



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
 TOLERANTES A METALES PESADOS ASOCIADAS A RAÍCES DE
 PLANTAS QUE HABITAN EN LOS JALES MINEROS DE HUAUTLA,
 MORELOS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BIÓL. MANUEL ISAAC MORALES OLIVARES

DIRECTOR:

DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2022

Este trabajo se realizó bajo la dirección del **Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís**, adscrito al Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LIA) en el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

AGRADECIMIENTOS

Quedo inmensamente agradecido con el **Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís** por su paciencia, dedicación e invaluable apoyo al dirigir y revisar esta tesis. Así mismo, le expreso mi admiración por ser un ejemplo de vida, quién me ha inspirado para seguir desarrollándome a nivel personal y académico.

Agradezco a la **Dra. Patricia Mussali Galante** por permitirme formar parte del Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LIA), donde se llevó a cabo esta investigación.

Agradezco a la **Dra. María Luisa Castrejón Godínez**, a la **Dra. Verónica Obregón Barboza** y al **Dr. Efraín Tovar Sánchez** por su valioso apoyo al formar parte de mi comité tutorial, donde brindaron numerosas observaciones y críticas constructivas para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mis amigos cercanos, particularmente al **M. en B. Marcos Eduardo Rosas Ramírez** y a la **M. en B. Sofía Janeth Catalán Figueroa**, quienes me orientaron metodológicamente y me ofrecieron apoyo moral durante los momentos difíciles.

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional brindado durante toda la vida.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada durante el transcurso de la maestría en biotecnología.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 3.1. Minería | 4 |
| 3.1.1. Industria minera metálica en México | 6 |
| 3.1.2. Industria minera metálica en el Estado de Morelos | 7 |
| 3.2. Impacto de la industria minera en el ecosistema | 7 |
| 3.3. Residuos mineros..... | 8 |
| 3.4. Metales pesados | 9 |
| 3.4.1. Fuentes de metales pesados..... | 9 |
| 3.4.2. Disponibilidad ambiental de metales pesados | 10 |
| 3.4.3. Biodisponibilidad ambiental de metales pesados | 10 |
| 3.4.4. Bioacumulación de metales pesados | 11 |
| 3.4.5. Biotransferencia y biomagnificación de metales pesados | 12 |
| 3.4.6. Mecanismos de toxicidad de metales pesados | 13 |
| 3.4.7. Límites máximos permisibles de metales pesados en el suelo | 16 |
| 3.5. Remediación de metales pesados | 17 |
| 3.5.1. Biorremediación de metales pesados..... | 18 |
| 3.5.1.1. Fitorremediación de metales pesados..... | 18 |
| 3.5.1.2. Remediación bacteriana de metales pesados..... | 20 |
| 3.6. Mecanismos celulares de tolerancia a metales pesados en bacterias | 21 |
| 3.6.1. Adsorción extracelular de metales pesados en bacterias..... | 22 |
| 3.6.2. Acumulación intracelular de metales pesados en bacterias | 23 |
| 3.6.3. Exportación activa de metales pesados en bacterias | 23 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.6.4. | Transformación enzimática de metales pesados en bacterias | 23 |
| 3.7. | Genes de tolerancia a metales pesados en bacterias..... | 24 |
| 4. | ANTECEDENTES..... | 26 |
| 5. | JUSTIFICACIÓN..... | 30 |
| 6. | HIPÓTESIS..... | 31 |
| 7. | OBJETIVOS..... | 32 |
| 8. | METODOLOGÍA | 33 |
| 8.1. | Área de estudio | 33 |
| 8.2. | Colecta de muestras | 33 |
| 8.3. | Aislamiento de bacterias | 35 |
| 8.4. | Morfología de colonias bacterianas..... | 37 |
| 8.5. | Tinción de Gram..... | 38 |
| 8.6. | Elaboración de cultivos de reserva..... | 38 |
| 8.7. | Cinéticas de crecimiento | 39 |
| 8.8. | Concentración mínima inhibitoria en medio sólido | 39 |
| 8.9. | Concentración mínima inhibitoria en medio líquido..... | 40 |
| 8.10. | Identificación bacteriana..... | 41 |
| 9. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 43 |
| 9.1. | Aislamiento de bacterias | 43 |
| 9.2. | Morfología celular de los aislados bacterianos..... | 47 |
| 9.3. | Cinéticas de crecimiento de los aislados bacterianos | 49 |
| 9.4. | Concentración mínima inhibitoria en medio sólido de los aislados bacterianos | 52 |
| 9.5. | Concentración mínima inhibitoria en medio líquido de los aislados bacterianos | 56 |
| 9.6. | Identificación bioquímica de los aislados bacterianos..... | 58 |

| | | |
|------|---|----|
| 9.7. | Identificación molecular de los aislados bacterianos..... | 60 |
| 9.8. | Genes de tolerancia a metales pesados de los aislados bacterianos | 61 |
| 9.9. | Potencial biotecnológico de los aislados bacterianos..... | 66 |
| 10. | CONCLUSIONES..... | 67 |
| 11. | PERSPECTIVAS..... | 69 |
| 12. | BIBLIOGRAFÍA..... | 70 |
| 13. | ANEXOS | 86 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Países con mayor producción de minerales a nivel mundial durante el año 2019 | 5 |
| Tabla 2. Estados mineros con mayor participación económica en México durante el año 2018 | 6 |
| Tabla 3. Límites máximos permisibles de metales pesados en suelos agrícolas de diferentes países | 17 |
| Tabla 4. Genes bacterianos de tolerancia a metales pesados y sus productos codificados | 25 |
| Tabla 5. Concentración biodisponible de metales pesados en los jales de Huautla, Morelos | 26 |
| Tabla 6. Nomenclatura y coordenadas geográficas de los sitios de colecta | 36 |
| Tabla 7. Morfología de colonias bacterianas | 37 |
| Tabla 8. Pruebas bioquímicas contenidas en el kit API 20E | 42 |
| Tabla 9. Nomenclatura de los aislados bacterianos | 43 |
| Tabla 10. Características morfológicas de las colonias bacterianas cultivadas en medio sólido LB | 46 |
| Tabla 11. Características microbiológicas de los aislados bacterianos | 47 |
| Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria de aislados bacterianos expuestos a diferentes sales metálicas en medio de cultivo LB sólido | 54 |
| Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria de aislados bacterianos expuestos a diferentes sales metálicas en medio de cultivo LB líquido | 58 |
| Tabla 14. Resultados de las pruebas bioquímicas API 20E | 59 |
| Tabla 15. Alineación de secuencias mediante BLAST | 60 |
| Tabla 16. Genes de tolerancia a metales pesados de <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>E. cloacae</i> | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Características microbiológicas de los aislados bacterianos..... | 48 |
| Figura 2. Cinéticas de crecimiento de los aislados obtenidos en los jales mineros.. | 51 |
| Figura 3. Cinéticas de crecimiento de los aislados obtenidos en la rizósfera de <i>P. laevigata</i> | 51 |
| Figura 4. Cinéticas de crecimiento de los aislados obtenidos en la rizósfera de <i>D. viscosa</i> | 52 |
| Figura 5. Ensayo de concentración mínima inhibitoria para la cepa J2-PL-S ante diferentes concentraciones de ZnSO ₄ | 53 |
| Figura 6. Formación de un espejo metálico durante el ensayo de concentración mínima inhibitoria para el aislado J2-DV-2 ante Pb(NO ₃) ₂ | 56 |
| Figura 7. Cinética de crecimiento para J2-PL-B expuesta a diferentes concentraciones de CdSO ₄ | 57 |

1. RESUMEN

Las actividades antropogénicas como la minería son fundamentales para el desarrollo de la civilización moderna, sin embargo, producen grandes cantidades de residuos que contienen elementos potencialmente tóxicos como los metales pesados, los cuales, causan daños en todos los niveles de organización biológica. Debido a esta problemática es fundamental desarrollar estrategias sustentables como la remediación bacteriana, que permitan restaurar los sitios contaminados con metales pesados. Desde esta perspectiva, el objetivo de este trabajo consistió en aislar, caracterizar e identificar bacterias tolerantes a metales pesados que habitan en jales mineros o que se encuentran asociados a la rizósfera de plantas acumuladoras de metales pesados como *Prosopis laevigata* y *Dodonaea viscosa*.

En el presente trabajo se aislaron 14 bacterias Gram-negativas, seis de ellas en residuos mineros sólidos (jales), cuatro a partir de la rizósfera de *P. laevigata* y cuatro en las raíces de *D. viscosa*. Mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria, se determinó la capacidad de los aislados J2-PL-B, J2-PL-S, J2-DV1, J2-DV2 e IN-DV-1 para tolerar CdSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y ZnSO_4 cuyas tolerancias máximas corresponden respectivamente a 1,000, 2,000, >30,000, 5,000 y 1,500 mg/L en medio sólido y a 100, 250, 1,500, 2,500 y 250 mg/L en medio líquido. El patrón de tolerancia en medio sólido para los aislados J2-PL-B, J2-PL-S y J2-DV-1 fue $\text{Mn} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{Zn}$, para la cepa J2-DV-2 fue $\text{Mn} > \text{Pb} = \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd}$ y para la bacteria IN-DV-1 fue $\text{Mn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$. Mientras que el patrón de tolerancia en medio líquido para el aislado J2-PL-B fue $\text{Mn} > \text{Pb} > \text{Cu} = \text{Zn} > \text{Cd}$, para la cepa J2-PL-S fue $\text{Pb} > \text{Mn} > \text{Cu} = \text{Zn} > \text{Cd}$ y para la bacteria J2-DV-1 fue $\text{Pb} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Cd} = \text{Zn}$. Las concentraciones toleradas y los patrones de tolerancia para los metales pesados evaluados, se atribuyen a diferentes mecanismos celulares que se encuentran codificados por el genoma de cada aislado bacteriano.

Por otra parte, tres de los aislados bacterianos fueron identificados mediante pruebas bioquímicas (API 20E) y moleculares (amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S), cuya identidad comprende a *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* y *Enterobacter cloacae*. Finalmente, en diferentes bases de datos (BACMET y GeneBank) se realizó una búsqueda de genes relacionados con la tolerancia de las bacterias identificadas ante los metales pesados evaluados, lo cual, evidenció la presencia de sistemas de adsorción, transporte celular y desintoxicación enzimática. Como conclusión de este trabajo, las bacterias *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. cloacae* son candidatas para ser empleadas en procesos de remediación de sitios contaminados con metales pesados.

Palabras clave:

Metales pesados, biorremediación, remediación bacteriana, concentración mínima inhibitoria, fitorremediación asistida.

2. INTRODUCCIÓN

Las actividades antropogénicas como la minería desempeñan un papel fundamental para el desarrollo de la sociedad moderna, debido a que permiten aprovechar los recursos minerales con el fin de obtener beneficios en el ámbito económico, social y tecnológico (Bolan *et al.*, 2014). Desafortunadamente, la industria minera es una actividad económica que genera grandes cantidades de residuos potencialmente peligrosos ricos en metales pesados, los cuales, producen efectos negativos en la salud de los organismos y alteran la dinámica del ecosistema (Farjana *et al.*, 2019). Aunque existen metodologías convencionales que emplean procesos físicos o químicos para remediar los sitios contaminados con metales pesados, su implementación requiere una inversión económica considerable, sólo pueden realizarse en áreas reducidas y producen contaminación secundaria (Liu *et al.*, 2018). Por este motivo, es necesario desarrollar alternativas sustentables como la biorremediación que permiten restaurar los ambientes contaminados de forma eficiente y práctica (Rahman y Singh, 2020). La remediación microbiana de metales pesados es una alternativa que aprovecha la capacidad de los microorganismos para transformar, remover o inmovilizar contaminantes, disminuyendo gradualmente su concentración en el ambiente (Medfu *et al.*, 2020). La remediación bacteriana de metales pesados es una alternativa versátil que puede emplearse en procesos de remediación *in situ* o *ex situ* (Paul *et al.*, 2021). Además, es una estrategia prometedora que puede ser utilizada de forma aislada o en conjunto con otras metodologías de remediación ambiental (Pratush *et al.*, 2018). Por este motivo el aislamiento, caracterización e identificación de bacterias tolerantes a metales pesados resulta de gran interés para desarrollar nuevas estrategias de remediación o potenciar la eficiencia de los ya existentes (Fan *et al.*, 2018).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Minería

La minería es una actividad económica primaria que se caracteriza por explorar, extraer y procesar los minerales depositados en el subsuelo (SGM, 2021). Los minerales son un recurso fundamental para la civilización moderna, debido a que son la fuente principal para obtener elementos químicos empleados como materia prima por diferentes sectores productivos (p. ej. industria alimentaria, automotriz, constructora, energética, farmacéutica, manufacturera, metalúrgica, petroquímica o siderúrgica), que buscan aprovecharlos en la elaboración de objetos indispensables para nuestra vida cotidiana tales como alimentos, combustibles, dispositivos electrónicos, fármacos, herramientas, máquinas, medios de comunicación, medios de transporte, viviendas, entre otros (Gaytán y Benita, 2014).

Actualmente, las actividades mineras se encuentran extendidas a nivel mundial y se practican en todos los continentes del planeta (a excepción de la Antártida). De acuerdo con los Datos Mundiales de Minería (WMD, por sus siglas en inglés), tan solo en el año 2019, la producción total de minerales fue de 18,286,889,669 toneladas. Durante este mismo año, los 20 países con mayor producción minera en orden de importancia, fueron China, Estados Unidos, Rusia, Australia, India, Indonesia, Arabia Saudí, Canadá, Brasil, Irán, Sudáfrica, Kazajistán, Irak, Emiratos Árabes Unidos, Catar, Noruega, Alemania, México, Kuwait y Nigeria, que en conjunto suman el 85.4% de la producción global como se muestra en la **Tabla 1** (Reichl y Schatz, 2021).

Tabla 1. Países con mayor producción de minerales a nivel mundial durante el año 2019 (Reichl y Schatz, 2021).

| Lugar | País | Masa (Mt) | Porcentaje (%) | Valor (MUSD) |
|-------|------------------------|---------------|----------------|------------------|
| 1 | China | 4,324 | 23.65 | 583,714 |
| 2 | Estados Unidos | 2,336 | 12.77 | 555,067 |
| 3 | Rusia | 1,686 | 9.22 | 421,049 |
| 4 | Australia | 1,351 | 7.39 | 174,640 |
| 5 | India | 1,061 | 5.80 | 129,033 |
| 6 | Indonesia | 732 | 4.00 | 97,180 |
| 7 | Arabia Saudí | 672 | 3.67 | 276,745 |
| 8 | Canadá | 499 | 2.73 | 170,820 |
| 9 | Brasil | 479 | 2.62 | 114,529 |
| 10 | Irán | 414 | 2.26 | 106,882 |
| 11 | Sudáfrica | 320 | 1.75 | 124,963 |
| 12 | Kazajistán | 260 | 1.42 | 92,631 |
| 13 | Irak | 244 | 1.34 | 111,371 |
| 14 | Emiratos Árabes Unidos | 239 | 1.31 | 95,533 |
| 15 | Catar | 209 | 1.14 | 50,318 |
| 16 | Noruega | 175 | 0.95 | 50,600 |
| 17 | Alemania | 170 | 0.93 | 10,460 |
| 18 | México | 161 | 0.88 | 69,236 |
| 19 | Kuwait | 145 | 0.79 | 64,117 |
| 20 | Nigeria | 142 | 0.78 | 52,678 |
| | Total | 15,619 | 85.41 | 3,351,566 |

Mt= Millones de toneladas; MUSD= Millones de dólares.

3.1.1. Industria minera metálica en México

En México, las actividades mineras se practican en las 32 entidades federativas y durante el año 2018 los diez Estados con mayor participación económica en orden descendente fueron Sonora, Zacatecas, Jalisco, Chihuahua, Durango, Guerrero, Guanajuato, Campeche, Sinaloa y Coahuila, que en conjunto sumaron el 70.6% de la producción nacional como se muestra en la **Tabla 2**. Además, la industria minera generó el 2.3% del Producto Interno Bruto (PIB) nacional y otorgó aproximadamente 2.7 millones de empleos (INEGI, 2020; SGM, 2021).

Tabla 2. Estados mineros con mayor participación económica en México durante el año 2018 (SGM, 2021).

| Lugar | Estado | Valor (MMXN) | Porcentaje (%) |
|-------|--------------|----------------|----------------|
| 1 | Sonora | 138,154 | 20.60 |
| 2 | Zacatecas | 67,448 | 10.06 |
| 3 | Jalisco | 52,812 | 7.87 |
| 4 | Chihuahua | 47,386 | 7.07 |
| 5 | Durango | 41,754 | 6.23 |
| 6 | Guerrero | 29,694 | 4.43 |
| 7 | Guanajuato | 29,353 | 4.38 |
| 8 | Campeche | 23,686 | 3.53 |
| 9 | Sinaloa | 21,765 | 3.25 |
| 10 | Coahuila | 21,745 | 3.24 |
| | Total | 473,797 | 70.66 |

MMXN= Millones de pesos mexicanos.

En México, la producción minera es diversa y se compone aproximadamente por 58 minerales diferentes, de los cuales, 15 pertenecen a la categoría de minerales metálicos. La minería mexicana goza de gran prestigio a nivel internacional, debido

a que ocupa el primer lugar en la producción de plata (Ag); tercero en plomo (Pb); cuarto en zinc (Zn); quinto en molibdeno (Mo); sexto en cadmio (Cd) y oro (Au); noveno en cobre (Cu); décimo segundo en hierro (Fe) y manganeso (Mn) (SGM, 2021).

3.1.2. Industria minera metálica en el Estado de Morelos

El Estado de Morelos posee 35 minas principales que se distribuyen de forma heterogénea en 16 de los 36 municipios que conforman su territorio, sin embargo, solo una de estas ha sido aprovechada para la extracción de minerales metálicos a nivel industrial. La mina “Tlaquiltenango” se ubica en el poblado de Huautla, su fundación ocurrió a finales del siglo XVII y los principales minerales obtenidos durante su funcionamiento fueron Ag, Pb y Zn. Aunque esta mina prosperó durante varios siglos, sus actividades finalizaron en la década de 1980 y actualmente la planta de beneficio de minerales presente en esta zona se encuentra inactiva (SGM, 2020).

3.2. Impacto de la industria minera en el ecosistema

A pesar de que la minería es una actividad económica que otorga beneficios considerables para la civilización moderna, también genera efectos negativos en el ambiente. En este sentido, de acuerdo a la magnitud espacial en donde se presentan dichos cambios, se han clasificado en tres categorías, a nivel de sitio, región o global (Agboola *et al.*, 2020). El impacto a nivel de sitio se restringe a la zona donde se realiza la extracción de minerales e incluye consecuencias como la modificación del paisaje, deforestación, pérdida de hábitats y disminución de la biodiversidad (Rehman *et al.*, 2021). Los efectos a nivel de región se manifiestan en lugares próximos a las minas y son originados esencialmente por el depósito de residuos mineros en áreas inadecuadas como valles o cuencas hidrológicas. Esto

a su vez, representa un riesgo potencial para el bienestar del ecosistema, debido a que los residuos contaminantes pueden dispersarse, interactuar con los seres vivos y deteriorar su salud (Menéndez y Muñoz, 2021). A nivel global los efectos se manifiestan en todo el mundo y están estrechamente relacionados con el uso de combustibles fósiles (empleados para el funcionamiento de la maquinaria de exploración, extracción, procesamiento, transformación y transporte de minerales), que liberan gases de efecto invernadero hacia la atmósfera y contribuyen al cambio climático (Sonter *et al.*, 2018).

3.3. Residuos mineros

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-157-SEMARNAT-2009, los residuos de la industria minera se clasifican en función del proceso que los produce y se integran en dos grupos principales. El primero incluye a los “residuos provenientes del minado” que comprenden a los cúmulos de minerales de baja ley (térreos) y a los apilamientos de minerales sin valor económico (tepetate). El segundo grupo comprende a los “residuos provenientes del beneficio de minerales” que a su vez se subdividen en tres clases: 1) residuos de la concentración de minerales (jales mineros y reactivos utilizados en procesos de flotación o lixiviación), 2) residuos de procesos pirometalúrgicos (escorias, lodos ácidos y polvos) y 3) residuos de procesos hidrometalúrgicos (lodos de precipitación de hierro y lodos de lixiviación con disolventes) (DOF, 2011).

Actualmente, la contaminación ambiental se reconoce como uno de los mayores problemas a nivel mundial y representa una creciente preocupación para la sociedad moderna. En este sentido, se ha descrito que las actividades mineras producen una amplia diversidad de residuos sólidos urbanos, residuos de manejo especial y residuos peligrosos, que tienen un impacto negativo en el entorno natural (McClintock, 2015). Particularmente, el manejo inadecuado de los residuos

peligrosos originados durante el beneficio de minerales, conocidos comúnmente como “jales mineros”, “relaves mineros” o “colas mineras”, son la principal fuente de contaminación ambiental, debido a que contienen elementos potencialmente tóxicos entre los que se encuentran los metales pesados (Zhang *et al.*, 2014).

3.4. Metales pesados

El término “metales pesados” se ha empleado para agrupar elementos químicos de acuerdo con el criterio de diferentes autores, sin embargo, desde una perspectiva química precisa, se ha propuesto definirlos como elementos químicos naturales de clase metálica que tienen una densidad mayor a 5 g/cm³, un número atómico superior a 20 y producen efectos tóxicos en concentraciones suficientemente elevadas (Duffus, 2001). De acuerdo con esta definición, los metales pesados agrupan un total de 51 elementos de la tabla periódica (Ali y Khan, 2018).

3.4.1. Fuentes de metales pesados

Los metales pesados son sustancias comunes en el ambiente que se encuentran en estado de agregación sólido, líquido o gaseoso, principalmente en forma de sulfuros, óxidos, hidróxidos, sulfatos, fosfatos y silicatos (Bradl, 2005). De acuerdo con su origen, los metales pesados pueden provenir de fuentes naturales o artificiales, las fuentes naturales comprenden a las rocas (ígneas, metamórficas y sedimentarias), el suelo, la materia orgánica y los meteoritos, mientras que las fuentes artificiales incluyen compuestos sintéticos como agroquímicos (plaguicidas), fertilizantes (fosfatados y nitrogenados) y productos derivados del petróleo (aceites, lubricantes, combustibles o pinturas) (Liu *et al.*, 2018). Por otra parte, los metales pesados pueden ser liberados en procesos relacionados con distintas actividades humanas como la combustión de carbón, los incendios forestales y el manejo inadecuado de residuos (Wu *et al.*, 2015).

3.4.2. Disponibilidad ambiental de metales pesados

Los metales pesados son abundantes en la corteza terrestre, sin embargo, sólo una fracción de su concentración total se encuentra ambientalmente disponible, que puede aumentar o disminuir en relación con diferentes factores fisicoquímicos como el pH, la materia orgánica o la temperatura (Chen *et al.*, 2019). De forma general, la disponibilidad ambiental de los metales pesados aumenta en ambientes que poseen un pH ácido, debido a que las moléculas adsorbentes adquieren cargas positivas que desplazan a los cationes metálicos liberándolos en el entorno, mientras que, en condiciones alcalinas los iones metálicos son adsorbidos por sustratos minerales o forman complejos hidroximetálicos que tienen una baja solubilidad en agua (Alloway, 2012). Por otra parte, en sitios con una alta concentración de materia orgánica, la movilidad de los metales pesados disminuye, fundamentalmente porque los compuestos orgánicos pueden inmovilizar átomos metálicos mediante procesos de intercambio iónico como la complejación, de forma opuesta, en sitios con una baja cantidad de sustancias orgánicas, los iones metálicos se encuentran disociados por lo que su movilidad es mayor (Kwiatkowska, 2018). Finalmente, una elevada temperatura puede aumentar la velocidad con la que se produce una reacción química, promover la oxidación de moléculas e incrementar el transporte vertical de los metales pesados a través de los diferentes niveles estratigráficos (desde el interior hacia la superficie terrestre) mediante la evaporación del agua subterránea, en cambio, las bajas temperaturas reducen la eventualidad de estos procesos (Punia, 2021).

3.4.3. Biodisponibilidad ambiental de metales pesados

Aun cuando los metales pesados se encuentran en estados accesibles para los seres vivos, solo un porcentaje de ellos puede estar ambientalmente biodisponible, en este sentido, la “biodisponibilidad ambiental” se define como la cantidad de una sustancia que puede ser absorbida por un sistema vivo a partir del entorno abiótico

(Zwolak *et al.*, 2019). La biodisponibilidad ambiental es un proceso que se mantiene vinculado con la capacidad de cada organismo para incorporar compuestos a través de la membrana celular, mediante mecanismos de transporte pasivos o activos. Para expresar de forma práctica la relación entre la biodisponibilidad ambiental y la concentración de un elemento químico en el entorno, se emplea el Factor de Transferencia (FT), como se muestra en la siguiente expresión matemática (McGeer *et al.*, 2003).

$$FT = \frac{CO}{CS}$$

FT: Factor de transferencia

CO: Concentración de un elemento en un organismo

CS: Concentración de un elemento en el suelo

3.4.4. Bioacumulación de metales pesados

Una vez que los metales pesados han sido adquiridos por un organismo puede ocurrir un proceso de “bioacumulación”, esto sucede cuando la absorción de un material es mayor que su eliminación, lo que habitualmente produce efectos tóxicos (Ali *et al.*, 2019). La bioacumulación es un tema complejo que está estrechamente relacionado con la habilidad de cada ser vivo para adsorber, inmovilizar, metabolizar, translocar o expulsar una sustancia, sin embargo, es necesario considerar el tiempo de exposición y la capacidad de cada especie para adaptarse a diferentes condiciones de estrés ambiental. Para expresar la relación entre la bioacumulación y la concentración de una sustancia en el entorno, se utiliza el Factor de Bioacumulación (FBA), como se muestra en la siguiente ecuación (Kim *et al.*, 2015).

$$FBA = \frac{COE - COC}{CS}$$

FBA: Factor de bioacumulación

COE: Concentración de un elemento en un organismo expuesto

COC: Concentración de un elemento en un organismo control

CS: Concentración de un elemento en el suelo

3.4.5. Biotransferencia y biomagnificación de metales pesados

Cuando los metales pesados han sido bioacumulados por un organismo, pueden ser transferidos hacia otros integrantes de la comunidad, mediante un proceso denominado biotransferencia o transferencia trófica. La “biotransferencia” se define como la cantidad de una sustancia que es obtenida por un sistema vivo a partir de las diferentes interacciones bióticas implicadas en la red alimentaria (Liu *et al.*, 2019). En la naturaleza, la transferencia trófica se relaciona con diferentes factores como la especie a partir de la cual se alimenta un ser vivo, el tipo de tejido que prefiere (una parte determinada) y la cantidad de alimento que ingiere. Para expresar de forma simplificada la relación entre la concentración de un elemento en un organismo y la cantidad que se encuentra almacenada en su dieta, se emplea el Factor de Transferencia Trófica (FTT), como se muestra en la siguiente expresión algebraica (Ali y Khan, 2019).

$$FTT = \frac{CO}{CA}$$

FTT: Factor de transferencia trófica

CO: Concentración de un elemento en un organismo (Consumidor)

CA: Concentración de un elemento en el alimento (Dieta)

De modo parecido, la “biomagnificación” es un proceso que ocurre únicamente cuando la concentración de un elemento químico en un organismo, aumenta de forma simultánea al nivel que ocupa en la red trófica, en otras palabras, esto sucede en el momento que los organismos consumidores poseen una mayor cantidad de una sustancia en comparación con las formas de vida a partir de las cuales se alimenta. La biomagnificación también es cuantificada mediante el uso del FTT y es perceptible cuando el resultado es mayor a 1 (Jara *et al.*, 2020).

