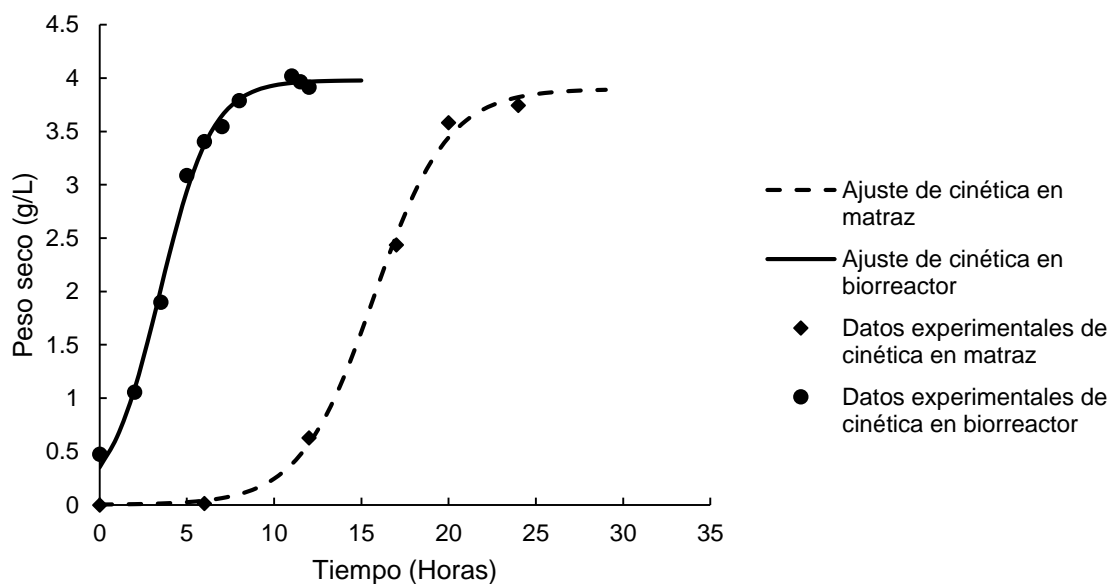


**Figura 19.** Peso seco (g/L) de *Rhodotorula taiwanensis* en función de la DO 600 nm en medio de cultivo YPG.

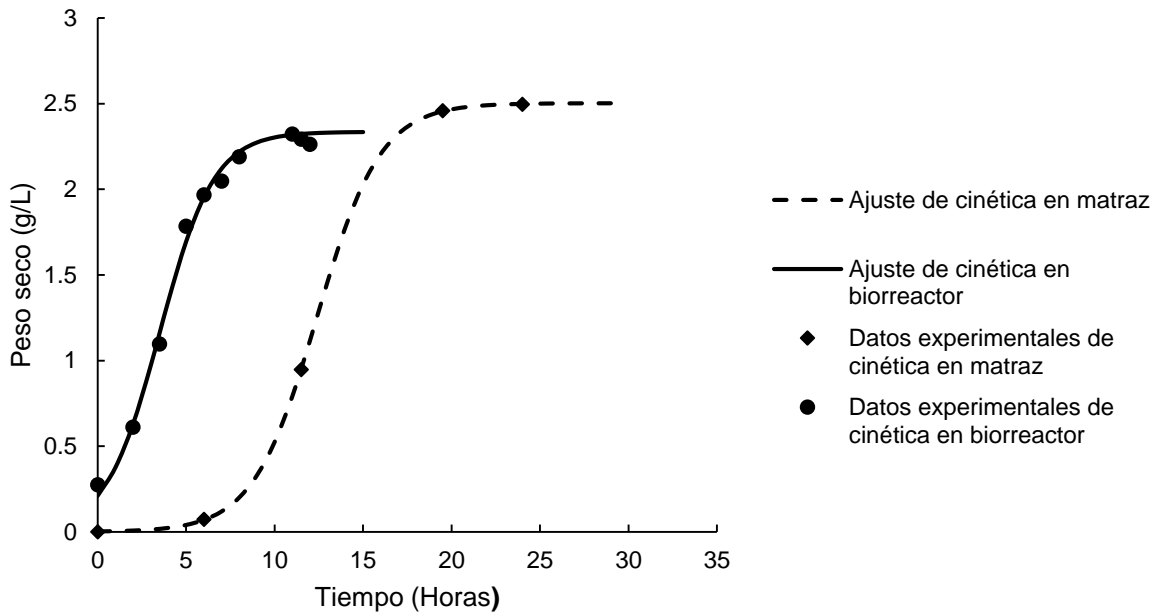
Las tres ecuaciones lineales obtenidas son útiles para determinar la concentración de biomasa en el medio de cultivo en función de la densidad óptica a 600 nm.

