



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Ciencia y Tecnología de Granos

**Efecto del cobre en el crecimiento, componentes subcelulares,
producción de polihidroxicanoatos y estrés oxidativo de *Bacillus
megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa* metalotolerantes**

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

Presenta:

Samara Cecilia Solorio Bojórquez

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2021

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**

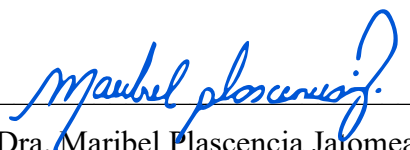


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

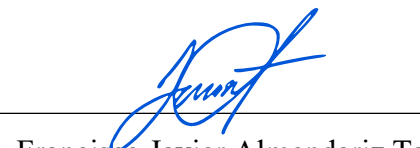
Efecto del cobre en el crecimiento, componentes subcelulares, producción de polihidroxicanoatos y estrés oxidativo de *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa* metalotolerantes.

Q.B.C. Samara Cecilia Solorio Bojórquez



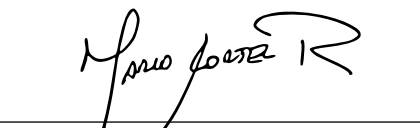
Dra. Maribel Plascencia Jatomea

Directora de tesis



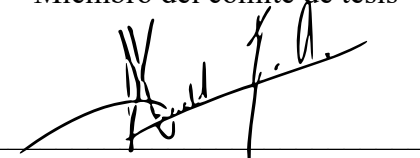
Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia

Miembro del comité de tesis



Dr. Mario Onofre Cortez Rocha

Miembro del comité de tesis



Dra. Isabel Estrada Alvarado

Miembro del comité de tesis

Hermosillo, Sonora a 15 de enero de 2021.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada “**Efecto del cobre en el crecimiento, componentes subcelulares, producción de polihidroxicanoatos y estrés oxidativo de *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa* metalotolerantes**”, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Maestra en Ciencia de los Alimentos, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

Samara Solorio Bojórquez
Samara Cecilia Solorio Bojórquez

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestría en Ciencias y Tecnología de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador de Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Q.B.C. Samara Cecilia Solorio Bojórquez

Dra. Carmen María López Saiz
Coordinadora del Programa de Posgrado

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo de tesis fue financiado a través del Proyecto: **“Tecnologías sustentables para la bioeliminación de metales pesados en aguas superficiales contaminadas de uso agrícola: uso de biocompositos y microorganismos metalotolerantes”** (CONACyT No. 2015-01-1594), aprobado en la Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales 2015. El proyecto se llevó a cabo bajo la responsabilidad técnica del Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia, adscrito al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la División de Ingeniería de la UNISON.

RESUMEN

En los últimos años, la ciencia se ha enfocado a la tecnología sustentable y ecológica y, en la actualidad, existe un gran interés en la remoción de metales como arsénico (As), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), fierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn). Lo anterior debido a la contaminación de suelos y ríos, así como de cultivos y animales que forman parte de la cadena alimentaria humana. Los sistemas de remoción basados en el uso de biomasa microbiana constituyen uno de los procesos biotecnológicos más prometedores para la biorremediación de agua y suelo, lo que se atribuye a su sustentabilidad y a que resultan ser amigables con el medio ambiente. La biorremediación involucra el uso de procesos fisicoquímicos como la sorción, utilizando materiales biológicos como biomasa de hongos, bacterias y levaduras, ya sea inactivada o viva. En estos procesos, el uso de biomasa viva ofrece la ventaja adicional de poder aprovechar el metabolismo microbiano para incrementar la captación de los iones metálicos; no obstante, la exposición continua a un contaminante en el ambiente puede incrementar la capacidad de adaptación, la resistencia e incluso la patogenicidad de los microorganismos. Por tal motivo, es importante evaluar el efecto de los contaminantes metálicos sobre el crecimiento microbiano a un nivel subcelular. En este trabajo se estudió y comparó el efecto del cobre sobre el crecimiento de los microorganismos metalotolerantes *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa*, aislados de sedimentos provenientes de la región del Río San Pedro, Cananea, Sonora. Se evaluó el efecto del pH y temperatura sobre la producción de biomasa y se estimaron los parámetros cinéticos de crecimiento. Posteriormente, para ambas especies microbianas se llevaron a cabo tinciones de las células utilizando diversos biomarcadores fluorescentes, a fin de observar el efecto del metal sobre la morfología, viabilidad, integridad de la membrana plasmática, biopolímeros de la pared celular y producción de polihidroxicanoatos, además del efecto sobre el estrés oxidativo general.

CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR	3
FUENTE DE FINANCIAMIENTO	4
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.	17
1.1. Contaminación por metales pesados	17
1.2. Cobre	18
1.2.1. Toxicidad. La toxicidad.	18
1.3. Métodos de remoción de metales	19
1.3.1. Métodos tradicionales o químicos.	19
1.3.2. Métodos biológicos.....	21
1.4. Procesos de sorción	22
1.4.1. Adsorción física	22
1.5. Uso de biomasa como biosorbente	23
1.5.1. Biomasa de plantas.	23
1.5.2. Biomasa de microorganismos.	24
1.6. Biorremediación	25
1.7. Biosorción con biomasa microbiana	25
3.7.1. Mecanismos de biosorción.....	26
1.8. Microorganismos tolerantes a metales	28
1.8.1. Mecanismo de tolerancia y detoxificación.....	29
1.8.2. Reparación celular	33
1.8.3. Producción de metabolitos.....	33
1.8.4. Producción de biosurfactantes.....	34
1.8.5. Proteínas.....	35
1.8.6. Polihidroxicanoatos.....	35
JUSTIFICACIÓN	16
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	42

2.1. Cultivo y propagación de los microorganismos	43
2.1.1. <i>Bacillus megaterium</i>	43
2.1.2. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	43
2.2. Preparación de los inóculos microbianos.....	44
2.2.1. <i>Bacillus megaterium</i>	44
2.2.2. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	44
2.3. Morfometría de los microorganismos	45
2.3.1. <i>Bacillus megaterium</i>	45
2.3.2. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	45
2.4. Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento microbiano utilizando fermentación en cultivos Batch.....	46
2.4.1. Medición del crecimiento microbiano	47
2.5. Estimación de los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano	47
2.5.1. Modelo logístico	48
2.6. Efecto del Cu²⁺ sobre los organelos subcelulares microbianos	50
2.6.1. Biopolímeros de la pared celular.....	50
2.6.2. Detección de estrés oxidativo general.....	51
2.6.3. Integridad de la membrana celular.....	51
2.6.4. Viabilidad celular.....	52
2.6.5. Azul Nilo	52
2.7. Análisis estadístico	53
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
3.1. Formulación y diseño de medios de cultivo para <i>Bacillus megaterium</i>	54
3.2. Morfometría.....	56
3.2.1. <i>Bacillus megaterium</i>	56
3.2.2. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	56
3.3. Efecto de pH y temperatura.....	60
3.3.1. <i>Bacillus megaterium</i>	60
3.3.2. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	64

3.4. Efecto sobre organelos subcelulares.....	68
3.4.1. <i>Bacillus megaterium</i>	69
3.4.2. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	81
CONCLUSIONES.....	95
ANEXO:.....	101
Formulación y diseño de medios de cultivo para <i>Bacillus megaterium</i>	101
BIBLIOGRAFÍA.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los mecanismos de biosorción en función de metabolismo celular y ubicación de la biosorción (Gaur y col., 2014).....	27
Figura 2. Esquema representativo del transporte de iones metálicos en la célula (Coto y col., 2010).....	30
Figura 3. Estructura química de PHA (Eckstein y col., 2001).	37
Figura 4. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente. Se aprecia la membrana que lo rodea en la que se encuentran enzimas polimerasas y despolimerasas (García y col., 2013).....	37
Figura 5. Esquema de síntesis de PHB (Eckstein y col., 2001).....	39
Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología general utilizada.	42
Figura 7. Curva de crecimiento microbiano (logaritmo del número de microorganismos vs. tiempo) tipo para una población bajo condiciones ambientales constantes (Larrosa y col., 2016).....	49
Figura 8. Turbidez de los cultivos de <i>Bacillus megaterium</i> en medio diseñado y medio estándar, ambos controles sin cobre, a 35°C, a las 24 h.	55
Figura 9. Células de <i>Bacillus megaterium</i> desarrolladas en medio estándar, con y sin cobre (10 ppm Cu ²⁺), a 35°C, a las 24 h.....	57
Figura 10. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> desarrolladas en medio Czapek con y sin cobre (10 ppm Cu ²⁺), a 28°C, a las 24 h.....	58
Figura 11. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de la temperatura y pH sobre el crecimiento (D.O. ₆₀₀) de <i>Bacillus megaterium</i> , a las 48 h, en medio de cultivo Diseñado, sin cobre (control).	61
Figura 12. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de la temperatura y el pH sobre el crecimiento (D.O. ₆₀₀) de <i>Bacillus megaterium</i> , a las 48 h, en medio de cultivo Diseñado y adicionado con cobre (10 ppm Cu ²⁺).....	61
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> (UFC/mL) en medio con cobre, a 35°C, a pH de 5.5, ajustada al modelo de Verhulst-Pearl.	63
Figura 14. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de la temperatura y pH sobre el crecimiento (D.O. ₆₀₀) de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> a las 24 h, en medio de cultivo Czapek sin cobre (control).	65
Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de la temperatura y el pH sobre el crecimiento (D.O. ₆₀₀) de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> a las 24 h, en medio de cultivo Diseñado y adicionado con cobre (10 ppm Cu ²⁺).....	65
Figura 16. Cinética de crecimiento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (UFC/mL) en medio control y con cobre (10 ppm Cu ²⁺), a 25°C, a pH de 5.5, ajustado al modelo de Verhulst-Pearl.	67
Figura 17. Células de <i>Bacillus megaterium</i> inoculado en medio líquido Diseñado control (sin Cu ²⁺) a 35°C, a las 72h, observadas a 40x, en campo claro.	70
Figura 18. Células de <i>Bacillus megaterium</i> inoculado en medio líquido Diseñado adicionado con Cu ²⁺ (10 ppm), a 35°C, a las 75 h, observadas a 40x, en campo claro.....	70

Figura 19. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido Diseñado control (sin Cu ²⁺), a 35°C, a las 72 h, teñidas con yoduro de propidio, observadas a 40x.	71
Figura 20. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido Diseñado y adicionado con Cu ²⁺ (10 ppm), a 35°C, a las 72 h, teñidas con yoduro de propidio, observadas a 40x.	71
Figura 21. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido diseñado control (sin Cu ²⁺), a 35°C, a las 72 h, teñidas con Blanco de calcoflúor, observadas a 40x.	73
Figura 22. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido diseñado y adicionado con Cu ²⁺ (10 ppm), a 35°C, a las 72 h, teñidas con Blanco de Calcofluor, observadas a 40x.	73
Figura 23. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido diseñado control (sin Cu ²⁺), a 35°C, a las 72 h, teñidas con 2,7-diclorofluorescein dicetato, observadas a 40x.	75
Figura 24. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido diseñado + 10 ppm Cu ²⁺ , a 35°C, a las 72 h, teñidas con 2,7-diclorofluorescein dicetato, observadas a 40x.	75
Figura 25. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido diseñado control (sin Cu ²⁺), a 35°C, a las 72 h, teñidas con el kit de viabilidad (live/dead cell kit), observadas a 40x.	78
Figura 26. Células de <i>Bacillus megaterim</i> en medio líquido diseñado + Cu ²⁺ (10 ppm), a 35°C, a las 72 h, teñidas con el kit de viabilidad (live/dead cell kit), observadas a 40x.	78
Figura 27. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido diseñado control, a 35°C, a las 72 h, teñidas con Azul Nilo, observadas a 40x.	80
Figura 28. Células de <i>Bacillus megaterium</i> en medio líquido diseñado + Cu ²⁺ (10 ppm), a 35°C, a las 72 h, teñidas con Azul Nilo, observadas a 40x.	80
Figura 29. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek (control), a 28°C, a las 24 h, observadas en campo claro a 40x y 100x.	82
Figura 30. Célula de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu ²⁺ , a 28°C, a las 24 h, observadas en campo claro a 40x y 100x.	83
Figura 31. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con yoduro de propidio, observadas a 40x.	84
Figura 32. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu ²⁺ , a 28°C, a las 24 h, teñidas con yoduro de propidio, observadas a 40x.	84
Figura 33. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> desarrolladas en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con Blanco de Calcoflúor, observadas a 40x.	86
Figura 34. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu ²⁺ , a 28°C, a las 24 h, teñidas con Blanco de Calcoflúor, observadas a 40x.	86
Figura 35. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con 2,7-diclorofluorescein diacetato (DCFH-DA), a 40X.	88
Figura 36. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu ²⁺ , a 28°C, a las 24 h, teñidas con 2,7-diclorofluorescein diacetato (DCFH-DA), a 40X.	88
Figura 37. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con kit de viabilidad (live /dead), a 40X.	91
Figura 38. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek + 10 ppm de Cu ²⁺ , a 28°C, a las 24 h, teñidas con kit de viabilidad, a 40X.	91
Figura 39. Células de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con Azul Nilo, a 100X.	94

Figura 40. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek + 10 ppm de Cu^{2+} , a 28°C, a las 24 h, teñidas con Azul Nilo, a 100X.....94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos limitantes para microorganismos productores de PHA.	39
Tabla 2. Unidades formadoras de colonias (UCF x 10 ⁸) de <i>Bacillus megaterium</i> , desarrolladas en los medios de cultivo líquido estándar y diseñado, con y sin cobre (10 ppm Cu ²⁺), a 35°C.	55
Tabla 3. Análisis morfométrico de <i>Bacillus megaterium</i> desarrollado en medio de cultivo Estándar, a 35°C, a las 24 h.	57
Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> en medio adicionado con Cu ²⁺ , a 35°C, a pH de 5.5, estimados mediante el modelo de Verhulst-Pearl.....	63
Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	67

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El río San Pedro es continuo en tramos y fluye hacia el norte, a través el eje central de la cuenca en Sonora (parte norte de México) y sudeste de Arizona. Los relaves se arrojan con frecuencia a lo largo de las corrientes cerca de las minas, donde las interacciones con el agua circulante, el aire y la lluvia, oxidan los sulfuros, particularmente la pirita; esta oxidación trae consigo la generación de drenajes ácidos de las minas (AMD). Como consecuencia, las corrientes transportan altos contenidos de contaminantes metálicos como Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe y otros metales cuya presencia en el medio ambiente representa un peligro a la salud. Hoy en día se sabe que la industria minera ha provocado la liberación de residuos ácidos en los efluentes, resultando en la contaminación del río debido a la acumulación y distribución de diversos metales pesados y sulfatos tanto en agua como en sedimentos (Gómez-Álvarez y col. 2009).

Los metales pesados son peligrosos para la salud de los seres humanos y la vida silvestre cuando están presentes en el medio ambiente a altas concentraciones. Las regiones mineras, incluyendo las áreas aledañas a las zonas dedicadas a esa actividad, son particularmente propensas a mostrar altos niveles de metales pesados tóxicos. Por lo general, estos contaminantes se derivan de la descarga de efluentes líquidos, tanto a tierra como en corrientes o cuerpos de agua, que son tratados de manera inapropiada o incluso sin tratamiento. Como consecuencia, las corrientes suelen transportar alto contenido de contaminantes metálicos como Fe, sulfatos (SO_4^{2+}) y potencialmente elementos traza tóxicos como As, Cd, Pb, Zn, Cu, mercurio (Hg), antimonio (Sb) y selenio (Se) (Gómez-Álvarez y col. 2009).

Al respecto, Gómez-Álvarez y col. (2004) monitorearon y reportaron la presencia de metales en el Río Sonora, en la región de San Pedro, en diferentes etapas e intervalos de tiempo durante 11 años, de 1994 a 2005. Anteriormente, ya se había registrado la presencia de altas concentraciones de metales como Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en el agua superficial del río. Entre estos contaminantes, el cobre se encontró en un rango de pH 3, acumulado a una concentración de 82 mg/L en agua superficial, en el año 1994. Los minerales más importantes que se han detectado en la región de Cananea, Sonora, corresponden a un pórfido cuprífero y

rocas volcánicas, siendo los minerales más abundantes y de interés los sulfuros ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), entre otros (Caviedes-Rubio y col. 2015). De esta manera, tras la oxidación de los sulfuros, los principales contaminantes en el río San Pedro son los sulfatos de cobre, sulfatos de hierro (ferroso y férrico) y el ácido sulfúrico, lo que ha ocasionado la presencia de altos niveles de sulfatos y cobre.

Los metales se presentan en ecosistemas acuáticos en concentraciones muy bajas y algunos son nutrientes para plantas y animales. Sin embargo, su presencia en altas concentraciones es tóxica para los seres vivos (Caviedes-Rubio y col. 2015). Estos metales entran en contacto con seres humanos y animales a través de la cadena alimentaria, ocasionando diversos trastornos metabólicos (Kumar y Mehta, 2014). Por su parte, en los ecosistemas, los metales pueden ser absorbidos por las plantas y pueden unirse de manera semipermanente con los componentes del suelo como arcilla o materia orgánica (Gómez-Álvarez y col. 2009).

A nivel químico, la causa primaria del elevado nivel de toxicidad es que los metales poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. Como resultado, estos efectos adversos en los sistemas biológicos dependen de reacciones con ligandos, los cuales son esenciales para su asimilación; a su vez, están presentes en gran cantidad en la célula, ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones, o bien como moléculas aisladas. En este sentido, la gran afinidad que muestran estos metales (como principales ligandos) por los grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo, trae como resultado la formación de uniones ligando-metal. Navarro-Aviñó y col. (2007), mencionan que esto es perjudicial para la célula debido a la ocurrencia de fenómenos no deseables en donde destacan los siguientes puntos:

- (1) La acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de estas.
- (2) El desplazamiento de elementos esenciales del metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia.
- (3) La catálisis de reacciones de generación de moléculas ROS (especies reactivas de oxígeno) o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo.

En todo caso, la toxicidad de los metales depende de su movilidad en el medio, lo que a su vez depende de la conformación química, persistencia y tendencia a la acumulación o bioacumulación (Caviedes-Rubio y col., 2015).

Por otra parte, debido a la capacidad que tienen algunos microorganismos para desarrollarse en las aguas contaminadas con metales, se han realizado diversos estudios para el aislamiento e identificación de microbiota nativa en aguas negras y así conocer la presencia de bacterias, hongos y levaduras en este medio. Estudios previos han permitido aislar diversas cepas microbianas a partir de sitios contaminados, con excelente capacidad para bioeliminar cantidades significativas de metales principalmente en soluciones acuosas (De Sotto y col., 2015). Por tal motivo, la resistencia o tolerancia de los microorganismos a los metales es un aspecto que puede aprovecharse para aplicaciones en biorremediación.

La biorremediación es un proceso que permite devolver a su estado original un ecosistema alterado (Sindhu y col., 2014) mediante un mecanismo de biosorción, que consiste en el uso de materiales biológicos para remover los metales pesados en efluentes contaminados, a través de diferentes mecanismos fisicoquímicos (Gaur y col., 2014). Aunque la captación de metales normalmente se ha evaluado en sistemas que involucran el uso de biomasa muerta o inactivada, este proceso también se puede llevar a cabo utilizando lotes provenientes de biomasa viva, cuya eficacia dependerá de la fuente de carbohidratos y sus grupos funcionales para la captación de los metales (Tejada-Tovar y col., 2015).

Generalmente, en los suelos se tiende a encontrar altas concentraciones de metales pesados. Esto se debe a la capacidad de intercambio catiónico, en donde las moléculas son atraídas a las partículas del suelo en respuesta a interacciones iónicas, acumulándose en el medio. Al respecto, existen factores intrínsecos (pH, concentración y tipo de nutrientes, factores de crecimiento, inhibidores, potencial redox, oxígeno, A_w , humedad, etc.) y extrínsecos (temperatura, humedad relativa, CO_2/O_2 , microorganismos contaminantes) que, en conjunto, pueden afectar la estructura química, la biodisponibilidad y la toxicidad de los metales acumulados, ocasionando estrés en los microorganismos presentes (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática ambiental que se ha generado por la contaminación de suelos y aguas con metales pesados, se han buscado alternativas de remoción amigables con el medio ambiente. Además, que sean fáciles de implementar en zonas de difícil acceso o donde no se cuente con infraestructura disponible, en comparación con las técnicas tradicionales que con frecuencia resultan costosas y de difícil aplicación. Entre las alternativas de tratamiento, la biorremediación ha recibido especial atención en los últimos años por ser una tecnología ecoamigable, en donde se pueden emplear materiales biosorbentes de origen natural tales como alginato, quitosano, zeolita, composta, residuos vegetales, algas marinas y biomasa de microorganismos. Entre estos materiales, la biomasa microbiana ha recibido especial atención debido a que se pueden utilizar las células muertas o vivas, esta última de gran interés ya que su uso permite aprovechar el metabolismo de los microorganismos.

Con respecto al uso de biomasa microbiana, en estudios previos se han identificado microorganismos metalotolerantes, tales como *Aspergillus australiensis* (Contreras-Cortés y col., 2019; 2020), *Bacillus megaterium* (Rodríguez-Córdova, 2018) y *Rhodotorula mucilaginosa* (Muñoz-Espinoza, 2020), los cuales son capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de cobre y se han utilizado para remover contaminantes metálicos en cultivos Batch. Lo anterior indica la factibilidad de aprovechar la metalotolerancia de estos microorganismos, que se ha asociado a la producción de gránulos de reserva de carbono como los polihidroxialcanoatos (PHAs), al metabolismo energético y a la composición química de la pared celular microbiana debido a los grupos funcionales disponibles para la captación de metales. Tomando en cuenta que la exposición continua a un contaminante en el ambiente puede incrementar la capacidad de adaptación, la resistencia e incluso la patogenicidad de los microorganismos, es de suma importancia conocer el posible efecto adverso de los contaminantes metálicos sobre el crecimiento microbiano, a un nivel subcelular; esto tendría un impacto significativo en el desarrollo y uso de sistemas de biorremediación de metales utilizando biomasa viva.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.

2.1. Contaminación por metales pesados

Se definen como “*metales pesados*” a aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 (cinco veces la densidad del agua), cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0.1% y casi siempre es menor del 0.01% (Navarro-Aviñó y col., 2007). En cierto grado, los metales son solubles en agua, aunque son más solubles a pH ácido (Cuizano y col., 2010).

El término “*metales pesados*” es impreciso ya que en general, se refiere a aquellos metales que, siendo elementos pesados, son “tóxicos” para la célula. Sin embargo, algunos elementos son beneficiosos para ella, ya que son esenciales para el crecimiento, como por ejemplo sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), vanadio (V), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y molibdeno (Mo). Estos elementos se utilizan en pigmentos respiratorios (Fe, Cu, V), enzimas (Zn), vitaminas (Co) y otros procesos metabólicos (Cuizano y col. 2010). Independientemente de su función, todos ellos pueden llegar a ser tóxicos en concentraciones excesivas. Una vez liberados al ambiente se absorben fácilmente a través de las membranas biológicas debido a su elevada afinidad química a las proteínas, sin embargo, no son fáciles de degradar y su eliminación es difícil (De Sotto y col. 2015).

La contaminación es un cambio perjudicial en las características físicas, químicas o biológicas del aire, tierra o agua, que pueden afectar nocivamente al medio ambiente. Se define como la presencia de concentraciones elevadas por encima de valores establecidos como límite permitido, de ciertas sustancias, sedimentos u organismos en el agua o en la atmósfera. Entre los contaminantes reconocidos, los metales pesados han sido identificados como los más peligrosos (Cuizano y col. 2010).

Hoy en día, los metales constituyen uno de los desechos contaminantes más tóxicos que se arrojan o descartan como desechos industriales. Aunque algunos elementos son imprescindibles para el desarrollo de los organismos, en cantidades excesivas pueden llegar a ser letales (Rojas y col., 2010).

2.2. Cobre

El cobre es un micronutriente indispensable y tiene un papel clave al actuar como cofactor catalítico en las reacciones redox celulares y la homeostasis del metal. Actualmente, este metal se emplea ampliamente en actividades industriales y en la agricultura, lo que resulta en una grave contaminación del medio ambiente. El Cu es altamente reactivo en forma libre y su exceso es fuertemente biotóxico para las células debido al estrés oxidativo, lo que puede causar el daño de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En consecuencia, comprender la respuesta del metabolismo de los microorganismos inducidos por metales pesados, incluido el Cu, es hoy en día el objetivo dominante de la investigación científica sobre la detección y eliminación de metales (Kan y col., 2017).

2.2.1. Toxicidad.

La toxicidad de los metales depende de su concentración, la forma química y la persistencia, la cual se define como el tiempo que tarda un contaminante en transformarse en una forma no tóxica. Algunos de los metales más comunes en efluentes son Pb, Cu, As, Hg y Cd. Un elemento indispensable para un ser vivo en concentraciones traza puede llegar a ser tóxico en concentraciones elevadas (Navarro-Aviñó y col., 2007). La mayoría de los metales se combinan con otras formas químicas antes de entrar en los organismos o incluso cuando se encuentran en el interior de estos. Por tanto, antes de determinar la toxicidad de un elemento es necesario determinar la forma química en la que se encuentra.

La toxicidad de los metales pesados es muy alta (Rojas y col., 2010). A nivel químico, la causa primaria del elevado nivel de toxicidad es que estos poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas (Rojas y col., 2010), radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo (Tejada-Tovar y col., 2015).