3.4.6. Mecanismos de toxicidad de metales pesados

Algunos metales pesados son nutrientes esenciales para la vida (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn), sin embargo, otros no desempeñan ninguna función biológica conocida (Ag, Cd, Hg y Pb). En ambos casos, cuando la concentración de estos elementos químicos es mayor a la requerida, pueden producir efectos tóxicos en los seres vivos (Fashola *et al.*, 2020). Los metales pesados causan toxicidad mediante diferentes mecanismos, relacionados principalmente con la modificación química o estructural de biomoléculas como las proteínas (con actividad o sin actividad enzimática) y los ácidos nucleicos, además, pueden inducir estrés oxidativo. Estos cambios promueven la alteración de distintos procesos metabólicos involucrados en la homeostasis celular como la actividad enzimática, la respiración, la producción de energía, así como en la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Lal, 2010).

De forma general, los metales pesados pueden modificar la conformación nativa de las proteínas causando en algunas ocasiones su desnaturalización y la respectiva pérdida de su función biológica (Mohammadimejad *et al.*, 2019). Esto sucede fundamentalmente porque los metales pesados tienen una fuerte afinidad a los grupos sulfhidrilo (SH) (que conforman a los puentes disulfuro) implicados en el correcto plegamiento de la estructura tridimensional de las proteínas, en este sentido, los metales pesados tienen la capacidad para interactuar con proteínas de

transporte localizadas en la membrana plasmática, modificando su capacidad para realizar procesos de intercambio iónico o de absorción de nutrientes a través de la membrana celular (Dutta *et al.*, 2018). De forma parecida, los metales pesados pueden alterar motivos estructurales como los dedos de zinc, que participan durante la interacción de complejos proteicos o entre proteínas y ADN, obstaculizando el apropiado desempeño de diferentes mecanismos moleculares como la replicación, la regulación transcripcional, la transducción de señales y la reparación del ADN (Witkiewics y Bal, 2006).

Los metales pesados son capaces de desplazar a los cofactores metálicos que emplean diferentes apoenzimas para llevar a cabo reacciones bioquímicas específicas (Bálsamo *et al.*, 2021). Desde esta perspectiva, la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) (dependiente de Mg^{+2}) puede perder su función biológica (fijación de CO_2 atmosférico) cuando otros cationes metálicos como el Co^{+2} , Ni^{+2} , o Zn^{+2} compiten y desplazan a su cofactor original (Nowicka, 2022). De forma similar, cuando la enzima ADN polimerasa (dependiente de Mg^{+2}) es expuesta a Co^{+2} , Mn^{+2} o Ni^{+2} , su velocidad de reacción disminuye, inhibiendo la síntesis del ADN (Covarrubias y Cabriales, 2017).

Los metales pesados pueden causar efectos genotóxicos, es decir, daños al material genético entre los que se incluyen la formación de aductos y la incorrecta replicación, transcripción o reparación del ADN (apareamiento erróneo de nucleótidos, escisión de bases nitrogenadas, delección de nucleótidos, rupturas de cadena sencilla y doble) (Kopp *et al.*, 2018). Los aductos son moléculas formadas por la unión covalente de un elemento químico con el ADN, de forma precisa, esto sucede cuando un metal pesado (comúnmente Ag o Cd) se une al séptimo átomo de una base púrica (adenina o guanina), causando cambios conformacionales que desestabilizan la estructura del ADN (Hartwig y Schwerdtle, 2002). La correcta replicación de la información genética también se encuentra comprometida en ambientes ricos en metales pesados, fundamentalmente porque la sustitución del

cofactor Mg^{+2} por otros elementos como el Co^{+2} , Mn^{+2} o Ni^{+2} en la enzima ADN polimerasa, reduce su fidelidad y aumenta la probabilidad de mutaciones en la secuencia complementaria (Renu *et al.*, 2021). Por otra parte, durante el proceso de transcripción del ADN, las mutaciones localizadas en la región promotora de un gen pueden interferir con la etapa de iniciación, debido a que la ARN polimerasa es incapaz de reconocer apropiadamente las secuencias de unión, además, en la fase de elongación la secuencia de ARN producida es modificada, mientras que en la fase de terminación la longitud del transcrito sintetizado ocasionalmente es variable (Jung y Lee, 2019). Finalmente, mientras se efectúa la traducción del ARNm, las proteínas resultantes son propensas a presentar cambios en su estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria, originando en algunas ocasiones productos no funcionales (Hernández *et al.*, 2009).

A nivel cromosómico los metales pesados tienen el potencial para producir diferentes aberraciones estructurales como el intercambio de cromátidas, cromosomas errantes, micronúcleos, entre otros (Hajmoradi y Beydokhti, 2019). El intercambio de cromátidas consiste en el cambio recíproco de cromátidas presentes en un mismo o en diferentes cromosomas durante la fase S del ciclo celular, por otro lado, los cromosomas errantes se caracterizan por la presencia de uno o varios cromosomas segregados en el transcurso de la anafase mitótica, mientras que los micronúcleos son fragmentos de cromosoma o cromosomas completos que se encuentran en el exterior del núcleo celular una vez que el proceso de la mitosis ha finalizado (Sabeen *et al.*, 2020).

Los metales pesados pueden generar estrés oxidativo, en este sentido, cuando las células se encuentran expuestas a elementos químicos como el Pb, la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) aumenta, provocando la modificación estructural de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Vigneshkumar *et al.*, 2013). El estrés oxidativo se debe al desequilibrio entre la producción de ERO y la generación de moléculas antioxidantes, encargadas de la desintoxicación celular, entre las que

se incluyen la catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Imlay, 2019). La catalasa es una enzima de tipo oxido reductasa, capaz de transformar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2) (Kaushal *et al.*, 2018). Esto previene la oxidación de los lípidos presentes en la membrana plasmática y la alteración de la permeabilidad celular (Feng *et al.*, 2020). La enzima glutatión peroxidasa emplea el glutatión (GSH) para estabilizar el H_2O_2 mediante el empleo de su grupo tiol de cisteína, formando glutatión disulfuro (GSSG) y H_2O (Jaishankar *et al.*, 2014). La transformación de las ERO es fundamental a nivel celular, debido a que inhibe la oxidación del ADN y ARN (Hofer *et al.*, 2005). Finalmente, la superóxido dismutasa permite transformar el anión superóxido (O_2^-) en H_2O y H_2O_2 , evitando su interacción con proteínas que poseen centros catalíticos de hierro-azufre (4Fe-4S) como las ferredoxinas que participan en la cadena transportadora de electrones (Steunou *et al.*, 2020).

3.4.7. Límites máximos permisibles de metales pesados en el suelo

La contaminación del suelo con metales pesados representa un riesgo considerable para la dinámica del ecosistema (He *et al.*, 2015; Mahurpawar, 2015). Para disminuir el impacto ambiental producido por los metales pesados, diversas organizaciones públicas como la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) en Suiza, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos, el Ministerio de Salud (MOH, por sus siglas en inglés) en China, la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en México, entre otras, han establecido límites máximos permisibles como se muestra en la **Tabla 3** (Kinuthia *et al.*, 2020). En México la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece los límites máximos permisibles para algunos metales pesados presentes en suelos con actividades realizadas a pequeña (residenciales, agrícolas, comerciales) o gran escala (industriales), además, incluye criterios para cuantificar, caracterizar y remediar sitios contaminados con metales pesados (DOF, 2007).

Tabla 3. Límites máximos permisibles de metales pesados en suelos agrícolas de diferentes países (mg/kg) (¹EPA 2021; ²Kinuthia *et al.*, 2020; ³DOF 2007).

| Elemento | USA ¹ | China ² | México ³ |
|----------|------------------|--------------------|---------------------|
| As | 0.11 | 40 | 22 |
| Cd | 0.48 | 0.6 | 37 |
| Cr | 11 | 300 | NA |
| Cu | 270 | 200 | NA |
| Hg | 1 | 1 | 23 |
| Mn | 900 | NA | NA |
| Ni | 72 | 60 | 1,600 |
| Pb | 200 | 80 | 400 |
| Zn | 150 | 300 | NA |

3.5. Remediación de metales pesados

La contaminación del suelo con metales pesados es persistente, debido a que estos elementos químicos no pueden ser degradados como los compuestos orgánicos. Desde esta perspectiva, se calcula que, en condiciones naturales es necesario el transcurso de hasta cinco milenios para que la cantidad de metales pesados presentes en un sitio contaminado disminuya a concentraciones basales, seguras para los seres vivos (Khalid *et al.*, 2017). Debido a esta problemática, se han desarrollado diferentes metodologías que emplean procesos físicos o químicos, para remediar o disminuir la concentración de estas sustancias en un periodo de tiempo menor. Los procesos físicos agrupan técnicas como el aislamiento o el reemplazo de suelos contaminados, mientras que los procesos químicos comprenden métodos de adsorción, electrocinética, lixiviación, precipitación química, entre otros (Su *et al.*, 2014). Desafortunadamente, las estrategias fisicoquímicas para la remediación de sitios contaminados con metales pesados tienen desventajas considerables ya que requieren una alta inversión económica y personal altamente calificado, además, solo pueden aplicarse en zonas reducidas y

generan contaminación secundaria. Estas desventajas han evidenciado la necesidad para desarrollar estrategias sustentables, que permitan remediar los sitios contaminados con metales pesados de forma eficiente, en áreas extensas, con una baja inversión económica y sin generar daños colaterales al ambiente (Bolan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018).

3.5.1. Biorremediación de metales pesados

En las últimas décadas, la biorremediación se ha propuesto como una alternativa sustentable para el tratamiento de la contaminación ambiental. La biorremediación es una técnica basada en el uso de organismos o sus componentes para transformar, remover o inmovilizar los contaminantes, provocando su disminución gradual en el ambiente (Kapahi y Sachdeva, 2019). Algunos de los modelos biológicos empleados de forma frecuente en procesos de biorremediación incluyen plantas, algas, hongos y bacterias (Cheng *et al.*, 2019; Salama *et al.*, 2019).

3.5.1.1. Fitorremediación de metales pesados

La fitorremediación se define como el aprovechamiento de organismos vegetales para el tratamiento de residuos contaminantes. La fitorremediación de metales pesados comprende diferentes procesos entre los que se incluyen la fitoestabilización, fitoextracción y fitovolatilización (Shikha y Singh, 2021). La fitoestabilización emplea la capacidad de las plantas para acumular sustancias contaminantes en el sistema radicular. Esta estrategia puede ser aprovechada para remediar el impacto de los metales pesados en el ecosistema, debido a que reduce la difusión de estos elementos químicos en el agua (superficial o subterránea) y el suelo, además, disminuye su entrada y dispersión en la red trófica (Mohan *et al.*, 2021). La fitoextracción emplea la facultad de los organismos vegetales para translocar compuestos hacia sus tejidos aéreos (i.e., hojas, flores, semillas o frutos).

Este proceso es empleado para restaurar sitios con altas concentraciones de metales pesados, debido a que las estructuras vegetales aéreas pueden ser cosechadas, sometidas a tratamiento y dispuestas de forma apropiada. Finalmente, la fitovolatilización emplea la habilidad de las plantas para transformar compuestos en moléculas volátiles que son liberadas hacia la atmósfera y representan baja o nula toxicidad para la biota (Muthusaravanan *et al.*, 2018).

Para realizar un proceso de fitorremediación exitoso, es fundamental contemplar el tipo de contaminante que se desea remediar, además, es necesario elegir especies vegetales que requieren poco mantenimiento y estén adaptadas para desarrollarse en ambientes con factores bióticos o abióticos determinados (Awa y Hadibarata, 2020). Por otra parte, es recomendable evitar la introducción de especies exóticas, debido a que pueden alterar los parámetros ecológicos de las comunidades, por este motivo, el empleo de especies nativas para remediar los sitios contaminados con metales pesados es la mejor opción (Muthusaravanan *et al.*, 2018).

A nivel mundial se han descrito diferentes géneros de plantas con la capacidad para bioacumular metales pesados entre los que destacan *Acacia*, *Alyssum*, *Brassica*, *Dodonaea*, *Thlaspi*, entre otros (Nawab *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha identificado un grupo reducido de organismos vegetales denominados hiperacumuladores de metales pesados, que se caracterizan por bioacumular estos elementos químicos en concentraciones superiores a dos o tres órdenes de magnitud en comparación a los contenidos por plantas que crecen en sitios no contaminados (Shah y Daverey, 2020). Algunos de los géneros de plantas hiperacumuladoras de metales pesados más estudiados son *Arabidopsis*, *Biscutella*, *Myristica*, *Noccaea*, *Nyssa*, *Phytolacca*, *Planchonella*, *Prosopis*, *Psychotria* y *Trichospermum* (Zappala *et al.*, 2013; Van der Ent *et al.*, 2013; Pollard *et al.*, 2014).

En México existen diferentes especies vegetales que son aptas para remediar la contaminación producida por metales pesados como *Acacia farnesiana*, *Acacia schaffneri*, *Amaranthus hybridus*, *Asphodelus fistulosus*, *Brassica campestris*, *Buddleja scordioides*, *Ipomoea longifolia*, *Pennisetum villosum*, *Purshia mexicana*, *Prosopis laevigata*, *Physalis hederifolia*, *Sicyos laciniatus*, *Scirpus americanus* y *Typha latifolia* (Carranza *et al.*, 2008; Salas *et al.*, 2009; Maldonado *et al.*, 2011; Salas *et al.*, 2021). Mientras que, en el Estado de Morelos se ha reportado la presencia de especies vegetales con potencial para el tratamiento de suelos contaminados con metales pesados como *Crotalaria pumila*, *Dodonaea viscosa*, *Pithecellobium dulce*, *Prosopis laevigata*, *Vachellia campechiana* y *Vachellia farnesiana* (Muro, 2020; Santoyo, 2020).

Desafortunadamente, la fitorremediación de metales pesados se ve obstaculizada por dos factores principales que comprenden la baja tasa de supervivencia de las plántulas en los sitios contaminados y el lento crecimiento de las plantas, debido a la baja disponibilidad de nutrientes en el suelo. Estos factores influyen respectivamente en la abundancia y producción de biomasa que es indispensable para la remoción de metales pesados, por lo cual, en las últimas décadas se ha propuesto el empleo sinérgico de bacterias para incrementar la eficiencia en los procesos de fitorremediación (Khalid *et al.*, 2021).

3.5.1.2. Remediación bacteriana de metales pesados

La remediación bacteriana se define como el aprovechamiento de bacterias para el tratamiento de residuos contaminantes (Pratush *et al.*, 2018). El empleo de bacterias en procesos de biorremediación posee ventajas considerables, debido a que estos organismos tienen un ciclo de vida corto, rápida reproducción y su amplia diversidad genética les permite adaptarse rápidamente a condiciones no favorables. Además, los cultivos bacterianos *in vitro* pueden realizarse con materiales de bajo costo,

mediante técnicas relativamente simples y son susceptibles para realizar modificación génica dirigida (Verma y Kuila, 2019).

La remediación bacteriana de metales pesados puede realizarse mediante diferentes procesos que comprenden la bioacumulación, bioadsorción, biolixiviación, biomineralización y biotransformación (Dave *et al.*, 2020). La bioacumulación consiste en el almacenamiento intracelular de metales pesados y su respectiva integración en los procesos metabólicos de los organismos. La bioadsorción permite capturar e inmovilizar elementos químicos en la superficie de la materia orgánica viva o muerta (Olguín y Sánchez, 2012). La biolixiviación aprovecha los metabolitos producidos por las células para disociar los metales pesados contenidos en residuos mineros (Gao *et al.*, 2021). La biomineralización se basa la capacidad de las células para sintetizar minerales con baja solubilidad a partir de soluciones que contienen metales pesados disueltos (Jalilvand *et al.*, 2020). Finalmente, la biotransformación emplea proteínas con actividad catalítica para transformar y disminuir la toxicidad o biodisponibilidad de los metales pesados (Wang *et al.*, 2021).

3.6. Mecanismos celulares de tolerancia a metales pesados en bacterias

Debido a la toxicidad de los metales pesados, las bacterias han desarrollado diferentes estrategias que les permiten sobrevivir en ambientes contaminados con estos elementos químicos. Algunos de los mecanismos celulares empleados por las bacterias para tolerar el estrés producido por los metales pesados incluyen la adsorción extracelular, acumulación intercelular o periplásmica, exportación activa y transformación enzimática (Pal *et al.*, 2022). Cada uno de estos mecanismos se encuentra estrechamente relacionado con las características de cada célula y difieren entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Nanda *et al.*, 2019).

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por tener una pared celular rica en peptidoglicano adicionada con ácido lipoteicoico, ácido teicoico o ácido teicurónico, la cual, es capaz de adsorber metales pesados en concentraciones superiores a las bacterias Gram-negativas. De forma opuesta, las bacterias Gram-negativas destacan por presentar bombas de exportación activa, cuya función es transportar metales pesados desde el interior hacia el exterior celular, con una eficiencia mayor a las sintetizadas por las bacterias Gram-positivas (Biswas *et al.*, 2021).

3.6.1. Adsorción extracelular de metales pesados en bacterias

Los metales pesados pueden ser inmovilizados extracelularmente mediante diferentes compuestos entre los que se incluyen las sustancias poliméricas extracelulares (SPE), sideróforos, péptidos, biosurfactantes, entre otros. Las SPE agrupan distintas moléculas formadas por lípidos, carbohidratos o proteínas, capaces de retener metales pesados, debido a que poseen grupos funcionales amino, carboxilo, hidroxilo, éster, sulfato y fosfato (Yin *et al.*, 2019). Los sideróforos son sustancias de bajo peso molecular altamente afines a elementos metálicos como el Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn, cuando ambos componentes interactúan forman complejos que pueden ser internalizados en la célula o mantenerse en el medio externo (Tamariz *et al.*, 2021). El glutatión es un tripéptido formado por tres aminoácidos (glutamato, cisteína y glicina), esta molécula es un precursor de otros péptidos de mayor tamaño con la capacidad para unirse a los iones metálicos (Schmacht *et al.*, 2017). Finalmente, los biosurfactantes comprenden una diversidad extensa de compuestos que se caracterizan por ser de naturaleza anfipática como los glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas y fosfolípidos, que forman complejos con los metales pesados mediante el empleo de enlaces iónicos (Sarubbo *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2019).

3.6.2. Acumulación intracelular de metales pesados en bacterias

Los metales pesados pueden penetrar en la membrana celular, sin embargo, las bacterias Gram-negativas son capaces de inmovilizarlos mediante su unión con proteínas localizadas en el espacio periplásmico (Kumar *et al.*, 2020). De forma parecida, cuando los metales pesados difunden hacia el citoplasma celular, pueden ser secuestrados por proteínas como las metalotioneínas que se caracterizan por tener regiones ricas en cisteína (Benhalima *et al.*, 2020). Por otra parte, estos elementos químicos pueden ser transformados en formas insolubles mediante su unión con sulfuros o polifosfatos, provocando su precipitación y almacenamiento en diferentes estructuras celulares entre las que destacan las vacuolas y los magnetosomas (Zhou *et al.*, 2012).

3.6.3. Exportación activa de metales pesados en bacterias

Cuando la concentración de metales pesados rebasa el nivel intracelular tolerado por una bacteria o los mecanismos de acumulación interna se encuentra ausentes, es necesario el empleo de estrategias alternas que permitan la supervivencia de las células. En este caso, para regular la concentración intracelular de metales pesados, algunas bacterias han desarrollado mecanismos de exportación activa (que emplean ATP), donde los iones metálicos son transportados hacia el medio exterior mediante diferentes proteínas exportadoras presentes en la membrana celular (Ayangbenro, 2017).

3.6.4. Transformación enzimática de metales pesados en bacterias

Los metales pesados pueden ser transformados en iones menos tóxicos mediante el empleo de enzimas que modifican el estado redox de estos elementos químicos (Saravanan *et al.*, 2021). Los procesos de óxido-reducción se dividen en dos

categorías, la primera reúne a las reacciones asimiladoras, que utilizan los elementos metálicos como aceptores finales de electrones, mientras que la segunda agrupa reacciones disimiladoras, donde los elementos metálicos son inactivados y no son utilizados en el metabolismo (Johnson y Sánchez, 2019). En este sentido, el As y Cr elemental pueden ser oxidados para formar As (V) y Cr (V), que son fácilmente retenidos por compuestos inorgánicos, de forma parecida, el Hg (II) puede ser reducido por la enzima Mercurio (III) reductasa originando Hg elemental que se caracteriza por ser menos tóxico y volátil (Bolan *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2019).

3.7. Genes de tolerancia a metales pesados en bacterias

Los mecanismos celulares de tolerancia a metales pesados tienen una base genética, es decir, existen diferentes genes que codifican productos con funciones específicas para tolerar estos contaminantes. El gen *cmeB* presente en el genoma de *Erwinia amylovora* codifica una proteína de transporte activo capaz de expulsar el Cu y Zn al exterior celular (Liang *et al.*, 2019). El gen *merA* contenido en el genoma de *Escherichia coli* codifica la enzima mercurio reductasa, que desempeña un papel importante en la transformación del Hg²⁺ a Hg que resulta un menos tóxico y volátil (Ojo *et al.*, 2004).

Actualmente se encuentran disponibles diferentes bases de datos, que contienen listas de genes relacionados con la tolerancia bacteriana a metales pesados como el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) o la base de datos de Genes de Resistencia a Metales y Biocidas Antibacterianos (BACMET, por sus siglas en inglés). Algunos ejemplos de genes que codifican productos que otorgan tolerancia al estrés producido por metales pesados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Genes bacterianos de tolerancia a metales pesados y sus productos codificados.

| Espece | Gen | GenBank ID / BACMET ID | Resistencia | Descripción | Referencia |
|---------------------------------|-------------|------------------------|-------------------------|---|-------------------------------|
| <i>Campylobacter lari</i> | <i>acr3</i> | BAK55636.1 | As | Proteína de flujo pasivo (337 aa) | Jirayama <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Erwinia amylovora</i> | <i>cmeB</i> | YP_003531866.1 | Cu y Zn | Proteína de flujo activo (1008 aa) | Smits <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Helicobacter acinonychis</i> | <i>cadA</i> | CAJ99690.1 | Cd, Co y Zn | ATPasa transportadora de aniones (686 aa) | Eppinger <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | <i>copA</i> | BAC0077 | Cu | ATPasa transportadora de aniones (609 aa) | Cha y Cooksey, 1991 |
| <i>Helicobacter felis</i> | <i>copP</i> | BAC0634 | Cu | Proteína de unión (66 aa) | Bayle <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Wautersia metalidurans</i> | <i>dmeF</i> | BAC0132 | Cd, Cu y Ni | Proteína transportadora de aniones (386 aa) | Scherer <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | <i>fbpA</i> | BAC0160 | Fe y Ga | Proteína periplásmica de unión a Fe (332 aa) | Anderson <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>merA</i> | BAC0648 | Hg | Proteína con actividad de mercurio reductasa (460 aa) | Griffin <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>zupT</i> | BAC0469 | Cd, Co, Cu, Fe, Ni y Zn | Proteína transportadora de iones divalentes (257 aa) | Grass <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>yqjH</i> | BAC0452 | Fe y Ni | Proteína con actividad reductasa de Fe (254 aa) | Wang <i>et al.</i> , 2011 |

4. ANTECEDENTES

En el año 2016 se determinó que los jales mineros ubicados en el poblado de Huautla, Morelos, poseen metales pesados en concentraciones biodisponibles que rebasan los límites máximos permisibles de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, como se muestra en la **Tabla 5** (Solís-Miranda, 2016).

Tabla 5. Concentración biodisponible de metales pesados en los jales de Huautla, Morelos (mg/kg) (Solís-Miranda, 2016).

| Metal | Jale 1 | | | Jale 2 | | |
|-------|---------|-------|------------|---------|---------|------------|
| | Base | Media | Superficie | Base | Media | Superficie |
| Cd | 7.8 | 5.0 | 3.1 | 21.4 | 7.0 | 4.8 |
| Cu | 71.1 | 54.1 | 70.4 | 69.5 | 63.2 | 156.6 |
| Mn | 258.6 | 260.9 | 186.2 | 216.2 | 243.1 | 263.3 |
| Pb | 1,355.8 | 638.0 | 815.3 | 4,123.2 | 1,695.3 | 973.0 |
| Zn | 1,515.1 | 603.7 | 358.0 | 1,225.6 | 1,447.1 | 983.0 |

Las bacterias son los microorganismos más diversos en el planeta y se estima que en el suelo existen aproximadamente 2.6×10^{29} especies (Kallmeller *et al.*, 2012). Las bacterias son capaces de prosperar en condiciones variables de humedad, pH, salinidad y temperatura, además, pueden crecer en sitios contaminados con metales pesados. La presencia de bacterias en sitios contaminados con metales pesados está estrechamente relacionada con su capacidad para tolerar estos elementos químicos (en determinadas concentraciones o combinaciones), mediante diferentes mecanismos celulares, que pueden ser aprovechados en procesos de biorremediación *in situ* o *ex situ* (Srivastava y Majumder, 2015).