### 4.5.3 Parámetros cinéticos en matraz y biorreactor

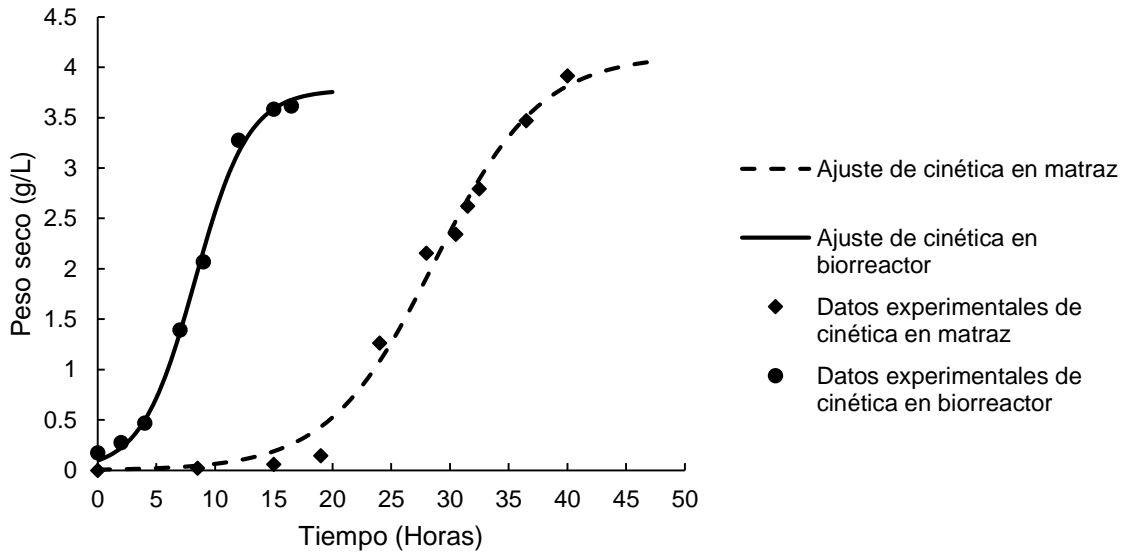
A partir de las cinéticas de crecimiento por lote en matraz y biorreactor de los tres microorganismos seleccionados, se determinaron los parámetros cinéticos al ajustar los datos experimentales a un modelo logístico de Verhulst-Pearl. En las Figuras 20, 21 y 22 se muestran los datos experimentales y ajustes de la evolución en el tiempo (Horas) de la concentración en peso seco (g/L) para cada uno de los tres microorganismos.



**Figura 20.** Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas rhodesiae* en medio de cultivo LB a pH de 6.0.



**Figura 21.** Cinéticas de crecimiento de *Bacillus cereus* en medio de cultivo LB a pH de 7.0.



**Figura 22.** Cinéticas de crecimiento de *Rhodotorula taiwanensis* en medio de cultivo YPG a pH de 5.0.

Los parámetros cinéticos de crecimiento en matraz y biorreactor obtenidos para *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis* se muestran en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Parámetros cinéticos de crecimiento en matraz y biorreactor.

Microorganismo	Sistema de crecimiento	$X_{\max}$ (g/L)	$\mu_{\max}$ (Horas <sup>-1</sup> )	$t_m$ (Horas)	Ajuste al modelo logístico (R <sup>2</sup> )
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Matraz agitado	3.89	0.47	15.71	0.99
	Biorreactor	3.97	0.67	3.45	0.99
<i>Bacillus cereus</i>	Matraz agitado	2.50	0.55	12.38	0.99
	Biorreactor	2.33	0.65	3.52	0.99
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	Matraz agitado	4.12	0.22	28.66	0.98
	Biorreactor	3.77	0.43	8.30	0.99

En cuanto a los rendimientos de biomasa obtenidos para cada microorganismo, no se observaron diferencias significativas entre los resultados de la concentración máxima de microorganismos ( $X_{\max}$ ) para las cinéticas de crecimiento en matraz y biorreactor. Lo anterior indica que se aprovechó los nutrientes del medio de cultivo en las mismas proporciones para la producción de biomasa en los dos sistemas de crecimiento.