Los efectos tóxicos en los sistemas biológicos dependen de las reacciones con ligandos que son esenciales para su asimilación. A su vez, estos ligandos están presentes en gran abundancia en la célula, ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones o bien como moléculas aisladas (Tejada-Tovar y col., 2015), ocasionando daños irreversibles en los diferentes organismos (Rojas y col., 2010). El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula, destacando en este aspecto sobre otros fenómenos como: (1) la acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de las mismas; (2) el desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia; (3) la catálisis de reacciones de generación de moléculas ROS (especies reactivas de oxígeno) o de radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo (Tejada-Tovar y col., 2015).

2.3. Métodos de remoción de metales

2.3.1. Métodos tradicionales o químicos.

Los métodos tradicionales para remover o eliminar metales pesados consisten en el intercambio iónico, la precipitación química y la ósmosis inversa (Contreras-Cortés y col., 2019; 2020).

Intercambio iónico: en este método, los polisacáridos de las paredes celulares microbianas actúan como contra iones y facilitan el intercambio de iones metálicos bivalentes (Gaur y col., 2014).

Complejación: la interacción de los metales con los grupos activos media su eliminación de la solución, mediante la formación de complejos en la superficie celular. Los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos también juegan un papel importante en la quelación de los metales tóxicos debido a su solubilización y lixiviación, lo que resulta en la generación de moléculas metalorgánicas (Gaur y col., 2014).

Precipitación: la precipitación independiente del metabolismo es el resultado de la interacción entre el metal y la superficie celular microbiana, lo cual es un fenómeno químico. La biosorción es dependiente de la localización en la superficie y se puede categorizar sobre la base de la ubicación donde se acumulan los metales eliminados de la solución como lo indican (Sindhu y col., 2014):

- Acumulación / precipitación extracelular
- Sorción / precipitación superficial celular
- Acumulación intracelular

Ósmosis inversa: Es un proceso de permeación a través de membranas para llevar a cabo la separación, lo cual se logra por difusión controlada o cribado. Este proceso tiene la capacidad de seleccionar elementos de tan solo 0.0001 mm, lo que le otorga un amplio abanico de capacidades de tratamiento (Caviedes-Rubio y col., 2015). Este tratamiento puede ser costoso debido a que requiere infraestructura sofisticada; asimismo, puede generar lodos tóxicos e incluso es posible que no se puedan eliminar completamente los metales, especialmente cuando se trata de eliminarlos en pequeñas cantidades (Contreras-Cortés y col., 2019; 2020).

En general, los métodos tradicionales para la remoción de metales pesados presentan limitaciones a largo plazo, las cuales se asocian principalmente a los altos costos en cuanto a la infraestructura requerida, la gran cantidad de sustancias químicas que se requieren para llevar a cabo el proceso y el mantenimiento continuo del mismo, además de la generación de residuos secundarios y lixiviados, que con frecuencia requieren de un tratamiento posterior o bien de una adecuada disposición de los residuos (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016). Por tal

motivo, los sistemas biológicos de tratamiento constituyen hoy en día una alternativa prometedora para propósitos de biorremediación de los contaminantes metálicos.

2.3.2. Métodos biológicos.

Los métodos físicos y químicos comúnmente afectan las propiedades del suelo y alteran la microflora, ocasionando problemas de contaminación secundaria. Por lo tanto, se requieren nuevos estudios en esta área, donde se involucren técnicas de reparación favorables al medio ambiente que incluyan tecnologías limpias, eficientes y económicas (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016).

El uso de plantas vasculares para acumular metales pesados se ha expandido rápidamente por diferentes países. Así, la utilización de diversas especies vegetales para transformar y remover contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo y el agua, conocida como fitorremediación, ha ganado una alta aceptación desde la última década. Lo anterior debido a que es una tecnología limpia, que utiliza los organismos naturales presentes en los ecosistemas y ayuda a preservar el estado natural del medio ambiente. (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016).

Fitorremediación: El proceso de fitorremediación depende del grado de contaminación, la disponibilidad del contaminante y la interacción de la planta con su hábitat (suelo y microorganismos). Constituye una tecnología que puede aplicarse *in situ* para tratar una gran variedad de contaminantes, gracias a la capacidad de absorción de las raíces de las plantas. En el caso de metales pesados, después de que estos son absorbidos por las plantas, pueden ser extraídos de la biomasa una vez cosechada y ser reciclados (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016).

Al respecto, diferentes investigaciones han reportado el potencial de la fitorremediación para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o bien estabilizar diferentes tipos de contaminantes presentes en suelo, aire, agua o sedimentos. Entre los contaminantes estudiados se encuentran elementos metálicos, metales radioactivos, compuestos orgánicos y

compuestos derivados del petróleo (Delgadillo-López y col., 2011, Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016).

Para la implementación de estas fito-tecnologías se requiere analizar criterios tales como la tolerancia y la bioacumulación del metal por parte de la planta, así como variables que incluyen la concentración del metal contaminante, el pH del medio, el contenido de nutrientes y la materia orgánica disponible en el suelo (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016).

2.4. Procesos de sorción

Para llevar a cabo la sorción de diversos contaminantes, los biosorbentes reportados en la literatura se caracterizan por ser materiales biológicos baratos, ecológicos y abundantes en la biósfera. Entre los materiales biosorbentes empleados para la remoción y/o eliminación de metales en soluciones acuosas se encuentra la biomasa de plantas como el musgo, la biomasa de microorganismos, liquenomas no viva, semillas y cáscaras de *Eucalyptus sheathiana*, minerales, entre otras (Abbar y col., 2017).

2.4.1. Adsorción física.

Consiste en un fenómeno que involucra interacciones de Van der Waals y fuerzas electrostáticas. La biomasa muerta de hongos, levaduras y algas han demostrado tener capacidad de adsorción de metales como Cu, uranio (U), Co, Zn y Cd, a través de interacciones electrostáticas (Gaur y col., 2014). Sin embargo, para llevar a cabo la adsorción de metales se ha propuesto además el uso de materiales naturales agrícolas e industriales, la fitorremediación, el uso de biopolímeros, hidrogeles e incluso ceniza (Karnib y col., 2014). No obstante, estos métodos aún están bajo estudio.

2.5. Uso de biomasa como biosorbente

Una de las principales ventajas de utilizar la biomasa como biosorbente es el fácil tratamiento de estos desechos después de su uso, utilizando incineración (Abbar y col., 2017). La biomasa se puede producir de manera fácil y rápida, con un alto rendimiento mediante el proceso de fermentación, a un costo relativamente bajo (Contreras-Cortés y col., 2019). Según los autores (Contreras-Cortés y col., 2019) la remoción de metales pesados puede variar al utilizar la biomasa viva o muerta (inactivada), dependiendo de la especie del organismo y del tipo de metal a remover.

2.5.1. Biomasa de plantas.

La biomasa, una fuente de energía renovable, es todo tipo de materia orgánica que tiene su origen en un proceso biológico (Kumar y Mehta, 2014).

En las plantas, durante la fotosíntesis (proceso de óxido-reducción) se absorbe la energía solar en la clorofila y se transforma el dióxido de carbono (CO_2). Este pasa a formar parte del aire y agua del suelo en forma de carbohidratos, que almacenan energía química mediante el proceso de conversión fotoelectroquímica de la fotosíntesis (Bustamante-García y col., 2013). Los carbohidratos se componen principalmente de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, los cuales están presentes en una proporción variable, en función de la naturaleza de la biomasa (García-Bustamante y col., 2016).

La unidad estructural de todo organismo vegetal es la célula, la cual está compuesta de una pared celular que es una capa resistente, generalmente flexible, aunque en ocasiones es rígida y proporciona soporte estructural a las plantas. Además, le da protección contra a las tensiones mecánicas y térmicas. Los principales constituyentes de la biomasa vegetal son hemicelulosa, celulosa, lignina y componentes extraíbles (García-Bustamante y col., 2016).

Existen diferentes tipos de biomasa de vegetal, como la agrícola y la leñosa. La biomasa agrícola es diferente ya que los cultivos tienen un alto contenido de hemicelulosa, que se descompone fácilmente cuando se calienta. Rowell (2012) reportó que la hemicelulosa se origina de grupos acetilo y metilo, los cuales son responsables de la liberación de gases volátiles ligeros (CO y CO₂) durante un tratamiento térmico a temperaturas de 200 a 300°C. Por su parte, la celulosa es el principal componente de la biomasa celulósica (almidones) y lignocelulósica (bagazo, hojas, frutos, etc.), constituyendo entre 40 y 60 % del contenido de la pared celular de la madera de latifoliadas y coníferas (García-Bustamante y col., 2016).

2.5.2. Biomasa de microorganismos.

La biomasa de microorganismos tolerantes a metales puede contener compuestos que potencialmente aumentan la absorción o la biosorción de contaminantes metálicos. No obstante, los beneficios potenciales de estos materiales y los aspectos toxicológicos relacionados con su aplicación en modelos vegetales o animales han sido poco explorados (Contreras-Cortés y col., 2019). Diferentes especies de bacterias, hongos y levaduras encontradas en el medio ambiente contaminado han sido reportadas con potenciales capacidades para la biorremediación (Muñoz-Silva y col., 2015).

Los microorganismos poseen la capacidad natural de degradar la materia orgánica y los desechos, y tienen la capacidad de crecer bajo condiciones de estrés tales como baja o alta temperatura y pH, baja disponibilidad de nutrientes, sequía, contaminantes químicos, entre otros. Microorganismos como las algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos se han utilizado ampliamente para la eliminación de metales pesados. La biomasa fúngica es abundante en el medio ambiente, se puede encontrar en sitios contaminados y además se puede producir fácil y rápidamente con un alto rendimiento mediante procesos de fermentación a un costo relativamente bajo. Asimismo, puede ser fácilmente manejable una vez obtenida (Contreras-Cortés y col., 2019).

2.6. Biorremediación

Según la Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency, EPA), la biorremediación se define como un proceso en donde se emplean microorganismos o enzimas producidas por estos, para transformar o degradar contaminantes tóxicos presentes en los ecosistemas (Tejada-Tovar y col., 2015). Esta estrategia biológica depende de las propiedades catabólicas de los microorganismos, los cuales pueden ser capaces de asimilar los contaminantes para su desarrollo. Los contaminantes que se liberan en las superficies pueden ser transportados de manera vertical y lateral a los suelos en las aguas. Asimismo, pueden ser inhalados o ingeridos a través del agua para consumo humano y ser absorbidos por las plantas y tejidos animales (Rojas y col., 2010).

2.7. Biosorción con biomasa microbiana

La biosorción es un proceso que utiliza materiales biológicos para la eliminación de contaminantes a través de diferentes mecanismos como la adsorción, absorción, complejación superficial, precipitación e intercambio iónico. Se fundamenta en la propiedad que tienen los materiales biológicos de acumular metales pesados presentes en aguas residuales hacia la superficie del material. Este depende de numerosos factores como la sustancia que se sorbe, los factores ambientales, el uso de biosorbente y la presencia o ausencia de procesos metabólicos (en los organismos vivos) (Gaur y col., 2014).

El proceso de biosorción se ha estudiado para sistemas monometálicos y multimetálicos. El estudio en un sistema monometálico es importante porque proporciona información sobre la adsorción individual de diferentes especies metálicas utilizando distintos tipos de biosorbentes. Asimismo, también es necesaria la elaboración de modelos matemáticos que cuantifiquen los sistemas en donde se cuenta con más de un metal. En este sistema, la determinación de las constantes es más compleja, puesto que se debe tener en cuenta la posible competencia entre los

metales existentes en la solución por los sitios activos de la superficie de la biomasa (Mori y col., 2013).

Los contaminantes que pueden eliminarse por biosorción pueden ser orgánicos e inorgánicos, o solubles e insolubles. Los metales que son altamente móviles, como el K^+ y Mg^+ , no se acumulan con la biomasa durante la fitorremediación, por lo tanto, se pueden eliminar fácilmente durante la biosorción (Gaur y col., 2014).

En general, la extracción de metales mediante el uso de biomasa residual se atribuye a sus proteínas, carbohidratos y componentes fenólicos que contienen grupos carboxilo, hidroxilo, sulfatos, fosfatos y amino. Estos grupos presentan gran afinidad por los iones metálicos, facilitando su captación (Tejada-Tovar y col., 2015). Por lo tanto, es esencial estudiar el efecto que tiene la presencia de una especie metálica, ya que podría interferir potencialmente en la adsorción de un metal de interés. De esta manera, se podría determinar qué tipo de biomasa es mejor para solventar cada uno de los problemas de contaminación que se puedan presentar en un determinado efluente (Gomathy y Sabarinathan, 2010).

2.7.1. Mecanismos de biosorción.

Existen varios criterios sobre la base de los cuales se pueden dividir los mecanismos de biosorción en los que incluye el metabolismo de la célula y el sitio en donde se localiza la biosorción (Figura 1).

La biosorción mediada por el metabolismo celular puede dividirse en procesos dependientes del metabolismo y no dependientes del metabolismo.

Dependiente del metabolismo: se produce sólo en las células viables y juega un papel vital en el mecanismo de defensa de los microorganismos que muestran una reacción con los metales tóxicos. La biosorción dependiente del metabolismo puede clasificarse como (Gaur y col., 2014):

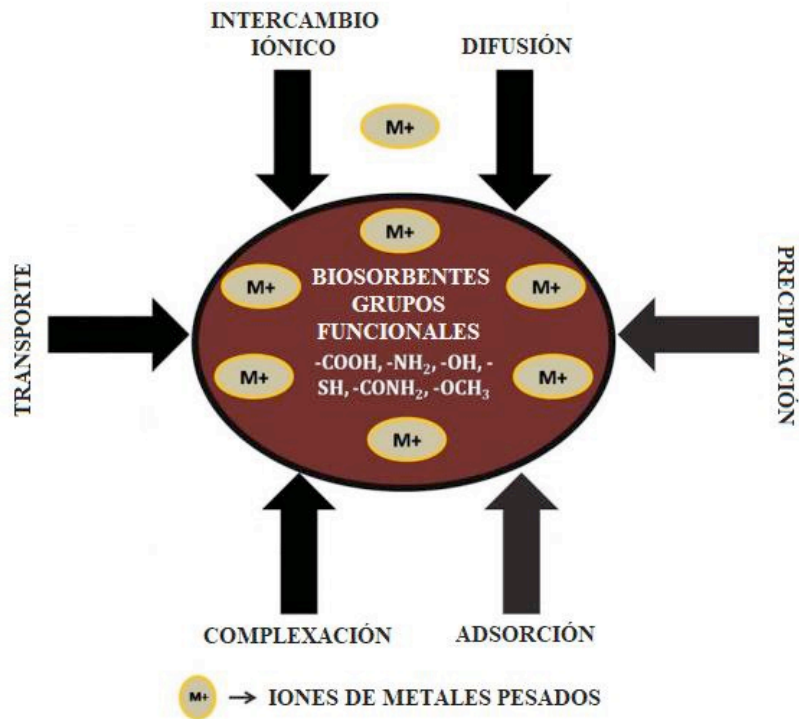


Figura 1. Clasificación de los mecanismos de biosorción en función de metabolismo celular y ubicación de la biosorción (Gaur y col., 2014).

- Transporte a través de la membrana celular: los microorganismos comparten el mismo mecanismo para el transporte de metales pesados a través de la membrana, así como el transporte de iones metabólicos como el sodio y el magnesio.
- Precipitación: la precipitación dependiente del metabolismo suele estar relacionada con el mecanismo de defensa del microorganismo, donde su reacción en presencia de metales tóxicos produce compuestos que favorecen la precipitación del elemento metálico.

No dependiente del metabolismo: implica la interacción entre el metal y los grupos funcionales presentes en la superficie microbiana. Muchos grupos funcionales (carboxilo, fosfato, sulfato, etc.) están presentes en la superficie microbiana debido a que la pared celular está formada por polisacáridos, proteínas y lípidos (Gaur y col., 2014).

2.8. Microorganismos tolerantes a metales.

Se ha reportado que cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus cereus* aisladas de ambientes contaminados han mostrado tolerancia a metales pesados, así como capacidad para la biorremediación. Ahemad (2014) reportó que varias especies del género *Bacillus* promotoras del crecimiento vegetal se han aplicado en procesos de desintoxicación de ambientes contaminados con metales pesados.

Gupta y Diwan (2017) encontraron que algunos microorganismos -entre ellos especies de *Bacillus*- tienen potencialidades para contribuir con la desintoxicación de ambientes contaminados, mediante la producción exopolisacáridos, mismos que tienen la capacidad de quelar metales pesados. Del mismo modo, varias especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Rhodotorula* se han aislado a partir de ambientes contaminados y han demostrado tener capacidad para biorremover elementos metálicos (Muñoz-Silva y col. 2019).

2.8.1. Mecanismo de tolerancia y detoxificación.

Desde hace años se han aislado microorganismos de ambientes contaminados con As, los cuales son capaces de asimilar el metal a través de sus rutas metabólicas, logrando un efecto detoxificador (Rodríguez-Martínez y col., 2017).

La biosorción que utiliza biomasa microbiana muerta es sólo un proceso de adsorción pasiva limitada por el área superficial, aunque tiene la ventaja de que no se necesita mantenimiento ni nutrición después de su obtención. Por otra parte, la aplicación de células vivas puede ser ventajosa ya que existe un metabolismo interno dependiente de los mecanismos de resistencia de los metales (Figura 2), como la desintoxicación y la bioacumulación del metal junto con un crecimiento celular sostenido que podría aumentar aún más la sorción del metal (Contreras-Cortés y col., 2019).

En el cultivo de microorganismos mediante fermentación es importante mantener las células en óptimas condiciones, para que estas mantengan activas las rutas metabólicas correspondientes a la producción de ATP mitocondrial, el metabolismo de calcio, la síntesis de proteínas, la regulación del ADN, la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs. Las dos últimas proporcionan los precursores para la biosíntesis de aminoácidos y los equivalentes reducidos, cuya oxidación genera la mayoría del ATP. Los daños a la membrana plasmática, a la producción de ATP mitocondrial y al control de los niveles de calcio intracelular, son rutas comunes para la destrucción final de la célula y merecen especial atención (Navarro-Aviño y col., 2007).

La membrana plasmática es un sistema complejo y tiene un funcionamiento altamente sofisticado, siendo la puerta de entrada de cualquier elemento (señal, nutriente, agente tóxico, etc.) al lugar donde se realizan las reacciones químicas que mantienen la vida de la célula. La membrana plasmática permite regular y mantener los gradientes iónicos, que a su vez regulan el volumen de la célula.

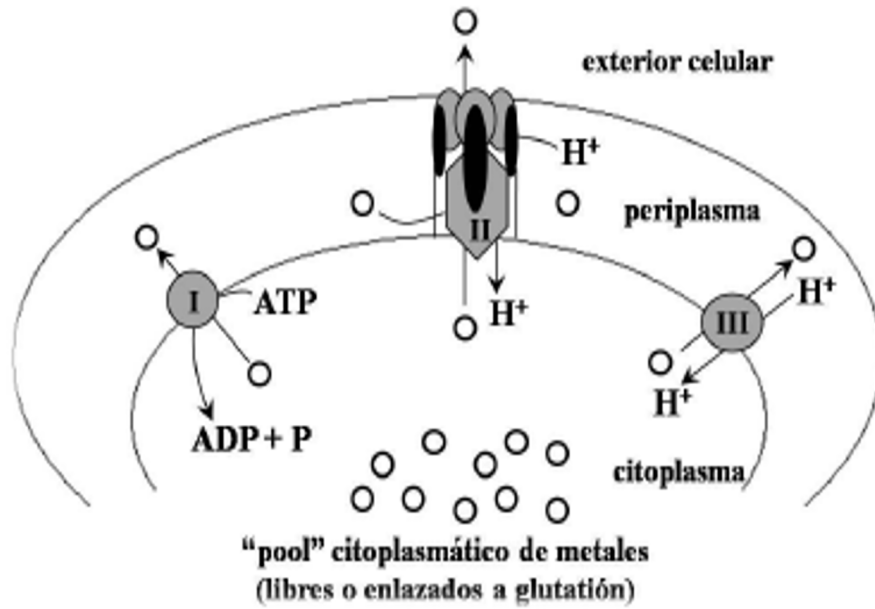


Figura 2. Esquema representativo del transporte de iones metálicos en la célula (Marrero-Coto y col., 2010).

Cuando la integridad de la membrana celular se encuentra dañada pueden entrar iones Ca^{2+} y salir iones K^+ . Estos iones son los responsables de los fenómenos de polarización y despolarización de la membrana y, en definitiva, de la transmisión eléctrica. La salida de K^+ favorece la entrada de agua y el aumento de agua en el interior de la célula incrementa el volumen de esta. Existen varios mecanismos que pueden inducir estos cambios, como por ejemplo la fluidización de la membrana, la peroxidación de lípidos, el daño al citoesqueleto, el bloqueo de canales, entre otros. Independiente de la agresión ocasionada por el compuesto tóxico, la membrana plasmática es uno de los componentes que primero responde al daño, siendo la pérdida de su integridad el resultado final de dicho daño. Por lo tanto, es conveniente tener en cuenta que el daño o las alteraciones en el citoesqueleto celular a su vez ocasionan daños en la membrana plasmática. Este último organelo, por lo tanto, se ve rápidamente afectado por la presencia de metales pesados. Sobre la membrana se producen efectos específicos de acuerdo con el elemento metálico, promoviéndose daños mediante varios mecanismos entre los que se encuentran (Navarro-Aviño y col., 2007):

- Oxidación y entrecruzamiento de proteínas (conteniendo grupos tiol).
- Inhibición de proteínas de membrana que son esenciales, como por ejemplo la enzima H^+ -ATPasa.
- Cambios en composición y fluidez de los lípidos de membrana, además de cambios en la permeabilidad.

En este contexto, se sabe que el Cu y el Cd son capaces de alterar la composición de los lípidos de membrana y provocan la fuga de solutos de la célula. En cualquier caso, los mecanismos involucrados esencialmente terminan alterando las propiedades eléctricas de la membrana plasmática de la célula. Sin embargo, la membrana puede estar involucrada en la tolerancia a metales pesados, reduciendo la captación o estimulando las bombas de flujo de metales que promueven la entrada al citosol (Navarro-Aviño y col., 2007).

Las células de diversos organismos contienen dos tipos de sistemas de captura de cationes metálicos. Uno es rápido e inespecífico, expresado constitutivamente y utilizado por una

variedad de sustratos y es dependiente del gradiente quimiosmótico existente a través de la membrana citoplasmática bacteriana. El segundo tipo posee una gran especificidad por el sustrato, es más lento y generalmente utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía, en adición al gradiente quimiosmótico (Marrero-Coto y col., 2010).

La acumulación gradual de cationes metálicos tanto en sitios antropogénicos como en los ecosistemas naturales, en adición a su toxicidad potencial y a la situación de “puerta abierta”, ha conducido al desarrollo de la homeostasis de los metales durante la evolución de la vida. Este fenómeno se atribuye a un proceso de adaptación espontánea al medio, debido al desarrollo o adquisición de sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de las elevadas concentraciones de iones metálicos para la célula (Marrero-Coto y col., 2010).

Dentro de la amplia diversidad microbiana existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia del metal. Por su parte, los microorganismos tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del elemento. Tanto los resistentes como los tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, ya que ambos pueden presentar la capacidad de extraer estos contaminantes (Marrero-Coto y col., 2010).

Cuando una célula se enfrenta a grandes concentraciones de algún metal que es acumulado por el sistema inespecífico, el catión del metal es transportado al citoplasma a pesar de su elevada concentración. Esto se debe a que los transportadores inespecíficos se expresan constitutivamente (Marrero-Coto y col., 2010).

La acumulación y compartimentalización de los iones metálicos en la célula bacteriana puede ocurrir en la membrana, en el espacio periplasmático y en el interior celular. Para ello intervienen polímeros estructurales y extracelulares que interactúan con los metales, atrapándolos dentro de su estructura (bioabsorción) o con proteínas que se unen y evitan las interacciones del metal con otras proteínas esenciales para el microorganismo (Marrero-Coto y col., 2010)

Entre las proteínas periplasmáticas que pueden capturar o quelar metales se encuentran la proteína SilE de unión a plata y las de unión a cobre, como el sistema CopABCD y la proteína CopH. La chaperona CopZ y la metalotioneína SmtA funcionan como captoras de diversos metales en el citoplasma celular (Marrero-Coto y col., 2010).

2.8.2. Reparación celular.

Se denomina mecanismo de reparación celular al conjunto de procesos que se activan como respuesta a los fenómenos de deterioro celular, como el estrés oxidativo. Estos mecanismos se activan para restablecer las características iniciales de la célula y los más conocidos son los que participan en la síntesis de componentes de pared, así como aquellos que participan en la activación de procesos de reparación de errores rutinarios en la copia de ADN. Después del daño causado por la presencia de metales pesados, en la reparación de la membrana plasmática están involucradas las metalotioneínas y, sobre todo, las proteínas de choque térmico. Estas últimas incrementan su expresión en una gran variedad de organismos, como respuesta al estrés (Navarro-Aviño y col., 2007). Es decir, ante condiciones adversas las bacterias son capaces de responder con diversos mecanismos de control activos, los cuales les permiten hacer frente a dichas condiciones. Uno de estos mecanismos es la respuesta general al estrés (De Almeida y col., 2004).

Los polihidroxicanoatos (PHA) juegan un papel importante en la supervivencia de los microorganismos ante condiciones de estrés. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos mediante los cuales la utilización de PHA favorece la supervivencia bacteriana bajo condiciones desfavorables (De Almeida y col., 2004).

2.8.3. Producción de metabolitos.

Se ha destacado la importancia de las levaduras y hongos filamentosos debido a que tienen una mayor capacidad de degradación en comparación a las bacterias. A menudo, el crecimiento de estos hongos se ve favorecido en condiciones de estrés como pH bajo, salinidad y menor

actividad de agua. Los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Bacillus* y *Pseudomonas* son algunos de los microorganismos que pueden crecer en ambientes hostiles (Delgadillo-Ordoño y col., 2017).