Actualmente, existen diversos estudios enfocados en el aislamiento de bacterias tolerantes a metales pesados. En el año 2020, en la ciudad de Krugersdorp, Gauteng, Sudáfrica, se aislaron bacterias multi-tolerantes a metales pesados a partir de jales mineros presentes en una mina de oro. Durante este trabajo se obtuvieron 35 aislados diferentes (24 Gram-positivos y 11 Gram-negativos), capaces de tolerar Cr, Zn, Pb, Ni, Cd y Co en concentraciones de hasta 10, 9, 7, 5, 3 y 1 mmol/L, respectivamente. Además, se observó que el patrón de tolerancia global para las bacterias aisladas fue Cr>Zn>Pb>Ni>Cd>Co (Fashola *et al.*, 2020).

En el año 2022, en la Región Autónoma Uigur de Xinjiang, China, se obtuvieron seis aislados bacterianos a partir de muestras provenientes de jales mineros de una mina de oro. En esta investigación se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria para determinar la tolerancia de las bacterias ante diferentes metales pesados. De forma precisa los aislados lograron tolerar Cd²⁺, Cr³⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ y Sb³⁺ en concentraciones de hasta 8, 5, 3, 8, 11, 4 y 9 mM, respectivamente (Kumari *et al.*, 2015).

En el año 2021, en el municipio de Mazapil, Zacatecas, México, se obtuvieron 71 aislados bacterianos a partir de muestras de agua, cercanas a sitios impactados por la industria minera. Durante este trabajo y de acuerdo con su índice de tolerancia, 11 bacterias fueron clasificadas como organismos resistentes a metales pesados (2 Gram-positivos y 9 Gram-negativos). La cepa con el mayor índice de tolerancia fue “*Pseudomonas M*” con un patrón de tolerancia que corresponde a Hg>Zn>Cr=Cu>Ag>Co (Escamilla *et al.*, 2021).

Por otra parte, se ha efectuado el aislamiento de bacterias tolerantes a metales pesados asociadas a las raíces de plantas. En el año 2019, en el municipio de Chietla, Puebla, se aislaron bacterias endófitas del género *Bacillus* a partir de las raíces de *P. laevigata*. La bacteria *Bacillus cereus* fue capaz de tolerar 15,000 mg/kg

de Cr (IV) y bioacumular 100 mg/kg de este elemento químico. Al mismo tiempo, se evaluó su capacidad para asistir a *P. laevigata* en la fitorremediación de metales pesados y se demostró que debido a su capacidad para bioacumular Cr (IV) incrementó la tasa de supervivencia de las plántulas. Además, promovió el crecimiento vegetal de *P. laevigata* a causa de la fijación del nitrógeno atmosférico (Ramírez *et al.*, 2019).

En el año 2016, en la ciudad de Malang, Indonesia, se obtuvieron muestras de las raíces de *Ficus septica* a partir de las cuales se aislaron bacterias endófitas pertenecientes al género *Enterobacter*. Las bacterias aisladas fueron capaces de tolerar Cr (VI) en concentraciones de 400-900 mg/L. En este estudio también se evaluó la capacidad de las bacterias para potenciar la fitorremediación de metales pesados mediante síntesis de exopolisacáridos, solubilización de fosfatos y producción de fitohormonas, además, se identificó la presencia del gen *ChR* que codifica la enzima cromato reductasa capaz de reducir el Cr (VI) a Cr (III) cuya toxicidad es menor (Rohma *et al.*, 2016).

En el año 2016, al norte de Tunisia, se cultivaron plantas de *Suya coronaria* en suelo contaminado con metales pesados, posteriormente, se colectaron los nódulos de las raíces a partir de los cuales se obtuvieron 82 aislados bacterianos. Las bacterias aisladas corresponden con los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sinorhizobium*, algunas de las cuales toleraron Pb, Zn, Cd, Cu y Ni en concentraciones de 4, 1.6, 4.1, 0.35 y 0.2 mM, respectivamente. Por otra parte, se demostró que las bacterias tienen la capacidad para producir ácido indol acético en concentraciones de hasta 64.18 µg/µL. Además, se realizaron pruebas cualitativas para determinar la capacidad de las bacterias para producir sideroforos y solubilizar fosfatos cuyo resultado fue positivo (Chiboub *et al.*, 2016).

En el año 2020, en la ciudad de Zanjan, Irán, se colectaron muestras de la rizósfera de *Glaucium calycinum* y *Glycyrrhiza glabra* a partir de las cuáles se aislaron bacterias del género *Variovorax* y *Stenotrophomonas* capaces de tolerar Pb y Cd en concentraciones de hasta 15 y 11 mM, respectivamente. También se observó que estas bacterias tienen la capacidad de modificar el pH del medio hasta valores aproximados de 9.5, mineralizando el 68, 76 y 92% de Cd, Pb y Zn, respectivamente. Se postula que las bacterias aisladas pueden ser candidatas para remediar la contaminación producida con metales pesados o promover el crecimiento vegetal y mejorar procesos de fitorremediación para estos elementos químicos (Jalilvand *et al.*, 2020).

5. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del ambiente con metales pesados representa una grave amenaza para la estabilidad del ecosistema y para la salud de los sistemas vivos. Aunque en la actualidad existen diferentes técnicas físicas y químicas para remediar los sitios contaminados con estos elementos químicos, su implementación requiere una alta inversión económica, sólo pueden emplearse en áreas reducidas y producen contaminación secundaria. Por estos motivos es necesario desarrollar estrategias prácticas, de bajo costo y sustentables como la remediación bacteriana, la cual destaca como una opción prometedora para implementarse de forma directa o indirecta en la remediación de ambientes ricos en metales pesados. Desde esta perspectiva resulta de gran interés aislar, caracterizar e identificar bacterias autóctonas adaptadas a las condiciones fisicoquímicas presentes en cada sitio de estudio y que se encuentran asociadas a la rizósfera de plantas acumuladoras de metales pesados, debido a que son candidatas potenciales para remediar ambientes contaminados con metales pesados o promover el crecimiento de especies vegetales empleadas en procesos de fitorremediación.

6. HIPÓTESIS

Dado que los jales mineros de Huautla, Morelos contienen metales pesados biodisponibles donde se establecen de manera natural especies de plantas que bioacumulan metales en el sistema radicular, entonces será posible aislar, caracterizar e identificar bacterias asociadas a estas plantas con diferentes patrones de tolerancia a metales pesados y con potencial para ser empleados en estrategias de biorremediación.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Aislar, caracterizar e identificar bacterias tolerantes a metales pesados que habitan en los jales o que se encuentran asociados a la rizósfera de plantas acumuladoras de metales pesados como *Prosopis laevigata* y *Dodonaea viscosa* en condiciones silvestres e invernadero.

7.2. Objetivos específicos

1. Aislar bacterias tolerantes a metales pesados, que habitan en los jales mineros de Huautla, Morelos.
2. Aislar bacterias tolerantes a metales pesados, asociadas a la rizósfera de *P. laevigata* y *D. viscosa* que se distribuyen en los jales mineros de Huautla, Morelos o en condiciones de invernadero.
3. Caracterizar la morfología en colonia y celular de las bacterias aisladas, así como sus cinéticas de crecimiento.
4. Evaluar la tolerancia de las bacterias aisladas ante CdSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y ZnSO_4 mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio sólido y líquido.
5. Identificar a las bacterias aisladas mediante pruebas bioquímicas API 20E y por análisis moleculares de amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

8. METODOLOGÍA

8.1. Área de estudio

En la zona central de México, se localiza el Estado de Morelos a una altitud promedio de 2,700 msnm. Morelos posee un clima cálido subhúmedo, con una temperatura y precipitación media anual de 21.5°C y 997 mm, respectivamente. Además, presenta dos temporadas estacionales bien definidas, la temporada de secas de diciembre-junio y la temporada de lluvias de julio-noviembre. Se reportan siete tipos de vegetación, sin embargo, el bosque de pino-encino y el bosque tropical caducifolio son los más representativos, debido a que ocupan la mayor extensión territorial (Castro y Bustos, 2006).

En la zona sur del Estado de Morelos se localiza el municipio de Tlaquiltenango que abarca aproximadamente el 11.14% de la superficie del territorio estatal. En este municipio se encuentra la localidad de Huautla que es un área de alto riesgo para la salud de los organismos, debido a que se encuentra próxima a tres zonas con residuos mineros sólidos que contienen metales pesados en concentraciones superiores a las permitidas en suelos agrícolas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-157-SEMARNAT-2009 (SGM, 2018).

8.2. Colecta de muestras

Las muestras de jale fueron colectadas de acuerdo con la Norma Técnica Mexicana NMX-AA-132-SCFI-2016, que describe los materiales necesarios, las técnicas de muestreo, los requisitos de almacenamiento y el adecuado procesamiento para muestras de suelo, con el objetivo de identificar y cuantificar diferentes elementos metálicos y metaloides. Algunas de las consideraciones para realizar esta colecta consistieron en emplear herramientas que no modificaran las características

químicas de las muestras (acero inoxidable o plástico), lavar las herramientas de trabajo después de cada uso para evitar la contaminación entre muestras, remover de la superficie objetos mayores a 2 cm (materia orgánica y rocas), coleccionar una cantidad suficiente en recipientes estériles, obtener la posición geográfica de cada sitio mediante un GPS y adquirir evidencia fotográfica.

En este estudio se coleccionaron muestras en diferentes ubicaciones entre las que se incluyen el “Jale 1”, “Jale 2” e “Invernadero”, este último lugar pertenece al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC). En cada sitio se obtuvieron dos tipos de muestras, las primeras fueron adquiridas a partir de los “jales mineros” y las segundas en la “rizósfera de plantas” como *P. laevigata* y *D. viscosa* (en ambas especies vegetales, las muestras de la rizósfera fueron obtenidas a partir de la zona pilífera en las raíces secundarias). Además, las muestras se clasificaron con base en la zona de donde fueron obtenidas, mismas que comprenden el área “base”, “media” y “superficial” de los jales. En la zona superficial, las muestras fueron coleccionadas mediante la técnica de “cinco de oros”, mientras que para la zona media y base se realizaron transectos sobre la ladera, donde se obtuvieron cinco muestras a distancias proporcionales. Finalmente, durante el trabajo en campo se asignó un nombre a cada sitio de colecta, esta nomenclatura se realizó con base en la ubicación, el tipo de muestra y la zona donde fueron coleccionadas las muestras como se muestra en la **Tabla 6**.

Para realizar la colecta de muestras (jale y rizósfera), se excavó a una profundidad de 20 cm utilizando un pico y una pala previamente desinfectadas con etanol al 70%. Las muestras destinadas para usarse en análisis fisicoquímicos fueron almacenadas en bolsas herméticas estériles (500 g). Las muestras biológicas fueron coleccionadas empleando abatelenguas estériles y se depositaron en matraces de vidrio estériles (10 g). Cada una de las muestras fue etiquetada y colocada en una hielera con hielo para su traslado al laboratorio, donde se almacenaron a 4°C para su posterior procesamiento. Para los análisis fisicoquímicos el procesamiento de las

muestras incluyó la remoción del material grueso como la materia orgánica y las rocas, posteriormente las muestras fueron disgregadas manualmente, tamizadas mediante el uso de una malla de acero inoxidable con aperturas de 2 mm y en algunos casos secadas a temperatura ambiente.

8.3. Aislamiento de bacterias

Para aislar las bacterias presentes en las muestras, se utilizaron tubos falcón con 9 mL de solución esterilizada de NaCl al 0.9%, se adicionó 1 g de jale y se agitó con un vortex durante 30 segundos. Posteriormente se permitió la sedimentación de la muestra durante 5 minutos. Con una micropipeta y puntas estériles, se colectaron 100 μ L de cada solución y se transfirieron a matraces con 50 mL de medio LB líquido (caldo Luria) adicionado con 1,000 mg/L de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y 100 mg/L de CdSO_4 . Los cultivos líquidos fueron incubados en condiciones de 30°C a 150 rpm durante 24 horas. De los cultivos líquidos se colectó una muestra de 5 μ L, que se inoculó en cajas de Petri (con medio LB sólido adicionado con 1,000 mg/L de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y 100 mg/L de CdSO_4) y se estrió por agotamiento con la ayuda de un asa de siembra. Finalmente, los cultivos fueron incubados a 30°C durante 24 horas y se obtuvo el registro fotográfico.

Tabla 6. Nomenclatura y coordenadas geográficas de los sitios de colecta.

| Ubicación | Muestra | Zona | Sitio | Latitud N | Longitud O | Altitud (msnm) |
|-----------------------|----------------------------------|------------|-----------|-------------|-------------|----------------|
| Jale 1 | Jale | Base | SJ1-MJ-B | 18°26'04.6 | 099°01'22.3 | 950 |
| | | Media | SJ1-MJ-M | 18°26'04.7 | 099°01'22.4 | 963 |
| | | Superficie | SJ1-MJ-S | 18°26'04.8 | 099°01'22.5 | 980 |
| | Rizósfera de <i>P. laevigata</i> | Base | SJ1-PL-B | 18°26'06.8 | 099°01'22.9 | 950 |
| | | Superficie | SJ1-PL-S | 18°26'05.0 | 099°01'22.3 | 980 |
| Jale 2 | Jale | Base | SJ2-MJ-B | 18°26'22.8 | 099°01'53.5 | 974 |
| | | Media | SJ2-MJ-M | 18°26'22.9 | 099°01'53.6 | 990 |
| | | Superficie | SJ2-MJ-S | 18°26'23.0 | 099°01'53.7 | 1,007 |
| | Rizósfera de <i>P. laevigata</i> | Base | SJ2-PL-B | 18°26'22.7 | 099°01'53.1 | 974 |
| | | Superficie | SJ2-PL-S | 18°26'22.6 | 099°01'53.0 | 1,007 |
| | Rizósfera de <i>D. viscosa</i> | Media | SJ2-DV-M1 | 18°26'23.1 | 099°01'54.3 | 990 |
| | | Media | SJ2-DV-M2 | 18°26'23.9 | 099°01'54.7 | 990 |
| Invernadero del CIByC | Rizósfera de <i>D. viscosa</i> | ... | SIN-DV-1 | 18°98'55.47 | 099°23'69.3 | 1,480 |
| | | ... | SIN-DV-2 | 18°98'55.48 | 099°23'69.4 | 1,480 |

8.4. Morfología de colonias bacterianas

Los cultivos fueron resembrados en cajas de Petri durante tres ocasiones para obtener colonias puras. Posteriormente las características morfológicas de las colonias bacterianas creciendo en medio LB adicionado con 1,000 mg/L de $Pb(NO_3)_2$ y 100 mg/L de $CdSO_4$ fueron clasificadas con base en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Morfología de colonias bacterianas (Souza *et al.*, 2013).

| | | | | | | |
|---------------------|---|----------|-------------|------------|-------------|------------|
| Color | Amarillo, blanco, rosa, transparente, entre otros | | | | | |
| Forma | Puntiforme | Circular | Filamentosa | Irregular | Rizoide | Fusiforme |
| Elevación | Plana | Elevada | Convexa | Acuminada | Rizada | Umbilicada |
| Bordes | Redondo | Ondulado | Lobulado | Espiculado | Filamentoso | |
| Textura | Lisa | | | Rugosa | | |
| Consistencia | Cremosa | | | Dura | | |
| Tamaño | Diámetro | | | | | |

8.5. Tinción de Gram

A partir de cultivos bacterianos realizados en cajas de Petri, se colectó una colonia aislada con la ayuda de un asa de siembra y se distribuyó homogéneamente sobre un portaobjetos con 10 μL de agua destilada estéril. Posteriormente la muestra fue fijada mediante calor usando un mechero de gas, se adicionó cristal violeta durante un minuto, el exceso de colorante fue removido mediante un lavado con agua destilada, se adicionó Yodo-Lugol durante un minuto, la muestra se decoloró mediante un lavado con etanol/acetona por 30 segundos, se adicionó safranina por un minuto, el exceso de colorante fue removido mediante un lavado con agua destilada y finalmente la muestra se dejó secar al aire libre. Para visualizar la muestra biológica se utilizó un microscopio compuesto, adicionando una gota de aceite de inmersión para conseguir un aumento de 100X y se adquirió registro fotográfico.

8.6. Elaboración de cultivos de reserva

Después de obtener las cepas puras, estas fueron resembradas en cajas de Petri con medio LB sólido adicionado con 1,000 mg/L de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y 100 mg/L de CdSO_4 . Los cultivos bacterianos fueron incubados a una temperatura de 30°C durante 48 horas. Cuando las bacterias proliferaron, se colectó una porción (disco) del medio sólido con células utilizando un asa de siembra y se transfirió a crioviales estériles de 1.5 mL. Después, se adicionó 1 mL de una solución estéril compuesta por agua destilada con glicerol en proporción 7:3 y finalmente los cultivos fueron almacenados para su preservación a una temperatura de -80°C.

8.7. Cinéticas de crecimiento

Para determinar el crecimiento de las bacterias, se cultivaron las cepas mediante la técnica de estriado por agotamiento en cajas de Petri con medio LB sólido e incubaron a 30°C durante 24 horas. Después, se colectó una colonia aislada y se resembró en medio LB líquido a una temperatura de 30°C con 150 rpm durante un periodo de 12 horas. Posteriormente, se transfirió una muestra del cultivo a una celda de cuarzo y con ayuda de un espectrofotómetro se midió su densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 600 nm. Mediante la fórmula $V_1=C_2V_2/C_1$ se calculó el volumen necesario para ajustar un matraz de 50 mL a una D.O. de 0.05, las muestras se incubaron a 30°C con 150 rpm durante un periodo de 12 horas. Finalmente, para monitorear la cinética de crecimiento de las bacterias, se colectaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas, que fueron medidas con un lector de microplacas ajustado a una longitud de onda de 600 nm y los datos de absorbancia obtenidos fueron analizados y graficados mediante el software Graphad Prism.

8.8. Concentración mínima inhibitoria en medio sólido

Para cuantificar la tolerancia de las bacterias aisladas ante distintos metales pesados (CdSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y ZnSO_4), se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) en placas de Petri. Para realizar este ensayo se cultivaron las cepas puras en medio LB sólido e incubaron a 30°C durante 24 horas. Transcurrido este periodo, se colectó una colonia aislada, se resembró en medio LB líquido y se colocó el matraz a una temperatura de 30°C a 150 rpm durante un periodo variable (4-5 horas) hasta alcanzar su fase exponencial. La muestra se transfirió a tubos falcón y se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue desechado, mientras que el pellet celular fue lavado con 5 mL de una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) previamente esterilizada. Posteriormente, la muestra se centrifugó, el PBS fue decantado y la biomasa fue

resuspendida en 5 mL de medio LB. La D.O. de la solución resultante fue medida con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Mediante la fórmula $V_1=C_2V_2/C_1$ se calculó el volumen necesario para ajustar un cultivo bacteriano fresco a una D.O. de 0.5.

En tubos falcón estériles se colocó 1 mL del cultivo bacteriano previamente ajustado (D.O. de 0.1) y 9 mL de medio LB agar tibio, la muestra se homogenizó manualmente mediante giros leves (10) y se colocó en cajas de Petri previamente adicionadas con 10 mL de medio LB agar hasta su respectiva solidificación. Posteriormente, en las cajas de Petri inoculadas, se adicionaron gotas (5 μ L) de una solución acuosa con CdSO₄, CuSO₄, MnSO₄, Pb(NO₃)₂ o ZnSO₄ en concentraciones de 50, 100, 250, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000, 25,000 y 30,000 mg/L (considerando la concentración biodisponible de metales pesados presentes en los jales mineros a partir de los cuales fueron obtenidos los aislados bacterianos y una dosis menor a la empleada en el medio selectivo de aislamiento) y como control negativo se adicionó agua destilada estéril en la misma cantidad. Las cajas de Petri resultantes se mantuvieron inmóviles hasta la respectiva evaporación de las soluciones empleadas y se incubaron a 30°C durante un periodo de 24 horas. Al día siguiente se midió el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento producidos y se obtuvo registro fotográfico.

8.9. Concentración mínima inhibitoria en medio líquido

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de CMI en medio sólido, se realizaron pruebas para determinar la CMI en medio líquido. Para realizar este ensayo se utilizó el procedimiento anterior, sin embargo, después resuspender la biomasa celular en 5 mL de medio LB y medir la absorbancia de la solución resultante, se calculó el volumen necesario para ajustar 50 mL de medio LB (adicionado con metales pesados) a una D.O. de 0.1, posteriormente las muestras

se incubaron a 30°C con 150 rpm durante un periodo de 12 horas. Para monitorear el crecimiento de las bacterias, se colectaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas, que fueron medidas con un lector de microplacas ajustado a una longitud de onda de 600 nm y los datos de absorbancia obtenidos fueron analizados y graficados mediante el software Graphad Prism.

8.10. Identificación bacteriana

Las bacterias aisladas fueron enviadas al cepario ubicado en la Facultad de Química de la UNAM para su respectiva identificación bioquímica y molecular. La identificación bioquímica se efectuó mediante el kit API® 20E de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este kit es una alternativa rápida, precisa y de fácil manejo para identificar bacterias Gram-negativas entéricas que contiene 20 pruebas bioquímicas diferentes como se muestra en la **Tabla 8**. Por otra parte, la identificación molecular se realizó mediante la amplificación y secuenciación parcial del gen ARNr 16S. Finalmente, las secuencias resultantes fueron analizadas mediante la Herramienta Básica de Búsqueda y Alineación Local (BLAST, por sus siglas en inglés) del NCBI.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas contenidas en el kit API 20E.

| Prueba | | Componentes activos | Reacción química |
|--------|------------------|-----------------------------------|--|
| 1 | ONPG | 2-nitrofenil-βD-galactopiranosida | Hidrólisis de 2-nitrofenil-βD-galactopiranosida mediante β-galactosidasa |
| 2 | ADH | L-arginina | Hidrólisis de L-arginina mediante Arginina-dihidrolasa |
| 3 | LDC | L-lisina | Hidrólisis de L-lisina mediante Lisina Decarboxilasa |
| 4 | ODC | L-ornitina | Hidrólisis de L-ornitina mediante Ornitina Decarboxilasa |
| 5 | CIT | Citrato trisódico | Empleo de citrato trisódico como única fuente de carbono |
| 6 | H ₂ S | Tiosulfato de sodio | Producción de sulfuro de hidrógeno |
| 7 | URE | Urea | Hidrólisis de la urea mediante Ureasa |
| 8 | TDA | L-triptófano | Hidrólisis de triptófano mediante Triptófano desaminasa |
| 9 | IND | L-triptófano | Producción de indol mediante triptófano |
| 10 | VP | Piruvato de sodio | Producción de acetoina |
| 11 | GEL | Gelatina | Hidrólisis de la gelatina mediante Gelatinasa |
| 12 | GLU | D-glucosa | Asimilación de D-glucosa |
| 13 | MAN | D-manitol | Asimilación de D-manitol |
| 14 | INO | Inositol | Asimilación de Inositol |
| 15 | SOR | D-sorbitol | Asimilación de D-sorbitol |
| 16 | RHA | L-ramnosa | Asimilación de L-ramnosa |
| 17 | SAC | D-sacarosa | Asimilación de D-sacarosa |
| 18 | MEL | D-melibiosa | Asimilación de D-melibiosa |
| 19 | AMY | Amigdalina | Asimilación de Amigdalina |
| 20 | ARA | L-arabinosa | Asimilación de L-arabinosa |

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Aislamiento de bacterias

Durante el aislamiento de bacterias se obtuvieron un total de 14 colonias, para poder reconocerlas se le otorgó un nombre a cada una de ellas con base en el sitio a partir del cual fueron obtenidas como se señala en la **Tabla 9**. De forma general las colonias bacterianas aisladas se caracterizan por tener color blanco brillante (100%); forma circular (100%); elevación convexa (92.8%) y cóncava (7.2%); borde redondo (100%); textura lisa (100%); consistencia cremosa (92.8%) y dura (7.8%); diámetro de 1 mm (50%) y 2mm (50%) como se muestra en la **Tabla 10**.

Tabla 9. Nomenclatura de los aislados bacterianos.

| Sitio | Colonia |
|-----------|---------|
| SJ1-MJ-B | J1-MJ-B |
| SJ1-MJ-M | J1-MJ-M |
| SJ1-MJ-S | J1-MJ-S |
| SJ1-PL-B | J1-PL-B |
| SJ1-PL-S | J1-PL-S |
| SJ2-MJ-B | J2-MJ-B |
| SJ2-MJ-M | J2-MJ-M |
| SJ2-MJ-S | J2-MJ-S |
| SJ2-PL-B | J2-PL-B |
| SJ2-PL-S | J2-PL-S |
| SJ2-DV-M1 | J2-DV-1 |
| SJ2-DV-M2 | J2-DV-2 |
| SIN-DV-1 | IN-DV-1 |
| SIN-DV-2 | IN-DV-2 |

De acuerdo con la ubicación, la morfología de colonias obtenidas en el jale 1 fueron color blanco brillante (100%); forma circular (100%); elevación convexa (100%); borde redondo (100%); textura lisa (100%); consistencia cremosa (100%); diámetro de 1 mm (20%) y de 2mm (80%). Mientras que en el jale 2 fueron color blanco brillante (100%); forma circular (100%); elevación convexa (85.7%) y cóncava (14.3%); borde redondo (100%); textura lisa (100%); consistencia cremosa (85.7%) y dura (14.3%); diámetro de 1 mm (57.1%) y de 2mm (42.9%). Finalmente, las bacterias aisladas en el invernadero del CIByC fueron color blanco brillante (100%); forma circular (100%); elevación convexa (100%) y cóncava (100%); borde redondo (100%); textura lisa (100%); consistencia cremosa (100%); diámetro de 1 mm (100%). Para observar con detalle cómo cambió la proporción en la morfología de las colonias aisladas con base en la ubicación (jale 1, jale 2 e invernadero), el tipo de muestra (jale o rizósfera), la especie de planta a partir de la cual se colectaron (*P. laevigata* y *D. viscosa*) y la zona en la que fueron aisladas (base, media y superficial), consultar la sección del anexo.

La morfología en colonia de los aislados bacterianos corresponde con lo reportado por Mustapha y Halimoon, (2015), quienes aislaron bacterias a partir de efluentes industriales de galvanoplastia, con características similares que incluyen color blanco (80%) y amarillo (20%); forma circular (80%) e irregular (20%); borde redondo (80%) y ondulado (20%); elevación plana (20%), elevada (40%) y convexa (40%). Mientras que Samanta *et al.*, (2012), obtuvo aislados bacterianos cuya morfología en colonia fue color blanco opaco (100%); forma circular (100%); elevación convexa (100%); borde redondo (100%); consistencia cremosa (100%); diámetro largo (100%).