Para los tres microorganismos en las cinéticas de crecimiento en biorreactor la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ ) aumentó respecto a los valores de las cinéticas de crecimiento en matraz agitado. Las  $\mu_{\max}$  obtenidas de las cinéticas de crecimiento en matraz agitado se incrementaron dentro de un rango de 0.1-0.2 horas<sup>-1</sup> en las cinéticas de crecimiento en biorreactor. Las condiciones de operación del biorreactor como la cantidad de inóculo, aireación, agitación, control de temperatura, pH y formación de espuma favorecieron el aumento de la velocidad específica de crecimiento. El aumento de la velocidad específica de crecimiento acortó el tiempo en el que se alcanzó la concentración máxima de microorganismos.

Relacionando los parámetros cinéticos del tiempo a la mitad de la concentración máxima de microorganismos ( $t_m$ ) del crecimiento, en matraz y biorreactor, para cada uno de los tres microorganismos, *Pseudomonas rhodesiae* alcanzó la mitad de la concentración

máxima de biomasa a las 3.45 horas de crecimiento en biorreactor y a las 15.71 horas de crecimiento en matraz agitado. Para *Bacillus cereus* se obtuvo la mitad de la concentración máxima de biomasa a las 3.52 horas de la cinética en biorreactor y a las 12.38 horas de la cinética en matraz agitado. *Rhodotorula taiwanensis* alcanzó la mitad de la concentración máxima de biomasa a las 8.30 horas de crecimiento en biorreactor y a las 28.66 horas de crecimiento en matraz agitado.

El tiempo en alcanzar la mitad de la concentración máxima de microorganismos en las cinéticas de crecimiento en biorreactor del presente estudio es proporcional al  $26.45 \pm 2.25$  % del tiempo en alcanzar la mitad de la concentración máxima de microorganismos en las cinéticas de crecimiento en matraz. El tiempo en que se alcanzó la concentración máxima de microorganismos en las cinéticas de crecimiento en biorreactor es proporcional al  $43.27 \pm 3.94$  % del tiempo en alcanzar la concentración máxima de microorganismos en las cinéticas de crecimiento en matraz.

Varias investigaciones han mejorado la productividad de cultivos de extremófilos a través de la optimización de la composición del medio, la configuración del biorreactor, las condiciones operacionales y el modo de operación de la fermentación. Cada microorganismo tiene propiedades especiales, el diseño y la configuración del biorreactor debe ser fijada en relación con sus condiciones de crecimiento específicas, generando un ambiente que permita la expresión del máximo potencial de cada extremófilo (Deive & Sanromán, 2017).

El tiempo de las cinéticas de crecimiento repercute en costos de operación, en este estudio se determinó que el tiempo de las cinéticas de crecimiento en biorreactor es proporcional a menos de la mitad del tiempo de las cinéticas de crecimiento en matraz, considerando las condiciones de operación establecidas.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Conforme aumentaron las condiciones ácidas y oxidantes de las muestras de sedimento del Río San Pedro disminuyó la concentración de microorganismos. La concentración de microorganismos en los sedimentos del Río San Pedro se encuentra dentro de un rango aproximado de  $10^3$  a  $10^5$  unidades formadoras de colonias por gramo de sedimento. Se aislaron de los sedimentos siete microorganismos tolerantes a cobre y manganeso. Los tres microorganismos que presentaron mayor tolerancia a cobre y manganeso así como también mayor crecimiento en medio de cultivo líquido se identificaron como: *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis*.

Los sedimentos del Río San Pedro son una fuente de microorganismos tolerantes a cobre y manganeso con posibles aplicaciones en la biorremediación de aguas y sedimentos contaminados con metales pesados. El aislamiento de microorganismos metalotolerantes en medios de cultivo sólidos enriquecidos con metales pesados representa una aproximación al medio ambiente en los sedimentos, debido a que los metales pesados se encuentran en los medios de cultivo sólidos y sedimentos principalmente como una mezcla de iones y compuestos insolubles.