Estos microorganismos poseen abundantes grupos funcionales que han sido reportados como responsables de la biosorción de metales pesados en la pared de hongos, levaduras y bacterias, como carboxilo, amina (Contreras-Cortés y col., 2019; 2020).

2.8.4. Producción de biosurfactantes.

Los biosurfactantes son moléculas complejas producidas por los microorganismos, que comprenden una gran variedad de estructuras químicas como son los glicolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos, complejos de proteína-polisacárido, péptidos, fosfolípidos y lípidos naturales. Algunas bacterias productoras de biosurfactantes son importantes para el crecimiento de otros microorganismos, así como para su supervivencia en el ambiente. Por ejemplo, la producción de surfactina es necesaria para la formación del cuerpo fructífero de *Bacillus subtilis* (Vargas-Nieto y col., 2010). Asimismo, también la producción de subtilisina, lipoproteínas y lipopéptidos como lichenisina son importantes para el desarrollo de *Bacillus licheniformis*; la polimixina para *Bacillus polymyxa* y la gramicidina S para *Bacillus brevis* (Burgos-Díaz, 2012).

Dentro de las estructuras de tipo lipopéptido, con significativa capacidad biotensoactiva, se encuentran los lipopéptidos cíclicos tales como la gramicidina S y las polimixinas. Estas dos clases de biotensoactivos poseen actividad antibacteriana debido a su capacidad de solubilizar enzimas de membrana. La surfactina es otro biotensoactivo perteneciente a este grupo y reconocido como uno de los más poderosos (Jiménez-Islas y col., 2010).

Los biotensoactivos poliméricos están constituidos por diversos grupos químicos. Un ejemplo es el emulsán, en el cual los ácidos grasos se encuentran ligados a un esqueleto de heteropolisacáridos (Rosenberg y col., 1979). Otro biotensoactivo polimérico es el liposán, cuya estructura está constituida por 83% de carbohidratos y 17% de proteínas (Cirigliano y Carman,

1984). Las vesículas y células microbianas con actividad tensoactiva se denominan biotensoactivos particulados. Las cianobacterias y algunos microorganismos patógenos del género *Serratia* son ejemplos de microorganismos que tienen una elevada hidrofobicidad superficial asociada a la producción de biosurfactantes (Jiménez-Islas y col., 2010).

2.8.5. Proteínas.

Entre las proteínas periplasmáticas están unión a plata SilE y el sistema CopABCD y la proteína CopH. La chaperona CopZ y la metalotioneína SmtA en el citoplasma celular (Marrero-Coto y col., 2010), las proteínas de choque térmico (HSPs) (Almeida y col., 2004) que son proteínas producidas generalmente por eventos de tipo estrés celular (Guerrero-Rojas y Guerrero-Fonseca, 2018).

2.8.6. Polihidroxicanoatos.

El carbono es el principal constituyente de las células y forma aproximadamente el 50% de su peso seco. Como fuente de carbono, los microorganismos son capaces de utilizar una gran gama de compuestos carbonados, principalmente carbohidratos como la glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, entre otros, según la especie. Por esto, la asimilación de diferentes tipos de azúcares es una de las pruebas imprescindibles para la identificación de cepas de hongos, levaduras y bacterias (García y col., 2013). La glucosa es un carbohidrato simple y la mayoría de los organismos vivos pueden catabolizarla. En el caso de las bacterias, la glucosa es fácilmente transportada a través de la membrana citoplasmática y puede ser transformada en polímeros de reserva intracelular (Bravo y Fernández, 2009).

Los polihidroxicanoatos (PHA) son biopolímeros de ácidos hidroxicanoicos que algunos microorganismos acumulan intracelularmente como materiales de reserva y empleados posteriormente como fuente de carbono y energía. La polimerización de los ácidos hidroxicanoicos por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxicanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster (Figura 3), por lo que son llamados biopoliésteres (Delgado y

Cordoba, 2015). Entre estas reservas se encuentran los gránulos de PHA y los compuestos más comunes son el P3HB (ácido polihidroxi-butírico), el PLA (poliácido láctico o polilactida), el PGA (ácido poliglicólico), el P3HV (poli(3-hidroxi-valerato)) y el P(3-HHx) (poli(3-hidroxi-hexanoato)). (Bello-Gil y Brandl, 2007). Existen diferentes métodos para la detección de PHA y una de las técnicas más reportadas es la tinción con colorantes lipofílicos como el azul Nilo o el rojo Nilo.

Los PHA se acumulan como polímeros líquidos, móviles y amorfos en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma de los microorganismos, rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contienen enzimas polimerasas y despolimerasas (Figura 4). Bacterias como *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* spp. entre otras, sintetizan PHA como compuestos de almacenamiento de fuentes de carbono y energía; además, probablemente cumplen con otras funciones en la célula bacteriana. De esta manera, constituyen un grupo de materiales biodegradables de gran potencial biotecnológico (Ale-Borja y col., 2015).

Investigaciones previas realizadas sobre los procesos de producción y acumulación de los PHA, indican que el número de gránulos por célula se define en las primeras etapas del proceso y que la producción del polímero cesa cuando el contenido de acumulación alcanza entre el 80-90% del peso celular en base seca de la bacteria. El fenómeno anterior ha llevado a la conclusión de que existen restricciones físicas que le impiden a la célula acumular una mayor cantidad del biopolímero, a pesar de la disponibilidad de sustrato y de la actividad de la enzima PHA polimerasa (Ale-Borja y col., 2015).

La producción de los gránulos de PHA se induce bajo una serie de condiciones desfavorables para el crecimiento bacteriano, con lo cual se producen y acumulan intracelularmente estos biopolímeros como reserva de energía cuando las células bacterianas se encuentran bajo condiciones de estrés. Generalmente, el estrés puede ser nutricional por la limitación de fósforo, nitrógeno u oxígeno, o bien puede originarse por crecimiento en un medio con pH no óptimo, e incluso con un exceso de la fuente de carbono (Tabla 1) (Madison y Huisman, 1999).

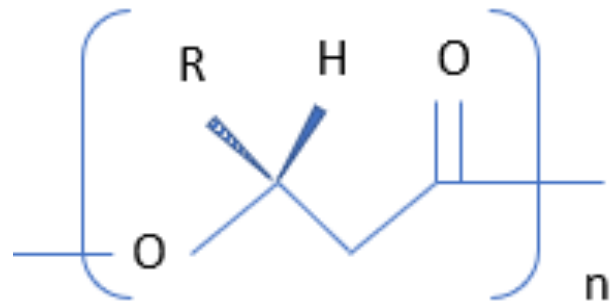


Figura 3. Estructura química de PHA (Eckstein citado diferente y col., 2001).

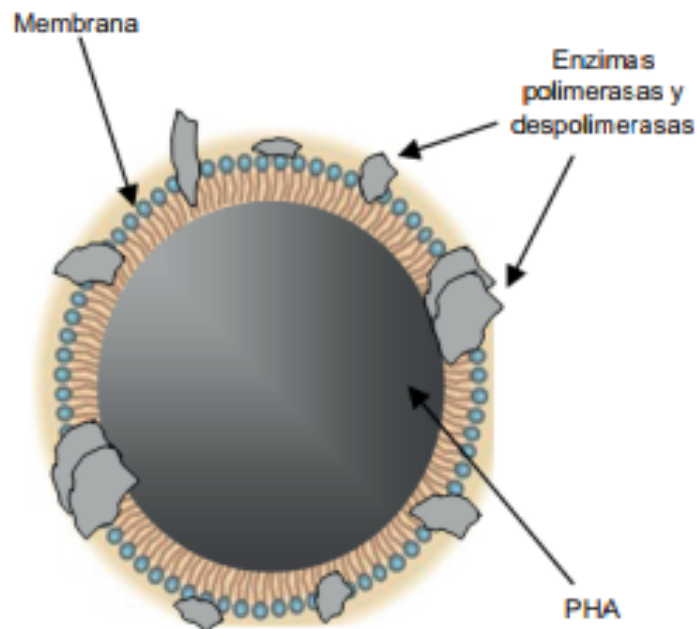


Figura 4. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente. Se aprecia la membrana que lo rodea en la que se encuentran enzimas polimerasas y despolimerasas (García y col., 2013).

El primer PHA descubierto fue el poli(3-D-hidroxi-butirato) (PHB), un homopolímero que fue detectado en la especie *Bacillus megaterium* en 1925 (Marrero-Coto y col., 2010). Los PHAs se clasifican de acuerdo con la composición de sus monómeros en tres clases (Figura 5), de los cuales se destacan el PHB y el polímero poli 3(HB-co-HV) desde el punto de vista industrial (Sánchez y col., 2012):

- De cadena corta (PHASCL), conformados por monómeros de 3 a 5 carbonos, como el poli-3-hidroxivalerato ([P(3HV)] y el poli-3-hidroxi-butirato [P(3HB)] o polihidroxi-butirato (PHB).
- De cadena mediana (PHAMCL), constituidos por monómeros de 6 a 14 carbonos, como el copolímero poli-3(HB-co-HV).
- De cadena mixta (PHAMCM), que combinan los dos anteriores y que, por tanto, constan de monómeros entre 3 y 14 carbonos, como es el caso del poli (3HB-co-3HV-co-3HHx) (Sttube y Tian, 2003).

Algunas bacterias sintetizan polímeros mediante un camino metabólico que involucra tres enzimas: una b-cetotiolasa que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, una acetoacetil-CoA reductasa que convierte este compuesto en 3-hidroxi-butiril-CoA, y una polimerasa que polimeriza los monómeros. Este camino metabólico es el que utilizan la mayoría de las bacterias productoras de PHB (Eckstein y col., 2001).

Se han encontrado otros microorganismos como *R. sphaeroides* que son capaces de utilizar ácidos grasos volátiles (AGVs) como sustrato y de captar energía de la luz, lo cual es conocido como fototofía. Este mecanismo les permite usar la luz como fuente de energía para la generación de ATP (fotofosforilación). La capacidad para utilizar los AGVs que son subproductos de la digestión anaerobia, les otorga una ventaja competitiva (Ye y col. 2013). Los microorganismos fototróficos tienen una ventaja competitiva debido a que presentan comportamientos fisiológicos interesantes en ausencia de nitrógeno, ya que la enzima nitrogenasa se activa produciendo nitrógeno y acumulando PHB en condiciones anaerobias (Figura 4), lo cual representa una ventaja competitiva (Ye y col. 2013).

Tabla 1. Compuestos limitantes para microorganismos productores de PHA.

Microorganismos	Compuestos limitantes.
<i>Alcaligenes latus</i>	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Nitrógeno
<i>Ralstonia eutropha</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Pseudomonas sp. K.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	Oxígeno
<i>Rhizobium ORS571</i>	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Fósforo
<i>Caulobacter crescentus</i>	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	

Fuente: Lemos-Delgado y Mina-Córdoba, 2015

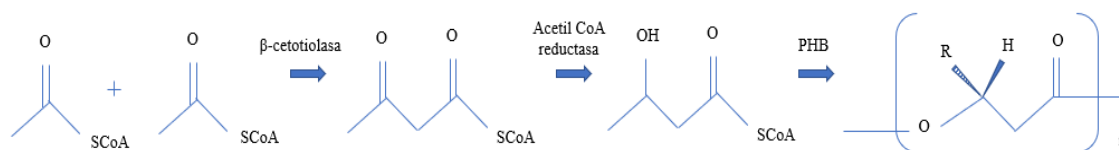


Figura 5. Esquema de síntesis de PHB (Eckstein y col. 2001).

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

En los microorganismos metalotolerantes *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa*, la producción de polihidroxicanoatos en presencia de cobre está relacionada con el estrés oxidativo general y con afectaciones en organelos subcelulares.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del cobre sobre la cinética de crecimiento, morfometría, viabilidad, organelos subcelulares y estrés oxidativo de *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa* tolerantes a cobre.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando fermentaciones en cultivos Batch, adicionados con y sin cobre.
2. Estimar los parámetros cinéticos de crecimiento $X(t)$ = Concentración de microorganismos en el tiempo t (UFC/mL); t = tiempo (h); X_{\max} = producción máxima de microorganismos (UFC/mL); m_{\max} = velocidad específica de crecimiento máxima (h); y t_m = tiempo al cual se produce la mitad de la población máxima del microorganismo.
3. Evaluar efecto del cobre en organelos subcelulares, producción de polihidroxicanoatos y estrés oxidativo de *B. megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 6 se muestra el diagrama de flujo de la metodología general utilizada. Se emplearon microorganismos metalotolerantes aislados a partir de sedimentos contaminados con metales pesados provenientes de la región del Río San Pedro, Cananea, Sonora, los cuales fueron identificados como *Rhodotorula mucilaginosa* y *Bacillus megaterium*, ambas especies tolerantes a cobre.

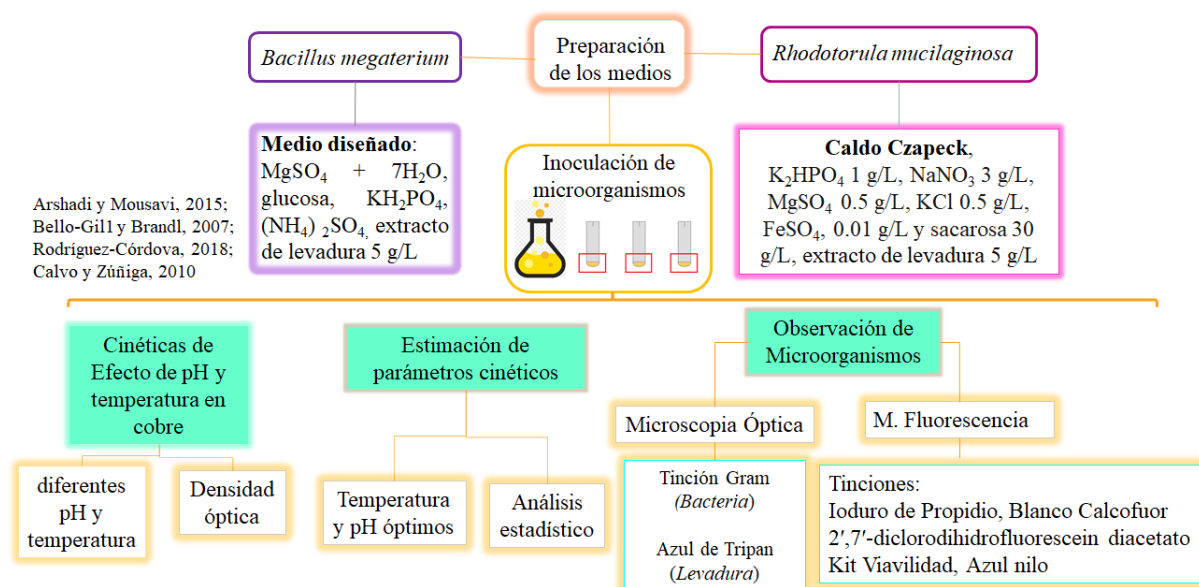


Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología general utilizada.

5.1. Cultivo y propagación de los microorganismos.

5.1.1. *Bacillus megaterium*

Una vez aislada e identificada la bacteria *Bacillus megaterium* se mantuvo en conservación en agar nutritivo adicionado con 10 ppm de Cu^{2+} (adicionado como sulfato de cobre II, CuSO_4), en refrigeración (Rodríguez-Córdova, 2018). La bacteria fue resembrada en placas con agar bacteriológico (15 g/L) y caldo nutritivo adicionado con 5 g/L de extracto de levadura (EE).

Para su propagación, se tomó una muestra de las células resembradas y se inocularon en un medio de sales basado en la metodología de Arshadi y Mousavi (2015) modificada, además de extracto de levadura (5 g/L) y 10 ppm Cu^{2+} (Arshadi y Mousavi, 2015, modificado por Bello-Gill y Brandl (2007) y Rodríguez-Córdova, 2018). Una vez desarrollada, la bacteria se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.1.2 *Rhodotorula mucilaginosa*

La levadura *Rhodotorula mucilaginosa* previamente identificada por Muñoz-Espinoza (2020) se mantuvo en placas con agar Saboraud + 10 ppm de Cu^{2+} en refrigeración. Para su propagación se inoculó en medio líquido de Czapek según los factores extrínsecos más adecuados, como se menciona en la siguiente sección. Una vez desarrollada, la levadura se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.2. Preparación de los inóculos microbianos

5.2.1. *Bacillus megaterium*

La preparación de inóculos se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL adicionados con 100 mL de medio de sales con la siguiente formulación: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.61 g/L, glucosa 50 g/L, KH_2PO_4 4.4 g/L y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7.55 g/L, además de extracto de levadura (5 g/L) y 10 ppm Cu^{2+} (Arshadi y Mousavi, 2015; Bello-Gill y Brandl, 2007 y Rodríguez-Córdova, 2018). Una vez inoculado, el pH del medio se ajustó a $\text{pH} = 5.5$ utilizando solución de NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N según fuera necesario (Calvo y Zúñiga, 2010), incubando a 35°C , a 170 rpm durante 48 h.

Para ajustar la concentración de los inóculos se utilizó la escala de McFarland, la cual se preparó añadiendo 0.5 mL de una solución de cloruro de bario dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1.175% (p/v) a un volumen de 99.5 mL de solución de H_2SO_4 al 1% (v/v). Para comprobar la turbidez del estándar de McFarland de 0.5 se midió la absorbancia a 600 nm. De acuerdo con la técnica, la absorbancia debe fluctuar entre un valor de 0.08 a 0.1. En este trabajo, el inóculo de *Bacillus megaterium* se ajustó a una concentración de 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL), correspondiente a una absorbancia entre 0.8-1.0 de la escala McFarland de 0.5.

5.2.2. *Rhodotorula mucilaginosa*

Para la inoculación se preparó medio Czapek líquido con la siguiente formulación: K_2HPO_4 1.0 g/L, NaNO_3 3.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO_4 , 0.01 g/L y sacarosa 30 g/L, enriquecido con 5.0 g/L de extracto de levadura (Contreras-Cortés y col., 2020) y adicionado con 10 ppm de Cu^{2+} . El medio inoculado se incubó a 30°C , a 170 rpm. Antes de inocular, el pH del medio se ajustó a $\text{pH} = 5.5$ utilizando solución de NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N según fuera necesario (Latha y col. 2005; De Sotto y col., 2015). Se ajustó la concentración del inóculo siguiendo la técnica de McFarland anteriormente descrita, a 625 nm.

5.3. Morfometría de los microorganismos

5.3.1. *Bacillus megaterium*

Las mediciones de los diámetros y longitud de las células bacterianas desarrolladas en medio de cultivo sólido se llevaron a cabo mediante la técnica de procesamiento de imágenes, utilizando el programa Image-Pro Plus versión 6.3 (MediaCybernetics, Inc.) (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Para ello, se prepararon frotis de los cultivos bacterianos, se tiñeron mediante la técnica de tinción Gram y se observaron a 100x en un microscopio óptico (Olympus U-CMAD3, Japón), conectado a una cámara (Infinity1, Japón) y a una computadora para procesar las imágenes (Velez-Haro, 2010). En total se tomaron 60 mediciones de los diámetros y las longitudes de las células de ambos organismos. Cada experimento se realizó por cuadruplicado.

5.3.2. *Rhodotorula mucilaginosa*

Se prepararon frotis de las células levaduriformes a partir de los cultivos obtenidos en placas con agar Sabouraud. Antes de su observación, los frotis se tiñeron con colorante azul de tripano al 4% (p/v). Este es un colorante azoico utilizado en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad, ya que permite diferenciar entre células vivas y muertas. Las células vivas o tejidos con membranas celulares intactas no se colorean debido a la selectividad de las células. Mientras que el colorante no se absorbe en las células viables, en las células muertas si logra atravesar la membrana y permite observar las células de color azul bajo el microscopio. Debido a que las células vivas son excluidas de la tinción, este método también se conoce como tinción por exclusión (Escobar y col., 2009).

En este estudio, de las preparaciones teñidas se capturaron imágenes en el objetivo de 40x y se procesaron en el microscopio de acuerdo con el procedimiento antes descrito para la bacteria. En total se midieron al menos 60 células por tratamiento y se contabilizó el número de células viables (sin color) y no viables (color azul).

5.4. Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento microbiano utilizando fermentación en cultivos Batch

Las fermentaciones de cada uno de los microorganismos se llevaron a cabo en cultivos Batch, por triplicado. Para *Bacillus megaterium* se utilizaron tubos de ensaye a los cuales se les añadieron 10 mL de medio de sales formulado + extracto de levadura (EE, 5 g/L) + 10 ppm Cu^{2+} , mientras que para *Rhodotorula mucilaginosa* se emplearon tubos con 10 mL de caldo Czapek + EE (5 g/L) + 10 ppm de Cu^{2+} . Los medios se prepararon de acuerdo con el procedimiento antes descrito para la propagación (sección 2.1 y 2.2).

Para evaluar el efecto del pH, cada uno de los medios de cultivo líquido preparados se distribuyó en 4 diferentes matraces. Al medio contenido en cada matraz se le ajustó el pH utilizando solución de NaOH 0.1 M o HCl 0.1 M, según fuese necesario, obteniendo tratamientos con valores de pH de 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5. Los medios de cultivo con diferente pH fueron adicionados en volúmenes de 10 mL a los tubos de ensaye y esterilizados a 121°C durante 15 min, a 115 libras de presión.

Los tubos con los medios de cultivo esterilizados se inocularon con la bacteria y la levadura, por separado. Para los cultivos bacterianos, cada uno de los tubos se inoculó con un volumen de 40 μL del inóculo de *Bacillus megaterium*, con una absorbancia de 1.48. Para las fermentaciones de los cultivos levaduriformes, los tubos se inocularon con 10 μL de la suspensión de *Rhodotorula mucilaginosa*, con una absorbancia de 1.71.

Una vez inoculado cada microorganismo en los tubos con los medios de cultivo, se incubaron a 25, 30, 35 y 42°C. A las 24 y 48 h de incubación se realizaron muestreos al azar, a fin de cuantificar la cantidad de biomasa producida (Acebo-González y Hernández-García, 2013). A partir de los datos experimentales se realizaron gráficos de superficie de respuesta y se determinaron los valores óptimos de pH y temperatura (Contreras-Cortés y col., 2020) para ambos microorganismos.

5.4.1. Medición del crecimiento microbiano

La medición del crecimiento de los microorganismos a diferentes valores de pH y temperatura se llevó a cabo utilizando la técnica de turbidimetría, que se basa en la acción de un haz de luz sobre una suspensión celular, por absorción (densidad óptica, DO) o por dispersión (Transmitancia) (Acebo-González y Hernández-García, 2013). En este caso, la turbidez se expresó como DO, que es directamente proporcional a la concentración de las células (Marrero-Coto y col., 2010). Este método permite estimar rápidamente el crecimiento de una población microbiana, en donde la cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la concentración de células que hay en el cultivo. Para *Bacillus megaterium*, la absorbancia se leyó a 600 nm, mientras que para *Rhodotorula mucilaginosa* la lectura se realizó a 625 nm.

5.5. Estimación de los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano

Una vez determinada la combinación de pH y temperatura a la cual los microorganismos presentaron su mayor crecimiento, se procedió a realizar las fermentaciones microbianas en cultivos Batch. Para cada microorganismo, los medios de cultivo se prepararon e inocularon de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 3, por triplicado. Se realizaron muestreos a diferentes intervalos de tiempo cada 4 h, hasta las 24 h y finalmente a las 48 h. En el caso de *Bacillus megaterium* se midió la absorbancia a las 72 h.

A todas las muestras se les determinó la concentración celular mediante turbidimetría. Los datos experimentales obtenidos a partir de las cinéticas de fermentación fueron ajustados al modelo logístico de Verhulst, a fin de determinar los parámetros cinéticos de crecimiento para la bacteria y la levadura (Ye y col., 2013).

5.5.1. Modelo logístico

El modelo matemático logístico es uno de los más utilizados para describir el crecimiento microbiano, el cual suele ilustrarse a través de la curva de crecimiento (Figura 7). Esta curva es la representación del logaritmo del número de microorganismos en un cultivo con respecto al tiempo. Aunque las condiciones del medio sean favorables para el crecimiento, el microorganismo necesita un tiempo para adaptarse a ese nuevo ambiente antes de comenzar el crecimiento. Esta etapa se conoce como fase de adaptación y antecede a la denominada fase exponencial, caracterizada por un crecimiento exponencial a una velocidad (μ_{max}). El crecimiento se mantiene hasta que la población microbiana se estabiliza y se detiene su crecimiento, lo cual se conoce como fase estacionaria. Por último, cuando la población microbiana decae debido al agotamiento de todos los recursos o nutrientes del medio, se dice que ha llegado a la fase de declive o muerte (Pérez y col., 2016).

5.5.1.1. Modelo logístico de Verhulst-Pearl

A fin de caracterizar las cinéticas de los dos microorganismos reportados como tolerantes a cobre, se utilizó el modelo logístico de Verhulst-Pearl (Ec. 1) para estimar sus parámetros de crecimiento de *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa*, en presencia del metal (10 ppm de Cu^{2+}). Los datos de las cinéticas de producción de biomasa a las concentraciones crecientes de UFC/mL se ajustaron mediante el programa Origin Pro® 9.1 con la opción de ajuste Slogistic 1 (Álvarez-Villa y col., 2018).

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

Donde: $X(t)$ = Concentración de microorganismos en el tiempo t (UFC/mL); t = tiempo (h); X_{max} = producción máxima de microorganismos (UFC/mL); μ_{max} = velocidad específica de crecimiento máxima (h); y t_m = tiempo al cual se produce la mitad de la población máxima del microorganismo (h).