Aunque la morfología de las colonias bacterianas es relativamente estable, las condiciones ambientales pueden modificar sus características generales. De acuerdo con Matsushita *et al.*, (2004), algunos factores como la nutrición, temperatura o exposición a compuestos tóxicos, pueden alterar el fenotipo de las

bacterias a nivel colonial. Por su parte, Sunilkumar *et al.*, (2021), han documentado que los metales pesados producen cambios considerables en la morfología de las colonias bacterianas, debido a que estos elementos químicos repercuten en la síntesis de biomoléculas (lípidos, polisacáridos y proteínas) que intervienen en la organización intracelular e intercelular. Además, Mounaouer *et al.*, (2014), atribuyen estos cambios a la capacidad de las células para producir biopolímeros relacionados con la protección celular ante el estrés producido por los metales pesados.

Por otra parte, se ha reportado que los metales pesados pueden producir cambios en la morfología celular de las bacterias. En el estudio realizado por Mohite *et al.*, (2018), mediante el análisis de microfotografías electrónicas, se comprobó que las bacterias sometidas a estrés por Ag, Cd, Cr, Cu, Hg y Pb, presentan cambios en la textura celular, originados por una mayor acumulación de exopolisacáridos en la membrana plasmática. Por su parte, Wang *et al.*, (2020), mediante la misma metodología, observó un aumento en la longitud de las células bacterianas expuestas a metales pesados, lo que se traduce como una disminución en la relación entre la superficie y el volumen celular. Estos cambios morfológicos a nivel celular están estrechamente relacionados con la capacidad de las bacterias para adaptarse y sobrevivir en ambientes contaminados con metales pesados.

Tabla 10. Características morfológicas de las colonias bacterianas cultivadas en medio sólido LB adicionado con $Pb(NO_3)_2$ (1,000 mg/L) y $CdSO_4$ (100 mg/L) a 30°C durante 24 horas (J2-MJ-S 48 horas).

| Colonia | Color | Forma | Elevación | Borde | Textura | Consistencia | Diámetro (mm) |
|---------|------------------|----------|-----------|---------|---------|--------------|---------------|
| J1-MJ-B | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 2 |
| J1-MJ-M | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 1 |
| J1-MJ-S | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 2 |
| J1-PL-B | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 2 |
| J1-PL-S | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 2 |
| J2-MJ-B | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 2 |
| J2-MJ-M | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 2 |
| J2-MJ-S | Blanco brillante | Circular | Cóncava | Redondo | Lisa | Dura | 1 |
| J2-PL-B | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 1 |
| J2-PL-S | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 2 |
| J2-DV-1 | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 1 |
| J2-DV-2 | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 1 |
| IN-DV-1 | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 1 |
| IN-DV-2 | Blanco brillante | Circular | Convexa | Redondo | Lisa | Creмоса | 1 |

9.2. Morfología celular de los aislados bacterianos

De forma general, los 14 aislados obtenidos fueron bacterias Gram-negativas, de las cuales seis poseen forma de estreptobacilos, siete son bacilos cortos y uno es un filamento, como se señala en la **Tabla 11** y se observa en la **Figura 1**. De acuerdo con la ubicación, las características celulares de las bacterias en el jale 1 fueron Gram-negativas (100%) con forma de estreptobacilos (100%). Mientras que en el jale 2 fueron Gram-negativas (100%) con forma de bacilos cortos (85.7%) y filamentos (14.3%). Finalmente, en el invernadero del CIByC fueron Gram-negativas (100%) con forma de bacilos cortos (50%) y filamentos (50%). Para observar con detalle cómo cambia la proporción en la morfología celular de las bacterias aisladas con base en la ubicación, el tipo de muestra, la especie de planta a partir de la cual se colectaron y la zona en la que fueron aisladas, consultar la sección del anexo.

Tabla 11. Características microbiológicas de los aislados bacterianos.

| Aislado | Tinción de Gram | Forma |
|---------|-----------------|-----------------|
| J1-MJ-B | Gram-negativas | Estreptobacilos |
| J1-MJ-M | Gram-negativas | Estreptobacilos |
| J1-MJ-S | Gram-negativas | Estreptobacilos |
| J1-PL-B | Gram-negativas | Estreptobacilos |
| J1-PL-S | Gram-negativas | Estreptobacilos |
| J2-MJ-B | Gram-negativas | Bacilos cortos |
| J2-MJ-M | Gram-negativas | Bacilos cortos |
| J2-MJ-S | Gram-negativas | Filamentos |
| J2-PL-B | Gram-negativas | Bacilos cortos |
| J2-PL-S | Gram-negativas | Bacilos cortos |
| J2-DV-1 | Gram-negativas | Bacilos cortos |
| J2-DV-2 | Gram-negativas | Bacilos cortos |
| IN-DV-1 | Gram-negativas | Bacilos cortos |
| IN-DV-2 | Gram-negativas | Estreptobacilos |

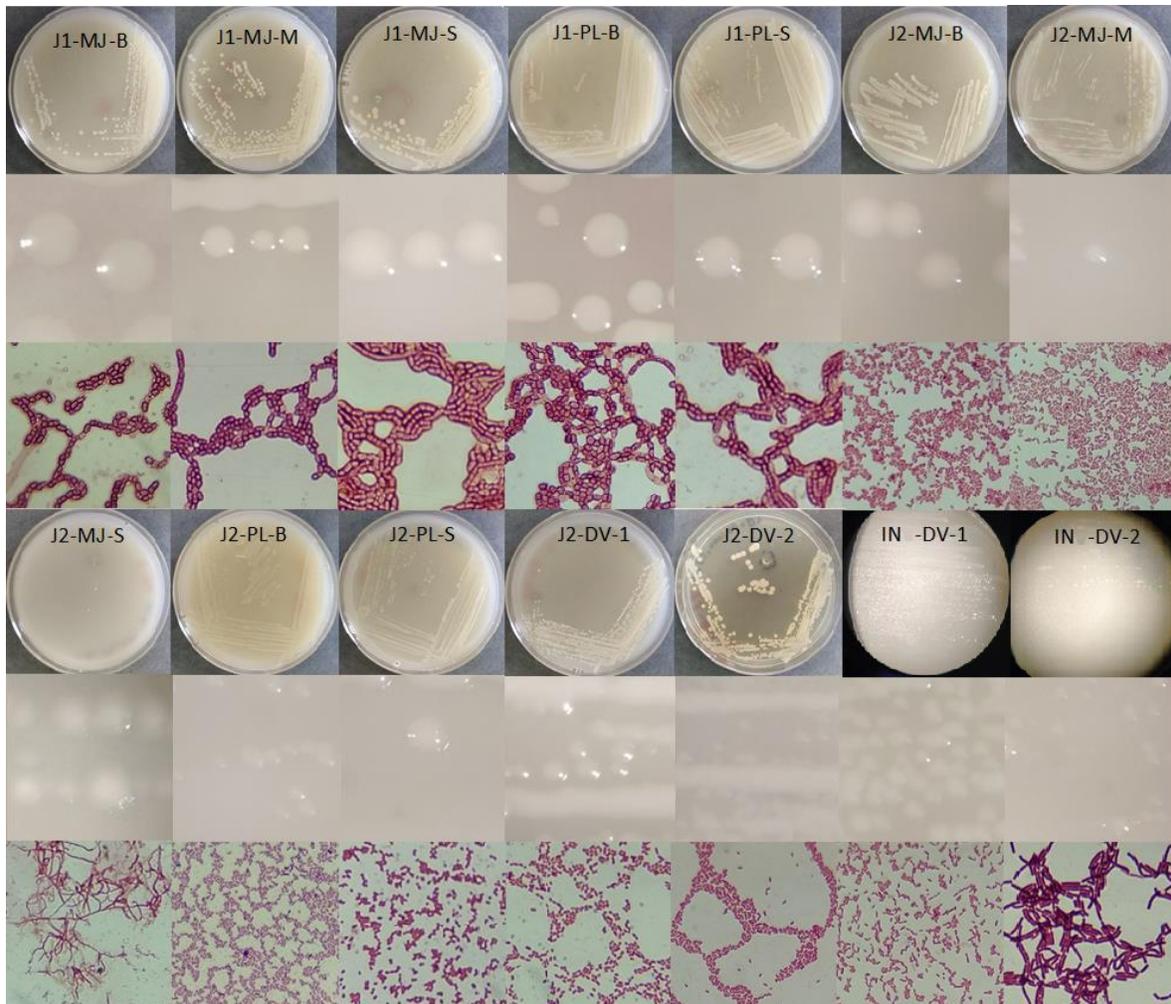


Figura 1. Características microbiológicas de los aislados bacterianos.

Aunque hasta el momento se conocen 9,346 especies bacterianas, de acuerdo con Cavalier, (2002) e ITIS, (2021), un 52% son Gram-negativas y el 48% restante Gram-positivas. Desde esta perspectiva, sería sensato pensar que al aislar bacterias presentes en una muestra ambiental la proporción entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas sería similar, sin embargo, en este trabajo obtuvimos que el 100% de los aislados son Gram-negativos. Estos resultados contrastan con lo reportado por Yamina *et al.*, (2012), que empleo agar nutritivo adicionado con 100 mg/L de Cd, Cr, Pb y Zn para aislar bacterias tolerantes a metales pesados a partir de efluentes de tenería, donde obtuvo un total de 13 aislados bacterianos, de los

cuales, un 77% fueron Gram-negativos y el 23% restante Gram-positivos. Por su parte, en la investigación realizada por Marzan *et al.*, (2017), se determinó que al aislar bacterias en aguas residuales empleando medio de cultivo LB suplementado con 300 mg/L de Pb, un 33% de los aislados fueron Gram-negativos y el 67% restante Gram-positivos. Además, el estudio realizado por Ayangbenro *et al.*, (2019), concluye que a partir de las muestras colectadas en una mina activa y cultivadas en medio LB adicionado con 50 mg/L de Cd, Cr y Pb, el 100% de las bacterias aisladas fueron Gram-negativas. Finalmente, durante la investigación realizada por Biswas *et al.*, (2021), se menciona que la presencia de bacterias Gram-negativas en sitios contaminados con metales pesados puede justificarse, debido principalmente a que este tipo de bacterias se caracterizan por tener bombas de eflujo eficientes (en comparación con la bacterias Gram-positivas) que les permiten expulsar las sustancias tóxicas hacia el exterior celular, evitar su acumulación interna y disminuir los efectos negativos producidos a largo plazo.

9.3. Cinéticas de crecimiento de los aislados bacterianos

Durante los ensayos para evaluar las cinéticas de crecimiento fue posible observar tres periodos diferenciados entre los que se incluye la fase de latencia, exponencial y estacionaria. A grandes rasgos, los aislados J1-MJ-B, J1-MJ-M, J1-MJ-S, J2-PL-B, J2-PLS e IN-DV-2 presentaron una fase de latencia entre las 0-2 horas, el crecimiento de tipo exponencial se produjo entre las 4-6 horas y la fase estacionaria entre las 10-12 horas. Por otra parte, los aislados J2-MJ-B, J2-MJ-S, J2-PL-B, J2-PL-S, J2-DV-1, J2-DV2 e IN-DV-1 no presentaron una fase de latencia evidente, mientras que la fase de crecimiento exponencial tuvo un periodo de 0-6 horas, finalmente la fase estacionaria ocurrió después de las 10 horas. Es necesario destacar que la cinética de crecimiento para el aislado J2-MJ-S, no pudo ser realizada, debido a que esta cepa fue incapaz de crecer en medio de cultivo líquido bajo las condiciones empleadas (el crecimiento en medio de cultivo sólido es de tipo internalizado y su muerte en cultivo líquido indican que es una bacteria con

metabolismo anaerobio), por este motivo fue descartada para realizar pruebas posteriores.

Aunque existen diferencias entre las curvas de crecimiento bacteriano, es necesario destacar que esto puede deberse a la capacidad de cada bacteria para crecer en condiciones fisicoquímicas específicas, es decir, la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo utilizado, la temperatura, el pH, la agitación, entre otros factores, pueden repercutir en el crecimiento bacteriano, además, es necesario tomar en cuenta las diferencias genéticas o metabólicas de cada aislado, así como, el tiempo de duplicación como lo menciona Madigan *et al.*, (2015). En este sentido el aislado con mayor crecimiento fue J1-MJ-B con una D.O. de 0.83 a las 12 horas, mientras que la cepa con menor crecimiento (sin tomar en cuenta a J2-MJ-S) fue IN-DV-2 con una D.O. de 0.53 a las 12 horas. Un resumen de los datos obtenidos para las cinéticas de crecimiento se muestra en la sección del anexo, mientras que las gráficas correspondientes a las curvas de crecimiento bacteriano se señalan en la **Figura 2, 3 y 4.**

La producción de biomasa bacteriana resulta de gran interés en el tratamiento de sitios contaminados con metales pesados, debido a que la materia orgánica (viva o muerta) puede ser empleada en procesos de bioadsorción. En la investigación realizada por García *et al.*, (2016), se aislaron bacterias del género *Bacillus* capaces de tolerar Cd, Cr, Mn y Pb en concentraciones de hasta 50 mg/L, respectivamente. Además, se demostró que la bioadsorción depende en gran medida del tiempo de contacto entre la biomasa bacteriana y los efluentes que contienen metales pesados, cuyo punto más cercano al estado de equilibrio se alcanzó aproximadamente a los 80 minutos, por otra parte, la adsorción de estos elementos químicos fue favorecida en condiciones de pH alcalinas entre los rangos de 7-12.

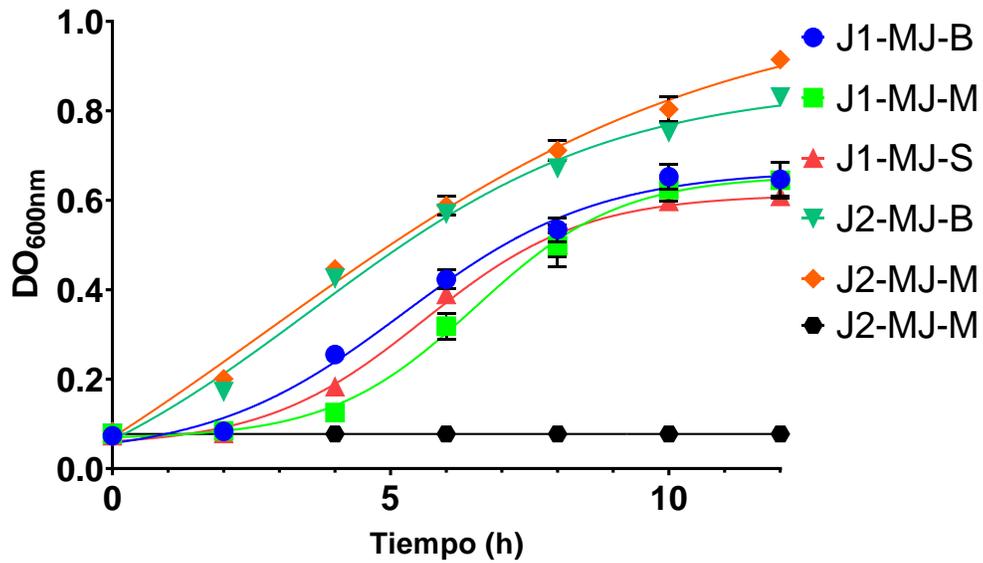


Figura 2. Cinéticas de crecimiento de los aislados obtenidos en los jales mineros. Cada punto indica la media, mientras que las barras de dispersión representan la desviación estándar.

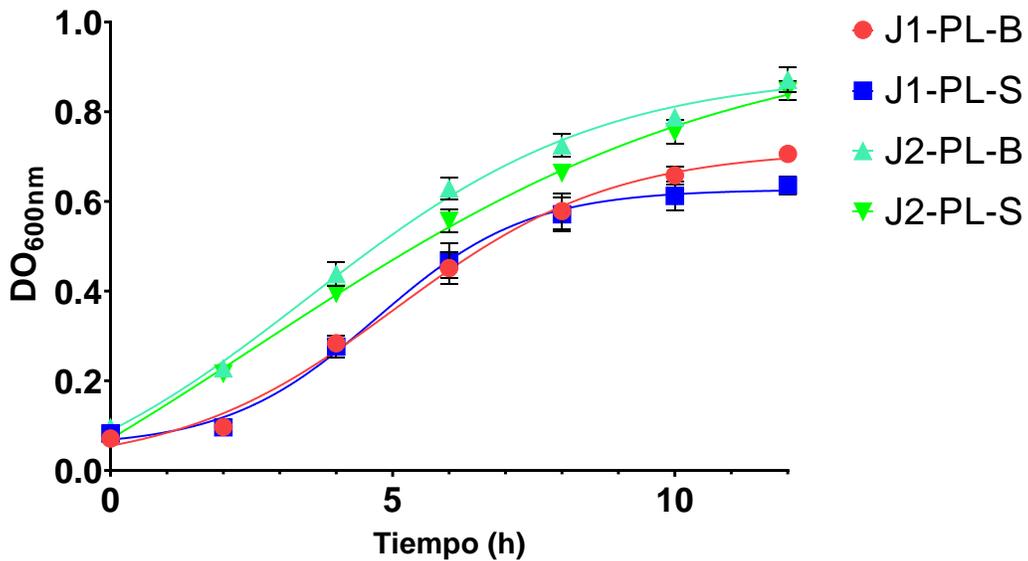


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de los aislados obtenidos en la rizósfera de *P. laevigata*. Cada punto indica la media, mientras que las barras de dispersión representan la desviación estándar.

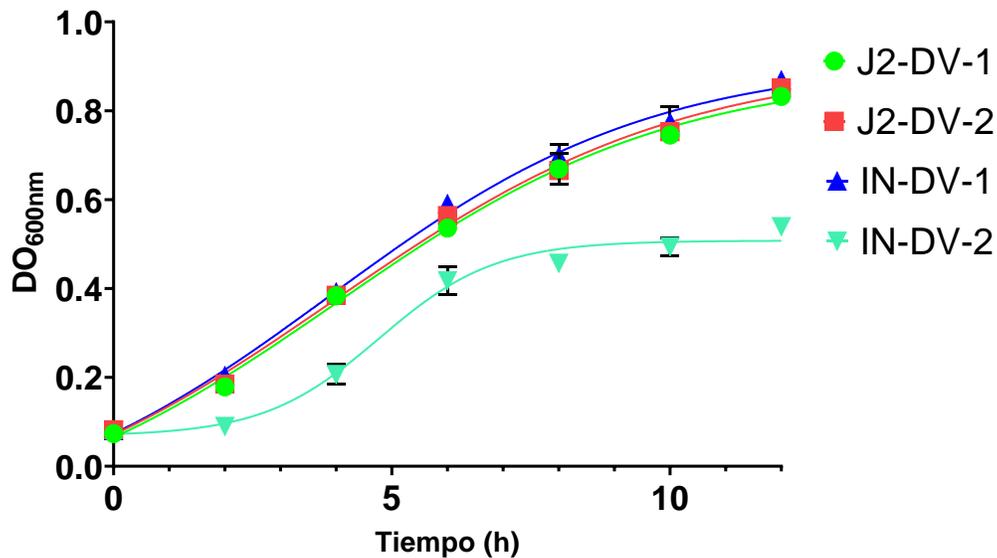


Figura 4. Cinéticas de crecimiento de los aislados obtenidos en la rizósfera de *D. viscosa*. Cada punto indica la media, mientras que las barras de dispersión representan la desviación estándar.

9.4. Concentración mínima inhibitoria en medio sólido de los aislados bacterianos

Durante los ensayos de CMI los aislados bacterianos presentaron tres modelos de tolerancia ante los metales pesados. En concentraciones bajas los metales pesados no producen una disminución en el crecimiento celular, es decir, no se observan halos de inhibición de crecimiento. En concentraciones intermedias los metales pesados causan una disminución en el crecimiento de las bacterias que es perceptible por la presencia de halos traslúcidos, esto significa que, aunque existen condiciones de estrés por las concentraciones de metales, las bacterias logran sobrevivir, desarrollarse y reproducirse. Finalmente, en concentraciones suficientemente elevadas los metales pesados inhiben totalmente la replicación celular, que se hace evidente por la presencia de halos transparentes, es decir, sin crecimiento bacteriano. Estos modelos de tolerancia se encuentran representados en la **Figura 5**.

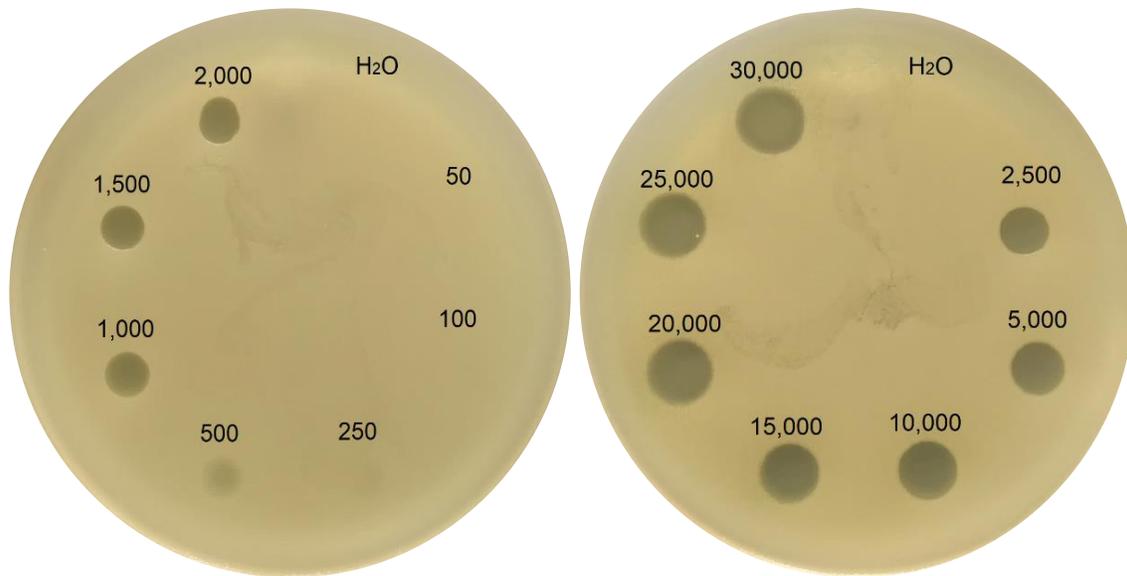


Figura 5. Ensayo de concentración mínima inhibitoria para la cepa J2-PL-S ante diferentes concentraciones de ZnSO₄ (mg/L). En concentraciones bajas (50-100 mg/L) no se observa un halo de inhibición, en cantidades intermedias (250-500 mg/L) se percibe un halo de inhibición traslúcido y en dosis elevadas (1,000-30,000 mg/L) se aprecia un halo de inhibición transparente.

Durante este trabajo se logró evaluar la tolerancia de cinco cepas ante cinco metales pesados en diferentes concentraciones. De forma general, la mayor tolerancia observada para CdSO₄, CuSO₄, MnSO₄, Pb(NO₃)₂ y ZnSO₄ fue de 1,000, 2,000, >30,000, 5,000 y 1,500 mg/L respectivamente. Por otra parte, de acuerdo con la CMI y el diámetro de inhibición, se observan diferentes patrones de tolerancia, es decir, para las cepas J2-PL-B, J2-PL-S y J2-DV-1 el patrón de tolerancia fue Mn>Cu>Cd>Pb>Zn, por su parte el aislado J2-DV-2 manifiesta un patrón de tolerancia de Mn>Pb=Cu>Zn>Cd y finalmente la bacteria IN-DV-1 tiene un patrón de tolerancia Mn>Pb>Cu>Cd>Zn. Un resumen de los datos obtenidos en los ensayos de CMI se muestra en la **Tabla 12**, además, los resultados detallados se presentan en la sección del anexo.

Los cinco aislados bacterianos evaluados en este estudio tienen una mayor tolerancia ante Cd, Cu y Zn en comparación con lo reportado para *Escherichia coli* por Bhardwaj *et al.*, (2018), cuya CMI fue de 29, 65 y 49 mg/L, respectivamente. Por otra parte, Bedoya *et al.*, (2019), demostró que la CMI para *Pseudomonas aeruginosa* ante Pb es de 2,500 mg/L, en este sentido, el aislado IN-DV-1 supera este valor con una CMI de 5,000 mg/L. Además, los cinco aislados evaluados en este trabajo tienen una mayor tolerancia ante Mn con una CMI >30,000 mg/L que supera la resistencia de diferentes bacterias aisladas en los mismos jales mineros por Solís-Miranda, (2016). Finalmente, los aislados de este estudio tienen una CMI ante Zn de 1,000 mg/L, mientras que, las bacterias aisladas por Sen y Joshi, (2016), en las minas localizadas en Zawar, Rajasthan, toleraron concentraciones de hasta 31,000 mg/L.

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria (mg/L) de aislados bacterianos expuestos a diferentes sales metálicas en medio de cultivo LB sólido.

| Cepa | Cd | | Cu | | Mn | | Pb | | Zn | |
|---------|-------|---------------------|-------|---------------------|---------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|
| | CMI | ($\Theta \pm SD$) | CMI | ($\Theta \pm SD$) | CMI | ($\Theta \pm SD$) | CMI | ($\Theta \pm SD$) | CMI | ($\Theta \pm SD$) |
| J2-PL-B | 1,000 | 5 \pm 0 | 2,000 | 6 \pm 0 | >30,000 | ND | 1,000 | 5.67 \pm 0.58 | 1,000 | 7 \pm 0 |
| J2-PL-S | 1,000 | 5.67 \pm 0.58 | 1,500 | 4 \pm 0 | >30,000 | ND | 1,000 | 6 \pm 0 | 1,000 | 6 \pm 0 |
| J2-DV-1 | 1,000 | 5.67 \pm 0.58 | 1,500 | 5 \pm 0 | >30,000 | ND | 1,000 | 6 \pm 0 | 1,000 | 6 \pm 0 |
| J2-DV-2 | 1,000 | 6.33 \pm 0.58 | 1,500 | 6 \pm 0 | >30,000 | ND | 1,500 | 6 \pm 0 | 1,500 | 7 \pm 0 |
| IN-DV-1 | 1,000 | 5.67 \pm 0.58 | 1,500 | 5.67 \pm 0.58 | >30,000 | ND | 5,000 | 7 \pm 0 | 1,000 | 6.33 \pm 0.58 |

$\Theta \pm DS$ = Diámetro de inhibición \pm desviación estándar; ND= No desarrollado

La tolerancia de las cepas aisladas ante los metales pesados evaluados, está estrechamente relacionada con el requerimiento metabólico de cada elemento químico. De acuerdo con Pal *et al.*, (2002), algunos metales pesados son esenciales en el desarrollo celular (Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni y Zn), de forma opuesta, existen elementos químicos no esenciales (Ag, Cd, Hg y Pb). Desafortunadamente, es necesario resaltar que hasta el momento no se han establecido rangos precisos para delimitar la concentración de los metales pesados requeridos o no por las bacterias, debido a que su diversidad genética es amplia y habitan en ambientes con diferentes valores de concentración y biodisponibilidad de estos elementos químicos.