El rango de la concentración mínima inhibitoria en medio de cultivo sólido para *Pseudomonas rhodesiae* fue de 600-800 ppm de Cu y 400-600 ppm de Mn, para *Bacillus cereus* fue de <200 ppm de Cu y 400-600 ppm de Mn, para *Rhodotorula taiwanensis* fue de 600-800 ppm de Cu y 800-1000 ppm de Mn. Las concentraciones mínimas inhibitorias de los tres microorganismos identificados se pueden aplicar principalmente para

determinar la toxicidad de los metales en la ecología microbiana presente en sedimentos con altas concentraciones de metales pesados. Y en el caso de la aplicación de los microorganismos en procesos de biorremediación indicarán la concentración límite de cobre y manganeso en la que se pueden desarrollar para el tratamiento de aguas y sedimentos contaminados.

Los microorganismos extremófilos *Pseudomonas rhodesiae* y *Rhodotorula taiwanensis* se pueden clasificar como microorganismos metalófilos a cobre y manganeso, y el extremófilo *Bacillus cereus* se puede clasificar como microorganismo metalófilo a manganeso. Los microorganismos identificados del Río San Pedro tienen el potencial de utilizarse como biosorbentes de cobre y manganeso debido a la tolerancia que presentaron hacia estos metales.

Se determinó que en los medios de cultivo líquidos LB y YPG a pH de 6.0 el cobre y manganeso no se solubilizaron totalmente a concentraciones superiores de 500 ppm de cobre y 200 ppm de manganeso, ya que se observó la presencia de precipitados. Las concentraciones donde se observó la solubilización de los metales en los medios de cultivo líquidos LB y YPG a pH de 6.0 fueron a 400 ppm de cobre y 100 ppm de manganeso. Por lo que con las concentraciones solubles de cobre y manganeso en los medios de cultivo líquidos fue posible realizar un análisis del crecimiento de los microorganismos en función de la concentración del metal.

La adaptación que presentaron los microorganismos debido a la concentración de cobre y manganeso en el medio de cultivo líquido influyó en el tiempo en el que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento ya que se alargó la fase de adaptación (fase lag). La inhibición del crecimiento repercutió ampliamente en la producción de biomasa principalmente a 400 ppm de cobre para *Pseudomonas rhodesiae*, 50 ppm de cobre para *Bacillus cereus* y 400 ppm de cobre para *Rhodotorula taiwanensis*. Por lo que dos posibles señales de estrés microbiano causado por metales pesados en cinéticas de crecimiento son una mayor fase de adaptación (fase lag) y la inhibición del crecimiento. Los microorganismos *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis* podrían ser utilizados en cinéticas de crecimiento bajo condiciones de estrés



causado por la magnitud de la concentración de cobre y manganeso en el medio de cultivo con el fin de aumentar la producción EPS de la biomasa.

Se determinaron los parámetros cinéticos en cultivo por lote en matraz y biorreactor para cada uno de los tres microorganismos. Las  $\mu_{max}$  obtenidas de las cinéticas de crecimiento en matraz agitado se incrementaron dentro de un rango de 0.1-0.2 Horas<sup>-1</sup> en las cinéticas de crecimiento en biorreactor. Las condiciones de operación del biorreactor favorecieron el aumento de la velocidad específica de crecimiento acortando el tiempo en el que se alcanzó la concentración máxima de microorganismos.

Se determinó que el tiempo en alcanzar la concentración máxima de microorganismos en las cinéticas de crecimiento en biorreactor es proporcional a menos de la mitad del tiempo de las cinéticas de crecimiento en matraz considerando las condiciones de operación establecidas. El tiempo en que se alcanzó la concentración máxima de microorganismos en las cinéticas de crecimiento en biorreactor es proporcional al 43.27  $\pm$  3.94 % del tiempo en alcanzar la concentración máxima de microorganismos en las cinéticas de crecimiento en matraz. Los parámetros cinéticos de *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis* son útiles para el escalamiento a nivel planta piloto de la producción masiva de biomasa biosorbente de metales pesados en un biorreactor tipo tanque agitado.

## 5.2 Recomendaciones

Aislar microorganismos tolerantes a As, Zn, Fe y Ni de muestras de sedimentos del Río San Pedro para utilizarlos como potenciales biosorbentes de metales pesados y corroborar si son especies diferentes o iguales a las aisladas en el presente estudio.

Determinar la concentración mínima inhibitoria para As, Zn, Fe y Ni de *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis*, así como analizar la concentración mínima inhibitoria como mezcla de metales pesados en el medio de cultivo para observar si hay diferencias respecto a la concentración de un solo metal en el medio de cultivo.