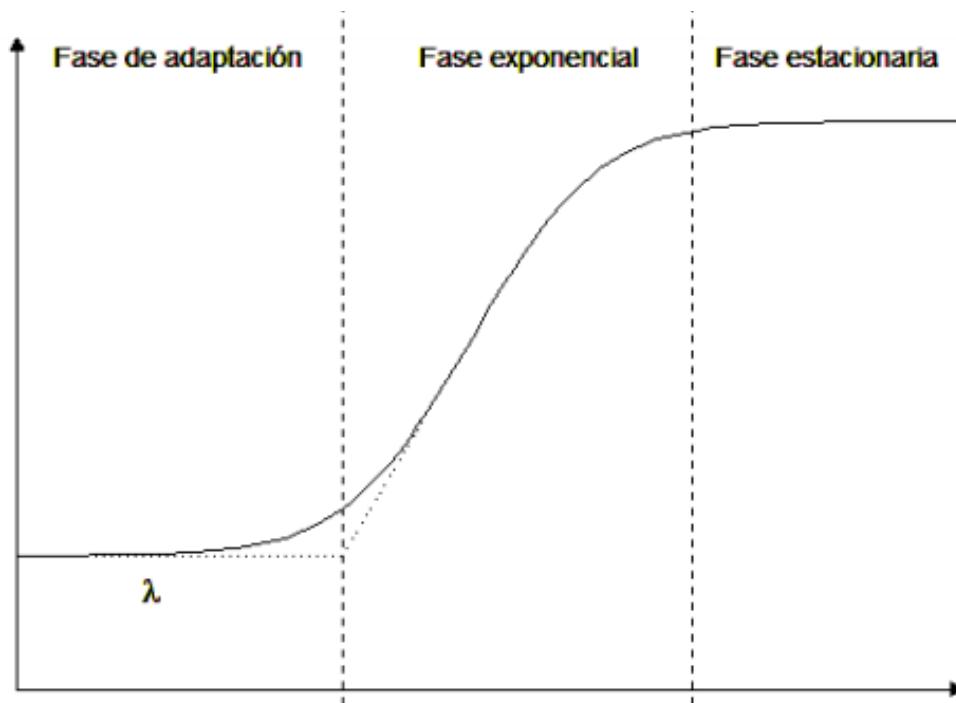


Figura 7. Curva de crecimiento microbiano (logaritmo del número de microorganismos vs. tiempo) tipo para una población creciendo bajo condiciones ambientales constantes (Pérez y col., 2016).

5.6. Efecto del Cu²⁺ sobre los organelos subcelulares microbianos

Para determinar el efecto de Cu²⁺ sobre los componentes celulares de *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa* mediante microscopía de fluorescencia, se utilizó un microscopio invertido (Modelo DMi8, Leica Microsystems, Alemania) equipado con filtros de fluorescencia (filtro RHOD excitación 546/10 y emisión 585/40, filtro DAPI excitación 350/50 y emisión 460/40, y filtro FITC excitación 480/40 y emisión 527/30). Las imágenes se capturaron con una cámara DFC 450C monocromática enfriada (Leica Microsystems, Alemania) y se analizaron utilizando un software de superposición de fluorescencia (LAS AF ver. 3.1.0, Leica Microsystems CMS GmbH, Alemania). Las preparaciones se realizaron utilizando muestras de los cultivos microbianos desarrollados en presencia y ausencia de cobre (10 ppm Cu²⁺).

5.6.1. Biopolímeros de la pared celular

Esta técnica se basa, por una parte, en la propiedad que tiene este fluorocromo de emitir fluorescencia al ser activado por la radiación ultravioleta, y por otra, en la afinidad que presenta por polisacáridos como la celulosa, quitina y glucanos, lo que permite la localización de estos componentes en la pared celular de los organismos fúngicos (Rodríguez-Córdova, 2016; Contreras-Cortés y col., 2020).

En este trabajo se utilizó una solución al 0.05% de Blanco de Calcoflúor (Fluorescent brightener 28, Calcofluor White M2R, por tinopal UNPA-GX, F3543, Sigma-Aldrich, USA) en agua destilada. Para la tinción se depositó una gota de la suspensión del microorganismo (desarrollado en medio con y sin 10 ppm de Cu²⁺) sobre un portaobjetos y se mezcló suavemente con dos gotas del colorante. Posteriormente se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y el portaobjetos se mantuvo en cámara húmeda durante su incubación en refrigeración a 4°C durante 2 min. en completa oscuridad. Finalmente, el portaobjetos se montó sobre el microscopio de fluorescencia y se observó la muestra utilizando el filtro UV (Gálvez-Iriqui y col., 2019).

5.6.2. Estrés oxidativo general

El 2',7'-diclorofluorescein diacetato (DCFH₂-DA) es un colorante no polar que no emite fluorescencia. Este compuesto se desesterifica por vía intracelular y se convierte en DCFH₂ altamente fluorescente. Esta conversión ocurre debido a la oxidación por la acción de enzimas esterasas celulares, lo que evidencia el estrés oxidativo de la célula. Este fluorocromo permite la cuantificación rápida de especies reactivas al oxígeno (ROS) y otros peróxidos, en respuesta al metabolismo oxidativo asociado al estrés (Rastogi y col., 2010).

Para determinar el estrés oxidativo (ROS) en ambos microorganismos después de la exposición a Cu²⁺, se siguió la metodología descrita por Dananjaya y col. (2017), modificada por Gálvez-Iriqui y col. (2019). Se utilizó una solución de DCFH₂-DA (2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato o 2,7-DCFH₂-DA, D2321 Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 100 µM (p/v) en una mezcla de metanol-agua (30:70). Para la tinción, se mezclaron dos gotas del colorante con una del cultivo microbiano previamente depositada sobre un portaobjetos. Este se mantuvo en cámara de humedad a 4°C por 20 min en la oscuridad (Contreras-Cortés y col., 2020), antes de ser observado en el microscopio de fluorescencia.

5.6.3. Integridad de la membrana celular

El yoduro de propidio es un colorante fluorescente para teñir ácidos nucleicos. Las membranas celulares que mantienen su integridad excluyen el IP, lo que permite diferenciar las células viables (sin teñir) de las apoptóticas o muertas (rojas). Esto ocurre debido a que el colorante es capaz de penetrar en células dañadas e intercalarse con el material celular, emitiendo una fluorescencia roja que indica daño celular (Rodríguez-Córdova, 2016) o células que se encuentran en una etapa temprana del proceso de apoptosis. En este trabajo se utilizó una solución de IP (P4170, Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 0.02 mg/ml (p/v). Una vez preparada se adicionó una gota del colorante a una gota del cultivo microbiano depositada sobre un portaobjetos, se mezcló suavemente e incubó a 4°C por 15 min en oscuridad, antes de su observación en el microscopio de fluorescencia (Gálvez-Iriqui y col., 2019).

5.6.4. Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad de los microorganismos expuestos al cobre se empleó un kit de viabilidad (células vivas/muertas, kit de doble tinción, 04511, Sigma, USA). Se preparó la solución de acuerdo con el fabricante, mezclando 10 µL de la solución A y 5 µL de la solución B, los cuales se agregaron a 5 mL de buffer de fosfatos (PBS) hasta homogenizar. Posteriormente se agregaron 2 gotas del colorante a los portaobjetos inoculados, incubando a 37°C por 15 min. La solución A se compone por calceína-AM que tiñe las células viables de un color verde limón, mientras que la solución B se compone por IP, que tiñe las células no viables de rojo (Gálvez-Iriqui y col., 2019).

Se realizó un frotis fresco con el medio líquido, añadiendo una gota de la muestra y dos gotas de la tinción. Se incubaron a su temperatura óptima según cada microorganismo (35°C para *Bacillus megaterium* y 28°C para *Rhodotorula mucilaginosa*), manteniéndose en cámaras de humedad durante 15 minutos en oscuridad hasta su observación (Rodríguez-Córdova, 2018; Contreras-Cortés y col., 2020).

5.6.5. Azul Nilo

El azul Nilo forma parte del grupo de colorantes oxazina y se ha utilizado para detectar ADN y lípidos. Además, también ayuda a identificar el crecimiento microbiano (principalmente de bacterias) y se utiliza básicamente por su sensibilidad para la detección de gránulos de PHA en colonias microbianas en crecimiento (Bello-Gil y Brandl, 2007).

Dentro de los PHA, el poli-p-hidroxibutirato (PHB) es un polímero de éster que funciona como una fuente de energía y carbono en las células procariontas y eucariotas. Existe como gránulos o cuerpos de inclusión dentro de la célula y se ha reportado que su producción se asocia a un mecanismo de defensa bajo situaciones de estrés, como por ejemplo la exposición a metales pesados en hongos filamentosos (Contreras-Cortés y col., 2020).

En este trabajo, para observar la producción de PHAs se llevó a cabo la metodología reportada por Ostle y Holt 1982, modificada. Se preparó una solución acuosa al 1% (p/v) de azul Nilo (cloruro de azul Nilo, 222550 Sigma-Aldrich, USA) y se mezclaron dos gotas de este con una gota del cultivo microbiano, sobre un portaobjetos, se colocó en una cámara húmeda y se incubó a 37°C durante 10 min. El azul Nilo exhibe una alta especificidad por los PHA (entre ellos el PHB) y fluoresce de color naranja intenso dentro de las células bajo el filtro azul.

5.7. Análisis estadístico

Mediante el software InfoStat (versión 2017, desarrollado por la Universidad Nacional de Córdoba, FCA-UNC, Córdoba, Argentina) se calculó el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia $p=0.05$. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba Tukey, a un intervalo de confianza del 95% en medios con y sin presencia de cobre. Se utilizó Oring Pro 8.9 para obtener las gráficas de superficie de respuesta, para observar los mejores valores de pH y temperatura para el crecimiento de los microorganismos.

El Ajuste al modelo logístico (R^2) de los datos experimentales al modelo Verhulst-Pearl se realizó con la herramienta Solver de Excel. Este modelo permitió estimar los parámetros cinéticos X_{max} , m_{max} , T_m y T_d .

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Formulación y diseño de medios de cultivo para *Bacillus megaterium*

Se formularon dos tipos de medios de cultivo, con y sin cobre (10 ppm Cu²⁺), uno consistente en caldo nutritivo adicionado con extracto de levadura (5% p/v) (medio estándar) y un medio de sales diseñado específicamente para la bacteria (medio diseñado) tomando como base sus requerimientos nutricionales. Al evaluar el crecimiento en ambos medios, se observó una mayor densidad de biomasa de *Bacillus megaterium* en el medio estándar + 10 ppm Cu²⁺, a las primeras 48 h de incubación a 35°C. Por otro lado, en el medio diseñado se observó un mayor crecimiento en el medio control a las 24 y 48 h (Tabla 2, Figura 8).

Al comparar el crecimiento de *Bacillus megaterium* en ambos medios de cultivo control (sin cobre), se encontró una menor densidad de crecimiento (47.85 ± 0.041 UFC) en el medio estándar en comparación con el medio diseñado (57.30 ± 0.085 UFC), a las 24 y 48 h. Sin embargo, en la presencia de Cu (II) se observó lo contrario, siendo el medio estándar + 10 ppm Cu²⁺ el que permitió un mayor crecimiento (47.13 ± 0.473 UFC) de la bacteria, a las 48 h (Tabla 1, Anexo 1).

En el medio de cultivo diseñado la bacteria presentó un crecimiento similar a las 24 y 48 h, lo cual se puede atribuir a la capacidad de adaptación del microorganismo al metal. Se ha reportado que la adaptación de *B. megaterium* a la presencia de metales se asocia a la captación y formación de enlaces con el Cu (II), ya que este participa en el metabolismo bacteriano y favorece la producción de metabolitos como enzimas, proteínas, polihidroxicanoatos, entre otros (Contreras y col., 2020). Ambos medios fueron adecuados para el crecimiento de *Bacillus megaterium*. En este estudio, tomando como base los resultados anteriores, se seleccionó el medio de cultivo diseñado para los estudios posteriores. En ensayos preliminares, en este medio se observó un crecimiento constante después de las 48 h.

Tabla 2. Unidades formadoras de colonias (UCF x 10⁸) de *Bacillus megaterium*, desarrolladas en los medios de cultivo líquido estándar y diseñado, con y sin cobre (10 ppm Cu²⁺), a 35°C.

Tiempo	Medio estándar	Medio diseñado
Medio control, 24 h	47.85 ± 0.041	57.30 ± 0.085
Medio con Cu ²⁺ , 24 h	47.13 ± 0.473	36.30 ± 6.438
Medio control, 48 h	45.21 ± 0.023	58.75 ± 0.041
Medio con Cu ²⁺ , 48 h	45.29 ± 1.65	36.42 ± 6.367

Las lecturas de absorbancia se realizaron a 600 nm.



Medio Diseñado



Medio Estándar

Figura 8. Turbidez de los cultivos de *Bacillus megaterium* en medio diseñado y medio estándar, ambos controles sin cobre, a 35°C, a las 24 h.

6.2. Morfometría

6.2.1. *Bacillus megaterium*

Para llevar a cabo las mediciones de las estructuras bacterianas se utilizó el programa Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, USA), realizando un total de 60 mediciones del diámetro y de la longitud de las células bacterianas, por tratamiento. En el medio adicionado con Cu (II) se observaron células con un aumento en el diámetro y longitud promedio con respecto a las bacterias desarrolladas en el medio control, lo cual puede ser atribuido a la tolerancia de *B. megaterium* al cobre (Figura 9, Tabla 3).

Se ha reportado que, en presencia de metales, *Bacillus megaterium* puede presentar tolerancia por mecanismos asociados al incremento en la producción de metabolitos como proteínas y polihidroxicanoatos (PHA) (Marrero-Coto y col., 2010). Este incremento puede ocasionar un aumento en la producción de vacuolas, dando como resultado un mayor diámetro y longitud celular. La biosíntesis de metabolitos como los PHA y otros carbohidratos se ha asociado al metabolismo energético (Bravo y Fernández, 2009).

6.2.2. *Rhodotorula mucilaginosa*

De la misma manera se llevaron a cabo las mediciones de las estructuras de *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando el programa Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, USA). Se realizaron un total de 60 mediciones del diámetro de las células de la levadura, por tratamiento.

El crecimiento de la levadura en ambos medios de cultivo Czapek, con y sin cobre, fue similar, encontrando un ligero incremento en el diámetro promedio de las células desarrolladas en presencia de Cu²⁺ ($6.60 \pm 3.30 \mu\text{m}$) con respecto al diámetro promedio en el tratamiento control ($6.29 \pm 0.04 \mu\text{m}$), a las 24 h, a 28°C (Figura 10).

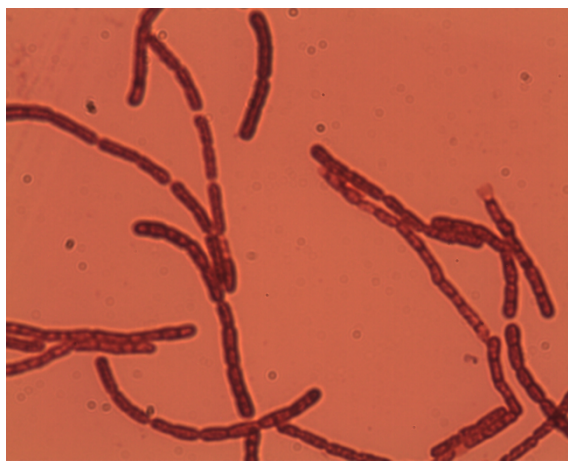
Tabla 3. Análisis morfométrico de *Bacillus megaterium* desarrollado en medio de cultivo Estándar, a 35°C, a las 24 h.

	Medio control	Medio con Cu (II)
	μm	μm
Diámetro	1.35 ± 0.19	1.43 ± 0.16
Longitud	7.01 ± 3.09	8.46 ± 0.52

Valor promedio de cuatro mediciones \pm error estándar.



Control (sin cobre) a 100x

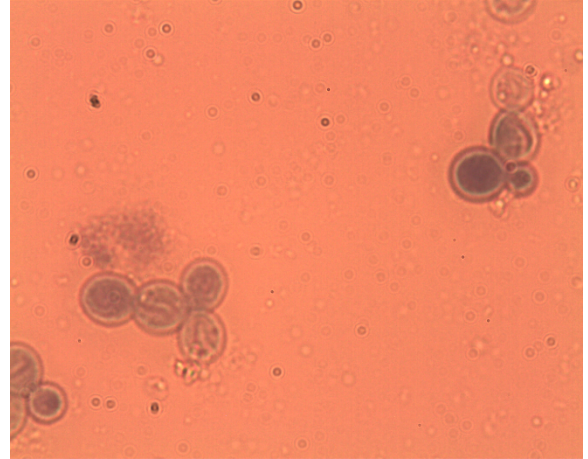


Con 10 ppm de Cu^{2+} a 100x

Figura 9. Células de *Bacillus megaterium* desarrolladas en medio estándar, con y sin cobre (10 ppm Cu^{2+}), a 35°C, a las 24 h.



Control (sin cobre) a 100x



Con 10 ppm de Cu²⁺ a 100x

Figura 10. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* desarrolladas en medio Czapek con y sin cobre (10 ppm Cu²⁺), a 28°C, a las 24 h.

Sin embargo, cuando la levadura se desarrolló en el medio con Cu^{2+} , se observó de manera notable la presencia de vacuolas de mayor tamaño y una mayor cantidad de gránulos internos en comparación a las células inoculadas en el medio control. Esto se puede atribuir a la biosíntesis de metabolitos como los PHA y otros carbohidratos, lo cual se ha asociado al metabolismo energético (Benavides, 2009).

Además del análisis morfométrico, para observar el efecto del metal sobre la levadura se realizó una tinción de las células con colorante azul de tripano, el cual permite diferenciar las células viables (incolores) de las no viables (de color azul) (Figura 10).

Al contabilizar el número de unidades formadoras de colonias (UFC), en el medio control se encontró un mayor número de UFC/mL totales (4.17×10^6) y viables (3.78×10^6) con relación a la cantidad de células desarrolladas en el medio con cobre (2.52×10^6 UFC/mL totales y 2.01×10^6 UFC/mL viables). Estos valores indican que en el medio de cultivo formulado con el metal (10 ppm de Cu^{2+}) existe un menor porcentaje de células vivas (79.8%), en comparación con el medio control (90.6%), a las 24 h. La presencia de células vivas con un crecimiento lento en comparación con el control se puede asociar al estrés metabólico ocasionado por el metal.

Al respecto, en estudios previos se ha reportado que la adaptabilidad de algunas especies fúngicas como *Aspergillus australensis* a metales puede explicarse por el gen responsable de la síntesis de proteínas metalotioneínas, que son las encargadas de la captación celular de varios metales de transición, entre ellos el cobre. Estas proteínas se han postulado como responsables de la desintoxicación de una variedad de metales de clase II b en diferentes especies microbianas (Contreras-Cortés y col., 2020).

6.3. Efecto de pH y temperatura

6.3.1. *Bacillus megaterium*

Al observar el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de la bacteria en el medio diseñado control (sin cobre), se encontró una mayor producción de biomasa a pH de 5.5 y temperatura de 42°C. Sin embargo, el crecimiento bacteriano fue similar a todas las temperaturas evaluadas, siendo el pH el parámetro que más afectó el desarrollo de *Bacillus megaterium* (Figura 11).

Bajo dichas condiciones experimentales (temperatura elevada y pH alto), es posible que el grado de especiación del cobre en el medio favorezca un mayor crecimiento de la bacteria. Asimismo, considerando que el microorganismo fue aislado de relaves mineros de la Región del Río San Pedro en Cananea, Sonora, el mayor crecimiento a 42°C puede deberse a su adaptación a las condiciones ambientales existentes en la región semidesértica que prevalecen en el Noroeste del país, en donde se presentan marcadas fluctuaciones de temperatura y existe una diversidad de metales pesados (García y col., 2013)

Por su parte, en el medio diseñado adicionado con cobre (10 ppm) se encontró que el crecimiento de la bacteria se incrementó al aumentar el pH y la temperatura, observándose una mayor producción de biomasa en el medio con pH de 5.5 a 42°C (Figura 12).

El Cu^{2+} es un agente oxidante que ocasiona daño celular a través de la oxidación del ion cúprico. De acuerdo con el estudio de Portales y col. (2015), en los relaves mineros el cobre está presente como una especie altamente móvil. Sin embargo, en altas concentraciones es dañino para los seres vivos incluyendo los microorganismos, y es capaz de producir malformaciones en algunas especies de plantas.

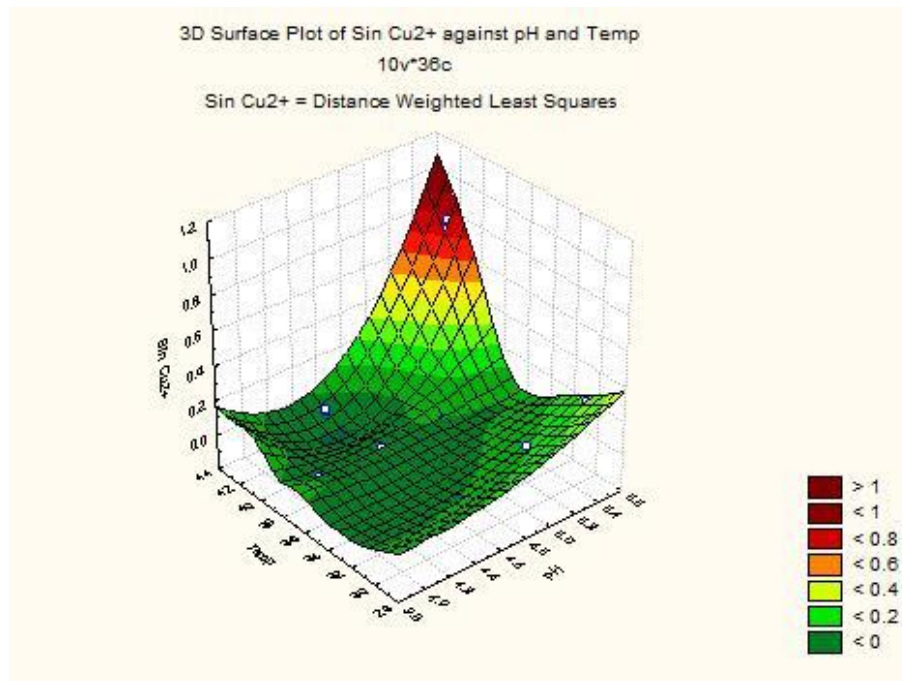


Figura 11. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de la temperatura y pH sobre el crecimiento (D.O.₆₀₀) de *Bacillus megaterium*, a las 48 h, en el medio de cultivo Diseñado, control sin cobre (control).

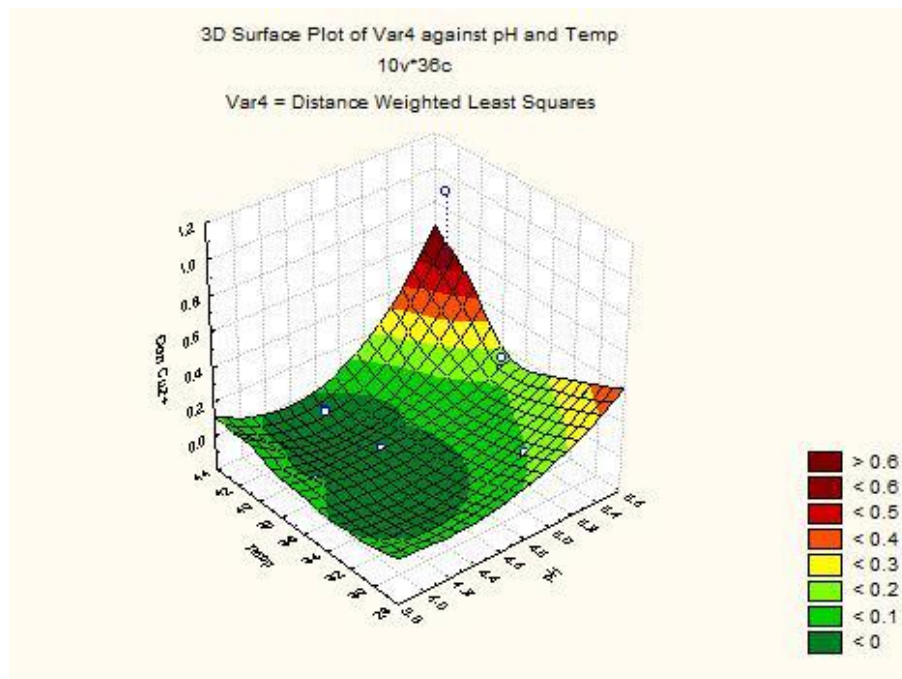


Figura 12. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de la temperatura y el pH sobre el crecimiento (D.O.₆₀₀) de *Bacillus megaterium*, a las 48 h, en el medio de cultivo Diseñado y adicionado con cobre (10 ppm Cu²⁺).

En este contexto, la movilización depende del tipo de unión o interacción de los metales a las especies presentes en el medio o suelo (que se conoce como especiación elemental) y de la naturaleza de los medios que contienen el contaminante. En México, en los lixiviados de la mina Aurora se reportó una especiación de cobre elevada entre 125 ± 21 y $1,763 \pm 10$ mg/kg, mientras que en la superficie del suelo se encontraron valores entre 22 ± 5 y 88 ± 5 mg/kg. De acuerdo con Portales y col. (2015), es posible que las especies de cobre altamente solubles se puedan movilizar por la fuerza capilar hacia los relaves superiores de la mina y una vez allí, su movilidad se controle por los procesos sorción y del pH.