Finalmente, durante el ensayo de CMI para el aislado J2-DV-2 ante Pb y a pesar de que esta bacteria no destaca por tener la mayor tolerancia reportada a este elemento químico, fue posible observar la formación de un espejo metálico como se señala en la **Figura 6**. Esto puede atribuirse a un cambio en el estado de valencia del Pb, producido por su interacción con diferentes moléculas producida por las células bacterianas. Hasta el momento, se han descrito diferentes bacterias del género *Clostridium*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Rhodobacter*, capaces de reducir el $Pb(NO_3)_2$ en PbS y en $PbSiO_3$, sin embargo, de acuerdo con Govarthanan *et al.*, (2013), los mecanismos celulares y bioquímicos de este proceso son desconocidos. Por otra parte, Lorenzo *et al.*, (2019), menciona que las bacterias reductoras de metales pesados desempeñan un papel importante en los procesos de biominería, debido a su capacidad para recuperar elementos químicos con un valor económico considerable (Ag y Au) a partir de residuos mineros. Además, es probable que la cepa J2-DV-2 pueda ser empleada en estrategias de biomineralización de Pb, por lo que se propone como una alternativa sustentable para desarrollar nuevas metodologías de remediación bacteriana para los metales pesados.



Figura 6. Formación de un espejo metálico durante el ensayo de concentración mínima inhibitoria para el aislado J2-DV-2 ante $Pb(NO_3)_2$.

9.5. Concentración mínima inhibitoria en medio líquido de los aislados bacterianos

Durante este trabajo se determinó la CMI en medio líquido para las cepas J2-PL-B, J2-PLS y J2-DV-1, ante cinco sales metálicas. Los resultados muestran que el aumento gradual en la concentración de metales pesados en el medio de cultivo, reduce el crecimiento bacteriano hasta inhibir su proliferación celular. Además, en medios de cultivo adicionados con dosis que rebasan la CMI, la turbidez aumenta dramáticamente, debido a la formación de complejos entre los componentes del caldo LB (extracto de levadura y triptona) y los metales pesados, cuyo proceso ha sido reportado previamente por Hassen *et al.*, (1998). Las curvas de crecimiento obtenidas durante los ensayos de CMI se ilustran en la **Figura 7**.

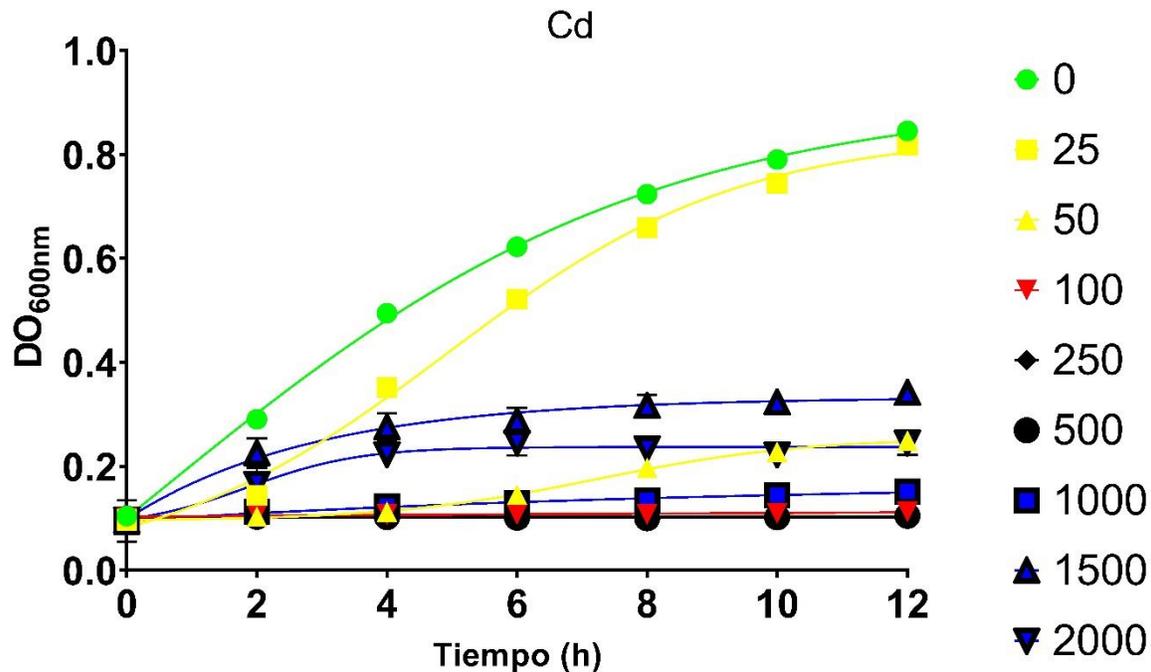


Figura 7. Cinética de crecimiento para J2-PL-B expuesta a diferentes concentraciones de CdSO₄. La línea verde muestra el crecimiento de la cepa sin metal (C-), las líneas amarillas indican un efecto bacteriostático moderado, la línea roja señalan un efecto bacteriostático total, la línea negra indican una concentración mayor a la CMI y las líneas azules la formación de complejos metálicos (omitidos en gráficas posteriores). Cada punto indica la media, mientras que las barras de dispersión representan la desviación estándar.

La CMI más alta para CdSO₄, CuSO₄, MnSO₄, Pb(NO₃)₂ y ZnSO₄ fue de 100, 250, 1,500, 2,500 y 250 mg/L respectivamente. Es importante señalar que el patrón de tolerancia para el aislado J2-PL-B fue Mn>Pb>Cu=Zn>Cd, para la cepa J2-PL-S fue Pb>Mn>Cu=Zn>Cd y para la bacteria J2-DV-1 fue Pb>Mn>Cu>Cd=Zn. Cabe resaltar que los resultados obtenidos durante los ensayos de CMI en medio líquido son diferentes a los reportados en medio sólido, sin embargo, como lo menciona Al-Hiti y Gilbert, (1983), esto puede atribuirse a que los ensayos de CMI en medio sólido son poco precisos.

Por otra parte, debido a que la biomasa bacteriana producida en medios de cultivos líquidos es significativamente mayor a la sintetizada en medios sólidos, los metales pesados esenciales como el Cu, Mn y Zn son bioacumulados e implementados en la formación de nuevas biomoléculas, por lo que su concentración y su efecto tóxico para las células disminuye. Además, las bacterias son capaces de producir compuestos orgánicos que modifican el pH del medio de cultivo y que a su vez promueven la óxido reducción de los metales pesados, modificando su toxicidad como sugieren Akinci y Guven, (2011). Un resumen de los datos obtenidos para las CMI en medio líquido se señala en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria (mg/L) de aislados bacterianos expuestos a diferentes sales metálicas en medio de cultivo LB líquido.

| Cepa | Cd | Cu | Mn | Pb | Zn |
|---------|-----|-----|-------|-------|-----|
| J2-PL-B | 100 | 250 | 2,500 | 2,000 | 250 |
| J2-PL-S | 100 | 250 | 1,500 | 2,000 | 250 |
| J2-DV-1 | 100 | 250 | 1,500 | 2,000 | 100 |

9.6. Identificación bioquímica de los aislados bacterianos

El kit de pruebas bioquímicas API 20E permitió identificar a los aislados J2-PL-S, J2-DV-1 y J2-DV-2 como *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* y *Enterobacter cloacae* respectivamente, de forma opuesta, el aislado J2-PL-B no pudo ser identificado mediante esta técnica. Cada uno de los resultados obtenidos durante este ensayo se muestran en la **Tabla 14**. Las pruebas bioquímicas API 20E, son empleadas de forma rutinaria para la identificación de bacterias entéricas. En este sentido, Cardak y Altuğ, (2014), en Estambul, Turquía, obtuvieron 126 aislados tolerantes a metales pesados que fueron agrupados en la familia Enterobacteriaceae.

Tabla 14. Resultados de las pruebas bioquímicas API 20E.

| Prueba | | Cepas bacterianas | | | |
|---------|------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| | | J2-PL-B | J2-PL-S | J2-DV-1 | J2-DV-2 |
| 1 | ONPG | + | + | + | + |
| 2 | ADH | - | - | - | + |
| 3 | LDC | - | + | + | - |
| 4 | ODC | - | - | - | + |
| 5 | CIT | + | + | + | + |
| 6 | H ₂ S | - | - | - | - |
| 7 | URE | - | + | + | - |
| 8 | TDA | - | - | - | - |
| 9 | IND | + | - | + | - |
| 10 | VP | + | + | + | + |
| 11 | GEL | - | - | - | - |
| 12 | GLU | + | + | + | + |
| 13 | MAN | + | + | + | + |
| 14 | INO | - | + | + | - |
| 15 | SOR | - | + | + | + |
| 16 | RHA | + | + | + | + |
| 17 | SAC | - | + | + | + |
| 18 | MEL | + | + | + | + |
| 19 | AMY | - | + | + | + |
| 20 | ARA | + | + | + | + |
| Especie | | No identificada | <i>K. pneumoniae</i> | <i>K. oxytoca</i> | <i>E. cloacae</i> |

- = reacción negativa; + = reacción positiva

9.7. Identificación molecular de los aislados bacterianos

Para complementar la identificación obtenida a través de pruebas bioquímicas, se realizó la amplificación del gen ARNr 16S, los productos de PCR fueron secuenciados y las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante la herramienta BLAST del NCBI como se observa en la **Tabla 15**. Durante este ensayo las secuencias obtenidas a partir de las cepas J2-PL-S y J2-DV-1 corresponden en un 97% con *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, respectivamente. De forma opuesta, las cepas J2-PL-B e IN-DV-1 no pudieron ser identificadas, debido a que sus secuencias presentan una cobertura reducida del 60% y 3%, respectivamente. Además, la secuencia obtenida de J2-DV-2 presenta una alineación al azar con la base de datos, por lo que su valor E resulta positivo y su confiabilidad es nula.

Tabla 15. Alineación de secuencias mediante BLAST.

| Aislado | Nombre | ID de la secuencia | Cobertura (%) | Valor E | Identidad (%) |
|-----------------------|------------------------------|--------------------|---------------|----------|---------------|
| J2-PL-B (1,138 pb) | Bacterium Y4_579_1 | KF295313.1 | 60 | 5.00E-98 | 74.36 |
| | <i>Citrobacter freundii</i> | LC110442.1 | 25 | 2.00E-37 | 76.90 |
| | <i>Enterobacter soli</i> | MK000881.1 | 14 | 6.00E-18 | 77.58 |
| | <i>Enterobacter sp.</i> | MG836033.1 | 14 | 6.00E-18 | 77.19 |
| J2-PL-S (1,133 pb) | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MT516162.1 | 99 | 0 | 97 |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | KY494861.1 | 99 | 0 | 96.92 |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MT597479.1 | 99 | 0 | 96.84 |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MT277112.1 | 99 | 0 | 96.92 |

Continuación **Tabla 15.**

| Aislado | Nombre | ID de la secuencia | Cobertura (%) | Valor E | Identidad (%) |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------|---------------|---------|---------------|
| J2-DV-1 (1,113 pb) | Bacteria no cultivada | HM841666.1 | 98 | 0 | 96.73 |
| | <i>Klebsiella sp.</i> UIWRF0480 | KR190043.1 | 98 | 0 | 96.65 |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | KF303807.1 | 98 | 0 | 96.65 |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | AJ871857.1 | 98 | 0 | 96.91 |
| J2-DV-2 (937 pb) | <i>Pseudomonas sp.</i> | MK673959.1 | 3 | 0.017 | 100 |
| | Bacterium | MK824297.1 | 3 | 0.017 | 100 |
| | <i>Enterobacter sp.</i> | MG754444.1 | 3 | 0.017 | 100 |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MZ389297.1 | 3 | 0.017 | 100 |

E = Valor de aciertos al azar

9.8. Genes de tolerancia a metales pesados de los aislados bacterianos

La tolerancia de las bacterias identificadas ante metales pesados se atribuye principalmente a la presencia de genes que codifican proteínas para expulsar, adsorber y cambiar el estado de óxido reducción de estos elementos químicos. Los genes de tolerancia a metales pesados pueden encontrarse directamente en el cromosoma bacteriano o ser adquiridos mediante la incorporación de plásmidos, en este sentido, para *K. pneumoniae* se han descrito diferentes genes alojados en el cromosoma como *chrB* y *chrB corA*, *corC* y *fieF*, de forma opuesta, los genes *arsA*, *arsC* y *pbrA* ha sido encontrados en los plásmidos *pKPN-IT*, *pKP187* y *pLVPK* respectivamente. Las proteínas codificadas por el genoma también pueden actuar de forma específica o inespecífica con los metales pesados, es decir, existen proteínas transportadoras de membrana implicadas en la movilidad de un solo elemento químico como *merT* que transporta únicamente Hg, contrariamente, la

proteína mntH es capaz de transportar múltiples metales pesados como Cd, Co, Fe, Mn y Zn. Algunos de los genes de tolerancia que poseen las especies bacterianas identificadas en este trabajo se muestran en la **Tabla 16**.

Retomando la **Tabla 13**, podemos observar que la tolerancia del aislado J2-PL-B es diferente para la mayoría de metales pesados, esto se debe probablemente a que el transporte de Pb y Mn sea realizado por un sistema especializado, mientras que para Cu y Zn el sistema sea inespecífico, debido a que no hay una diferencia entre la tolerancia a estos metales pesados. Por otra parte, si comparamos la tolerancia entre bacterias para los metales pesados podemos notar que, aunque hay diferencias, es probable que las bacterias aisladas posean mecanismos de tolerancia similares a excepción de la cepa J2-PL-B para Mn y *K. oxytoca* para Zn.

Tabla 16. Genes de tolerancia a metales pesados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. cloacae*.

| Especie | Gen | Gene Bank ID/BACMET ID | Confirmado/ Predictivo | Tolerancia | Codifica | Referencia |
|----------------------|-------------|------------------------|---------------------------|-----------------|--|------------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> | <i>arsA</i> | AEV55102.1 | Predictivo | As y Sb | ATPasa para el eflujo de arsenito (588 aa) | García <i>et al.</i> 2012 |
| | <i>arsB</i> | YP_002287001 | Predictivo | As y Sb | Subunidad en la bomba de eflujo de arsenito (429 aa) | Gootz <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>arsC</i> | YP_002235705.1 | Predictivo | As | Arsenato reductasa (141 aa) | Foutz <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>chrA</i> | AEJ98529.1 | Predictivo | Cr | Transportador de cromato (455 aa) | Shin <i>et al.</i> , 2012 |
| | <i>chrB</i> | YP_002238121.1 | Predictivo | Cr | Proteína de resistencia a cromato (319 aa) | Foutz <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>cusF</i> | BAC0110 | Confirmado | Cu y Ag | Proteína de unión periplásmica (subunidad de una bomba de eflujo) (110 aa) | Franke <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>corA</i> | ZP_06014099.1 | Predictivo | Co, Mg, Mn y Ni | Proteína transportadora (316 aa) | Muzny <i>et al.</i> 2009 |
| | <i>corC</i> | ZP_06014468.1 | Predictivo | Co y Mg | Proteína de eflujo (315 aa) | Muzny <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>cueO</i> | AEJ96539.1 | Predictivo | Cu | Multicobre oxidasa (532 aa) | Shin <i>et al.</i> , 2012 |
| | <i>cutF</i> | YP_002240320.1 | Predictivo | Cu | Proteína de adhesión a Cu (232 aa) | Delhaye <i>et al.</i> , 2019 |

Continuación **Tabla 16**

| Especie | Gen | Gene Bank ID/BACMET ID | Confirmado/ Predictivo | Tolerancia | Codifica | Referencia |
|----------------------|-------------|------------------------|---------------------------|------------------------|--|--------------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> | <i>fetB</i> | ZP_06014816.1 | Predictivo | Fe | ATPasa de eflujo (260 aa) | Muzny <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>fieF</i> | YP_002917064.1 | Predictivo | Cd, Co, Fe, Ni y Zn | Proteína de eflujo (300 aa) | Foutz <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>merT</i> | AAM44223.1 | Predictivo | Hg | Proteína transportadora de mercurio (136 aa) | Essa <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>mgtA</i> | YP_002240790.1 | Predictivo | Co y Mg | ATPasa transportadora (902 aa) | Foutz <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>mntH</i> | AEW62513.1 | Predictivo | Cd, Co, Fe, Mn y Zn | Proteína transportadora (392 aa) | Ou <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>K. pneumoniae</i> | <i>modA</i> | YP_002239621.1 | Predictivo | Mo y W | Proteína periplásmica transportadora (257 aa) | Foutz <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>pbrA</i> | BAC0298 | Confirmado | Pb | ATPasa de eflujo (799 aa) | Borremans <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>pbrB</i> | BAC0299 | Confirmado | Pb | Peptidasa señal de eflujo (358 aa) | Borremans <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>siP</i> | BAC0346 | Confirmado | Ag | ATPasa de eflujo (826 aa) | Gupta <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>K. oxytoca</i> | <i>nirA</i> | BAC0276 | Confirmado | Ni | Proteína de unión con una región C-terminal rica en histidina (356 aa) | Park <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>nirB</i> | BAC0277 | Confirmado | Ni | Proteína de unión (89 aa) | Park <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>niC</i> | BAC0278 | Confirmado | Ni | Proteína transportadora en la membrana (307 aa) | Park <i>et al.</i> , 2010 |

Continuación **Tabla 16**

| Especie | Gen | Gene Bank ID/BACMET ID | Confirmado/ Predictivo | Tolerancia | Codifica | Referencia |
|-------------------|-------------|------------------------|---------------------------|-----------------|---|----------------------------------|
| <i>K. oxytoca</i> | <i>nirD</i> | BAC0279 | Confirmado | Ni | Proteína transportadora de (164 aa) | Park <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>E. cloacae</i> | <i>arsA</i> | YP_003602593.1 | Predictivo | As y Sb | ATPasa de eflujo | Ren <i>et al.</i> , 2010 |
| | <i>corA</i> | YP_003615448.1 | Predictivo | Co, Mn, Mg y Ni | Proteína transportadora (316 aa) | Ren <i>et al.</i> , 2010 |
| | <i>chrA</i> | YP_003612468.1 | Predictivo | Cr | Proteína transportadora de cromato (455 aa) | Ren <i>et al.</i> , 2011 |
| | <i>merA</i> | CAA70231.1 | Predictivo | Hg | Mercurio reductasa (561 aa) | Minakhin, 1996 |
| | <i>merF</i> | BAC0228 | Confirmado | Hg | Proteína transportadora (81 aa) | Wilson <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>pfr</i> | YP_004952692.1 | Predictivo | Cu, Fe y Mn | Ferritina 1 (165 aa) | Humann <i>et al.</i> , 2011 |
| | <i>terW</i> | BAC0391 | Confirmado | Te | Proteína transportadora (155 aa) | Valkovicova <i>et al.</i> , 2011 |
| | <i>zinT</i> | YP_003612513.1 | Predictivo | Cd y Zn | Proteína hipotética (212 aa) | Ren <i>et al.</i> , 2011 |

9.9. Potencial biotecnológico de los aislados bacterianos

Las bacterias identificadas destacan por su capacidad para ser empleadas en procesos de remediación de metales pesados como la bioadsorción y biomineralización, además, como lo menciona Liu et al., (2014), son capaces de promover el crecimiento vegetal y potenciar procesos de fitorremediación de metales pesados. Las especies bacterianas identificadas en este trabajo también han sido reportadas como buenos candidatos para realizar diferentes procesos biotecnológicos. Por otra parte, *K. pneumoniae* es una bacteria con la capacidad para degradar compuestos derivados del petróleo entre los que se incluye el pireno y el benzo-[α]-pireno, pueden producir fitohormonas como el ácido indol-3-acético esenciales para el crecimiento vegetal y producir dioles empleados en la producción de bioplásticos (Phadi et al., 2013; Pramanik et al., 2017; Kumar et al., 2019). Por su parte, *K. oxytoca* es capaz de realizar la fijación de nitrógeno atmosférico, degradar plaguicidas organoclorados (endosulfán) u organofosforados (glifosato) y producir polisacáridos empleados en el tratamiento de intoxicaciones producidas por metales pesados (Gallo et al., 2018; Tomulescu et al., 2021). Finalmente, *E. cloacae* puede emplearse en el tratamiento de aguas residuales que contienen compuestos nitrogenados, producir biocombustibles (biohidrógeno) o degradar petróleo y fenantreno (Ozyurek y Bilkay, 2017; Wan et al., 2017; Abdel et al., 2020; Zhang et al., 2021).

10. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo comprenden:

- Se obtuvieron 14 aislados bacterianos Gram-negativos.
- La concentración mínima inhibitoria más alta para los aislados bacterianos evaluados en medio sólido ante CdSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y ZnSO_4 fue de 1,000, 2,000, >30,000, 5,000 y 1,500 mg/L respectivamente.
- La concentración mínima inhibitoria más alta para los aislados bacterianos evaluados en medio líquido ante CdSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y ZnSO_4 fue de 100, 250, 1,500, 2,500 y 250 mg/L respectivamente.
- El patrón de tolerancia en medio sólido para los aislados J2-PL-B, J2-PL-S y J2-DV-1 fue $\text{Mn}>\text{Cu}>\text{Cd}>\text{Pb}>\text{Zn}$, para la cepa J2-DV-2 fue $\text{Mn}>\text{Pb}=\text{Cu}>\text{Zn}>\text{Cd}$ y para la bacteria IN-DV-1 fue $\text{Mn}>\text{Pb}>\text{Cu}>\text{Cd}>\text{Zn}$. Mientras que el patrón de tolerancia en medio líquido para el aislado J2-PL-B fue $\text{Mn}>\text{Pb}>\text{Cu}=\text{Zn}>\text{Cd}$, para la cepa J2-PL-S fue $\text{Pb}>\text{Mn}>\text{Cu}=\text{Zn}>\text{Cd}$ y para la bacteria J2-DV-1 fue $\text{Pb}>\text{Mn}>\text{Cu}>\text{Cd}=\text{Zn}$.
- La tolerancia de los aislados bacterianos ante los metales pesados evaluados está relacionada con diferentes mecanismos celulares de resistencia codificados por el genoma de cada bacteria.

- Las bacterias identificadas corresponden con *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* y *Enterobacter sp.*
- Las bacterias identificadas son candidatos potenciales para emplearse en procesos de biorremediación de sitios contaminados con metales pesados.

11. PERSPECTIVAS

Para continuar con este trabajo se han planteado diferentes perspectivas que comprenden:

- Continuar con la caracterización de la resistencia a metales pesados y la identificación de los aislados bacterianos.
- Determinar la capacidad de remoción de metales pesados de las cepas caracterizadas, a través de la evaluación de la adsorción, bioacumulación y mineralización de metales pesados con el fin de dilucidar el potencial de las bacterias para ser empleadas en procesos de remediación.
- Determinar el efecto de mezclas de metales pesados sobre el crecimiento de los aislados bacterianos.
- Evaluar la tolerancia a metales pesados de consorcios bacterianos hacia los metales pesados evaluados y sus combinaciones.
- Evaluar la capacidad de degradación de contaminantes orgánicos como plaguicidas organofosforados por las cepas de *K. pneumonie* y *K. oxytoca* caracterizadas.
- Evaluar la capacidad de las bacterias para promover el crecimiento vegetal y promover la fitorremediación de metales pesados.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Agboola, O., Babatunde, D. E., Fayomi, O. S. I., Sadiku, E. R., Popoola, P., Moropeng, L., Yahaya, A., & Mamudu, O. A. (2020). A review on the impact of mining operation: Monitoring, assessment and management. *Results in Engineering*, 8, 100181.
- Akinci, G., & Guven, D. E. (2011). Bioleaching of heavy metals contaminated sediment by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. *Desalination*, 268(1-3), 221-226.
- Al-Hiti, M. M. A., & Gilbert, P. (1983). A note on inoculum reproducibility: a comparison between solid and liquid culture. *Journal of Applied Bacteriology*, 55(1), 173-175.
- Alexakis, D. (2016). Human health risk assessment associated with Co, Cr, Mn, Ni and V contents in agricultural soils from a Mediterranean site. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(3), 359-373.
- Ali, H., & Khan, E. (2018). What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term 'heavy metals'-proposal of a comprehensive definition. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(1), 6-19.
- Ali, H., & Khan, E. (2019). Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs-Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25(6), 1353-1376.
- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019, 1-14.
- Alloway, B. J. (2012). Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. *Springer Science & Business Media*. 22, 11-29.
- Aslam, S. N., Newman, M. A., Erbs, G., Morrissey, K. L., Chinchilla, D., Boller, T., Jensen, T. T., Castro, C., Lerano, T. Molinaro, A., Jackson, R. W., Knigth, M. R., & Cooper, R. M. (2008). Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Current Biology*, 18(14), 1078-1083.
- Awa, S. H., & Hadibarata, T. (2020). Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(2), 1-15.

- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(1), 94.
- Ayangbenro, A. S., Babalola, O. O., & Aremu, O. S. (2019). Biofloculant production and heavy metal sorption by metal resistant bacterial isolates from gold mining soil. *Chemosphere*, *231*, 113-120.
- Bálsamo Crespo, E., & Bulus Rossini, G. (2021). Comparative Assessment of Cadmium and Copper Toxicity to *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *107*(2), 378-384.
- Benhalima, L., Amri, S., Bensouilah, M., & Ouzrout, R. (2020). Heavy metal resistance and metallothionein induction in bacteria isolated from Seybouse river, Algeria. *Applied Ecology and Environmental Research*, *18*(1), 1721-1737.
- Bengochea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(2), 123-144.
- Bhardwaj, R., Gupta, A., & Garg, J. K. (2018). Impact of heavy metals on inhibitory concentration of *Escherichia coli*—a case study of river Yamuna system, Delhi, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(11), 1-17.
- Biswas, R., Halder, U., Kabiraj, A., Mondal, A., & Bandopadhyay, R. (2021). Overview on the role of heavy metals tolerance on developing antibiotic resistance in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology*, *203*(6), 2761-2770.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M. B., & Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal (loid) s contaminated soils-to mobilize or to immobilize?. *Journal of Hazardous Materials*, *266*, 141-166.
- Bradl, H. B. (2005). Sources and origins of heavy metals. *Interface Science and Technology*, *6*, 1-27.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chávez-Ávila, V. M., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd. MC Johnston). I. Via cotyledonary nodes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *43*(3), 260-266.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C. E., & Vernon-Carter, E. J. (2010). *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*, *101*(15), 5862-5867.