Estudiar la solubilidad del cobre y manganeso en medios de cultivo líquidos a diferentes valores de pH, para determinar las concentraciones máximas de metal que se pueden añadir a los medios de cultivo en forma soluble, con la finalidad de analizar el crecimiento de microorganismos metalotolerantes bajo condiciones de estrés por metales pesados en medios de cultivo líquidos.

Estudiar si el crecimiento de microorganismos metalotolerantes bajo condiciones de estrés por metales pesados en el medio de cultivo aumentan significativamente la capacidad de la biomasa para biosorber metales pesados en comparación con biomasa obtenida del crecimiento de microorganismos metalotolerantes sin condiciones de estrés por metales pesados.

Diseñar y operar una planta piloto para la producción de *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula taiwanensis* en un biorreactor tipo tanque agitado con el propósito de desarrollar un biosorbente para la biorremediación de aguas y sedimentos contaminados por metales pesados.

## CAPÍTULO 6

### REFERENCIAS

- Agate, A., Lundgren, D., & Skyring, G. (1982). A Laboratory Manual of Geomicrobiology. In. Department of Microbiology Maharashtra Association for the Cultivation of Science (MACS).
- Aguilar-Hinojosa, Y., Meza-Figueroa, D., Villalba-Atondo, A. I., Encinas-Romero, M. A., Valenzuela-García, J. L., & Gómez-Álvarez, A. (2016). Mobility and Bioavailability of Metals in Stream Sediments Impacted by Mining Activities: the Jaralito and the Mexicana in Sonora, Mexico. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(9), 345. doi:10.1007/s11270-016-3046-1
- Akhbarizadeh, R., Shayestefar, M. R., & Darezereshki, E. (2014). Competitive Removal of Metals from Wastewater by Maghemite Nanoparticles: A Comparison Between Simulated Wastewater and AMD. *Mine Water and the Environment*, 33(1), 89-96. doi:10.1007/s10230-013-0255-3
- Aksu, Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40(3), 997-1026. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.008>
- Ansari, M. I., & Malik, A. (2007). Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 98(16), 3149-3153. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.008>
- Apiratikul, R., & Pavasant, P. (2008). Batch and column studies of biosorption of heavy metals by *Caulerpa lentillifera*. *Bioresource Technology*, 99(8), 2766-2777. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.036>
- Atkinson, B. (1986). *Reactores bioquímicos*: Reverté.
- Atlas, R. M., Bartha, R., & Guerrero, R. (2001). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*: Pearson Educación.
- Bramhachari, P. V., Kishor, P. B., Ramadevi, R., Kumar, R., Rao, B. R., & Dubey, S. K. (2007). Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VB0S3. *J Microbiol Biotechnol*, 17(1), 44-51.
- Chanturia, V. A., Medyanik, N. L., Shadrinova, I. V., & Mishurina, O. A. (2016). Chemical aspects of manganese removal from mine water at copper-sulfide deposits. *Journal of Mining Science*, 52(1), 169-176. doi:10.1134/S1062739116010261
- Comisión Nacional del Agua. (2009). *Normas oficiales mexicanas : NOM - 001-SEMARNAT - 1996, NOM - 002 - SEMARNAT - 1996, NOM - 003 - SEMARNAT - 1997*. México, D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