De acuerdo con los datos experimentales de la cinética de crecimiento a los valores de temperatura y pH que favorecen el mejor crecimiento de la bacteria (35°C a pH de 5.5), se encontró que *B. megaterium* creció en medio adicionado con cobre (10 ppm Cu^{2+}). Contrario a lo que se esperaba, no se observó crecimiento suficiente en el medio control, por lo que sólo se presentan los datos de la cinética en medio con el metal (Figura 13). La curva de crecimiento mostró un comportamiento típico sigmoideal, alcanzando la fase estacionaria entre las 48 y 72 h.

La baja densidad celular observada en el medio control (absorbancias < 0.050) (datos no presentados) se puede atribuir a los requerimientos de cobre por parte de la bacteria. Esto tomando en consideración el papel de este metal como elemento esencial para el desarrollo de los microorganismos, en particular los tolerantes a metales.

Los parámetros cinéticos de crecimiento de *Bacillus megaterium* en medio adicionado con Cu^{2+} , estimados a partir del ajuste de los datos experimentales al modelo matemático de Verhulst-Pearl, se presentan en la Tabla 4.

En este estudio, la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) obtenida para *B. megaterium* (en el medio diseñado + 10 ppm Cu^{2+}) fue menor a la reportada por Álvarez-Villa y col. (2018) para *B. cereus* en medio de cultivo líquido LB adicionado con 50 ppm Cu^{2+} y pH 6 en un cultivo en lote ($\mu_{\text{max}} = 0.55 \text{ h}^{-1}$), encontrando una diferencia notable de más de tres órdenes de magnitud para *B. cereus*.

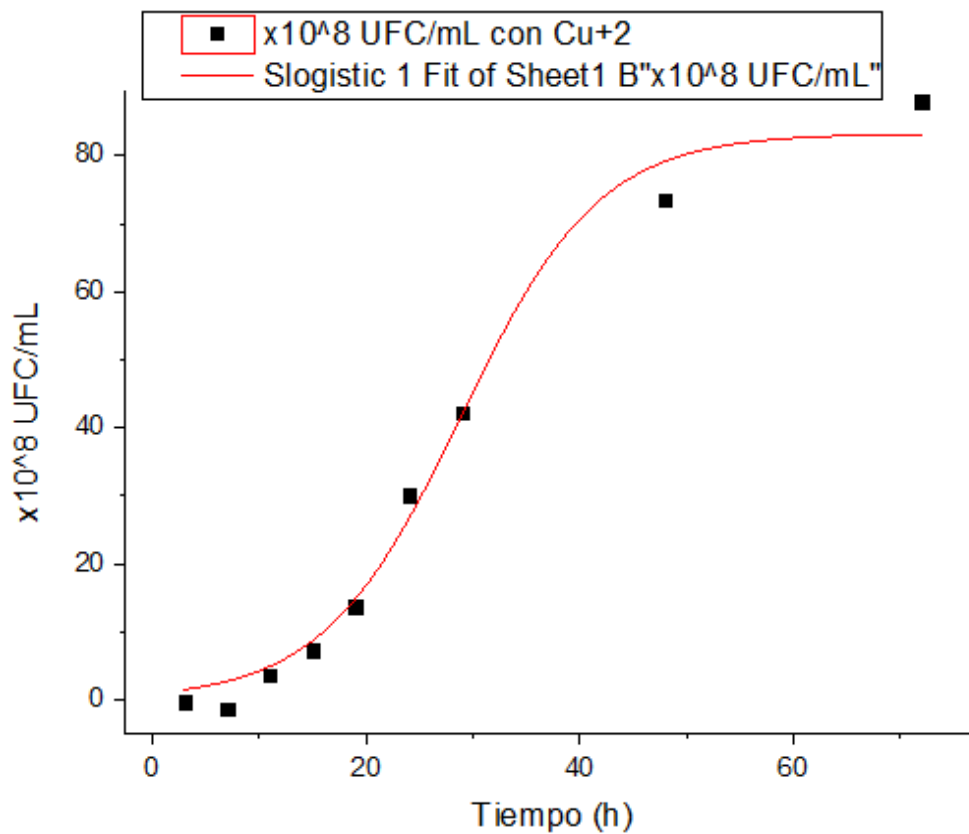


Figura 13. Cinética de crecimiento de *Bacillus megaterium* (UFC/mL) en medio con cobre, a 35°C y pH de 5.5, ajustada al modelo de Verhulst-Pearl.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento de *Bacillus megaterium* en medio adicionado con Cu^{2+} (10 ppm), a 35°C y pH de 5.5, estimados mediante el modelo de Verhulst-Pearl.

	X_{\max} (UFC/mL)	μ_{\max} (h^{-1})	t_m (h)	t_d (h)	R^2
cobre	83.26	0.155	28.87	4.47	0.9859

X_{\max} = Concentración máxima de microorganismos; μ_{\max} = velocidad específica de crecimiento máxima; t_m = tiempo a la mitad de la concentración máxima del microorganismo; t_d = tiempo de duplicación.

Asimismo, el tiempo (t_m) en el cual se obtuvo la mitad de la concentración máxima de biomasa (X_{max}) para *B. cereus* fue de 12.38 h (Álvarez-Villa y col., 2018), que corresponde a la mitad del valor de t_m obtenido en este estudio para *B. megaterium*. En ambos estudios el coeficiente de determinación (R^2) fue > 0.9859 , lo que indica que los datos experimentales se ajustaron bien al modelo matemático utilizado.

Lo anterior indica que la velocidad de crecimiento de *B. megaterium* es más lenta. Estos resultados sugieren que ambas especies de *Bacillus* presentan requerimientos nutricionales similares; sin embargo, el aprovechamiento de los nutrientes puede diferir en función del tipo de medio de cultivo y la asimilación de las fuentes de los nutrientes. Otras variables que pueden influir en el metabolismo de la bacteria son la presencia de factores de crecimiento y la concentración de metal presente en el medio.

6.3.2. *Rhodotorula mucilaginosa*

Al observar el efecto combinado del pH y de la temperatura sobre el crecimiento de la levadura, se encontró que ambos factores afectan la producción máxima de biomasa en medio líquido Czapek, con y sin cobre (Figura 14). Sin embargo, la presencia del metal (10 ppm Cu^{2+}) favoreció el crecimiento de la levadura, encontrando una mayor densidad de células a pH de 5.5 y a 28°C, con respecto al control.

En este estudio, es importante señalar que independientemente de la presencia de cobre en el medio, la producción de biomasa se vio favorecida a la menor temperatura analizada (28°C) y el desarrollo de la levadura se incrementó conforme aumentó el pH del medio de cultivo (Figuras 14 y 15).

Al comparar el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* en ambos medios de cultivo, con y sin cobre, se encontró que el metal favorece el desarrollo de la levadura (Figura 15).

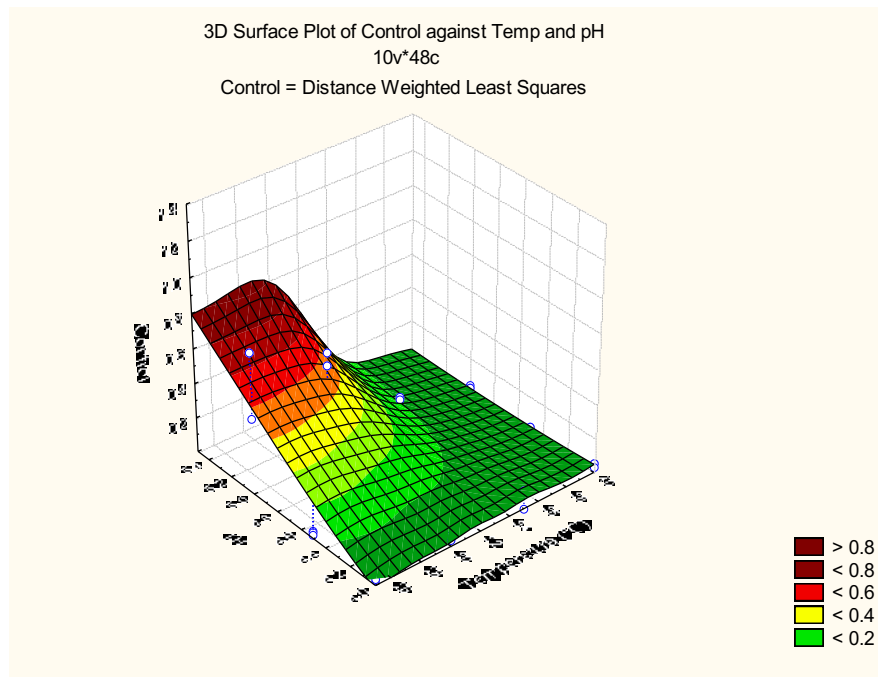


Figura 14. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de la temperatura y pH sobre el crecimiento (D.O.₆₀₀) de *Rhodotorula mucilaginosa*, a las 24 h, en medio de cultivo Czapek sin cobre (control).

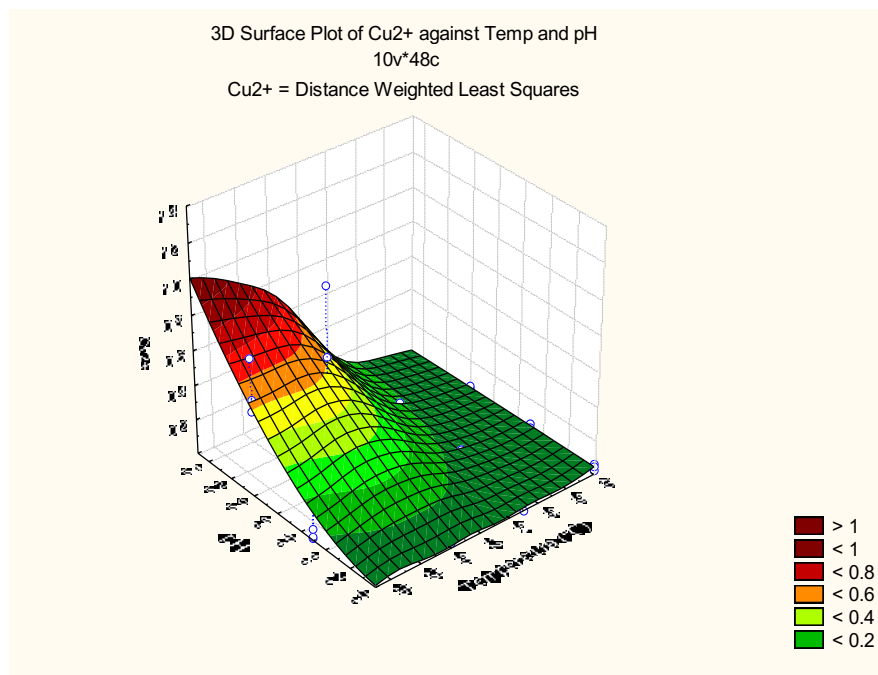


Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de la temperatura y el pH sobre el crecimiento (D.O.₆₀₀) de *Rhodotorula mucilaginosa*, a las 24 h, en medio de cultivo Diseñado y adicionado con cobre (10 ppm Cu²⁺).

En cuanto a la captación de cobre por especies de hongos tolerantes a metales, en algunos estudios se ha reportado que la presencia del metal favorece el desarrollo y metabolismo fúngico (Kan y col. 2019). Por ejemplo, Contreras-Cortés y col. (2020) reportaron que *Aspergillus australensis* es capaz de crecer en medio de cultivo adicionado con elevadas concentraciones de cobre (como CuSO_4), observando su crecimiento hasta con 1000 ppm de Cu^{2+} . De acuerdo con estos autores, el cobre participa directamente en el metabolismo microbiano y se le considera esencial para realizar diversas funciones celulares. Sirve como cofactor esencial para varias enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, incluidas las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, entre otras.

A partir de los resultados experimentales obtenidos al evaluar el efecto del pH y de la temperatura en ambos microorganismos, se realizó una cinética de crecimiento a 25°C en medio de cultivo con pH ajustado a 5.5, por ser las condiciones en donde se obtuvo la mayor densidad celular (X_{max}). Al observar los gráficos de la cinética de crecimiento en medio con y sin cobre se encontró una producción de levaduras (UFC/mL) ligeramente mayor en el medio con Cu^{2+} (Figura 16).

Los parámetros cinéticos de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio adicionado con Cu^{2+} , estimados a partir del ajuste de los datos experimentales al modelo de Verhulst-Pearl, se presentan en la tabla 5.

De acuerdo con los parámetros estimados, el crecimiento de la levadura fue similar en ambos medios de cultivo, con y sin cobre. No obstante, los valores obtenidos confirmaron que *Rhodotorula mucilaginosa* mostró un mejor desarrollo celular (X_{max}) en presencia del metal (10 ppm Cu^{2+}), lo cual se puede asociar a la adaptación a estos contaminantes metálicos. En estudios utilizando los hongos tolerantes al cobre *R. taiwanensis* (Álvarez-Villa, 2018) y *Aspergillus australensis* (Contreras-Cortés y col. 2020) aislados de la misma región del Río San Pedro, se han encontrado resultados similares a los del presente estudio.

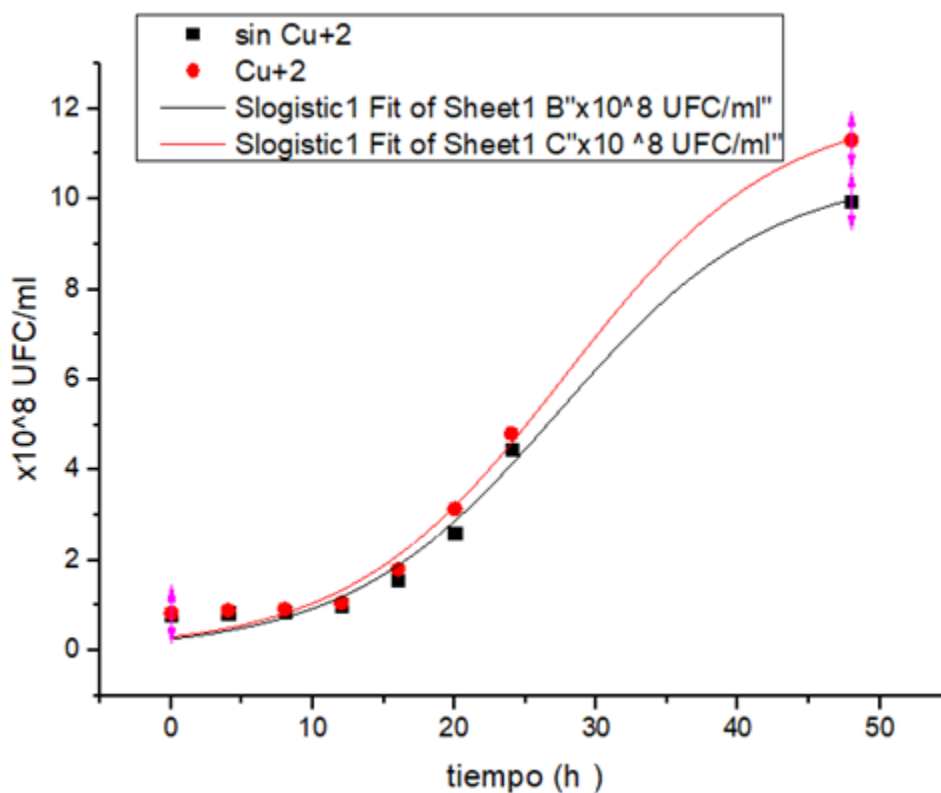


Figura 16. Cinética de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* (UFC/mL) en medio control y con cobre (10 ppm Cu²⁺), a 25°C, a pH de 5.5, ajustada al modelo de Verhulst-Pearl.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de *Rhodotorula mucilaginosa*.

Medio de cultivo	X_{max} (UFC/mL)	μ_{max} (h ⁻¹)	t_m (h)	t_d (h)	R^2
Sin cobre	10.60	0.135	27.37	5.14	0.9848
Cu ²⁺	12.08	0.133	27.67	5.20	0.9897

Concentración máxima de microorganismos (X_{max}); velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}); tiempo al cual se produce la mitad de la concentración máxima del microorganismo (t_m); tiempo de duplicación (t_d).

En este trabajo, la velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) obtenida para *R. mucilaginosa* (en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu^{2+}) fue menor a la reportada por Álvarez-Villa y col. (2018), quien encontró una $\mu_{\max} = 0.22 \text{ h}^{-1}$ para *R. taiwanensis* en medio de cultivo líquido YPG (adicionado con 100 ppm Cu^{2+} , a pH 5), utilizando un cultivo en lote. Sin embargo, el tiempo de duplicación (t_m) obtenido para *R. taiwanensis* fue de 28.66 h (Álvarez-Villa y col. 2018), que es similar al t_m obtenido para *R. mucilaginosa* en este estudio. El coeficiente de determinación (R^2) fue > 0.98 , indicando que los datos experimentales se ajustaron bien al modelo matemático utilizado.

En un estudio reciente, Contreras y col. (2020) reportaron una $\mu_{\max} = 0.019 \text{ h}^{-1}$ para *Aspergillus australensis* tolerante a cobre (en medio líquido Czapek + 50 ppm Cu^{2+}), el cual fue menor al valor encontrado para *R. mucilaginosa*. Estos autores evaluaron además la tolerancia al metal utilizando cinéticas de crecimiento radial en agar dextrosa Saboraud (con concentraciones de 50-2500 ppm de CuSO_4), encontrando que el hongo fue capaz de crecer en medio con hasta 1200 ppm; Asimismo, reportaron un notable aumento ($p < 0.05$) del crecimiento radial de *A. australensis* en el medio con 250 ppm de cobre, lo que se asoció a la tolerancia.

Lo anterior, aunado a las concentraciones de cobre estudiadas en los bioensayos, puede explicar la falta de crecimiento de *B. megaterium* en medio control (sin cobre), así como el mejor desarrollo de *R. mucilaginosa* en el medio con cobre, ya que ambos fueron aislados de sedimentos recolectados en el mismo ecosistema, la región del río San Pedro, en Cananea, Sonora, México.

6.4. Efecto sobre organelos subcelulares

Se realizaron tinciones con marcadores fluorescentes con el fin de observar los organelos subcelulares de *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa* después de crecer en medio con y sin Cu (II). Específicamente, se determinó el efecto del metal sobre la integridad de la membrana plasmática, biopolímeros de la pared celular y gránulos de polihidroxialcanoatos,

además de evidenciar el efecto asociado a la inducción de estrés oxidativo general y viabilidad de las células microbianas. Las observaciones de las preparaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia (DMi8, Leica, USA).

6.4.1. *Bacillus megaterium*

En el campo claro se observaron células en forma de bacilos, alargadas y arregladas principalmente en forma de cadena, encontrando una mayor cantidad de células en el medio líquido diseñado, adicionado con cobre (10 ppm Cu^{2+}), con pH ajustado a 5.5 (Figuras 17 y 18).

6.4.1.1. Integridad de la membrana plasmática

El efecto del metal sobre la integridad de la membrana se determinó utilizando yoduro de propidio como fluorocromo. En ambos medios de cultivo se observaron células teñidas de color rojo intenso, característico del yoduro de propidio (Figuras 19 y 20). Sin embargo, en el medio adicionado con el metal se encontró mayor intensidad de la fluorescencia en el interior de las células, observándose mayor cantidad de bacterias teñidas. Esto indica que, a esta concentración de cobre, el metal es capaz de ocasionar afectaciones en la integridad de la membrana celular bacteriana, indicado por el ingreso del colorante a las células.

Tomando en cuenta que *Bacillus megaterium* es una bacteria tolerante a cobre (Rodríguez-Córdova, 2018), es posible deducir que la presencia de cobre sea capaz de inducir afectaciones en la integridad de la membrana; sin embargo, las evidencias señalan que, a pesar de estas afectaciones, las células se encuentran viables. Esto se puede asociar a la capacidad de adaptación de la bacteria a contaminantes metálicos como el cobre.

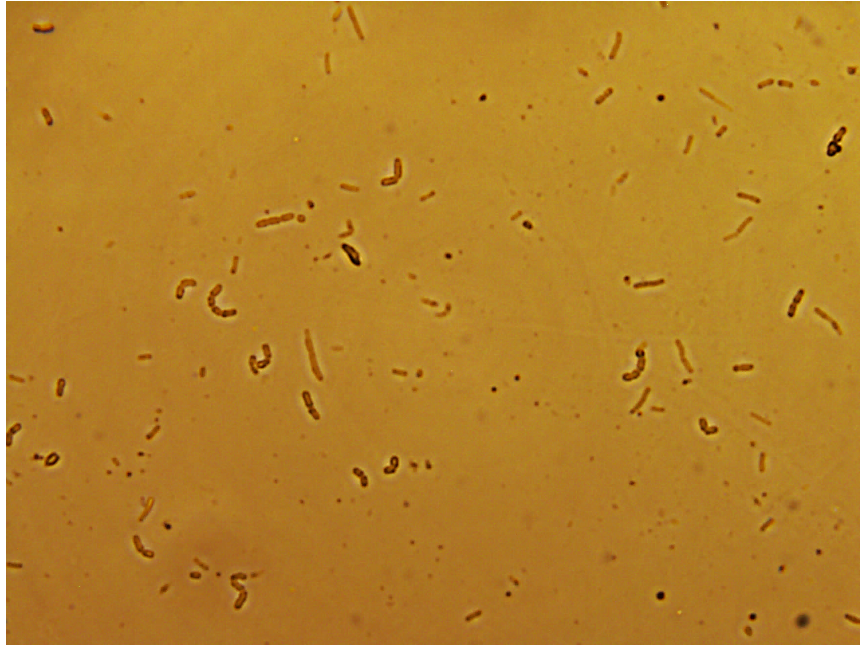


Figura 17. Células de *Bacillus megaterium* inoculado en medio líquido Diseñado control (sin Cu^{2+}), a 35°C , a las 72 h, a 40x, en campo claro.

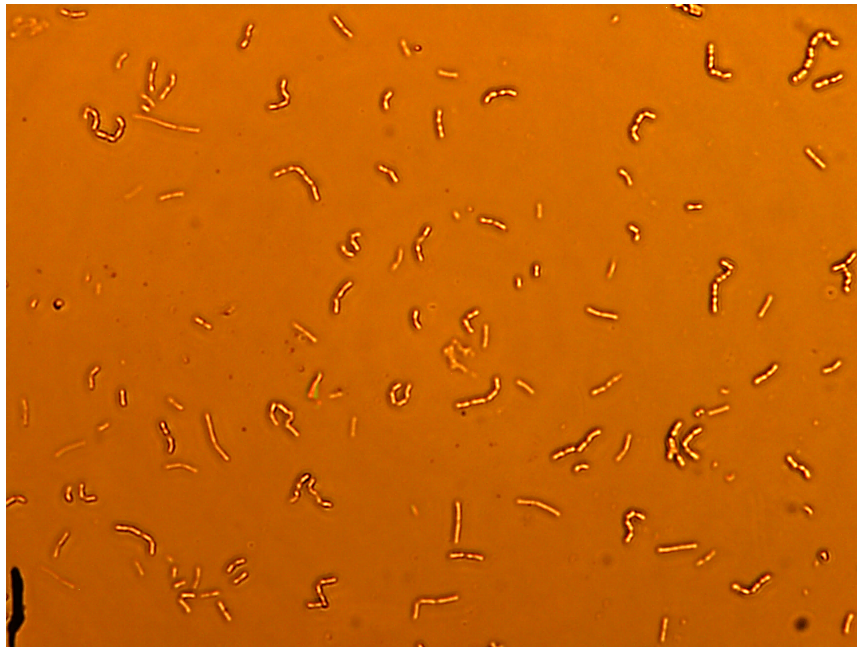


Figura 18. Células de *Bacillus megaterium* inoculado en medio líquido Diseñado adicionado con Cu^{2+} (10 ppm), a 35°C , a las 75 h, a 40x, en campo claro.

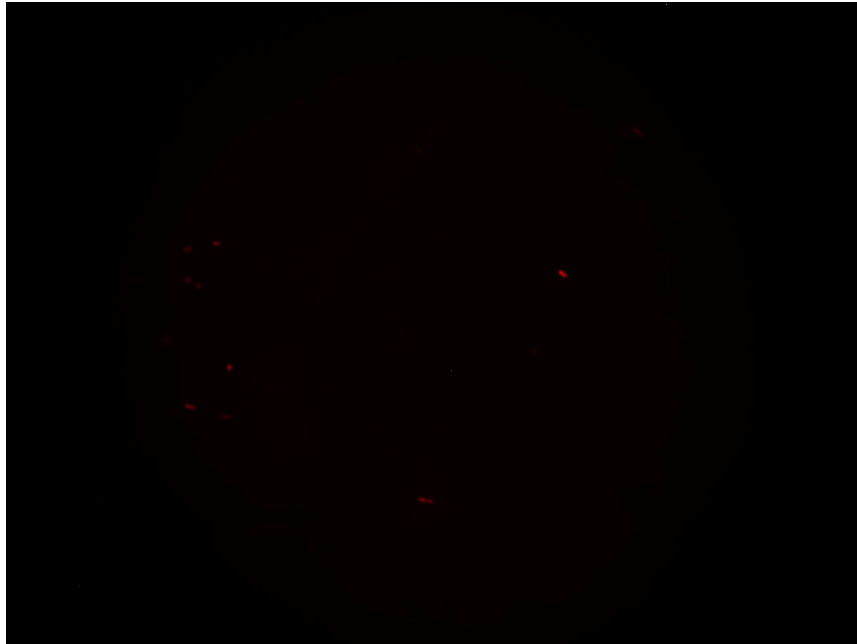


Figura 19. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido Diseñado control (sin Cu^{2+}), a 35°C , a las 72 h, teñidas con yoduro de propidio, a 40x.