- Buendía-González, L., Cruz-Sosa, F., Saíguez-Huezo, M. E., Barrera-Díaz, C. E., Hernández-Jaimes, C., & Orozco-Villafuerte, J. (2019). In vitro simultaneous accumulation of multiple heavy metals by *Prosopis laevigata* seedlings cultures. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3), 1167-1177.
- Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., Alfaro-De La Torre, M. C., & García-De La Cruz, R. F. (2008). Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, México. *Water, Air, and Soil Pollution*, 188(1), 297-309.
- Castro-Franco, R., y Bustos Zagal, M. G. (2003). Lagartijas de Morelos, México: distribución, hábitat y conservación. *Acta Zoológica Mexicana*, (88), 123-142.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), 7-76.
- Charkiewicz, A. E., & Backstrand, J. R. (2020). Lead toxicity and pollution in Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(12), 4385.
- Chellaiah, E. R. (2018). Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Applied Water Science*, 8(6), 1-10.
- Chen, X., Zhao, Y., Zeng, C., Li, Y., Zhu, L., Wu, J., Chen, J., & Wei, Z. (2019). Assessment contributions of physicochemical properties and bacterial community to mitigate the bioavailability of heavy metals during composting based on structural equation models. *Bioresource Technology*, 289, 121657.
- Cheng, S. Y., Show, P. L., Lau, B. F., Chang, J. S., & Ling, T. C. (2019). New prospects for modified algae in heavy metal adsorption. *Trends in Biotechnology*, 37(11), 1255-1268.
- Chiboub, M., Saadani, O., Fatnassi, I. C., Abdelkrim, S., Abid, G., Jebara, M., & Jebara, S. H. (2016). Characterization of efficient plant-growth-promoting bacteria isolated from *Sulla coronaria* resistant to cadmium and to other heavy metals. *Comptes Rendus Biologies*, 339(9-10), 391-398.
- Corona-Chávez, P., Maldonado, R., Ramos-Arroyo, Y. R., Robles-Camacho, J., Lozano-SantaCruz, R., & Martínez-Medina, M. (2017). Geoquímica y mineralogía de los jales del distrito minero Tlalpujahua-El Oro, México, y sus implicaciones de impacto ambiental. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 34(3), 250-273.

- Covarrubias, S. A., & Cabriales, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7-21.
- Dave, D., Sarma, S., Parmar, P., Shukla, A., Goswami, D., Shukla, A., & Saraf, M. (2020). Microbes as a boon for the bane of heavy metals. *Environmental Sustainability*, 3(3), 233-255.
- DOF, Diario Oficial de la Federación (2007). Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. [En línea] disponible en: https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat_ssa1-2004.pdf
- DOF, Diario Oficial de la Federación (2011) Norma Oficial Mexicana NOM-157-SEMARNAT-2009. [En línea] disponible en: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4485/semarnat1/semarnat1.htm>
- Duffus, J. H. (2001). "Heavy Metals"-A meaningless term. *Chemistry International--Newsmagazine for IUPAC*, 23(6), 163-167.
- Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U., & Roy, S. (2018). Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant Signaling & Behavior*, 13(8), e1460048.
- Elizondo, C., Márquez-Linares, M. A., Marín-García, M. L., & Gutiérrez-Yurrita, P. J. (2016). Flora que crece naturalmente en presas de jale minero abandonadas susceptibles de ser utilizadas en reclamación, Zimapán, Hidalgo, México. *Interciencia*, 41(7), 298-492.
- EPA, Environmental Protection Agency (2021). Regional screening level (RSL) resident soil table (TR=1E-06, HQ=1). [En línea] disponible en: <https://semspub.epa.gov/work/HQ/400754.pdf>
- Escamilla-Rodríguez, A., Carlos-Hernández, S., & Díaz-Jiménez, L. (2021). Evidence of resistance of heavy metals from bacteria isolated from natural waters of a mining area in Mexico. *Water*, 13(19), 2766.
- Fan, M., Liu, Z., Nan, L., Wang, E., Chen, W., Lin, Y., & Wei, G. (2018). Isolation, characterization, and selection of heavy metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria from root nodules of Robinia pseudoacacia in a Pb/Zn mining area. *Microbiological Research*, 217, 51-59.
- Farjana, S. H., Huda, N., Mahmud, M. P., & Saidur, R. (2019). A review on impact of mining and mineral processing industries through life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production*, 231, 1200-1217.

- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2016). Heavy metal pollution from gold mines: environmental effects and bacterial strategies for resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(11), 1047.
- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2020). Physicochemical properties, heavy metals, and metal-tolerant bacteria profiles of abandoned gold mine tailings in Krugersdorp, South Africa. *Canadian Journal of Soil Science*, 100(3), 217-233.
- Feng, L., Peillex-Delphe, C., Lü, C., Wang, D., Giannakis, S., & Pulgarin, C. (2020). Employing bacterial mutations for the elucidation of photo-Fenton disinfection: Focus on the intracellular and extracellular inactivation mechanisms induced by UVA and H₂O₂. *Water Research*, 182, 116049.
- Gao, X., Jiang, L., Mao, Y., Yao, B., & Jiang, P. (2021). Progress, challenges, and perspectives of bioleaching for recovering heavy metals from mine tailings. *Adsorption Science & Technology*, 2021, 1-13.
- García, R., Campos, J., Cruz, J. A., Calderón, M. E., Raynal, M. E., & Buitrón, G. (2016). Biosorción de Cd, Cr, Mn y Pb de soluciones acuosas industriales por cepas de Bacillus sp aisladas de lodos activados. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(1), 5-14.
- Gaytán, E., & Benita, F. (2014). La industria minera en México: patrones de desempeño y determinantes de eficiencia. *Lecturas de Economía*, 80, 103-131.
- Govarthanan, M., Lee, K. J., Cho, M., Kim, J. S., Kamala-Kannan, S., & Oh, B. T. (2013). Significance of autochthonous Bacillus sp. KK1 on biomineralization of lead in mine tailings. *Chemosphere*, 90(8), 2267-2272.
- Guan, Y., Shao, C., & Ju, M. (2014). Heavy metal contamination assessment and partition for industrial and mining gathering areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(7), 7286-7303.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng G., Liu C., Wan Y., Chen J., & He, Y. (2010). Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium Bacillus sp. L14. *Bioresource Technology*, 101(22), 8599-8605.
- Hajmoradi, F., & Beydokhti, A. T. (2019). Effect of heavy metals on meiosis cell division in Stachys inflata benth. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 17(4), 363-373.
- Hartwig, A., & Schwerdtle, T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*, 127(1-3), 47-54.

- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., & Boudabous, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64(1), 7-15.
- He, Z., Shentu, J., Yang, X., Baligar, V. C., Zhang, T., & Stoffella, P. J. (2015). Heavy metal contamination of soils: sources, indicators and assessment. *Journal of Environmental Indicators*, 9, 17-18.
- Hernández-Franco, P., Valverde, M., & Rojas, E. (2009). Los metales como inhibidores del sistema de reparación del ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 12(2), 75-82.
- Hernández-Plata, I., Rodríguez, V. M., Tovar-Sánchez, E., Carrizalez, L., Villalobos, P., Mendoza-Trejo, M. S., & Mussali-Galante, P. (2020). Metal brain bioaccumulation and neurobehavioral effects on the wild rodent *Liomys irroratus* inhabiting mine tailing areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(29), 36330-36349.
- Imlay, J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress?. *Environmental Microbiology*, 21(2), 521-530.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018). Resultados de la encuesta nacional de ocupación y empleo, cifras durante el tercer trimestre de 2018. [En línea] disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/enoe_ie/enoe_ie2018_11.pdf
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2020). Estadística Mensual de la Industria Minero-metalúrgica. [En línea] disponible en: http://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/Anuario_2019_Edicion_2020.pdf
- IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry (2021). Compendium of chemical terminology. [En línea] disponible en: <https://goldbook.iupac.org/>
- ITIS, Integrated Taxonomic Information System (2021). [En línea] disponible en: <https://www.itis.gov/>
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60-72.
- Jalilvand, N., Akhgar, A., Alikhani, H. A., Rahmani, H. A., & Rejali, F. (2020). Removal of heavy metals zinc, lead, and cadmium by biomineralization of urease-producing bacteria isolated from Iranian mine calcareous soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(1), 206-219.

- Jara-Marini, M. E., Molina-García, A., Martínez-Durazo, Á., & Páez-Osuna, F. (2020). Trace metal trophic transference and biomagnification in a semiarid coastal lagoon impacted by agriculture and shrimp aquaculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(5), 5323-5336.
- Johnson, D. B., & Sánchez-Andrea, I. (2019). Dissimilatory reduction of sulfate and zero-valent sulfur at low pH and its significance for bioremediation and metal recovery. *Advances in Microbial Physiology*, 75, 205-231.
- Jung, J., & Lee, S. J. (2019). Biochemical and biodiversity insights into heavy metal ion-responsive transcription regulators for synthetic biological heavy metal sensors. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(10), 1522-1542.
- Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R. R., Smith, D. C., & D'Hondt, S. (2012). Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 16213-16216.
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2019). Bioremediation options for heavy metal pollution. *Journal of Health and Pollution*, 9(24), 1-20.
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A., & Arya, S. K. (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 192-199.
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 247-268.
- Khalid, M., Saeed, U. R., Hassani, D., Hayat, K., Pei, Z. H. O. U., & Nan, H. U. I. (2021). Advances in fungal-assisted phytoremediation of heavy metals: A review. *Pedosphere*, 31(3), 475-495.
- Kim, R. Y., Yoon, J. K., Kim, T. S., Yang, J. E., Owens, G., & Kim, K. R. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*, 37(6), 1041-1061.
- Kinuthia, G. K., Ngure, V., Beti, D., Lugalia, R., Wangila, A., & Kamau, L. (2020). Levels of heavy metals in wastewater and soil samples from open drainage channels in nairobi, Kenya: community health implication. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Kopp, B., Zalko, D., & Audebert, M. (2018). Genotoxicity of 11 heavy metals detected as food contaminants in two human cell lines. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59(3), 202-210.

- Kumar, P., Dalal, V., Sharma, N., Kokane, S., Ghosh, D. K., Kumar, P., & Sharma, A. K. (2020). Characterization of the heavy metal binding properties of periplasmic metal uptake protein CLas-ZnuA2. *Metallomics*, 12(2), 280-289.
- Kumari, D., Pan, X., Achal, V., Zhang, D., Al-Misned, F. A., & Golam Mortuza, M. (2015). Multiple metal-resistant bacteria and fungi from acidic copper mine tailings of Xinjiang, China. *Environmental Earth Sciences*, 74(4), 3113-3121.
- Kwiatkowska-Malina, J. (2018). Functions of organic matter in polluted soils: The effect of organic amendments on phytoavailability of heavy metals. *Applied Soil Ecology*, 123, 542-545.
- Lal, N. (2010). Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal toxicity and tolerance in plants. *Plant Adaptation and Phytoremediation*, 35-58.
- Leguizamo, M. A. O., Gómez, W. D. F., & Sarmiento, M. C. G. (2017). Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands—a review. *Chemosphere*, 168, 1230-1247.
- Liang, Z., Huang, L., He, F., Zhou, X., Shi, Z., Zhou, J., Chen, Y., Lv, M., Chen, Y., & Zhang, L. H. (2019). A substrate-activated efflux pump, DesABC, confers zeamine resistance to *Dickeya zeeae*. *Molecular Biology and Physiology*, 10(3), 13-19.
- Liu, L., Li, W., Song, W., & Guo, M. (2018). Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Science of the Total Environment*, 633, 206-219.
- Liu, J., Liu, Y. J., Liu, Y., Liu, Z., & Zhang, A. N. (2018). Quantitative contributions of the major sources of heavy metals in soils to ecosystem and human health risks: A case study of Yulin, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 261-269.
- Liu, J., Cao, L., & Dou, S. (2019). Trophic transfer, biomagnification and risk assessments of four common heavy metals in the food web of Laizhou Bay, the Bohai Sea. *Science of the Total Environment*, 670, 508-522.
- Lorenzo-Tallafigo, J., Iglesias-González, N., Mazuelos, A., Romero, R., & Carranza, F. (2019). An alternative approach to recover lead, silver and gold from black gossan (polymetallic ore). Study of biological oxidation and lead recovery stages. *Journal of Cleaner Production*, 207, 510-521.
- Ma, W., Li, X., Wang, Q., Ren, Z., Crabbe, M. J. C., & Wang, L. (2019). Tandem oligomeric expression of metallothionein enhance heavy metal tolerance and bioaccumulation in *Escherichia coli*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, 301-307.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2015). Brock. Biología de los microorganismos. *Pearson 14*, 77-80
- Mahurpawar, M. (2015). Effects of heavy metals on human health. *International Journal of Reseach-Granthaalayah*, 2394-3629.
- Maldonado-Magaña, A., Favela-Torres, E., Rivera-Cabrera, F., & Volke-Sepulveda, T. L. (2011). Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant and Soil*, 339(1), 377-389.
- Martínez-González, F., Sosa-Pérez, F., & Ortiz-Medel, J. (2010). Comportamiento de la humedad del suelo con diferente cobertura vegetal en la Cuenca La Esperanza. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 1(4), 89-103.
- Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., & Chowdhury, A. M. A. (2017). Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 65-74.
- Matsushita, M., Hiramatsu, F., Kobayashi, N., Ozawa, T., Yamazaki, Y., & Matsuyama, T. (2004). Colony formation in bacteria: experiments and modeling. *Biofilms*, 1(4), 305-317.
- McClintock, N. (2015). A critical physical geography of urban soil contamination. *Geoforum*, 65, 69-85.
- McGeer, J. C., Brix, K. V., Skeaff, J. M., DeForest, D. K., Brigham, S. I., Adams, W. J., & Green, A. (2003). Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(5), 1017-1037.
- Medfu Tarekegn, M., Zewdu Salilih, F., & Ishetu, A. I. (2020). Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1), 1783174.
- Menéndez, J., & Muñoz, S. (2021). Contaminación del agua y suelo por los relaves mineros. *Paideia XXI*, 11(1), 141-154.
- Mohammadinejad, R., Shavandi, A., Raie, D. S., Sangeetha, J., Soleimani, M., Hajibehzad, S. S., Thangadurai, D., Hospet, R., Popoola J. O., Arzani, A., Gómez-Lim, M. A., Iravani, S., & Varma, R. S. (2019). Plant molecular farming: production of metallic nanoparticles and therapeutic proteins using green factories. *Green Chemistry*, 21(8), 1845-1865.

- Mohan, I., Gorla, K., Dhar, S., Kothari, R., Bhau, B. S., & Pathania, D. (2021). Phytoremediation of heavy metals from the biosphere perspective and solutions. *Pollutants and Water Management: Resources, Strategies and Scarcity*, 95-127.
- Mohite, B. V., Koli, S. H., & Patil, S. V. (2018). Heavy metal stress and its consequences on exopolysaccharide (EPS)-producing *Pantoea* agglomerans. *Applied biochemistry and biotechnology*, 186(1), 199-216.
- Mounaouer, B., Nesrine, A., & Abdennaceur, H. (2014). Identification and characterization of heavy metal-resistant bacteria selected from different polluted sources. *Desalination and Water Treatment*, 52(37-39), 7037-7052.
- Muro-González D.A. (2020). Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros. [En línea] disponible en: <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/1275/MUGDNL07T.pdf?sequence=1>
- Muro-González, D. A., Mussali-Galante, P., Valencia-Cuevas, L., Flores-Trujillo, K., & Tovar-Sánchez, E. (2020). Morphological, physiological, and genotoxic effects of heavy metal bioaccumulation in *Prosopis laevigata* reveal its potential for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(32), 40187-40204.
- Mustapha, M. U., & Halimoon, N. (2015). Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent. *Procedia Environmental Sciences*, 30, 33-37.
- Muthusarayanan, S., Sivarajasekar, N., Vivek, J. S., Paramasivan, T., Naushad, M., Prakashmaran, J., Gayathri, V., & Al-Duaij, O. K. (2018). Phytoremediation of heavy metals: mechanisms, methods and enhancements. *Environmental Chemistry Letters*, 16(4), 1339-1359.
- Nanda, M., Kumar, V., & Sharma, D. K. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. *Aquatic Toxicology*, 212, 1-10.
- Nawab, J., Khan, S., Shah, M. T., Gul, N., Ali, A., Khan, K., & Huang, Q. (2016). Heavy metal bioaccumulation in native plants in chromite impacted sites: A search for effective remediating plant species. *Clean-Soil, Air, Water*, 44(1), 37-46.
- Nowicka, B. (2022). Heavy metal-induced stress in eukaryotic algae-mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 1-52.
- Ojo, K. K., Tung, D., Luis, H., Bernardo, M., Leitao, J., & Roberts, M. C. (2004). Gram-positive *merA* gene in gram-negative oral and urine bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 238(2), 411-416.

- Olguín, E. J., & Sánchez-Galván, G. (2012). Heavy metal removal in phytoremediation and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnology*, 30(1), 3-8.
- Pal, A., Bhattacharjee, S., Saha, J., Sarkar, M., & Mandal, P. (2022). Bacterial survival strategies and responses under heavy metal stress: A comprehensive overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 48(3), 327-355.
- Paul, O., Jasu, A., Lahiri, D., Nag, M., & Ray, R. R. (2021). In situ and ex situ bioremediation of heavy metals: the present scenario. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 29(4), 454-469.
- Pollard, A. J., Reeves, R. D., & Baker, A. J. (2014). Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science*, 217, 8-17.
- Pratish, A., Kumar, A., & Hu, Z. (2018). Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. *International Microbiology*, 21(3), 97-106.
- Punia, A. (2021). Role of temperature, wind, and precipitation in heavy metal contamination at copper mines: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(4), 4056-4072.
- Ramírez-Ayala, R., & Azcona-Cruz, M. I. (2018). Efectos tóxicos del manganeso. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 22(2), 71-75.
- Ramírez, V., Baez, A., López, P., Bustillos, M. D. R., Villalobos, M. A., Carreño, R., Contreras, J. L., Muñoz-Rojas, J., Fuentes, L. E., Martínez, J., & Munive, J. A. (2019). Chromium hyper-tolerant *Bacillus* sp. MH778713 assists phytoremediation of heavy metals by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Frontiers in Microbiology*, 10, 1833.
- Rahman, Z., & Singh, V. P. (2020). Bioremediation of toxic heavy metals (THMs) contaminated sites: concepts, applications and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22), 27563-27581.
- Rehman, G., Khattack, I., Hamayun, M., Rahman, A., Haseeb, M., Umar, M., Ali, S., Iftikhar, M., Shams, W. A., & Pervaiz, R. (2021). Impacts of mining on local fauna of wildlife in District Mardan & District Mohmand Khyber Pakhtunkhwa Pakistan. *Brazilian Journal of Biology*, 84.
- Reichl, C., & Schatz, M. (2021) World Mining Data 2021. [En línea] disponible en: <https://www.world-mining-data.info/wmd/downloads/PDF/WMD2021.pdf>
- Renu, K., Chakraborty, R., Myakala, H., Koti, R., Famurewa, A. C., Madhyastha, H., Vellingiri, B., George, A., & Gopalakrishnan, A. V. (2021). Molecular mechanism of heavy metals (lead,

- chromium, arsenic, mercury, nickel and cadmium)-induced hepatotoxicity-A review. *Chemosphere*, 271, 129735.
- Rocha, R. B., Meira, H. M., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2019). Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes. *Biodegradation*, 30(4), 215-233.
- Rohmah, N. S. R. N. S., Jatmiko, Y. D., Siswanto, D., & Mustafa, I. (2020). The potency of endophytic bacteria isolated from *Ficus septica* as phytoremediation promoting agent of Cr (VI) contaminated soil. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(5), 1920-1927.
- Román-Ponce, B., Ramos-Garza, J., Vásquez-Murrieta, M. S., Rivera-Orduña, F. N., Chen, W. F., Yan, J., Estrada-de los Santos, P., & Wang, E. T. (2016). Cultivable endophytic bacteria from heavy metal (loid)-tolerant plants. *Archives of Microbiology*, 198(10), 941-956.
- Sabeen, M., Mahmood, Q., Bhatti, Z. A., Irshad, M., Bilal, M., Hayat, M. T., Irshad, U., Akbar, T. A., Arslan, M., & Shahid, N. (2020). *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(5), 1368-1374.
- Salama, E. S., Roh, H. S., Dev, S., Khan, M. A., Abou-Shanab, R. A., Chang, S. W., & Jeon, B. H. (2019). Algae as a green technology for heavy metals removal from various wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 1-19.
- Salas-Luévano, M. A., Manzanares-Acuña, E., Letechipía-de León, C., & Vega-Carrillo, H. R. (2009). Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23(1), 27-32.
- Salas-Luévano, M. A., Puente-Cuevas, R., & Vega-Carrillo, H. R. (2021). Concentrations of heavy metals and measurement of 40K in mine tailings in Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences*, 80(5), 1-12.
- Salazar-Ramírez, G., Flores-Vallejo, R. D. C., Rivera-Leyva, J. C., Tovar-Sánchez, E., Sánchez-Reyes, A., Mena-Portales, J., Sánchez-Carbente, M., Gaitán-Rodríguez, M., Batista-García, R., Villareal, M., Mussali-Galante, P., & Folch-Mallo, J. (2020). Characterization of fungal endophytes isolated from the metal hyperaccumulator plant *Vachellia farnesiana* growing in mine tailings. *Microorganisms*, 8(2), 226.
- Samanta, A., Bera, P., Khatun, M. A. H. A. M. U. D. A., Sinha, C., Pal, P., Lalee, A., & Mandal, A. (2012). An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(1), 178-189.

- Santoyo-Martínez, M. (2020). Estudio ecotoxicológico sobre la bioacumulación de metales pesados en dos especies vegetales asociada a los jales de Huautla, Morelos. [En línea] disponible en:
<http://riiaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/1270/SAMMRG06T.pdf?sequence=1>
- Santoyo-Martínez, M., Mussali-Galante, P., Hernández-Plata, I., Valencia-Cuevas, L., Flores-Morales, A., Ortiz-Hernández, L., Flores-Trujillo, K., Ramos-Quintana, F., K., & Tovar-Sánchez, E. (2020). Heavy metal bioaccumulation and morphological changes in *Vachellia campechiana* (Fabaceae) reveal its potential for phytoextraction of Cr, Cu, and Pb in mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 11260-11276.
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Vo, D. V. N., Jeevanantham, S., Karishma, S., & Yaashikaa, P. R. (2021). A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126451.
- Sarubbo, L. A., Rocha Jr, R. B., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., & Banat, I. M. (2015). Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. *Chemistry and Ecology*, 31(8), 707-723.
- Sauceda, E. N. R., Martínez, G. E. R., Valverde, B. R., Ruiz, R. M., Hermida, M. D. L. C. C., Torres, S. M. M., & Ruiz, H. H. P. (2014). Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai*, 10(3), 173-193.
- Schmacht, M., Lorenz, E., & Senz, M. (2017). Microbial production of glutathione. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 1-13.
- SE, Secretaría de economía (2016). Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra. *NMX-AA-132-SCFI-2016*. [En línea] disponible en: <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/2010/nmx-aa-132-scfi-2016.pdf>
- SEMARNAT, Secretaría de medio ambiente y recursos naturales (2021). Residuos. [En línea] disponible en:
https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe15/tema/pdf/Cap7_Residuos.pdf
- SGM, Servicio Geológico Mexicano (2020). Panorama minero del Estado de Morelos. [En línea] disponible en: <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/MORELOS.pdf>
- SGM, Servicio Geológico Mexicano (2021). Anuario estadístico de la minería mexicana. [En línea] disponible en: https://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/Anuario_2020_Edicion_2021.pdf

- Shah, V., & Daverey, A. (2020). Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation*, 18, 100774.
- Shikha, D., & Singh, P. K. (2021). In situ phytoremediation of heavy metal-contaminated soil and groundwater: a green inventive approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(4), 4104-4124.
- Solís-Miranda B.M. (2016). Aislamiento de bacterias de jales mineros y análisis de su potencial para la remediación de sitios contaminados con metales pesados. Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma del Estado de Morelos*, 1-70.
- Sonter, L. J., Ali, S. H., & Watson, J. E. (2018). Mining and biodiversity: key issues and research needs in conservation science. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1892), 20181926.
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327-335.
- Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401-419.
- Srivastava, N. K., & Majumder, C. B. (2008). Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 1-8.
- Steunou, A. S., Babot, M., Bourbon, M. L., Tambosi, R., Durand, A., Liotenberg, S., Krieger-Liszkay, A., Yamaichi, Y., & Ouchane, S. (2020). Additive effects of metal excess and superoxide, a highly toxic mixture in bacteria. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1515-1529.
- Su, C., Jiang, L., & Zhang, W. (2014). A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environmental Skeptics and Critics*, 3(2), 24-38.
- Sule, K., Umbsaar, J., & Prenner, E. J. (2020). Mechanisms of Co, Ni, and Mn toxicity: From exposure and homeostasis to their interactions with and impact on lipids and biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(8), 183250.
- Sunilkumar, C. R., Stephen-Victor, E., Naripogu, K. B., Samanth Kumar, J., Nuthan, B. R., Marulasiddaswamy, K. M., Kini, Q. R., & Geetha, N. (2021). Differential multi-cellularity is required for the adaptation for *Bacillus licheniformis* to withstand heavy metals toxicity. *Indian Journal of Microbiology*, 61(4), 524-529.
- Tamariz-Angeles, C., Huamán, G. D., Palacios-Robles, E., Olivera-Gonzales, P., & Castañeda-Barreto, A. (2021). Characterization of siderophore-producing microorganisms associated to

- plants from high-Andean heavy metal polluted soil from Callejón de Huaylas (Ancash, Perú). *Microbiological Research*, 250, 126811.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 133-164.
- Ullah, A., Mushtaq, H., Ali, H., Munis, M. F. H., Javed, M. T., & Chaudhary, H. J. (2015). Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4), 2505-2514.
- Van der Ent, A. J. M. M. J., Baker, A. J. M., Van Balgooy, M. M. J., & Tjoa, A. (2013). Ultramafic nickel laterites in Indonesia (Sulawesi, Halmahera): mining, nickel hyperaccumulators and opportunities for phytomining. *Journal of Geochemical Exploration*, 128, 72-79.
- Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100369.
- Vigneshkumar, B., Pandian, S. K., & Balamurugan, K. (2013). Catalase activity and innate immune response of *Caenorhabditis elegans* against the heavy metal toxin lead. *Environmental Toxicology*, 28(6), 313-321.
- Wang, S., Liu, T., Xiao, X., & Luo, S. (2021). Advances in microbial remediation for heavy metal treatment: a mini review. *Journal of Leather Science and Engineering*, 3(1), 1-10.
- Wang, Y., Luo, Y., Zeng, G., Wu, X., Wu, B., Li, X., & Xu, H. (2020). Characteristics and in situ remediation effects of heavy metal immobilizing bacteria on cadmium and nickel co-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110294.
- Witkiewicz-Kucharczyk, A., & Bal, W. (2006). Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicology Letters*, 162(1), 29-42.
- Wu, H. J., Wang, A. H., & Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 93-101.
- Wu, Q., Leung, J. Y., Geng, X., Chen, S., Huang, X., Li, H., Huang, Z., Zhu, L., Chen, J., & Lu, Y. (2015). Heavy metal contamination of soil and water in the vicinity of an abandoned e-waste recycling site: implications for dissemination of heavy metals. *Science of the Total Environment*, 506, 217-225.
- Yamina, B., Tahar, B., & Marie Laure, F. (2012). Isolation and screening of heavy metal resistant bacteria from wastewater: a study of heavy metal co-resistance and antibiotics resistance. *Water Science and Technology*, 66(10), 2041-2048.