- Comisión Nacional del Agua. (2015). *Estadísticas del Agua en México, edición 2015*. México: Comisión Nacional del Agua.
- De la Rosa Leal, M. E. (2012). *Visión Integral de la Sustentabilidad y la Responsabilidad Social* (U. d. Sonora Ed.). Hermosillo, Sonora: Universidad de Sonora.
- Deepika, K. V., Raghuram, M., Kariali, E., & Bramhachari, P. V. (2016). Biological responses of symbiotic Rhizobium radiobacter strain VBCK1062 to the arsenic contaminated rhizosphere soils of mung bean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, Part 1, 1-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.008>
- Deive, F. J., & Sanromán, M. Á. (2017). 14 - Bioreactor Development for the Cultivation of Extremophilic Microorganisms. In C. Larroche, M. Á. Sanromán, G. Du, & A. Pandey (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 403-432): Elsevier.
- Di Toro, D. M., Allen, H. E., Bergman, H. L., Meyer, J. S., Paquin, P. R., & Santore, R. C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(10), 2383-2396. doi:10.1002/etc.5620201034
- Dopson, M., Ossandon, F. J., Lövgren, L., & Holmes, D. S. (2014). Metal resistance or tolerance? Acidophiles confront high metal loads via both abiotic and biotic mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 5, 157.
- Dursun, A. Y., Uslu, G., Cuci, Y., & Aksu, Z. (2003). Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(VI) by growing *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 38(12), 1647-1651. doi:[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00075-4)
- Dönmez, G., & Aksu, Z. (1999). The effect of copper(II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. *Process Biochemistry*, 35(1), 135-142. doi:[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00044-8)
- Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F., & Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *AFRICAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY RESEARCH*, 3(2), 35-48.
- Filali, B. K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F. Z., Talbi, M., & Blaghen, M. (2000). Waste Water Bacterial Isolates Resistant to Heavy Metals and Antibiotics. *Current Microbiology*, 41(3), 151-156. doi:10.1007/s0028400
- Foos, A. (1997). Geochemical modeling of coal mine drainage, Summit County, Ohio. *Environmental Geology*, 31(3), 205-210. doi:10.1007/s002540050181
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407-418. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Garza Gonzalez, M. T., Barboza Perez, D., Vazquez Rodriguez, A., Garcia-Gutierrez, D. I., Zarate, X., Cantú Cardenas, M. E., . . . Morones-Ramirez, J. R. (2016). Metal-Induced Production of a Novel Bioadsorbent Exopolysaccharide in a Native *Rhodotorula mucilaginosa* from the Mexican Northeastern Region. *PLOS ONE*, 11(2), e0148430. doi:10.1371/journal.pone.0148430
- Gaudy, A. F., & Gaudy, E. T. (1981). *Microbiology for environmental scientists and engineers*. Auckland: McGraw-Hill.
- Gaur, N., Flora, G., Yadav, M., & Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(2), 180-193. doi:10.1039/C3EM00491K

- Gomathy, M., & Sabarinathan, K. G. (2010). MICROBIAL MECHANISMS OF HEAVY METAL TOLERANCE- A REVIEW. *Agricultural Reviews*, 31(2), 133-138.
- Gupta, R., Kumar, T., & Mittal, A. (2016). Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from soil of an iron industry, Haryana (India). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7, 1308+.
- Gutnick, D. L., & Bach, H. (2000). Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(4), 451-460. doi:10.1007/s002530000438
- Gómez Álvarez, A., Valenzuela G., L., & Meza Figueroa, D. (2011). *Metales Pesados y su Biodisponibilidad en el Río San Pedro, México* (e. u. m. d. L. L. A. P. G. C. K. Editorial Académica Española, Alemania. Ed.).
- Gómez-Alvarez, A., Meza-Figueroa, D., Villalba-Atondo, A. I., Valenzuela-García, J. L., Ramírez-Hernández, J., & Almendariz-Tapia, J. (2008). Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993–2005), Mexico–US border. *Environmental Geology*, 57(7), 1469. doi:10.1007/s00254-008-1424-8
- Gómez-Álvarez, A., Valenzuela-García, J. L., Aguayo-Salinas, S., Meza-Figueroa, D., Ramírez-Hernández, J., & Ochoa-Ortega, G. (2007). Chemical partitioning of sediment contamination by heavy metals in the San Pedro River, Sonora, Mexico. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 19(1), 25-35. doi:10.3184/095422907X198013
- Gómez-Álvarez, A., Valenzuela-García, J. L., Meza-Figueroa, D., de la O-Villanueva, M., Ramírez-Hernández, J., Almendariz-Tapia, J., & Pérez-Segura, E. (2011). Impact of mining activities on sediments in a semi-arid environment: San Pedro River, Sonora, Mexico. *Applied Geochemistry*, 26(12), 2101-2112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.07.008>
- Hamed, J., Dehghani, M., & Mohammadian, F. (2015). Isolation of Extremely Heavy Metal Resistant Strains of Rare Actinomycetes from High Metal Content Soils in Iran. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH*, 9(2), 475-480.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., & Boudabous, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64(1), 7-15. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00161-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00161-2)
- Hem, J. D. (1963a). CHEMICAL EQUILIBRIA AFFECTING THE BEHAVIOR OF MANGANESE IN NATURAL WATER. *International Association of Scientific Hydrology. Bulletin*, 8(3), 30-37. doi:10.1080/02626666309493334
- Hem, J. D. (1963b). *Chemical equilibria and rates of manganese oxidation* (1667A). Retrieved from <http://pubs.er.usgs.gov/publication/wsp1667A>
- Hem, J. D. (1972). Chemical Factors that Influence the Availability of Iron and Manganese in Aqueous Systems. *GSA Bulletin*, 83(2), 443-450. doi:10.1130/0016-7606(1972)83[443:CFTITA]2.0.CO;2
- Huang, F., Dang, Z., Guo, C.-L., Lu, G.-N., Gu, R. R., Liu, H.-J., & Zhang, H. (2013). Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 11-18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.062>
- Ilyas, S., Rehman, A., Coelho, A. V., & Sheehan, D. (2016). Proteomic analysis of an environmental isolate of *Rhodotorula mucilaginosa* after arsenic and cadmium