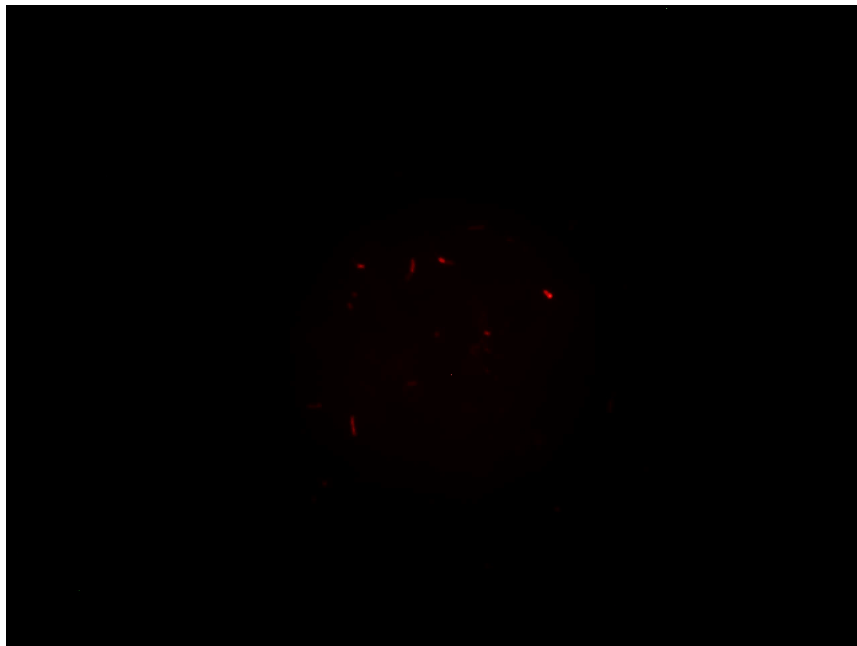


Figura 20. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido Diseñado y adicionado con Cu^{2+} (10 ppm), a 35°C , a las 72 h, teñidas con yoduro de propidio, a 40x.

6.4.1.2. Biopolímeros de la pared celular

Para observar el efecto del cobre en los biopolímeros de la pared celular se utilizó el marcador Blanco de Calcoflúor, el cual es capaz de unirse a la quitina, celulosa o glucanos presentes en las paredes celulares microbianas, formando un compuesto de color azul fluorescente intenso que permite evidenciar la localización de estos biopolímeros en las estructuras microbianas.

En este trabajo, al observar las bacterias desarrolladas en el medio control se encontró mayor intensidad en la fluorescencia y mayor cantidad de células teñidas con respecto a las células desarrolladas en presencia de Cu^{2+} (10 ppm) (Figuras 21 y 22).

En la figura 22 se aprecia una escasa presencia de células bacterianas teñidas, lo cual se puede relacionar con una posible interferencia entre el colorante y el metal, impidiendo la interacción con los componentes (por ejemplo, con peptidoglucano, péptidos, entre otros) presentes en la pared celular de la bacteria.

De acuerdo con Marrero-Coto y col. (2010), la acumulación de iones metálicos en la célula bacteriana puede ocurrir en la membrana, el espacio periplasmático y el interior de la célula (citoplasma). Entre la bicapa lipídica intervienen polímeros estructurales y extracelulares (lipoproteínas, ácido teicoico, peptidoglucano) que interactúan con los metales, atrapándolos dentro de su estructura (bioabsorción) o bien formando complejos con proteínas en el interior de la célula (sistema CopABCD y la proteína CopH, chaperona CopZ y la metalotioneína SmtA), a las cuales se unen evitando su interacción con otras proteínas esenciales para el microorganismo.

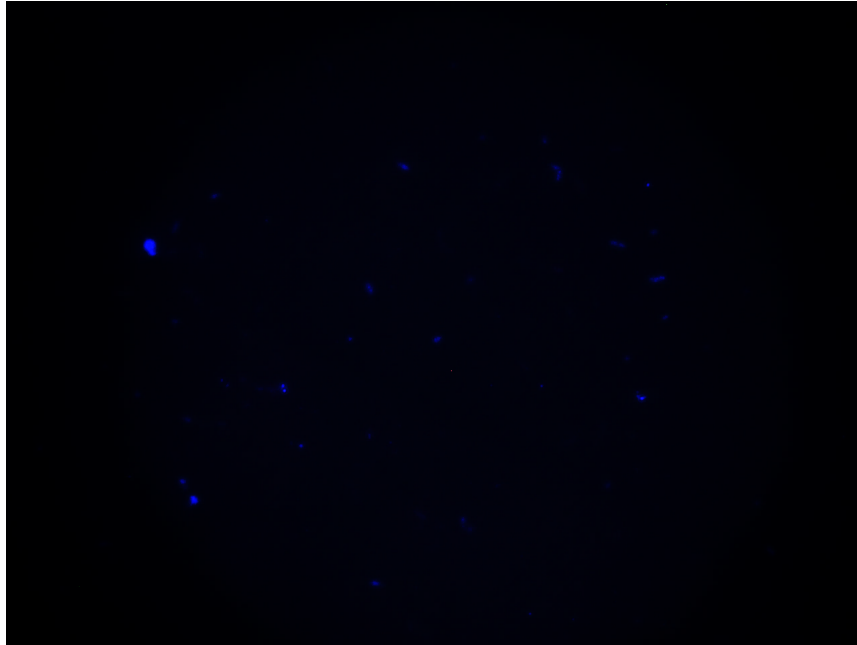


Figura 21. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido diseñado control (sin Cu^{2+}), a 35°C , a las 72 h, teñidas con Blanco de Calcoflúor, a 40x.



Figura 22. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido diseñado y adicionado con Cu^{2+} (10 ppm), a 35°C , a las 72 h, teñidas con Blanco de Calcoflúor, a 40x.

6.4.1.3. Estrés oxidativo general

Para evaluar el efecto del cobre sobre la inducción de estrés oxidativo general se utilizó el biomarcador 2,7-diclorofluorescein diacetato (DCFH₂-DA), una sonda permeable y no fluorescente. Cuando el DCFH₂-DA ingresa a la célula, los grupos lipofílicos de la molécula se liberan por acción de las enzimas esterasas en respuesta al metabolismo oxidativo, dejando la molécula cargada. Posteriormente, cuando ésta se oxida por las especies reactivas al oxígeno (ROS) o peroxidasas, el DCFH₂-DA se desesterifica en un compuesto que emite una fluorescencia intensa de color verde (Gálvez-Iriqui y col. 2019).

Se encontró una mayor intensidad de la fluorescencia en las bacterias desarrolladas en el medio control con respecto a las inoculadas en el medio adicionado con cobre (Figuras 23 y 24). Además, fue posible observar que en presencia del metal se desarrolló mayor cantidad de células, aunque la fluorescencia fue más débil. Esto se puede atribuir a la tolerancia a metales por la bacteria, que fue aislada de una región dedicada a la actividad minera; a su vez, puede explicar la mayor intensidad observada en las células desarrolladas en ausencia del metal (Figura 23).

Estudios previos han reportado que las interacciones entre los microorganismos y diversos metales constituye una base para la implementación de métodos de remoción de contaminantes metálicos. En este contexto, dependiendo del estado de oxidación del metal y de la especie microbiana involucrada, pueden realizar dos transformaciones. La primera depende de la movilidad del metal y se denomina biolixiviación microbiana, por ejemplo, la movilidad del Cu²⁺ por algunas bacterias como *Thiobacillus ferrooxidans* y *T. thiooxidans*, cuyo mecanismo ocurre a través de la liberación de sideróforos; estos compuestos son péptidos con capacidad complejante que son liberados al medio con el objeto de captar elementos metálicos como Fe, que es utilizado como oligoelemento en el metabolismo celular. La segunda transformación se asocia a la inmovilización del metal, que a su vez se relaciona con la tolerancia y resistencia microbiana a estos elementos (Vullo, 2003).

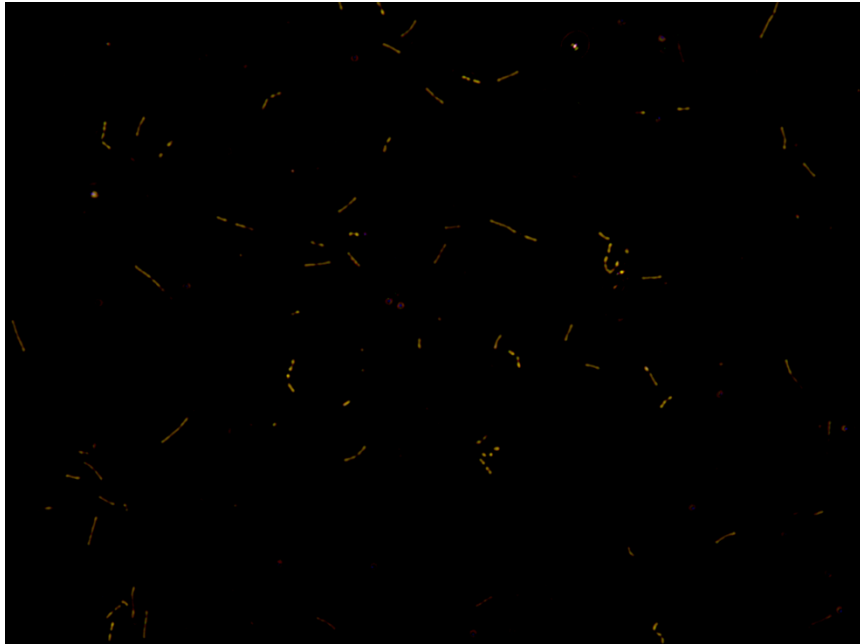


Figura 23. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido diseñado control (sin Cu^{2+}) a 35°C a las 72 h, teñidas con 2,7-diclorofluorescein diacetato, a 40x.

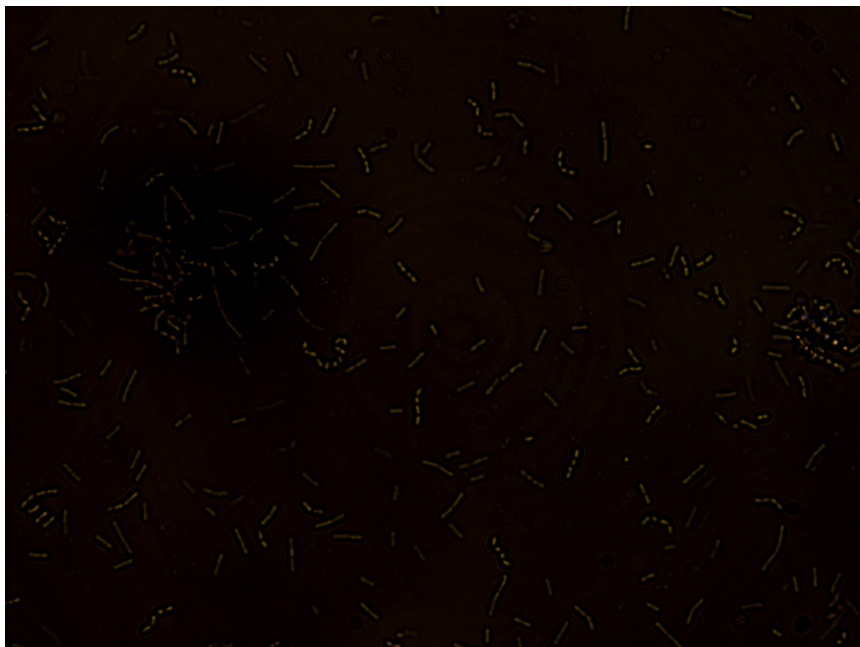


Figura 24. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido diseñado + 10 ppm Cu^{2+} a 35°C a las 72 h, teñidas con 2,7-diclorofluorescein diacetato, a 40x.

Tanto los microorganismos resistentes como los tolerantes son de particular interés para la captación de metales en sitios contaminados debido a que ambos pueden ser capaces de extraer estos contaminantes mediante su inmovilización. La resistencia o tolerancia de las especies microbianas es posible gracias a diferentes mecanismos entre los que se encuentra la absorción (Vullo, 2003).

La absorción de metales por los microorganismos es un proceso complicado que depende de la química de los iones metálicos, las características superficiales de las estructuras microbianas, la fisiología celular y la influencia fisicoquímica del medio ambiente, por ejemplo, el pH, temperatura y concentración de metales. Se ha reportado que los metales pesados y otros contaminantes aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como O^{2-} , OH^- y H_2O_2 . Las enzimas antioxidantes pueden prevenir el estrés oxidativo eliminando las ROS o reduciendo el glutatión oxidado a su forma reducida. Por ejemplo, los radicales superóxido (O^{2-}) generados se convierten en H_2O_2 por la acción de superóxido dismutasa. Además, la catalasa, la peroxidasa o el ciclo del glutatión del ascorbato previenen la acumulación celular de H_2O_2 en el que la peroxidasa de ascorbato la reduce a H_2O (Hussein y Joo, 2013).

6.4.1.4. Viabilidad celular

La viabilidad de las células desarrolladas en medio con y sin cobre se evaluó mediante el kit de doble tinción (live/dead cells kit, 04511, Sigma, USA). Este kit contiene calceína-AM y Ioduro de propidio (PI), que tiñen las células viables (verde) y muertas (rojo), respectivamente. La calceína-AM (éster acetoximetílico de calceína) es una molécula altamente lipofílica, no fluorescente y permeable a la membrana celular, que reacciona con las enzimas esterases de las células vivas emitiendo una fuerte fluorescencia de color verde. Alternativamente, el yoduro de propidio es un colorante no permeable capaz de llegar al núcleo pasando por áreas desordenadas de la membrana celular muerta o comprometida, tras lo cual se intercala con la doble hélice de ADN de la célula y emite una fluorescencia de color rojo (Contreras-Cortés y col., 2020).

El efecto del cobre sobre la viabilidad de *Bacillus megaterium* se muestra en las figuras 25 y 26. En ambos medios de cultivo se encontraron células vivas y muertas, siendo posible detectar una mayor cantidad de células muertas (rojas) en el medio control (Figura 25). Asimismo, en el medio control se observó una gran cantidad de células desarrolladas, las cuales se tiñeron de color amarillo-verde limón en lugar del color verde característico. El color amarillo-verde se puede atribuir al estrés ocasionado por el desarrollo en ausencia de cobre, lo cual es congruente con las evidencias encontradas en torno al estrés oxidativo general (Figura 23). A pesar del estrés, es posible que las células se encontraran viables ya que no permitieron el ingreso del yoduro de propidio.

Contrario a lo que se esperaba, en las bacterias desarrolladas en presencia de cobre se observaron señales de fluorescencia con menor intensidad en comparación con el control (Figura 26). Esto se puede atribuir a posibles interferencias entre los biomarcadores y el metal, reduciendo la formación de complejos de ambos colorantes con las estructuras de la célula.

6.4.1.5. Gránulos de polihidroxialcanoato

El polihidroxialcanoato (PHA) es un polímero de éster que funciona como una fuente de energía y carbono en células procariontas y eucariotas, en donde puede existir en forma de gránulos o cuerpos de inclusión. Se ha reportado que los gránulos de PHA están relacionados con los mecanismos de defensa bajo condiciones de estrés en los microorganismos, como por ejemplo la exposición a metales como el cobre. El colorante azul Nilo exhibe una alta especificidad por el polihidroxibutirato (PHB) y fluoresce de color naranja en el interior de las células (Contreras-Cortés y col., 2020).

En este trabajo, al teñir las células desarrolladas en el medio control no se observaron señales de fluorescencia (Figura 27), lo que indica que las bacterias no produjeron gránulos de PHAs. Por el contrario, en las células inoculadas en el medio de cultivo adicionado con cobre (10 ppm) se observaron pequeños gránulos teñidos de color naranja (Figura 28), confirmando la producción de PHAs en presencia del metal.

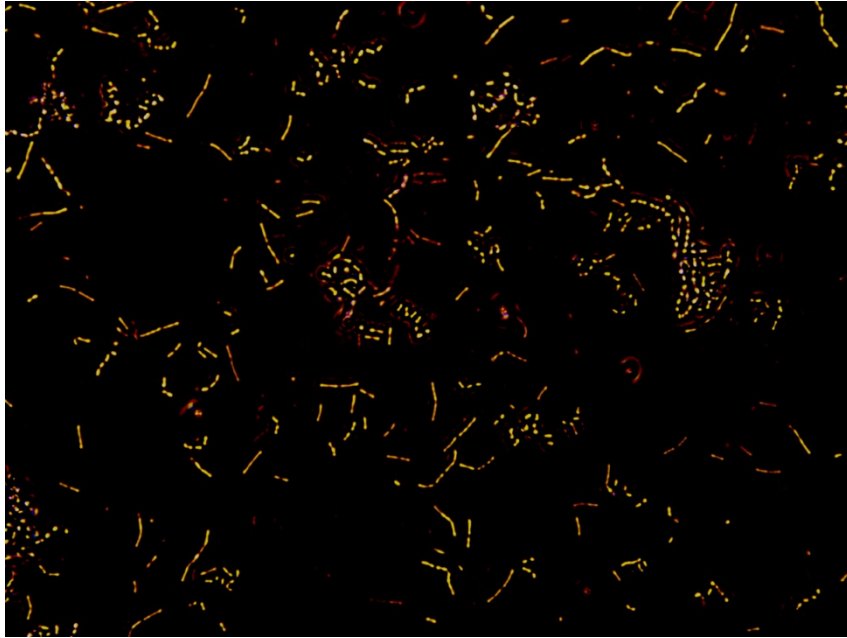


Figura 25. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido diseñado control (sin Cu^{2+}), a 35°C , a las 72 h, teñidas con el kit de viabilidad (live/dead cell kit), a 40x.

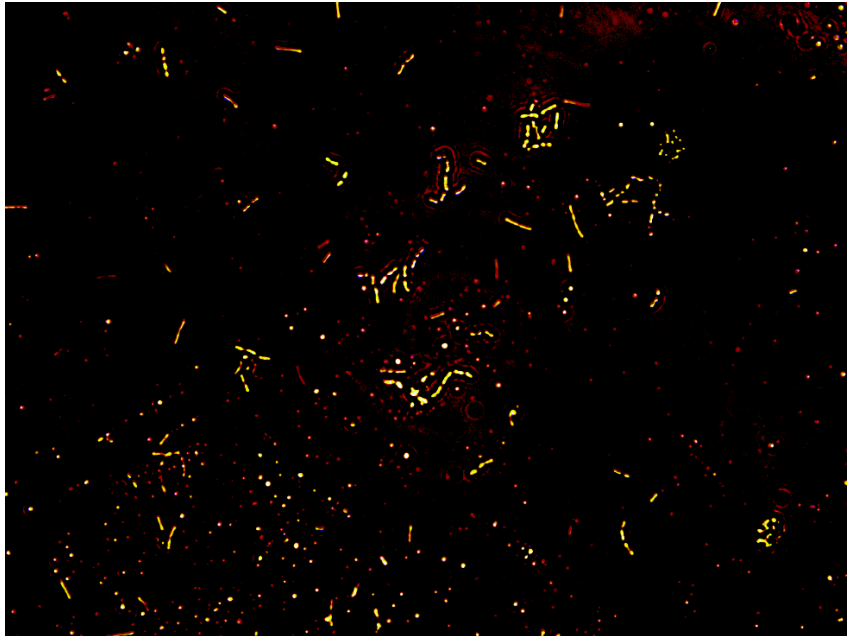


Figura 26. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido diseñado + Cu^{2+} (10 ppm), a 35°C , a las 72 h, teñidas con el kit de viabilidad (live/dead cell kit), a 40x.

En estudios previos se ha reportado que el colorante azul Nilo es más efectivo para teñir los gránulos de polihidroxibutirato (PHB) producidos por bacterias cultivadas en medios líquidos, como por ejemplo especies de *Bacillus megaterium* productoras de PHA (Bello-Gil y Brandl, 2007; De Almida y col., 2004).

Según De Almida y col. (2004), bacterias como *Bacillus megaterium* sintetizan PHA mediante un camino metabólico que involucra a las enzimas β -cetotiolasa, acetoacetil-CoA reductasa y una polimerasa. Además, estas bacterias son capaces de responder favorablemente ante condiciones adversas tales como escasas de nutrientes, cambios de temperatura, estrés osmótico y estrés oxidativo general.

Además, los microorganismos metalotolerantes de interés biotecnológico para propósitos de biorremediación (como por ejemplo *Thiobacillus ferrooxidans* y *T. thiooxidans*) pueden llevar a cabo mecanismos de biolixiviación en donde comúnmente existen reacciones de oxidación con metales, tal es el caso del cobre. Esto forma parte de los mecanismos de resistencia y/o tolerancia a metales en bacterias (Vullo y col., 2003).

Las reacciones de oxidación relacionadas con el metabolismo de bacterias tolerantes a metales pesados pueden explicar las interferencias observadas al realizar la tinción de las preparaciones bacterianas con Blanco de Calcoflúor (Figura 22), en donde se detectó una débil señal de fluorescencia.



Figura 27. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido diseñado control, a 35°C, a las 72 h, teñidas con Azul Nilo, a 40x.

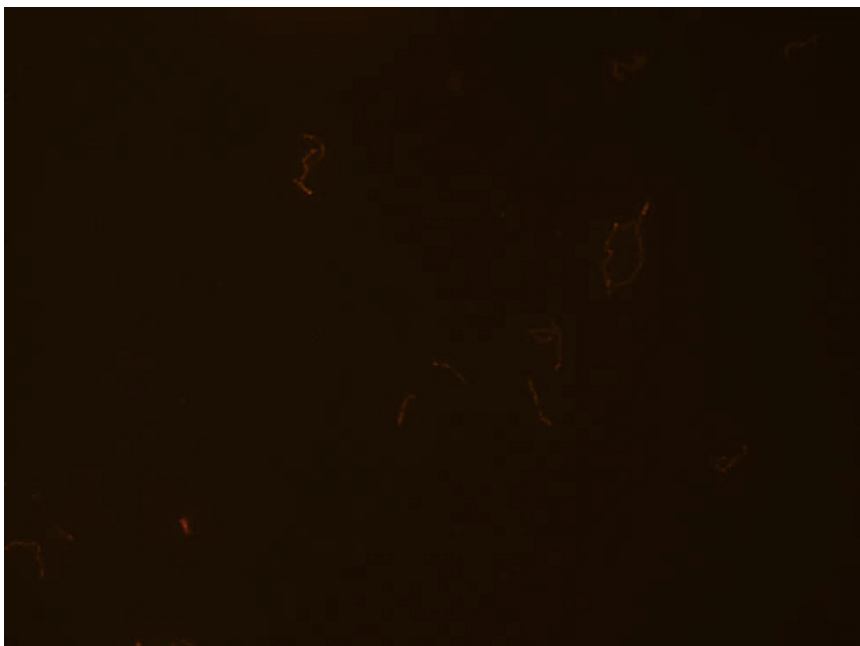


Figura 28. Células de *Bacillus megaterium* en medio líquido diseñado + Cu^{2+} (10 ppm), a 35°C, a las 72 h, teñidas con Azul Nilo, a 40x.

6.4.2. *Rhodotorula mucilaginosa*

Para observar el efecto del cobre en los organelos subcelulares de la levadura, se realizaron tinciones con colorantes fluorescentes siguiendo los protocolos utilizados para *B. megaterium*. Previamente a las tinciones con los biomarcadores, se realizaron observaciones de las levaduras en campo claro, encontrando diferencias estructurales notables en las desarrolladas en el medio líquido adicionado con 10 ppm de cobre (Figuras 29 y 30). Se encontró que las cultivadas en presencia de cobre presentaron vacuolas grandes en comparación con el control, además de mayor cantidad de células en crecimiento (Figura 30).

Contreras-Cortés y col. (2020) menciona que la acumulación se puede atribuir a varios grupos químicos tales como el grupo acetamido de la quitina, grupos amino y fosfato en ácidos nucleicos, grupos amino, amido, sulfhidrilo y carboxilo en proteínas e hidroxilos en polisacáridos ya que estos pueden atraer o unir iones metálicos. Además de las metalotioneínas, otros componentes, por ejemplo, la fitoquelatina y la enzima superóxido dismutasa, podrían participar en la unión de metales.

6.4.2.1. Integridad de la membrana plasmática

Con el fin de analizar el efecto del metal sobre la integridad de la membrana de la levadura, se utilizó yoduro de propidio como biomarcador. Tanto en el medio control como en el medio adicionado con cobre se observaron células teñidas de color rojo intenso, propio del yoduro de propidio (Figuras 31 y 32).

En el medio adicionado con cobre se evidenció mayor intensidad de la fluorescencia en el interior de las células con respecto a las levaduras inoculadas en el medio control, lo cual es similar a lo observado con *B. megaterium*. Esto sugiere que la concentración utilizada del metal (10 ppm Cu^{2+}) es capaz de ocasionar afectaciones en la integridad de las membranas celulares microbianas, procariota y eucariota, con el consecuente ingreso del colorante a la célula.