- Yin, K., Wang, Q., Lv, M., & Chen, L. (2019). Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 360, 1553-1563.
- Zappala, M. N., Ellzey, J. T., Bader, J., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. (2013). *Prosopis pubescens* (screw bean mesquite) seedlings are hyperaccumulators of copper. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(2), 212-223.
- Zhang, C., Yu, Z. G., Zeng, G. M., Jiang, M., Yang, Z. Z., Cui, F., Zhu, M. Y., Shen, L. Q., & Hu, L. (2014). Effects of sediment geochemical properties on heavy metal bioavailability. *Environment International*, 73, 270-281.
- Zhou, W., Zhang, Y., Ding, X., Liu, Y., Shen, F., Zhang, X., Deng, S., Xiao, H., Yang, G., & Peng, H. (2012). Magnetotactic bacteria: promising biosorbents for heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1097-1104.
- Zwolak, A., Sarzyńska, M., Szpyrka, E., & Stawarczyk, K. (2019). Sources of soil pollution by heavy metals and their accumulation in vegetables: A review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(7), 1-9.

13.ANEXOS

Tabla A1. Cambio porcentual en la morfología de las colonias aisladas en relación con su sitio de colecta.

| Sitio | | Color blanco brillante | Forma circular | Elevación convexa | Elevación cóncava | Borde redondo | Textura lisa | Consistencia cremosa | Consistencia dura | Diámetro 1 mm | Diámetro 2 mm |
|-------------------|---------------------|------------------------|----------------|-------------------|-------------------|---------------|--------------|----------------------|-------------------|---------------|---------------|
| Ubicación | Jale 1 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 20 | 80 |
| | Jale 2 | 100 | 100 | 85.7 | 14.3 | 100 | 100 | 85.7 | 14.3 | 57.1 | 42.9 |
| | Invernadero | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 |
| Tipo de muestra | Jale | 100 | 100 | 83.3 | 16.7 | 100 | 100 | 83.3 | 16.7 | 66.7 | 33.3 |
| | Rizósfera | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 62.5 | 37.5 |
| Especie de planta | <i>P. laevigata</i> | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 25 | 75 |
| | <i>D. viscosa</i> | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 |
| Zona | Base | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 25 | 75 |
| | Media | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 50 | 50 |
| | Superficie | 100 | 100 | 75 | 25 | 100 | 100 | 75 | 25 | 25 | 75 |

Tabla A2. Cambio porcentual en la morfología celular de las bacterias aisladas en relación con su sitio de colecta.

| Sitio | | Gram-negativas | Estreptobacilos | Bacilos cortos | Filamentos |
|-------------------|---------------------|----------------|-----------------|----------------|------------|
| Ubicación | Jale 1 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| | Jale 2 | 100 | 0 | 85.7 | 14.3 |
| | Invernadero | 100 | 50 | 50 | 0 |
| Tipo de muestra | Jale | 100 | 50 | 33.3 | 16.7 |
| | Rizósfera | 100 | 37.5 | 62.5 | 0 |
| Especie de planta | <i>P. laevigata</i> | 100 | 50 | 50 | 0 |
| | <i>D. viscosa</i> | 100 | 25 | 75 | 0 |
| Zona | Base | 100 | 50 | 50 | 0 |
| | Media | 100 | 25 | 75 | 0 |
| | Superficie | 100 | 50 | 25 | 25 |

Tabla A3. Valores de absorbancia obtenidos durante la cinética de crecimiento de los aislados bacterianos (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas).

| Aislado | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | M ± DS |
| J1-MJ-B | 0.07 ± 0.004 | 0.08 ± 0.003 | 0.26 ± 0.007 | 0.42 ± 0.021 | 0.53 ± 0.027 | 0.65 ± 0.029 | 0.65 ± 0.038 |
| J1-MJ-M | 0.08 ± 0.003 | 0.08 ± 0.006 | 0.13 ± 0.007 | 0.32 ± 0.029 | 0.50 ± 0.046 | 0.62 ± 0.026 | 0.64 ± 0.040 |
| J1-MJ-S | 0.07 ± 0.003 | 0.08 ± 0.002 | 0.18 ± 0.008 | 0.39 ± 0.018 | 0.50 ± 0.026 | 0.60 ± 0.013 | 0.61 ± 0.012 |
| J1-PL-B | 0.07 ± 0.004 | 0.10 ± 0.008 | 0.28 ± 0.015 | 0.45 ± 0.035 | 0.58 ± 0.040 | 0.66 ± 0.020 | 0.71 ± 0.012 |
| J1-PL-S | 0.08 ± 0.024 | 0.10 ± 0.028 | 0.28 ± 0.025 | 0.47 ± 0.038 | 0.57 ± 0.037 | 0.61 ± 0.032 | 0.64 ± 0.021 |
| J2-MJ-B | 0.08 ± 0.002 | 0.17 ± 0.005 | 0.43 ± 0.011 | 0.57 ± 0.019 | 0.67 ± 0.014 | 0.75 ± 0.019 | 0.83 ± 0.014 |
| J2-MJ-M | 0.08 ± 0.002 | 0.20 ± 0.005 | 0.45 ± 0.020 | 0.59 ± 0.022 | 0.71 ± 0.022 | 0.80 ± 0.027 | 0.92 ± 0.014 |
| J2-MJ-S | 0.08 ± 0.000 | 0.08 ± 0.000 | 0.08 ± 0.000 | 0.08 ± 0.000 | 0.08 ± 0.000 | 0.08 ± 0.000 | 0.08 ± 0.000 |
| J2-PL-B | 0.10 ± 0.006 | 0.23 ± 0.012 | 0.44 ± 0.027 | 0.63 ± 0.024 | 0.73 ± 0.025 | 0.79 ± 0.018 | 0.87 ± 0.028 |
| J2-PL-S | 0.08 ± 0.005 | 0.22 ± 0.013 | 0.39 ± 0.009 | 0.56 ± 0.025 | 0.66 ± 0.013 | 0.75 ± 0.027 | 0.85 ± 0.021 |
| J2-DV-1 | 0.07 ± 0.002 | 0.18 ± 0.006 | 0.38 ± 0.006 | 0.54 ± 0.007 | 0.67 ± 0.034 | 0.75 ± 0.008 | 0.83 ± 0.013 |
| J2-DV-2 | 0.08 ± 0.008 | 0.19 ± 0.008 | 0.38 ± 0.015 | 0.56 ± 0.016 | 0.67 ± 0.011 | 0.75 ± 0.011 | 0.85 ± 0.010 |
| IN-DV-1 | 0.08 ± 0.002 | 0.20 ± 0.010 | 0.39 ± 0.014 | 0.59 ± 0.018 | 0.70 ± 0.027 | 0.77 ± 0.035 | 0.87 ± 0.017 |
| IN-DV-2 | 0.08 ± 0.003 | 0.09 ± 0.004 | 0.21 ± 0.022 | 0.42 ± 0.032 | 0.46 ± 0.018 | 0.49 ± 0.021 | 0.54 ± 0.010 |

M ± DS= Media ± Desviación estándar.

Tabla A4. Halos de inhibición de crecimiento (mm) y tolerancia de la cepa J2-PL-B expuesta a diferentes concentraciones (mg/L) de cinco metales pesados.

| Concentración | Cd | | Cu | | Mn | | Pb | | Zn | |
|---------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| | $\Theta \pm DS$ | Tolerancia |
| 0 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 50 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 100 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 250 | 4 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I |
| 500 | 4 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I | 6 ± 0 | I |
| 1000 | 5 ± 0 | S* | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 5.7 ± 0.6 | S* | 7 ± 0 | S* |
| 1500 | 6 ± 0 | S | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S | 7 ± 0 | S |
| 2000 | 6 ± 0 | S | 6 ± 0 | S* | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S | 7 ± 0 | S |
| 2500 | 6 ± 0 | S | 6 ± 0 | S | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S | 7 ± 0 | S |
| 5000 | 7.3 ± 0.6 | S | 6 ± 0 | S | 5 ± 0 | I | 6 ± 0 | S | 7 ± 0 | S |
| 10000 | 8 ± 0 | S | 6 ± 0 | S | 6 ± 0 | I | 6.3 ± 0.6 | S | 7 ± 0 | S |
| 15000 | 9.3 ± 0.6 | S | 7 ± 0 | S | 6 ± 0 | I | 6.7 ± 0.6 | S | 8 ± 0 | S |
| 20000 | 9.3 ± 0.6 | S | 8 ± 0 | S | 6 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 8 ± 0 | S |
| 25000 | 10 ± 1.7 | S | 8 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 8 ± 0 | S |
| 30000 | 11.3 ± 2.3 | S | 8 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 8 ± 0.6 | S |

$\Theta \pm DS$ = Diámetro de inhibición \pm desviación estándar; R= Resistente; I= Intermedia; S= Susceptible; S*= Concentración mínima inhibitoria.

Tabla A5. Halos de inhibición de crecimiento (mm) y tolerancia de la cepa J2-PL-S expuesta a diferentes concentraciones (mg/L) de cinco metales pesados.

| Concentración | Cd | | Cu | | Mn | | Pb | | Zn | |
|---------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| | $\Theta \pm DS$ | Tolerancia |
| 0 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 50 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 100 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 250 | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 5 ± 0 | I |
| 500 | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 5.3 ± 0.6 | I | 5 ± 0 | I |
| 1000 | 5.7 ± 0.6 | S* | 4 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S* | 6 ± 0 | S* |
| 1500 | 6 ± 0 | S | 4 ± 0 | S* | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S | 6 ± 0 | S |
| 2000 | 6.3 ± 0.6 | S | 5 ± 0 | S | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S | 6 ± 0 | S |
| 2500 | 6.3 ± 0.6 | S | 6 ± 0 | S | 0 ± 0 | R | 7 ± 0 | S | 7 ± 0 | S |
| 5000 | 7 ± 0 | S | 7 ± 0 | S | 5 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 7.3 ± 0.6 | S |
| 10000 | 7.3 ± 0.6 | S | 8 ± 0 | S | 5 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 8 ± 0 | S |
| 15000 | 8 ± 0 | S | 8.7 ± 0.6 | S | 5 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 8.3 ± 0.6 | S |
| 20000 | 9 ± 0 | S | 9 ± 0 | S | 6 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 9.3 ± 0.6 | S |
| 25000 | 9.7 ± 1.2 | S | 9 ± 0 | S | 6 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 9.7 ± 0.6 | S |
| 30000 | 10.3 ± 0.6 | S | 10 ± 0 | S | 6 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 10.3 ± 0.6 | S |

$\Theta \pm DS$ = Diámetro de inhibición \pm desviación estándar; R= Resistente; I= Intermedia; S= Susceptible; S* = Concentración mínima inhibitoria.

Tabla A6. Halos de inhibición de crecimiento (mm) y tolerancia de la cepa J2-DV-1 expuesta a diferentes concentraciones (mg/L) de cinco metales pesados.

| Concentración | Cd | | Cu | | Mn | | Pb | | Zn | |
|---------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| | $\Theta \pm DS$ | Tolerancia |
| 0 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 50 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 100 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 250 | 5.7 ± 0.6 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 500 | 5.7 ± 0.6 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I | 6 ± 0 | I |
| 1000 | 5.7 ± 0.6 | S* | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S* | 7 ± 0 | S* |
| 1500 | 5.7 ± 0.6 | S | 5 ± 0 | S* | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S | 7 ± 0 | S |
| 2000 | 6 ± 0 | S | 6 ± 0 | S | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S | 7 ± 0 | S |
| 2500 | 6 ± 0 | S | 6 ± 0 | S | 0 ± 0 | R | 7 ± 0 | S | 7.3 ± 0.6 | S |
| 5000 | 7 ± 0 | S | 7 ± 0 | S | 6 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 8 ± 0 | S |
| 10000 | 8 ± 0 | S | 7.7 ± 0.6 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 8 ± 0 | S |
| 15000 | 8.3 ± 0.6 | S | 8 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 9 ± 0 | S |
| 20000 | 9.3 ± 0.6 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7.3 ± 0.6 | S | 9.3 ± 0.6 | S |
| 25000 | 9.3 ± 0.6 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 8 ± 0 | S | 10 ± 0 | S |
| 30000 | 10.3 ± 0.6 | S | 9.3 ± 0.6 | S | 6.7 ± 0.6 | I | 8 ± 0 | S | 10.3 ± 0.6 | S |

$\Theta \pm DS$ = Diámetro de inhibición ± desviación estándar; R= Resistente; I= Intermedia; S= Susceptible; S* = Concentración mínima inhibitoria.

Tabla A7. Halos de inhibición de crecimiento (mm) y tolerancia de la cepa J2-DV-2 expuesta a diferentes concentraciones (mg/L) de cinco metales pesados.

| Concentración | Cd | | Cu | | Mn | | Pb | | Zn | |
|---------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| | $\Theta \pm DS$ | Tolerancia |
| 0 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 50 | 6 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 100 | 6 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 250 | 6 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I | 6 ± 0 | I |
| 500 | 6 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I | 6 ± 0 | I |
| 1000 | 6.3 ± 0.6 | S* | 6 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I | 6.3 ± 0.6 | I |
| 1500 | 7 ± 0 | S | 6 ± 0 | S* | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | S* | 7 ± 0 | S* |
| 2000 | 7 ± 0 | S | 6 ± 0 | S | 0 ± 0 | R | 7 ± 0 | S | 7 ± 0 | S |
| 2500 | 8 ± 0 | S | 7 ± 0 | S | 0 ± 0 | R | 7 ± 0 | S | 7.3 ± 0.6 | S |
| 5000 | 8 ± 0 | S | 7.3 ± 0.6 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 7.3 ± 0.6 | S |
| 10000 | 9 ± 0 | S | 8 ± 0 | S | 6.7 ± 0.6 | I | 7 ± 0 | S | 8.3 ± 0.6 | S |
| 15000 | 9 ± 0 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 9.3 ± 0.6 | S |
| 20000 | 10 ± 0 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 10 ± 0 | S |
| 25000 | 10 ± 0 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 10 ± 0 | S |
| 30000 | 10.7 ± 0.6 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7.3 ± 0.6 | S | 11.3 ± 0.6 | S |

$\Theta \pm DS$ = Diámetro de inhibición \pm desviación estándar; R= Resistente; I= Intermedia; S= Susceptible; S* = Concentración mínima inhibitoria.

Tabla A8. Halos de inhibición de crecimiento (mm) y tolerancia de la cepa IN-DV-1 expuesta a diferentes concentraciones (mg/L) de cinco metales pesados.

| Concentración | Cd | | Cu | | Mn | | Pb | | Zn | |
|---------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| | $\Theta \pm DS$ | Tolerancia |
| 0 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 50 | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 100 | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R |
| 250 | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I |
| 500 | 5.7 ± 0.6 | I | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I | 6 ± 0 | I |
| 1000 | 5.7 ± 0.6 | S* | 5 ± 0 | I | 0 ± 0 | R | 6 ± 0 | I | 6.3 ± 0.6 | S* |
| 1500 | 5.7 ± 0.6 | S | 5.7 ± 0.6 | S* | 0 ± 0 | R | 6.3 ± 0.6 | I | 7 ± 0 | S |
| 2000 | 6 ± 0 | S | 6 ± 0 | S | 0 ± 0 | R | 6.7 ± 0.6 | I | 7.3 ± 0.6 | S |
| 2500 | 7 ± 0 | S | 6.7 ± 0.6 | S | 0 ± 0 | R | 7 ± 0 | I | 7.3 ± 0.6 | S |
| 5000 | 8.3 ± 0.6 | S | 7 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S* | 8 ± 0 | S |
| 10000 | 11 ± 0 | S | 8 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 9 ± 0 | S |
| 15000 | 11.3 ± 0.6 | S | 8.3 ± 0.6 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 9.3 ± 0.6 | S |
| 20000 | 12 ± 0 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 7 ± 0 | S | 10 ± 0 | S |
| 25000 | 13 ± 0 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 8 ± 0 | S | 10 ± 0 | S |
| 30000 | 13 ± 0 | S | 9 ± 0 | S | 7 ± 0 | I | 8 ± 0 | S | 11 ± 0 | S |

$\Theta \pm DS$ = Diámetro de inhibición \pm desviación estándar; R= Resistente; I= Intermedia; S= Susceptible; S* = Concentración mínima inhibitoria.

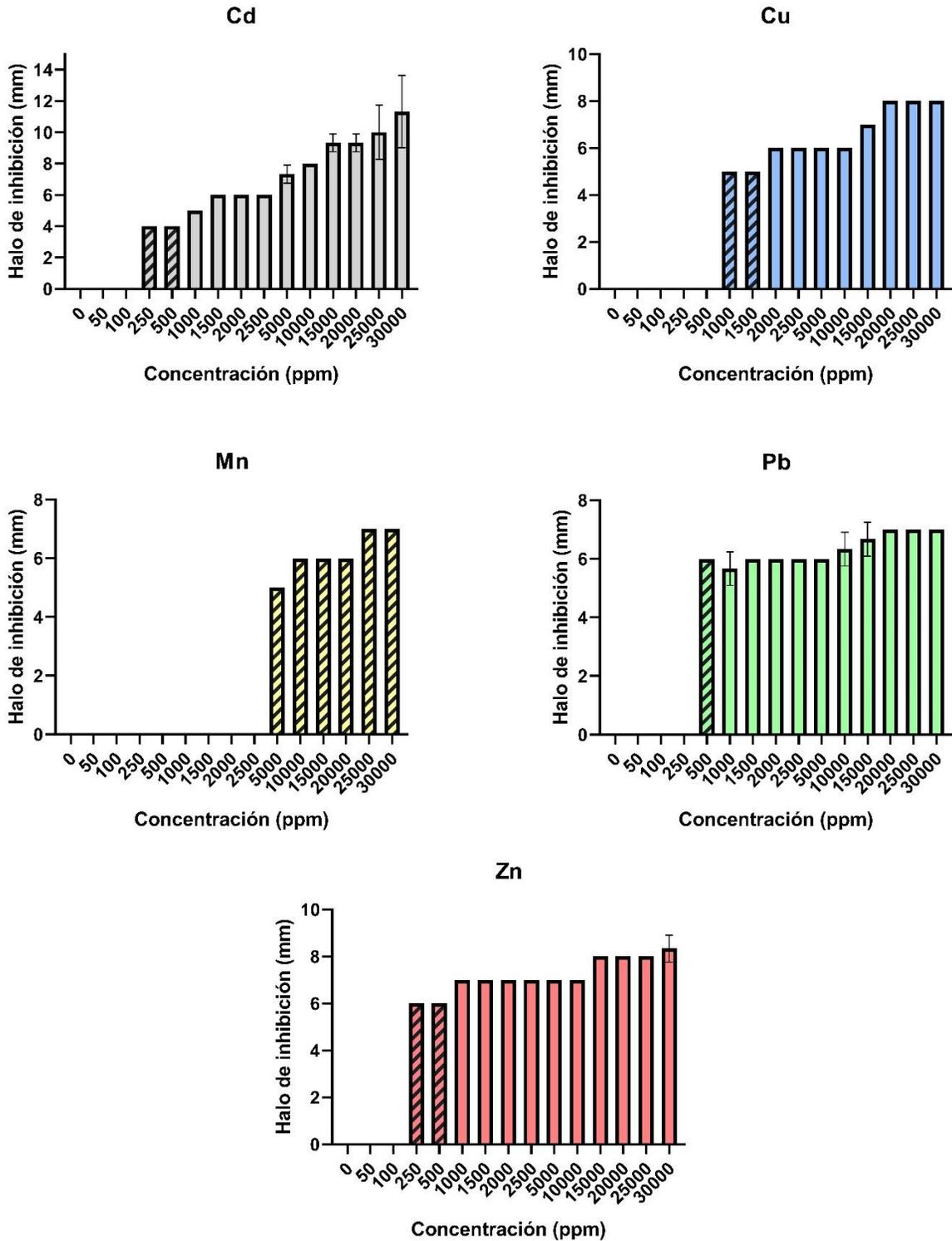


Figura A1. Halos de inhibición de crecimiento para J2-PL-B expuesta a diferentes concentraciones de cinco metales pesados. Las barras con líneas diagonales indican un efecto bacteriostático moderado, las barras claras señalan un efecto bacteriostático total.

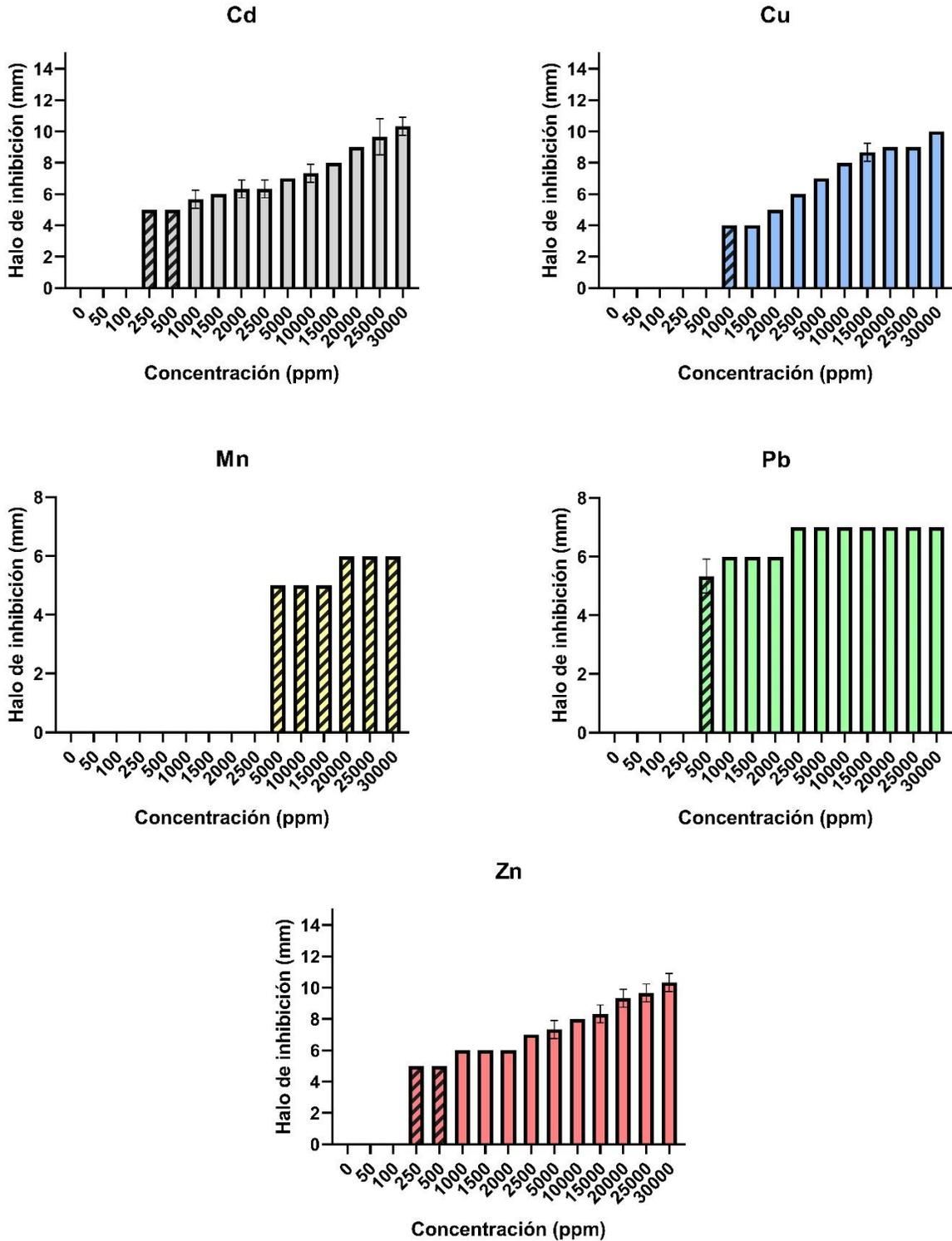


Figura A2. Halos de inhibición de crecimiento para J2-PL-S expuesta a diferentes concentraciones de cinco metales pesados. Las barras con líneas diagonales indican un efecto bacteriostático moderado, las barras claras señalan un efecto bacteriostático total.