- challenge: Identification of a protein expression signature for heavy metal exposure. *Journal of Proteomics*, 141, 47-56. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.012>
- Irawati, W., Wijaya, Y., Christian, S., & Djojo, E. S. (2016). Characterization of heavy metals resistant yeast isolated from activated sludge in Rungkut, Surabaya, Indonesia as biosorbent of mercury, copper, and lead. *AIP conference proceedings*, 1744(1), 020061. doi:10.1063/1.4953535
- Irazusta, V., Nieto-Peñalver, C. G., Cabral, M. E., Amoroso, M. J., & de Figueroa, L. I. C. (2013). Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. *Process Biochemistry*, 48(5), 803-809. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.006>
- Issazadeh, K., Jahanpour, N., Pourghorbanali, F., Raeisi, G., & Faekhondeh, J. (2013). Heavy metals resistance by bacterial strains. *Annals of Biological Research*, 4(2), 60-63.
- James, C. N., Copeland, R. C., & Lytle, D. A. (2004). Relationships between oxidation-reduction potential, oxidant, and pH in drinking water. *Proc. 2004 AWWA WQTC, San Antonio, Texas*, 1-13.
- Jaramillo Juárez, F., Rincón Sánchez, A. R., & Rico Martínez, R. (2009). *Toxicología ambiental*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes : Universidad de Guadalajara.
- Kepner, W. G., Semmens, D. J., Bassett, S. D., Mouat, D. A., & Goodrich, D. C. (2004). Scenario Analysis for the San Pedro River, Analyzing Hydrological Consequences of a Future Environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 94(1), 115-127. doi:10.1023/B:EMAS.0000016883.10110.15
- Kotrba, P., Mackova, M., & Macek, T. (2011). Microbial biosorption of metals.
- Latgé, J.-P. (2010). Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology*, 12(7), 863-872. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01474.x
- León, L. A., & Arregocés, O. (1981). *Química de Los Suelos Inundados*: CIAT.
- Li, Z., Yuan, H., & Hu, X. (2008). Cadmium-resistance in growing *Rhodotorula* sp. Y11. *Bioresource Technology*, 99(5), 1339-1344. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.004>
- Lopez-Fernandez, M., Romero-González, M., Günther, A., Solari, P. L., & Merroun, M. L. (2018). Effect of U(VI) aqueous speciation on the binding of uranium by the cell surface of *Rhodotorula mucilaginosa*, a natural yeast isolate from bentonites. *Chemosphere*, 199, 351-360. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.055>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *BROCK. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Education.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1998). *Brock Biología de los microorganismos* (8 ed.). Madrid: Prentice Hall.
- Mangold, S., Potrykus, J., Björn, E., Lövgren, L., & Dopson, M. (2013). Extreme zinc tolerance in acidophilic microorganisms from the bacterial and archaeal domains. *Extremophiles*, 17(1), 75-85. doi:10.1007/s00792-012-0495-3
- Matyar, F., Kaya, A., & Dinçer, S. (2008). Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in