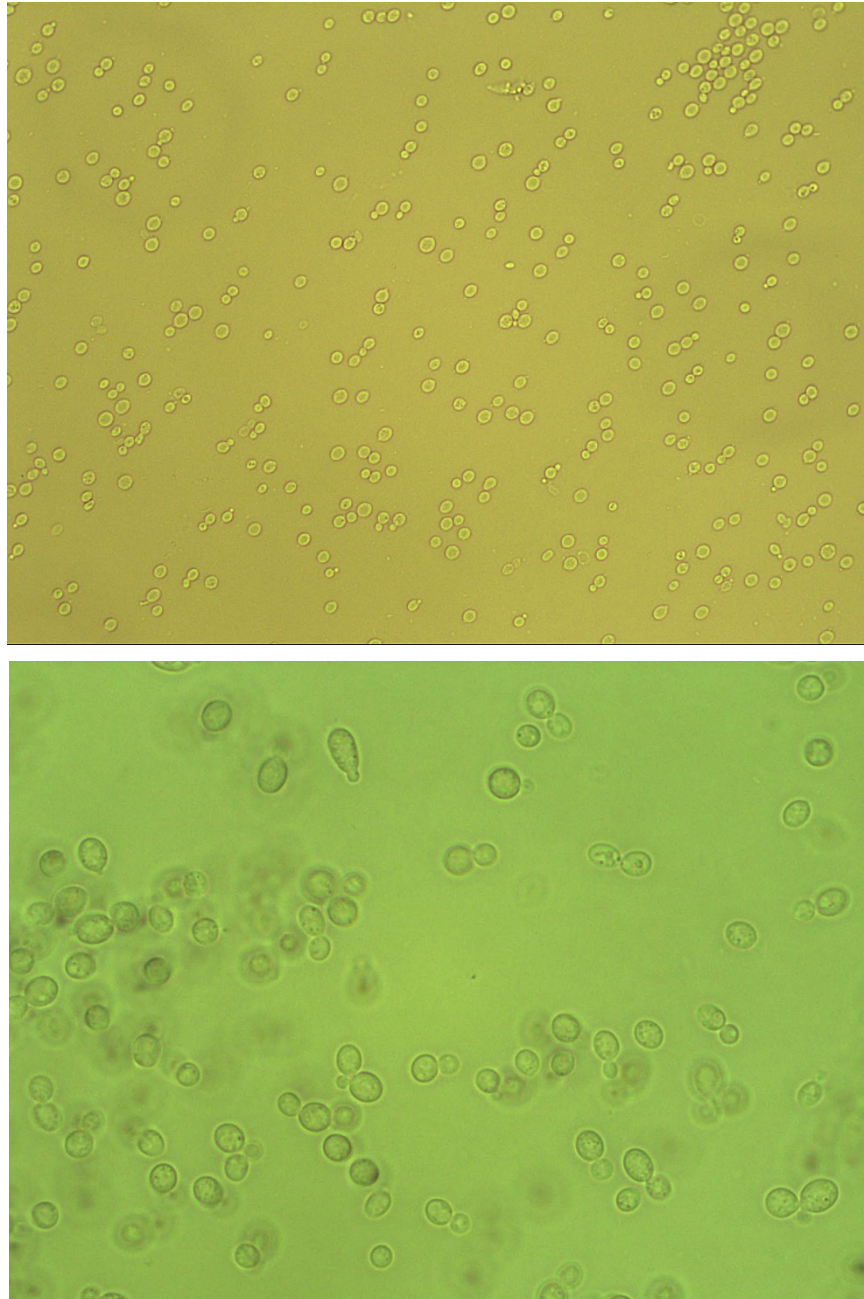


Figura 29. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek (control), a 28°C, a las 24 h, observadas en campo claro, a 40x y 100x.

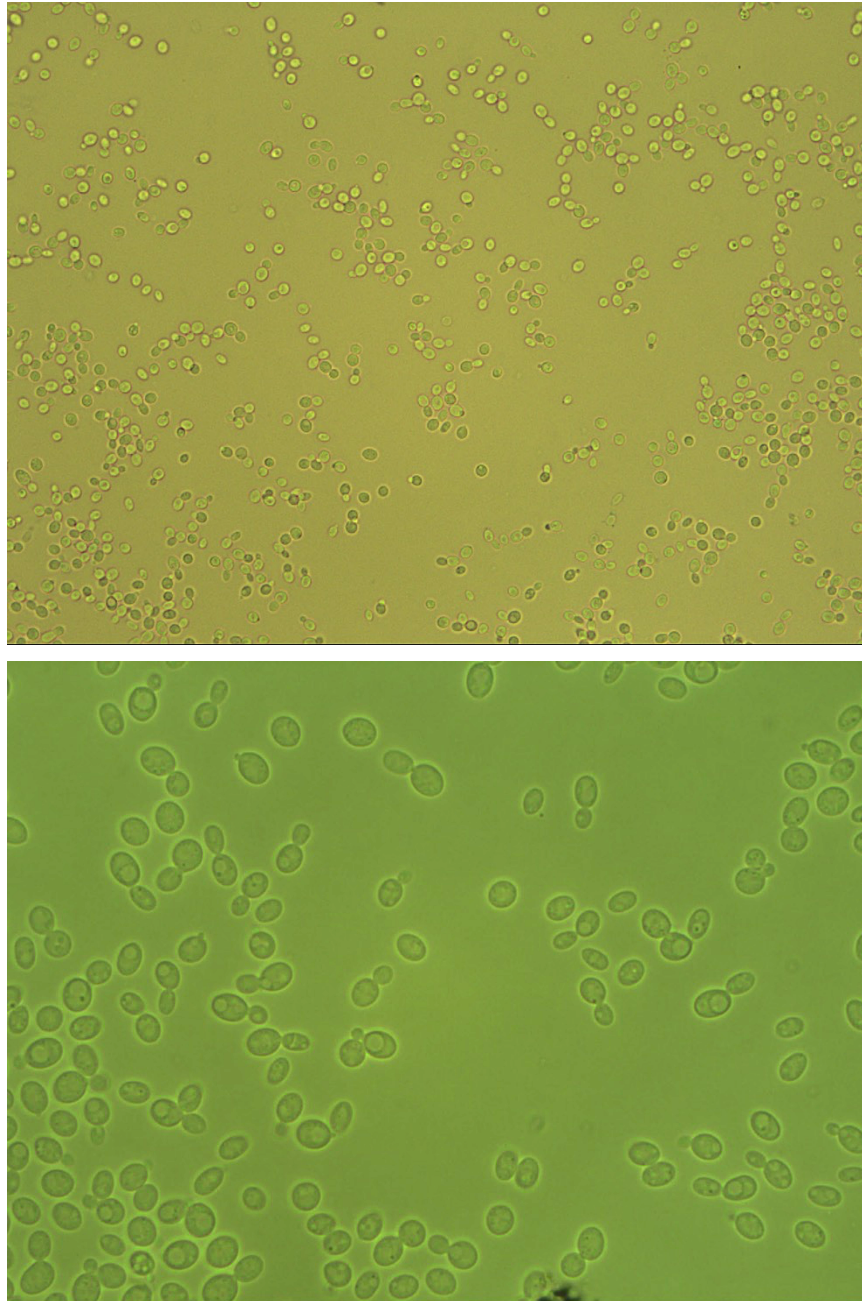


Figura 30. Célula de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu^{2+} , a 28°C , a las 24 h, observadas en campo claro, a 40x y 100x.

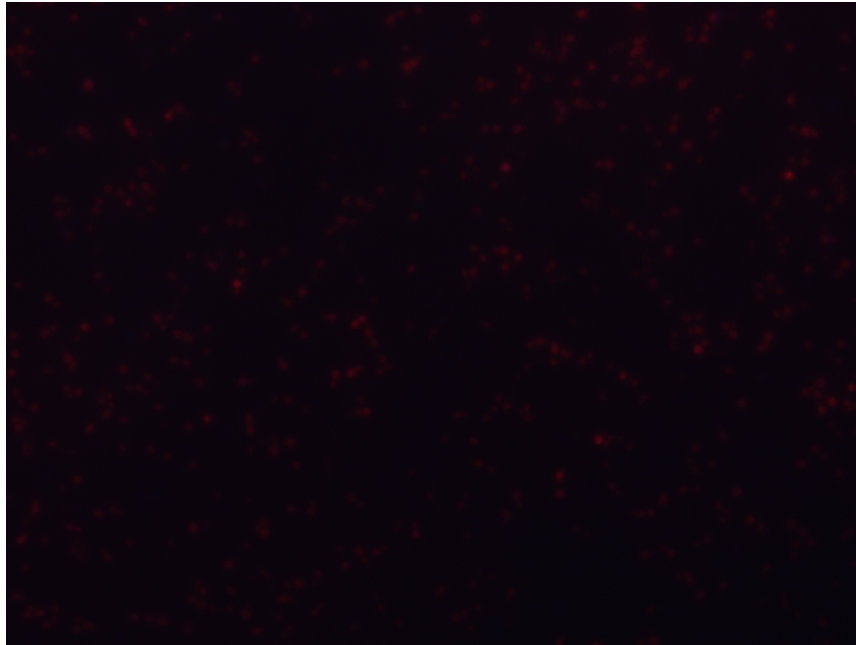


Figura 31. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con yoduro de propidio, a 40x.



Figura 32. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu²⁺, a 28°C, a las 24 h, teñidas con yoduro de propidio, a 40x.

Contreras-Cortés y col. (2020) encontraron que el hongo filamentoso *Aspergillus australensis* tolerante a cobre fue capaz de crecer bajo condiciones de estrés en medios formulados con 250 ppm del metal (Cu^{2+}). Al teñir las estructuras fúngicas con yoduro de propidio se observó un color rojo intenso en el interior, confirmando la interacción del yoduro de propidio (IP) con el ADN del hongo. Esto indica que los metales pesados como el cobre pueden inducir importantes afectaciones de la membrana celular de los hongos, tanto levaduriformes como filamentosos.

De acuerdo con la literatura, la peroxidación total de lípidos, relacionada con la conversión de lípidos insaturados en hidroperóxidos de lípidos polares, puede aumentar la fluidez de la membrana debido a la alteración de los fosfolípidos hidrófobos.

Otro factor que puede influir de manera importante en las funciones membranales es el estrés ocasionado por metales, lo cual se ha asociado con una mayor fluidez de la membrana debido a su permeabilización y al consecuente flujo de solutos citosólicos (Avery, 2001). Esto puede explicar la pérdida de la integridad de la membrana celular de la levadura después de la exposición al cobre, dando como resultado un incremento en la fluidez de la membrana y la permeabilización de los biomarcadores a la célula.

6.4.2.2. Biopolímeros de la pared celular

Para observar el efecto del cobre en los biopolímeros de la pared celular se utilizó el biomarcador Blanco de Calcoflúor, este es capaz de unirse a polímeros estructurales como la quitina, celulosa o glucanos de las paredes celulares microbianas, formando un compuesto de color azul fluorescente intenso que permite evidenciar la localización de estos biopolímeros en dichas estructuras microbianas. En este trabajo se logró observar las células de las levaduras desarrolladas en ambos medios, con y sin cobre. Sin embargo, como era de esperar, en el medio control se encontró una mayor intensidad en la fluorescencia y una mayor cantidad de células teñidas con respecto a las levaduras desarrolladas en presencia de 10 ppm de Cu^{2+} (Figuras 33 y 34).

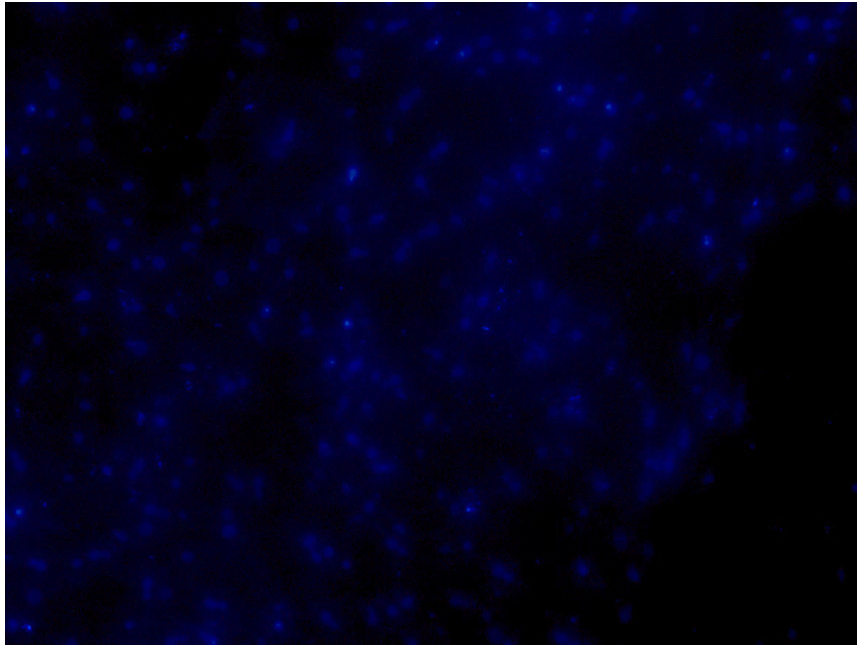


Figura 33. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* desarrolladas en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con Blanco de Calcoflúor, 40x.

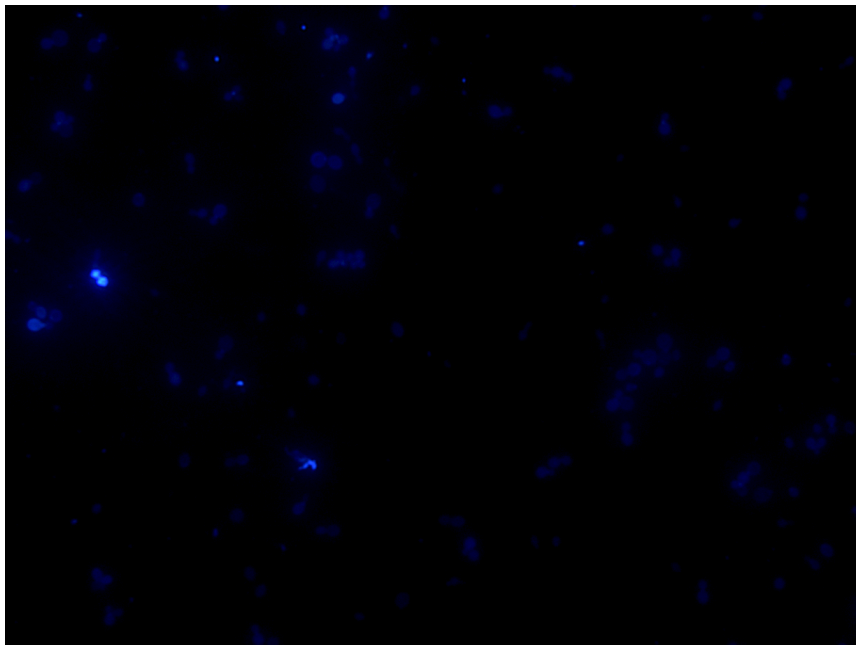


Figura 34. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu²⁺, a 28°C, a las 24 h, teñidas con Blanco de Calcoflúor, a 40x.

En estudios previos se ha demostrado que los metales pesados como el cobre son capaces de inducir afectaciones en la síntesis de biopolímeros de la pared celular en microorganismos fúngicos tolerantes a metales. Por ejemplo, en medio líquido Czapek + 250 ppm de Cu^{2+} , *Aspergillus australiensis* presentó una baja intensidad en la señal de fluorescencia con respecto al control (Contreras-Cortés y col., 2020). Esto indica que la presencia del metal produce afectaciones estructurales en los biopolímeros de la pared celular fúngica, lo cual puede estar relacionado con una disminución en la síntesis de estos polímeros.

Ambas especies de hongos, *Rhodotorula mucilaginosa* y *A. australensis*, son microorganismos provenientes de lixiviados mineros, en donde se encuentran expuestos a diferentes concentraciones de metales (entre ellos el cobre), lo que explica la tolerancia. Estos resultados concuerdan con las evidencias encontradas en la tinción con yoduro de propidio; es posible que este ingrese al interior de la célula con mayor facilidad (e intercalarse con el ADN) al haber menor cantidad de biopolímeros en la pared presentes en las levaduras.

6.4.2.3. Estrés oxidativo general

Para evidenciar el efecto del cobre sobre la inducción de estrés oxidativo general se utilizó el biomarcador 2,7-diclorofluoresceín diacetato (DCFH₂-DA), siguiendo el mismo protocolo utilizado con *Bacillus megaterium* (Gálvez-Iriqui y col., 2019). A diferencia de *B. megaterium*, *Rhodotorula mucilaginosa* presentó mayor cantidad de células fluorescentes cuando la levadura se desarrolló en el medio con cobre (10 ppm Cu^{2+}) con respecto a las del medio control (Figuras 35 y 36). Tomando en consideración que ambos microorganismos fueron aislados de la misma región minera, la detección de estrés oxidativo general se puede atribuir a la tolerancia de la levadura a metales pesados (Figura 35).

Contreras-Cortés y col. (2020) evidenciaron la presencia de estrés oxidativo en *Aspergillus australiensis* expuesto a 250 ppm de cobre, la cual fue similar al control; sin embargo, no se detectó fluorescencia cuando el hongo se expuso a una menor concentración del metal (50 ppm Cu^{2+}).

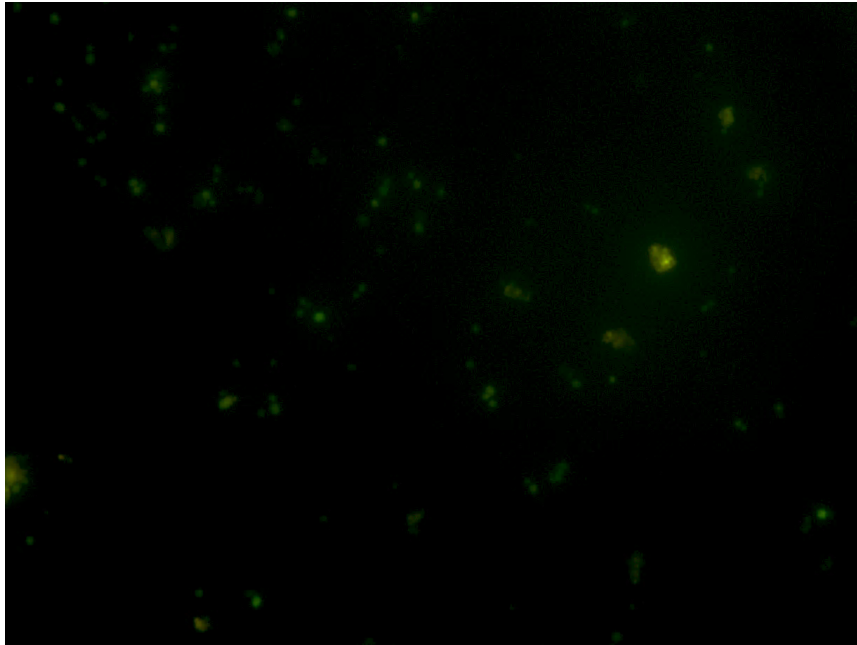


Figura 35. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con 2,7-diclorofluorescein diacetato (DCFH-DA), a 40X.

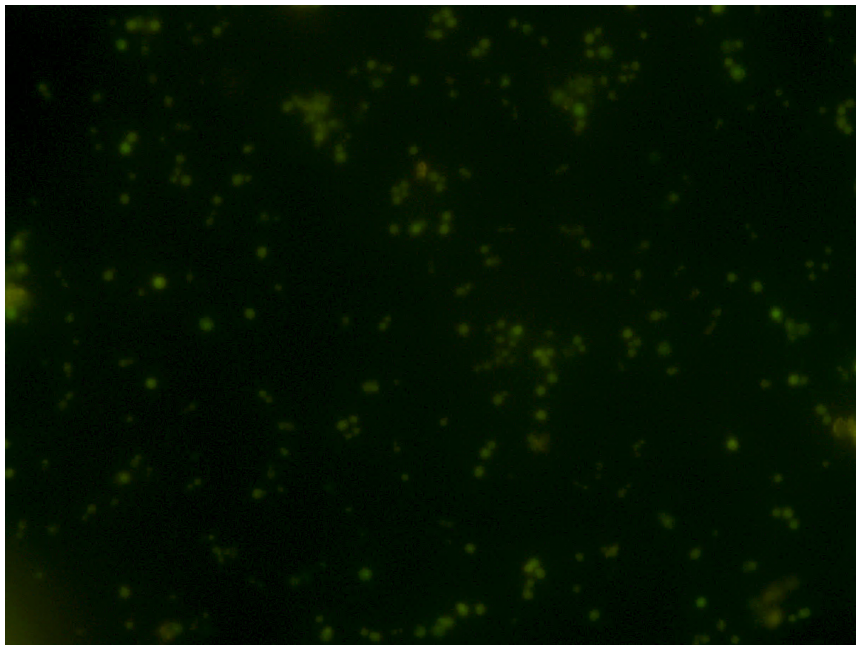


Figura 36. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek + 10 ppm Cu²⁺, a 28°C, a las 24 h, teñidas con 2,7-diclorofluorescein diacetato (DCFH-DA), a 40X.

Estos resultados difieren a los observados en este estudio, ya que las células de *Rhodotorula mucilaginosa* expuestas a 10 ppm de cobre mostraron evidencias de un mayor estrés oxidativo con relación al control. Esto se puede atribuir a la composición estructural de los hongos, la cual presenta diferencias para levaduras y mohos.

Hildebrandt-Ulrich. y col. (2007) reportaron que algunos hongos como las micorrizas arbusculares codifican proteínas involucradas en la respuesta al daño causado por especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, el estrés oxidativo ocasionado por la exposición a metales pesados es de importancia primaria para la simbiosis, al estar relacionado con la inducción de genes que codifican para la síntesis de proteínas de choque térmico y glutatión S-transferasa en el micelio de micorrizas arbusculares como en el hongo *Glomus intraradices* Sy167.

Lo anterior sugiere que el alivio del estrés oxidativo inducido por metales pesados constituye una preocupación principal para las especies de micorrizas arbusculares expuestas a elevadas concentraciones de metales pesados. Además, pueden estar implicadas otras estrategias que posiblemente contribuyan a la tolerancia a metales pesados, por ejemplo, la expresión mejorada de metalotioneínas y genes transportadores de Zn, particularmente bajo estrés ocasionado por cobre. De acuerdo estos autores, los productos de genes sensibles a metales pesados pueden actuar de una manera localizada, potencialmente restringida a estructuras fúngicas arbusculares (Hildebrandt-Ulrich y col., 2007).

Estudios anteriores mencionan que las principales macromoléculas celulares como los lípidos, las proteínas y el ADN son altamente susceptibles al ataque oxidativo y a la degradación, mientras que el ataque de las ROS a los carbohidratos es comparativamente lento. Avery (2001) menciona que existen varias razones para explicar los niveles elevados de ROS en la célula:

- Alteraciones intrínsecas en la fisiología del huésped.
- Estrés extrínseco (por ejemplo, toxicidad a metales).
- Formación de ROS inducida por metales a través de varios mecanismos. Por ejemplo, reacciones de Fenton o Haber-Weiss, que son catalizadas por metales redoxactivos (Cu,

Fe, Cr, V) que generan el radical hidroxilo (OH•) altamente reactivo a partir de H₂O₂ y superóxido (O^{•-2}). Se cree que la toxicidad del O^{•-2} está mediada indirectamente de manera similar, a través de la liberación de catalizadores de Fenton de ciertas enzimas hierro-azufre [4Fe-4S] (Srinivasan y col., 2000).

- Mecanismos indirectos por los cuales los metales pueden promover el daño oxidativo que incluyen: la inhibición de enzimas antioxidantes de defensa, el agotamiento de grupos sulfhidrilo unidos a proteínas y el glutatión, y la perturbación física de la disposición lipídica de la membrana con sensibilización concomitante a la peroxidación lipídica.

El resultado de cada uno de estos procesos o mecanismos es una tendencia hacia la formación de elevadas cantidades de ROS, o bien al aumento de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN (Avery, 2001).

6.4.2.4. Viabilidad celular

La viabilidad de las células de *Rhodotorula mucilaginosa* se evaluó utilizando el kit de viabilidad de doble tinción (live/dead cells kit, 04511, Sigma, USA), siguiendo el mismo protocolo que se utilizó para *Bacillus megaterium*.

La viabilidad de *R. mucilaginosa* en medio Czapek adicionado con cobre (10 ppm Cu²⁺) y sin cobre se muestra en las figuras 37 y 38. En ambos medios se observó una baja intensidad en las señales de fluorescencia, detectando células teñidas de color amarillo-verde limón pálido en lugar del característico color verde (vivas) o rojo (muertas). Este color amarillo-verde limón se puede atribuir a la presencia de células viables con paredes y membranas celulares dañadas o comprometidas.

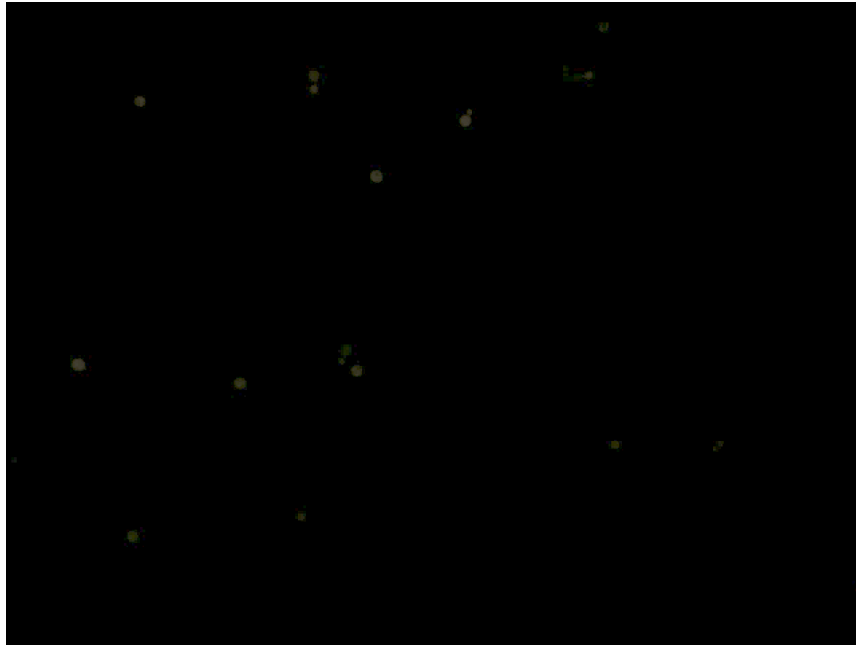


Figura 37. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con kit de viabilidad (live /dead), a 40X.