- Iskenderun Bay, Turkey. *Science of The Total Environment*, 407(1), 279-285. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.014>
- Medrano Roldán, H., & Galán Wong, L. J. (2000). *Biotecnología de minerales*: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología : Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango : COCYTed Laguna.
- Mihelcic, J. R., & Beth Zimmerman, J. (2012). *Ingeniería ambiental : fundamentos, sustentabilidad y diseño*. México: Alfaomega.
- Monachese, M., Burton, J. P., & Reid, G. (2012). Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl Environ Microbiol*, 78(18), 6397-6404. doi:10.1128/aem.01665-12
- Monge-Amaya, O., Valenzuela-García, J. L., Acedo-Félix, 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). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 24, 107-115.
- Ngomsik, A.-F., Bee, A., Siaugue, J.-M., Cabuil, V., & Cote, G. (2006). Nickel adsorption by magnetic alginate microcapsules containing an extractant. *Water Research*, 40(9), 1848-1856. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.036>
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51(6), 730-750.
- Oladipo, O., Olayinka, A., & Awotoye, O. (2014). Ecological impact of mining on soils of Southwestern Nigeria. *Environmental and Experimental Biology*, 12, 179-186.
- Oladipo, O. G., Ezeokoli, O. T., Maboeta, M. S., Bezuidenhout, J. J., Tiedt, L. R., Jordaan, A., & Bezuidenhout, C. C. (2018). Tolerance and growth kinetics of bacteria isolated from gold and gemstone mining sites in response to heavy metal concentrations. *Journal of Environmental Management*, 212, 357-366. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.038>
- Pal, A., & Paul, A. K. (2008). Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 49-64. doi:10.1007/s12088-008-0006-5
- Pan, J.-h., Liu, R.-x., & Tang, H.-x. (2007). Surface reaction of *Bacillus cereus* biomass and its biosorption for lead and copper ions. *Journal of Environmental Sciences*, 19(4), 403-408. doi:[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60067-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60067-9)
- Pourbaix, M. (1974). *Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions*: National Association of Corrosion Engineers.
- Prabhakaran, P., Ashraf, M. A., & Aqma, W. S. (2016). Microbial stress response to heavy metals in the environment. *RSC Advances*, 6(111), 109862-109877. doi:10.1039/C6RA10966G
- Prats, G. (2006). *Microbiología clínica*: Editorial Médica Panamericana.
- Prescott, S. C., Dunn, C. G., & Reed, G. (1982). *Prescott & Dunn's industrial microbiology* (4 ed.): AVI Pub. Co.
- Pérez, R. G., & Peris, M. C. V. (1997). *Microbiología*: Thomson-Paraninfo.
- Real Academia Española. (2014). Diccionario de la lengua española. 23.ª ed. Retrieved from <http://www.rae.es/>
- Romero Acosta, A. A. (1996). *Estudio de la Contaminación por Metales Pesados en Agua y Sedimento del Río San Pedro, Sonora, México.*, Universidad de Sonora., Hermosillo, Sonora.

- Rosario, K., Iverson, S. L., Henderson, D. A., Chartrand, S., McKeon, C., Glenn, E. P., & Maier, R. M. (2007). Bacterial community changes during plant establishment at the San Pedro River mine tailings site. *J Environ Qual*, 36(5), 1249-1259. doi:10.2134/jeq2006.0315
- Secretaría de Salud. (2000). MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Retrieved from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m127ssa14.html>
- Singha, T. K. (2012). Microbial extracellular polymeric substances: production, isolation and applications. *IOSR J Pharm*, 2(2), 271-281.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología: Médica Panamericana*.
- Tyler, G., Pålsson, A. M. B., Bengtsson, G., Bååth, E., & Tranvik, L. (1989). Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. *Water, Air, and Soil Pollution*, 47(3), 189-215. doi:10.1007/BF00279327
- Ungureanu, C., Ferdes, M., & Ana, C. (2012). *Torularhodin Biosynthesis and Extraction by Yeast Cells of Rhodotorula Rubra* (Vol. 63).
- Vega de Kuyper, J. C. (2007). *Química del Medio Ambiente*. México, D. F.: Alfaomega.
- Villalba-Villalba, A. G., Cruz-Campas, M. E., & Azuara-Gómez, G. V. (2018). *Aspergillus niger* Tiegh., isolated in Sonora, Mexico: metal tolerance evaluation. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XXIV(2), 131-146. doi:<http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.03.023>
- Vörösmarty, C. J., Green, P., Salisbury, J., & Lammers, R. B. (2000). Global Water Resources: Vulnerability from Climate Change and Population Growth. *Science*, 289(5477), 284.
- Wiley, J. M., Sherwood, L., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott - Microbiología, 7a edc: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.*
- Çolak, F., Atar, N., Yazıcıoğlu, D., & Olgun, A. (2011). Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance. *Chemical Engineering Journal*, 173(2), 422-428. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.084>
- Święciło, A., & Zych-Wężyk, I. (2013). Bacterial Stress Response as an Adaptation to Life in a Soil Environment. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(6), 1577-1587.