Figura 38. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek + 10 ppm de Cu²⁺, a 28°C, a las 24 h, teñidas con kit de viabilidad, a 40X.

Lo anterior se corroboró al observar las células de un mismo campo utilizando los filtros verde y azul, ya que al cambiar el filtro fue posible observar las mismas células con diferente señal de fluorescencia: células rojas (muertas) en el filtro verde, y células verdes (vivas) en el filtro azul. Esto concuerda con las evidencias obtenidas en los estudios previos al evaluar el efecto sobre la integridad de la membrana plasmática (Figuras 31 y 32) y los biopolímeros de la pared celular (Figuras 33 y 34).

Al evaluar el efecto del cobre sobre la viabilidad de *Aspergillus australiensis* expuesto a 250 ppm del metal, Contreras-Cortés y col. (2020) reportaron un considerable número de células teñidas de color rojo intenso después de la tinción con yoduro de propidio, es decir, células afectadas por la presencia del cobre, lo cual concuerda con los resultados obtenidos al evaluar el efecto sobre la integridad de la membrana celular de *R. mucilaginosa*.

Debido a las débiles señales de fluorescencia observadas, se procedió a realizar una tinción con el colorante azul de tripano, el cual permite diferenciar las células viables (incolores) de las no viables (de color azul) (Figura 10).

Como se mencionó anteriormente, la presencia del metal ocasionó una disminución en el porcentaje de células levaduriformes viables (79.8%) con respecto al control (90.6%), a las 24 h; sin embargo, el metal favoreció la relación entre células vivas y células totales desarrolladas (UFC/mL), a las 24 h.

6.4.2.5. Gránulos de polihidroxialcanoatos

Para detectar gránulos de polihidroxialcanoatos (PHA) se utilizó el biomarcador azul Nilo, el cual exhibe una señal fluorescente de color naranja que indica la presencia de PHA en el interior de las células (Contreras-Cortés y col., 2020). En este trabajo, al analizar las imágenes se encontró la presencia de gránulos en las levaduras desarrolladas en ambos medios de cultivo. Sin embargo, se detectó una mayor presencia de gránulos de PHA en las células de *Rhodotorula mucilaginosa* expuestas al cobre (10 ppm Cu^{2+}), además de un aumento en el número de células

con respecto al medio control (Figuras 39 y 40). Estos resultados concuerdan con estudios previos reportados por Contreras-Cortés y col. (2020), quienes detectaron un intenso color anaranjado en las estructuras del hongo *Aspergillus australiensis* desarrollado en medio con 250 ppm Cu^{2+} .

Tomando en cuenta las evidencias obtenidas al evaluar el estrés oxidativo general ocasionado por el cobre (tinción con 2,7-diclorofluorescein dicetato, DCFH-DA) en *R. mucilaginosa* tolerante a cobre, los resultados sugieren que es capaz de ocasionar estrés oxidativo en la célula, y a su vez, este se relaciona con la producción de metabolitos como los gránulos de reserva de energía y carbono (por ejemplo, PHA).

De acuerdo con Contreras-Cortés y col. (2020), la acumulación de metales como el cobre en células fúngicas se atribuye a varios grupos químicos tales como acetamido (de la quitina), amino y fosfato (de ácidos nucleicos), amino, amido, sulfhidrilo y carboxilo (de proteínas) e hidroxilos (de polisacáridos), que pueden atraerlos o unirlos; asimismo, las metalotioneínas y otros componentes celulares como la fitoquelatina y la superóxido dismutasa.

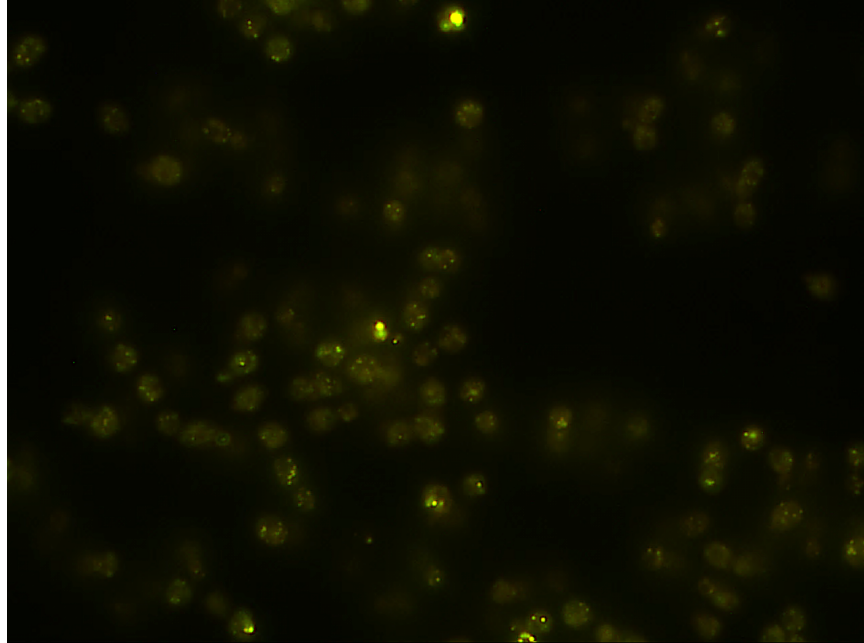


Figura 39. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek control, a 28°C, a las 24 h, teñidas con azul Nilo, a 100X.

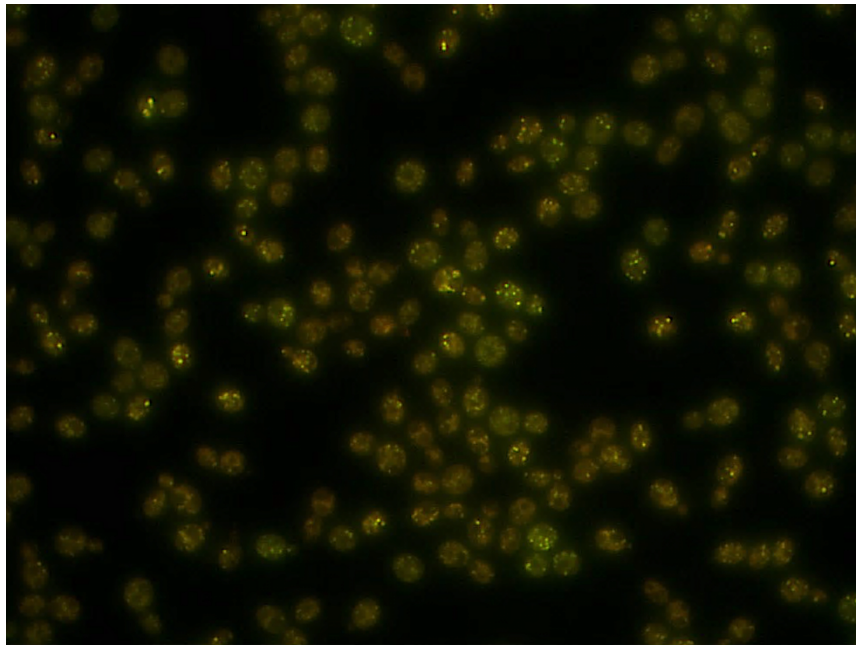


Figura 40. Células de *Rhodotorula mucilaginosa* en medio líquido Czapek + 10 ppm de Cu²⁺, a 28°C, a las 24 h, teñidas con Azul Nilo, a 100X.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

De manera integral, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el mecanismo de tolerancia al cobre por *Bacillus megaterium* y *Rhodotorula mucilaginosa* está relacionado con el metabolismo de los carbohidratos, específicamente, con la producción de gránulos de reserva de energía y carbono (PHA). Asimismo, la evidencia sugiere que la tolerancia al cobre está relacionada con la inducción de estrés oxidativo general y con alteraciones estructurales, caracterizadas por daños en la integridad de la membrana plasmática y paredes celulares tanto de la bacteria como del hongo levaduriforme, encontrando un mayor efecto a nivel subcelular en las células levaduriformes.

El no encontrar ningún efecto importante sobre la viabilidad en ambos microorganismos, indica que tienen el potencial para ser utilizados en procesos de biorremediación de metales que involucren el uso de sistemas con biomasa microbiana viva.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS

1. Abbar, B., Alem, A., Marcotte, S., Pantet, A., Ahfir, N. D., Bizet, L., and Duriatti, D. (2017). Experimental investigation on removal of heavy metals (Cu²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺) from aqueous solution by flax fibres. *Process Safety and Environmental Protection*, 109: 639-647.
2. Acebo-González, D., and Hernández-García, A. (2013). Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(1): 1-5.
3. Delgado, A. C. L., and Cordoba, A. M. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Rev. Inf. Técnico*, 79(1): 83-101.
4. Ale-Borja, N., García Villegas, V., Yipmantin-Ojeda, A., Guzmán Lezama, E., and Maldonado García, H. (2015). Estudio de la cinética de biosorción de plomo (II) en alga *Ascophyllum nodosum*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(3), 212-223.
5. Álvarez-Villa, A. (2018). Evaluación de las cinéticas de adaptación y tolerancia a metales pesados de microorganismos aislados de aguas y sedimentos contaminados de origen antropogénico. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias de la Ingeniería, Universidad de Sonora. Pp. 75-78.
6. Gómez-Álvarez, A., Meza-Figueroa, D., Villalba-Atondo, A. I., Valenzuela-García, J. L., Ramírez-Hernández, J., and Almendariz-Tapia, F. J. (2009). Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993-2005), Mexico-US border. *Environ. Geol.*, 57(7): 1469-1479.
7. Ostle, A. G., & Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and environmental microbiology*, 44(1), 238-241. <https://doi.org/10.1128/AEM.44.1.238-241.1982>.
8. Santhanam, A., and Sasidharan, S. (2010). Microbial production of polyhydroxy alkanotes (PHA) from *Alcaligenes* spp. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. *African Journal of Biotechnology*, 9(21), 3144-3150.
9. Benavides, D. B. (2009). Síntesis de polihidroxicanoatos a partir de bacterias diazótroficas aisladas de nódulos de leguminosas de la subfamilia *Faboideae* en bosques altoandinos del departamento de Nariño. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(21).
10. Beltrán-Pineda, M. E., and Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197.
11. Bustamante-García, V., Carrillo-Parra, A., Prieto-Ruíz, J. Á., Corral-Rivas, J. J., and Hernández Díaz, J. C. (2016). Química de la biomasa vegetal y su efecto en el rendimiento durante la torrefacción: revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(38), 5-23.
12. Caruso, C., Rizzo, C., Mangano, S., Poli, A., Di Donato, P., Nicolaus, B., ... and Giudice, A. L. (2018). Extracellular polymeric substances with metal adsorption capacity produced by *Pseudoalteromonas* sp. MER144 from Antarctic seawater. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(5), 4667-4677.

13. Calvo, P., and Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31-39.
14. Contreras-Cortés, A. G., Almendariz-Tapia, F. J., Gómez-Álvarez, A., Burgos-Hernández, A., Luque-Alcaraz, A. G., Rodríguez-Félix, F., ... and Plascencia-Jatomea, M. (2019). Toxicological assessment of cross-linked beads of chitosan-alginate and *Aspergillus australensis* biomass, with efficiency as biosorbent for copper removal. *Polymers*, 11(2), 222.
15. Contreras-Cortés, A. G., Almendariz-Tapia, F. J., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Rosas-Burgos, E. C., Rodríguez-Félix, F., ... and Plascencia-Jatomea, M. (2020). Biosorption of copper by immobilized biomass of *Aspergillus australensis*. Effect of metal on the viability, cellular components, polyhydroxyalkanoates production, and oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-16.
16. Cuizano, N. A., Reyes, Ú. F., Domínguez, S., Llanos, B. P., & Navarro, A. E. (2010). Relevancia del pH en la adsorción de iones metálicos mediante algas pardas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(2), 123-130.
17. Escobar, L., Alfonso, P. A., & Aristizábal, F. A. (2009). Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 49-56.
18. Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á., and Garcés-Jaraba, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecnológicas*, 18(34): 109-123.
19. de Almeida, A., Ruiz, J. A., López, N. I., and Pettinari, M. J. (2004). Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Química Viva*, 3(3): 122-133.
20. Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., and Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2): 597-612.
21. Delgadillo-Ordoñez, N. C., Posada-Suárez, L. R., Marcelo, E., Cepeda-Hernández, M. L., and Jimena, S. N. (2017). Aislamiento e identificación de levaduras degradadoras de hidrocarburos aromáticos, presentes en tanques de gasolina de vehículos urbanos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2): 141-151.
22. Bello-Gil, D. and Brandl, H. (2007). Selección de bacterias productoras de polihidroxibutirato. *Icidca*, 2: 1-18.
23. Bravo D., and Fernández P. (2009). Summary polyhydroxyalkanoate diazotrophic bacteria from isolated from nodules of legumes in the woods family *Fabaceae* andean highlands of Nariño. *Rev. la Asoc. Colomb. Ciencias Biológicas*, 21: 11–19.
24. Eckstein, D. (2001). A family approach to self-care: Creating a healthy balance. *The Family Journal*, 9(3), 327-336.
25. Rubio D. I. C., Calderón, R. A. M. Gualtero, A. P. Acosta, D. R., and Rojas, I. J. S. (2015). Tratamientos para la remoción de metales pesados comúnmente presentes en aguas residuales industriales. Una revisión. *Rev. Ing. y Región*, 13(1): 73-90.
26. Gálvez-Irqui AC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Calderón-Santoyo M, Argüelles-Monal WM, and Plascencia-Jatomea M. (2019). Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 103(7): 2985-3000.

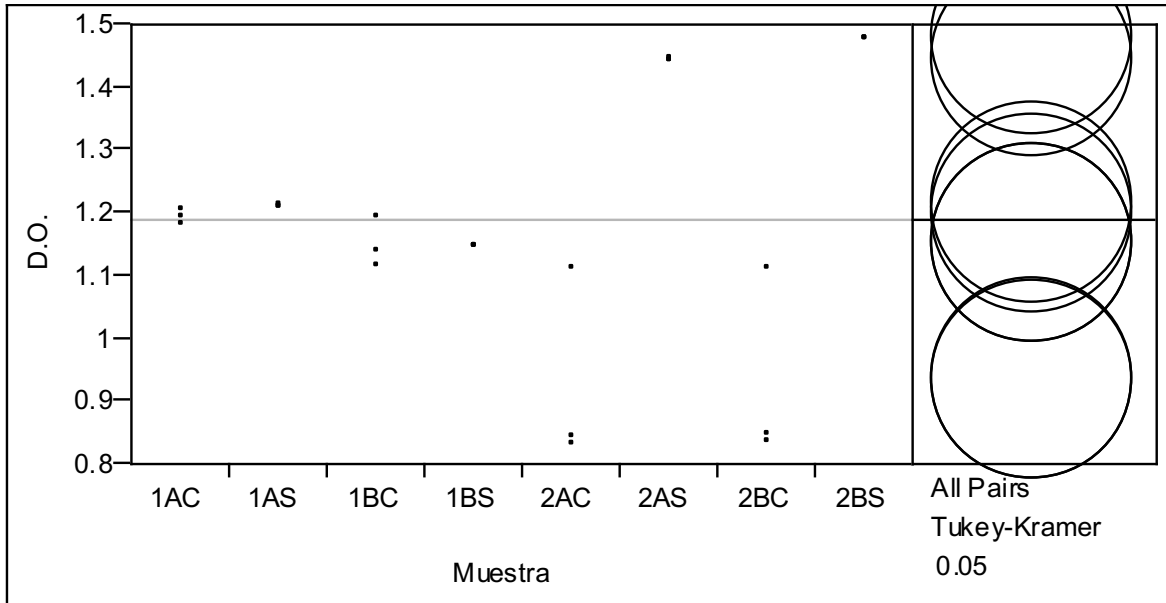
27. Guerrero-Rojas, R., and Guerrero-Fonseca, C. (2018). Mecanismos moleculares de las proteínas de choque térmico (HSPs) implicados en el desarrollo neoplásico. *Revista Salud Uninorte*, 34(2): 455-474.
28. Hildebrandt, U., Regvar, M. and Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68(1), 139-146.
29. Hussein, K. A. and Joo, J. H. (2013). Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20): 2288-2296.
30. Jiménez-Islas, D., Medina-Moreno, S. A., and Gracida-Rodríguez, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos: una revisión. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1): 65-84.
31. Marrero-Coto, J. Díaz-Valdivia, A., and Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Rev. CENIC Ciencias Biol.*, 41(1): 67-78.
32. Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar-Alonso, I., and López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2): 10-25.
33. Ye, J. Y., Liu, T., Chen, Y., Liao, Q., Wang, Z. K., and Chen, G. C. (2013). Effect of AI crude extract on PHB accumulation and hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrogen Energy*, 38(35): 15770-15776.
34. Pérez, A. G., Larrosa, J. A. E., and Escámez, P. S. F. (2016). Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *Anuario de Jóvenes Investigadores*, (9), 160-163.
35. Portales, R. L., Jiménez, G. C., Michel, H. C., Amador, D. O. R., Mikuš, K. V., Kump, P., and de la Rosa, G. (2015). Understanding copper speciation and mobilization in soils and mine tailings from “Mineral La Aurora” in central Mexico: contributions from Synchrotron techniques. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 67(3), 447-456.
36. Trejos, V., Fontalvo Alzate, J., and Gomez Garcia, M. A. (2009). Mathematical description and stability analysis of fermentative processes. *Dyna*, 76(158), 111-121.
37. Kan, G., Wang, X., Jiang, J., Zhang, C., Chi, M., Ju, Y., and Shi, C. (2019). Copper stress response in yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AN 5 isolated from sea ice, Antarctic. *Microbiology Open*, 8(3), e00657.
38. Karnib, M., Kabbani, A., Holail, H., and Olama, Z. (2014). Heavy metals removal using activated carbon, silica and silica activated carbon composite. *Energy Procedia*, 50: 1-113.
39. Avery S. V. (2001). Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. In: *Advances in applied microbiology*, vol. 49. Edited by Laskin, A. I., Bennett J. W., and Gadd, G. M. Ed. Academic Press. San Diego, California, USA. Pp. 113- 114.
40. Latha, B. V., Jeevaratnam, K., Murali, H. S., and Manja, K. S. (2005). Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. *Indian Journal of Biotechnology*, 4(3). 353-357
41. Arshadi M., and Mousavi, S. M. (2015). Enhancement of simultaneous gold and copper extraction from computer printed circuit boards using *Bacillus megaterium*. *Bioresour. Technol.*, 175: 315–324.
42. Gomathy M., and Sabarinathan K. G. (2010). Microbial mechanisms of heavy metal tolerance- a review. *Agric. Rev.*, 31(2): 133–138.

43. Mori, M., Maldonado, H., Guzmán, E., Eyra, M. C., Bernardelli, C. E., Viera, M., and Donati, E. R. (2013). Estudio cinético e isotérmico de la Biosorción de Zinc (II) Y Cadmio (II) para un sistema Monometálico-Bimetálico por *Undaria pinnatifida* sp. *Rev. Peru. Química e Ing. Química*, 16(2): 39–46.
44. Pinzón-bedoya, M. L. Estella, L. U. Z., and Villamizar, V. (2009). Modelamiento de la Cinética de Bioadsorción de Cr (III) usando Cáscara de Naranja. *Dyna*, 160(Iii): 95–106.
45. Muñoz-Silva, L., Olivera-Gonzales, P., Santillán Torres, M., and Tamariz-Angeles, C. (2019). Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista Peruana de Biología*, 26(1): 109-118.
46. Navarro-Aviñó, J.P., Aguilar-Alonso, I., and López-Moya, J.R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2): 1-17. Asociación Española de Ecología Terrestre Alicante, España.
47. Gaur, N., Flora, G., Yadav, M., and Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environ. Sci. Process. Impacts*, 16(2):180–93.
48. Prescott, M., Harley J.P., and Klein, D.A. (2002). Industrial microbiology and biotechnology in general microbiology. 5th Edn., McGraw-Hill, New York, USA.
49. Rastogi, R. P., Singh, S. P., Häder, D. P., and Sinha, R. P. (2010). Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(3): 603-607. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.006>.
50. Rodríguez-Córdova, F.J. (2018). Inmovilización de *Bacillus megaterium* en un sistema biopolimérico quitosano-alginato con aplicación potencial para bioeliminar cobre en aguas contaminadas. Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Pp. 86-87.
51. Rodríguez-Martínez, H. L., Peña-Manjarrez, M., Gutiérrez-Reyes, A. V., González-Trevizo, C. L., Montes-Fonseca, S. L., and López-Avalos, G. G. (2017). Biorremediación de arsénico mediada por microorganismos genéticamente modificados. *Terra Latinoamericana*, 35(4), 353-361.
52. Rojas, E. G., Cepeda, S. J. G., Leon, J. A. R., and Soto, C. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Nova*, 8(14), 195-205.
53. De Sotto, R., Monsanto, R. Z., Edora, J. L., Bautista, R. H., Bennett, R. M., and Dedeles, G. R. (2015). Reduction of Cr (VI) using indigenous *Aspergillus* spp. Isolated from heavy metal contaminated sites. *Mycosphere*, 6(1): 53–59.
54. Sánchez, S. A., Marín, M. A., Mora, A. L., and Yepes, M. del S. (2012). Identification of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria in soils contaminated with fique wastes. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, XIV(2): 89-100.
55. Ilhan, S., Nourbakhsh, M. N., Kiliçarslan, S., and Ozdag, H. (2004). Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish Electronoc Journal Biotechnol.*, 2: 50–57.
56. Sindhu, S. S., Parmar, P., and Phour, M. (2014). Nutrient cycling: potassium solubilization by microorganisms and improvement of crop growth. In *Geomicrobiology and biogeochemistry* (pp. 175-198). Springer, Berlin, Heidelberg.
57. Stubbe, J., and Tian, J. (2003). Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of

- the PHA synthase. *Natural product reports*, 20(5), 445-457.
58. Kumar S., and Mehta, D. (2014). Elemental analysis of soil samples using thick target-particle induced X-Ray emission (TT-PIXE) technique. *J. Nucl. Physics, Mater. Sci. Radiat. Appl.*, 1(2): 225–237.
 59. Vargas-Nieto, C., Carriazo, J. G., and Castillo, E. (2011). Estudio de materiales adsorbentes de bajo costo para remover Cr (VI) de efluentes acuosos. *Ingeniería e Investigación*, 31(1), 154-162.
 60. Venables, J., Stevenson, P. C., and Hiller, J. (1973). Electron back scattering patterns a new technique for obtaining crystallographic information in the scanning electron microscope. *Philosophical Magazine*, 27(5): 1193-1200.
 61. Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(3), 93-104.
 62. García, Y. G., Carlos, J., Contreras, M., Reynoso, O. G., and Córdova, A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxiálcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 29(1): 77–115.
 63. Ye, J. Y., Liu, T., Chen, Y., Liao, Q., Wang, Z. K., & Chen, G. C. (2013). Effect of AI crude extract on PHB accumulation and hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *International journal of hydrogen energy*, 38(35), 15770-15776.

ANEXOS:

Formulación y diseño de medios de cultivo para *Bacillus megaterium*



Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	2BS	2AS	1AS	1AC	1BC	1BS	2BC	2AC
2BS	0.00000	0.03533	0.26700	0.28467	0.32967	0.33167	0.54700	0.55000
2AS	-0.03533	0.00000	0.23167	0.24933	0.29433	0.29633	0.51167	0.51467
1AS	-0.26700	-0.23167	0.00000	0.01767	0.06267	0.06467	0.28000	0.28300
1AC	-0.28467	-0.24933	-0.01767	0.00000	0.04500	0.04700	0.26233	0.26533
1BC	-0.32967	-0.29433	-0.06267	-0.04500	0.00000	0.00200	0.21733	0.22033
1BS	-0.33167	-0.29633	-0.06467	-0.04700	-0.00200	0.00000	0.21533	0.21833
2BC	-0.54700	-0.51167	-0.28000	-0.26233	-0.21733	-0.21533	0.00000	0.00300
2AC	-0.55000	-0.51467	-0.28300	-0.26533	-0.22033	-0.21833	-0.00300	0.00000

Alpha = 0.05

Comparisons for all pairs using Tukey-Kramer HSD

	q*	Alpha							
	3.46212	0.05							
Abs(Dif)-LSD	2BS	2AS	1AS	1AC	1BC	1BS	2BC	2AC	
2BS	-0.22569	-0.19036	0.04131	0.05897	0.10397	0.10597	0.32131	0.32431	
2AS	-0.19036	-0.22569	0.00597	0.02364	0.06864	0.07064	0.28597	0.28897	
1AS	0.04131	0.00597	-0.22569	-0.20803	-0.16303	-0.16103	0.05431	0.05731	

1AC	0.05897	0.02364	-0.20803	-0.22569	-0.18069	-0.17869	0.03664	0.03964
1BC	0.10397	0.06864	-0.16303	-0.18069	-0.22569	-0.22369	-0.00836	-0.00536
1BS	0.10597	0.07064	-0.16103	-0.17869	-0.22369	-0.22569	-0.01036	-0.00736
2BC	0.32131	0.28597	0.05431	0.03664	-0.00836	-0.01036	-0.22569	-0.22269
2AC	0.32431	0.28897	0.05731	0.03964	-0.00536	-0.00736	-0.22269	-0.22569

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
2BS	A	1.4830000
2AS	A	1.4476667
1AS	B	1.2160000
1AC	B	1.1983333
1BC	B C	1.1533333
1BS	B C	1.1513333
2BC	C	0.9360000
2AC	C	0.9330000

Levels not connected by same letter are significantly different