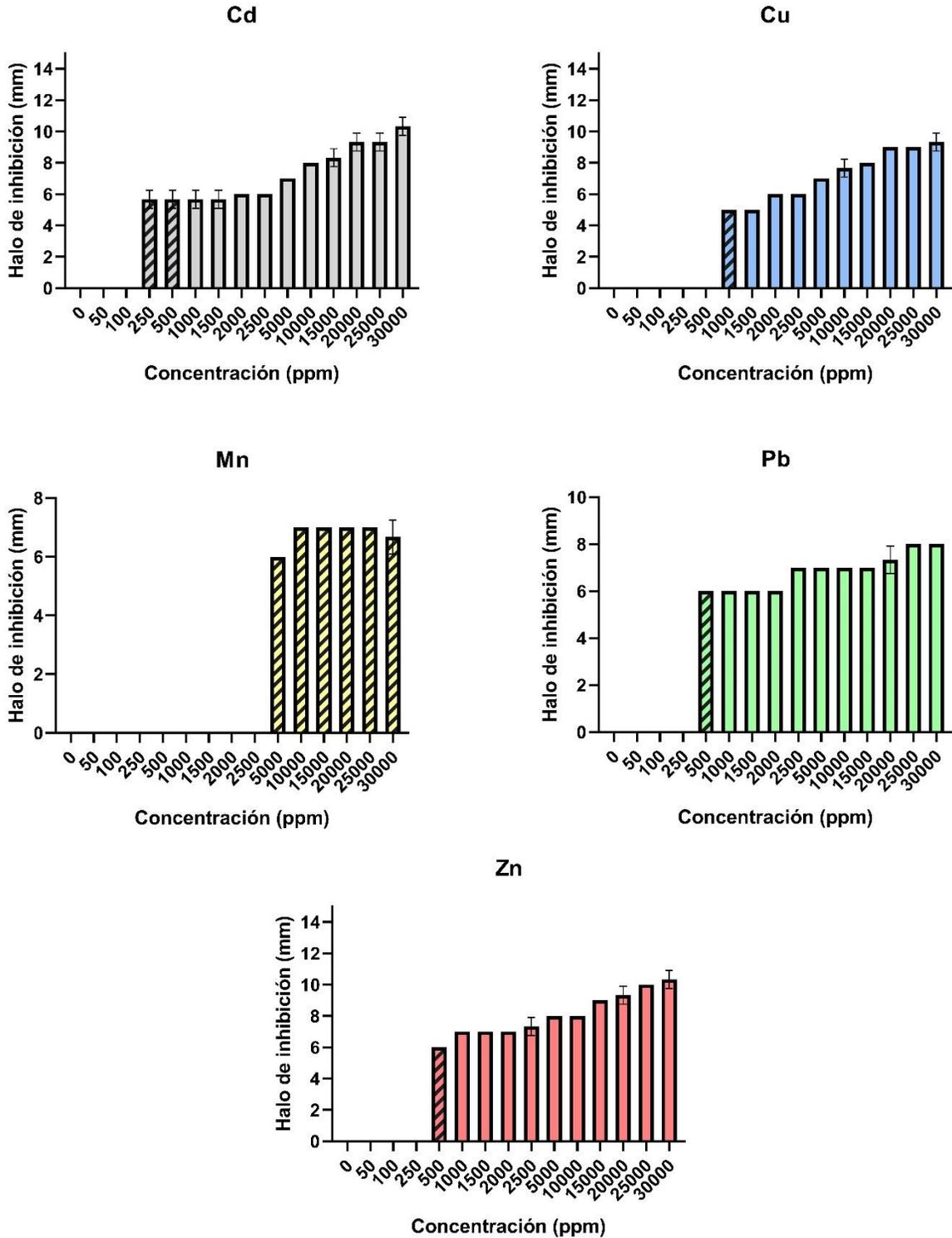


Figura A3. Halos de inhibición de crecimiento para J2-DV-1 expuesta a diferentes concentraciones de cinco metales pesados. Las barras con líneas diagonales indican un efecto bacteriostático moderado, las barras claras señalan un efecto bacteriostático total.

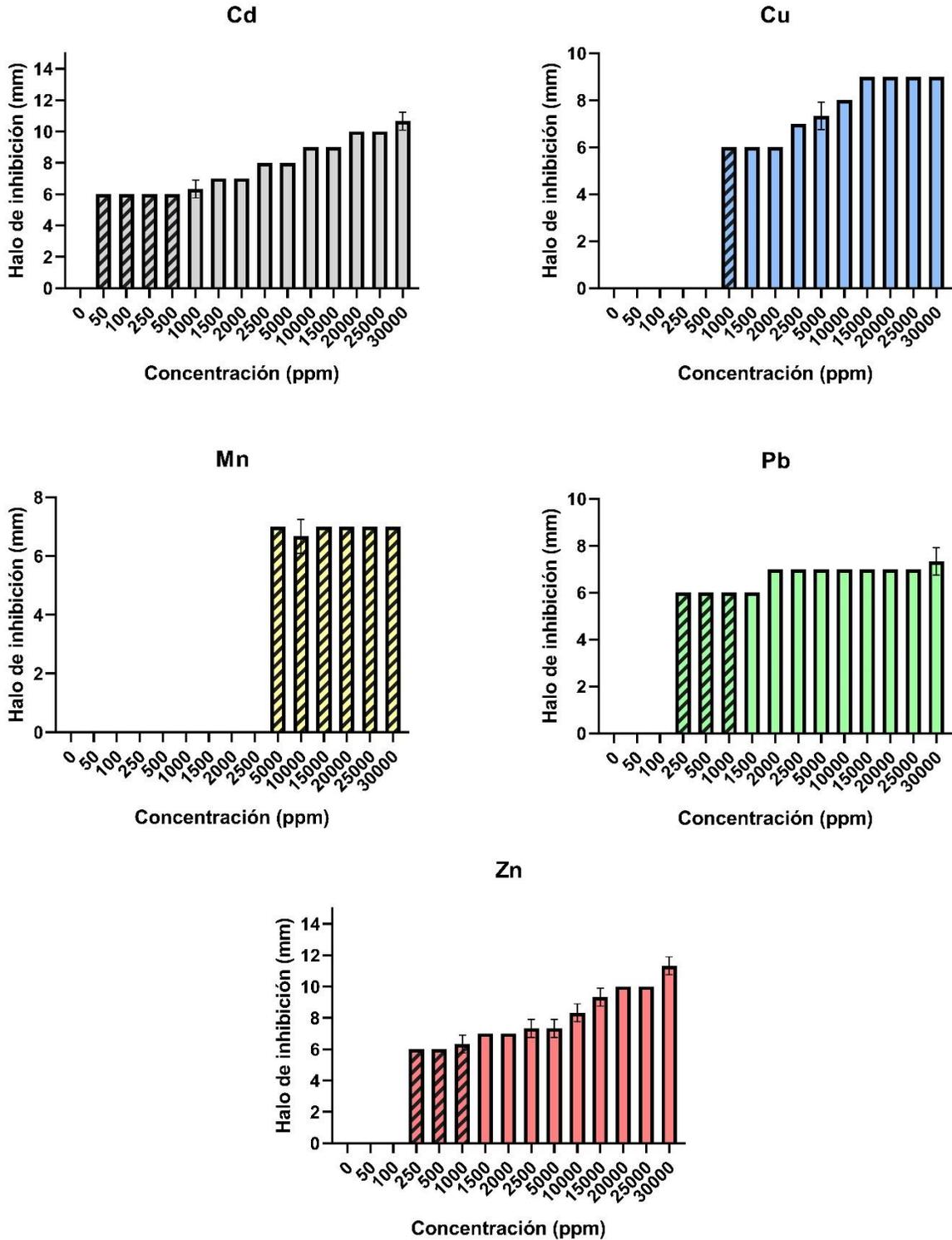


Figura A4. Halos de inhibición de crecimiento para J2-DV-2 expuesta a diferentes concentraciones de cinco metales pesados. Las barras con líneas diagonales indican un efecto bacteriostático moderado, las barras claras señalan un efecto bacteriostático total.

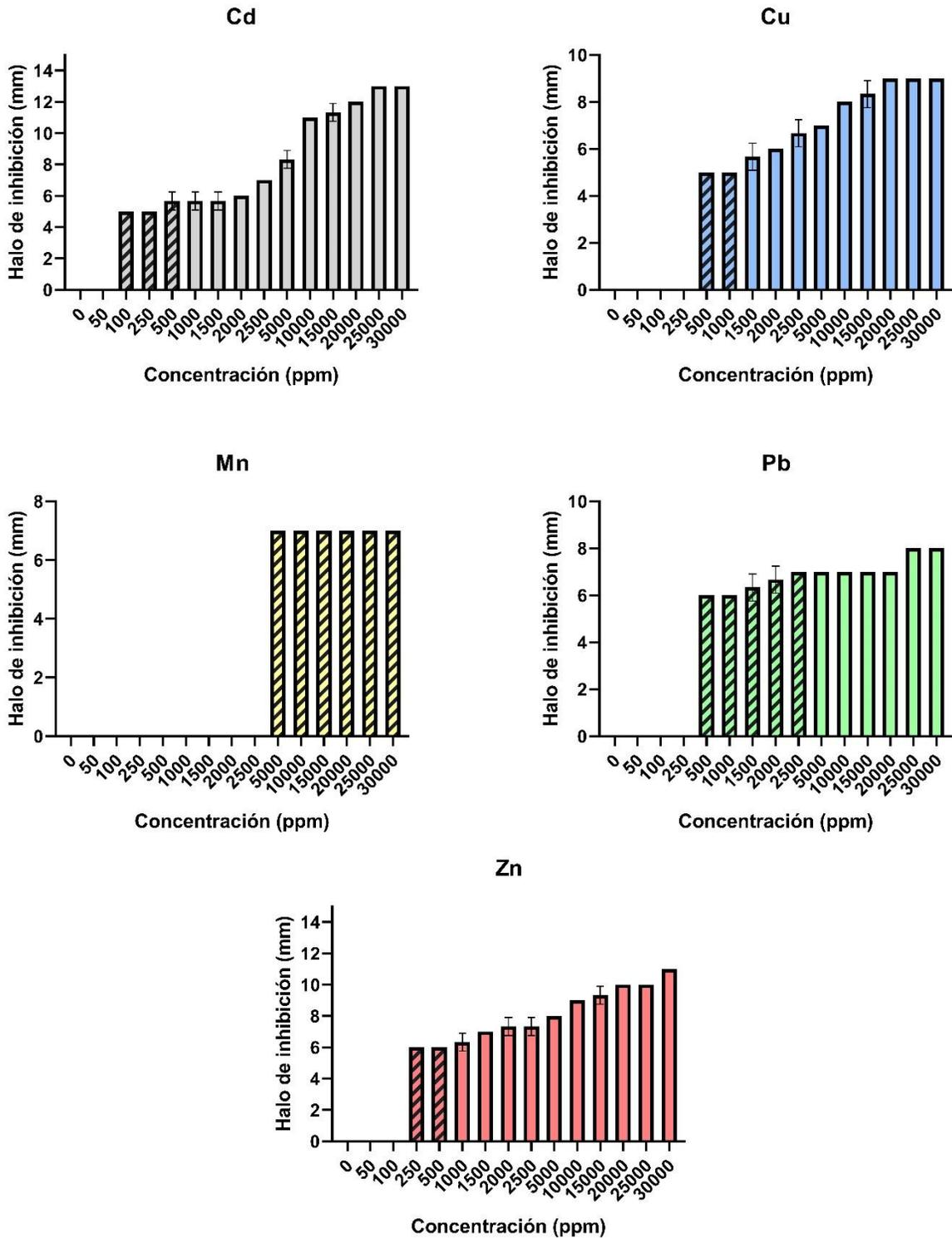


Figura A5. Halos de inhibición de crecimiento para IN-DV-1 expuesta a diferentes concentraciones de cinco metales pesados. Las barras con líneas diagonales indican un efecto bacteriostático moderado, las barras claras señalan un efecto bacteriostático total.

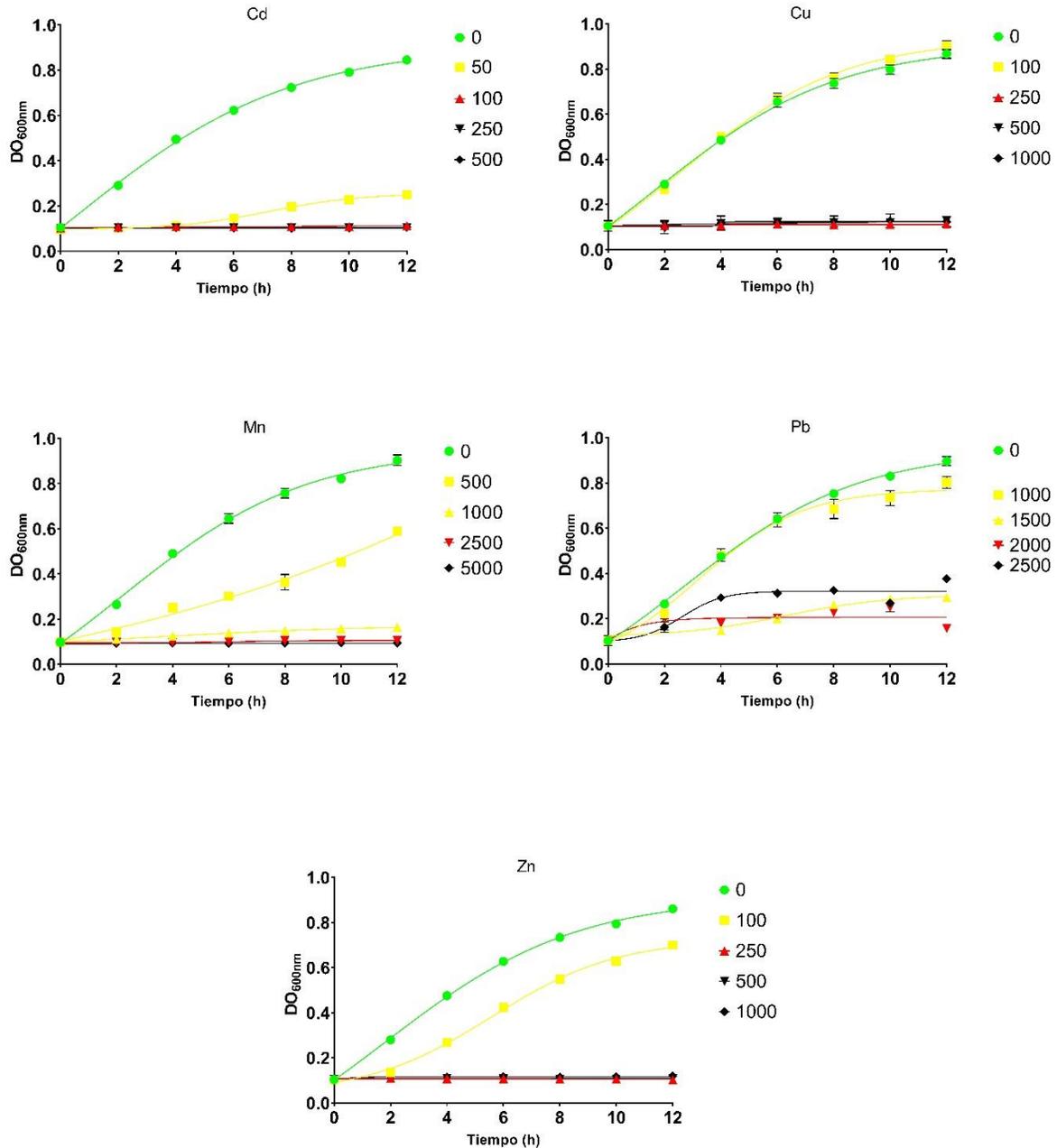


Figura A6. Cinética de crecimiento para J2-PL-B expuesta a diferentes concentraciones de cinco metales pesados. Las líneas verdes muestran el crecimiento de la cepa sin metal (C-), las líneas amarillas indican un efecto bacteriostático moderado, las líneas rojas señalan la concentración mínima inhibitoria y las líneas negras un efecto bacteriostático total

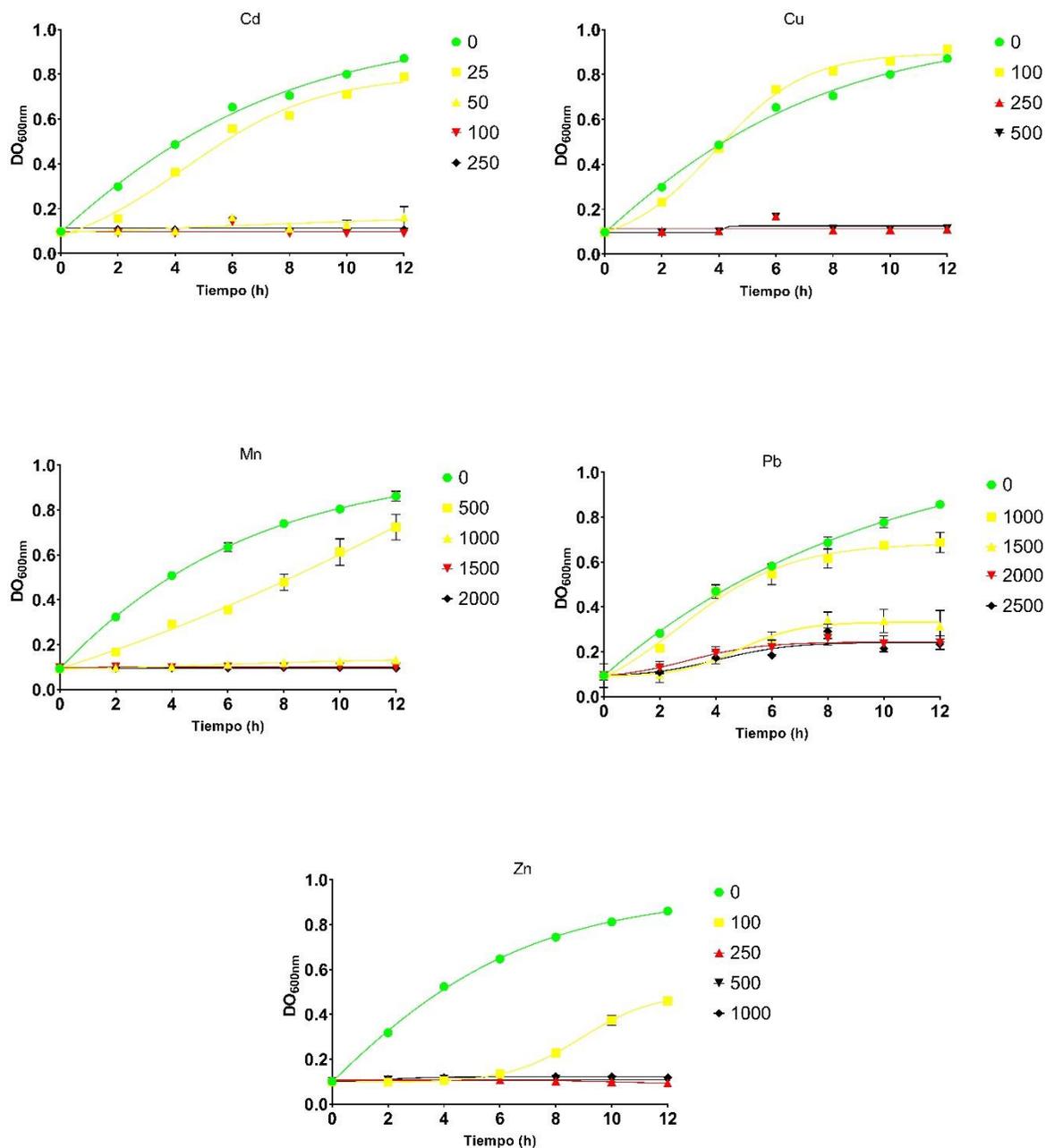


Figura A7. Cinética de crecimiento para J2-PL-S expuesta a diferentes concentraciones de cinco metales pesados. Las líneas verdes muestran el crecimiento de la cepa sin metal (C-), las líneas amarillas indican un efecto bacteriostático moderado, las líneas rojas señalan la concentración mínima inhibitoria y las líneas negras un efecto bacteriostático total.

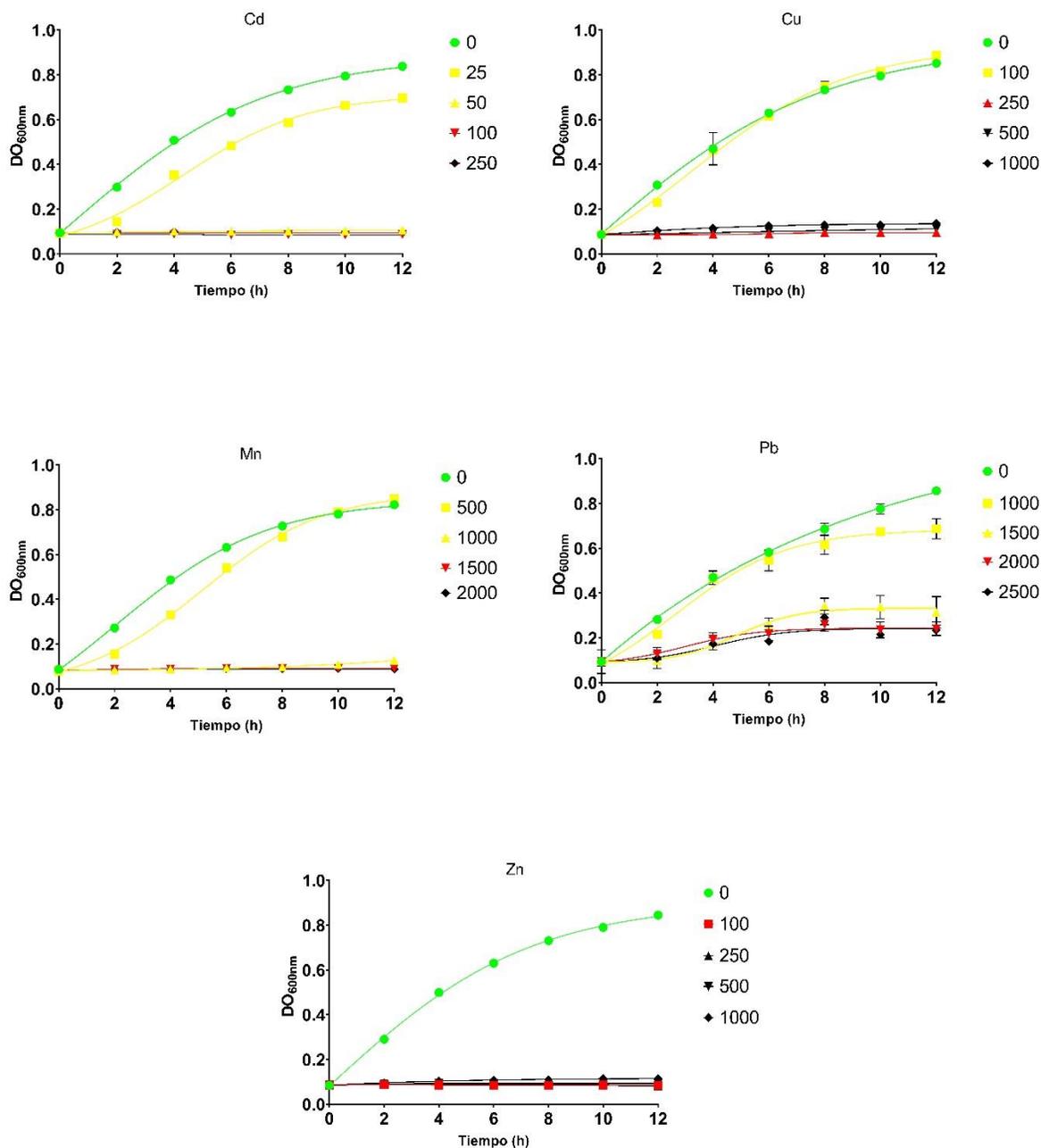


Figura A8. Cinética de crecimiento para J2-PL-S expuesta a diferentes concentraciones de cinco metales pesados. Las líneas verdes muestran el crecimiento de la cepa sin metal (C-), las líneas amarillas indican un efecto bacteriostático moderado, las líneas rojas señalan la concentración mínima inhibitoria y las líneas negras un efecto bacteriostático total.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dra. María Luisa Castrejón Godínez (FCB UAEM)

Tesis: **"Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias tolerantes a metales pesados asociadas a raíces de plantas que habitan en los jales mineros de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Manuel Isaac Morales Olivares**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2022-03-23 13:15:46 | Firmante

Md7B5eYe9oTTTTX6MvtL4J9/GX0bDRyDIIgZTFUocJxtoER+xUatOXVgxhqZt9jy/GYg3DViv4oKXMYsqnUz6+Nfjg1LimEULESVg81ryg8VzFe19JP9sv0UIZfWPBhaVZAUBfDSbR
GU0ckozVZ72/iKaKM7a8yVgUjsmWbczKKNjNY6JnxjvgHVY0DqN4ESwitv2A0kDqCdeMiAtv/BsduEvHHOluoCy0LqJJunZ49zB4cAKDRyHkh6wVgMr6Dyl3q98FsPsStaZRIRyhtu
30PJwHv2k+FpXPLdTv4/ywooWlong+bsJAaFMNenQ1ZgiT4piOgYbSn2z08k2oJhrA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



K3cCRt7qV

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DIAexUMIUPS251tAPovVfSa9U0dCs9Y4>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dra. María Luisa Castrejón Godínez (FCB UAEM)

Tesis: **"Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias tolerantes a metales pesados asociadas a raíces de plantas que habitan en los jales mineros de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Manuel Isaac Morales Olivares**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PATRICIA MUSSALI GALANTE | Fecha:2022-03-23 11:43:53 | Firmante

OtVXZILdQGTrTTHeecwRYq98iX844AI6xdQggTzQzQOOs2FZItFEvy/2O3ov89hpgoyVPCBqls/dQx8gmpmdA8c/sEc5jftxiq4hAwEDChYqynyWHeXtzMxoXaT7hmtTHNSr1NuD6gfqOgN7b2V/MXa626K+99fzNhndkNlxIKfXglnBa8NJNLhoUk8SS0sfevgMYHy02uMYG6clgHprzA1zFxO43xSb06QjjsUs4Cq0ptqVZ+N2ty6FVAU+vP+hi8bXPSZFS6ttV8W0t2zzYz4jS4SCDqaagcVgypc2tMtXdQn/3h74PQOojdckBPzIHdNXIU8wwsIKkrwbJiTQmg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Z2vwPj59x](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CeX3w7oTS8lwkpYYsfQoZb1d5lhXpYlk>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dra. María Luisa Castrejón Godínez (FCB UAEM)

Tesis: **"Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias tolerantes a metales pesados asociadas a raíces de plantas que habitan en los jales mineros de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Manuel Isaac Morales Olivares**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EFRAIN TOVAR SANCHEZ | Fecha:2022-03-23 07:12:54 | Firmante

WvZlhlMzs7PDPEJ7aqJfvgesVGatuhP+xzeeGX+TyKiPM5gXESr5+RhKPwgQrUXzBlycAlvgDhkOo2mEwiq5Jj8wjzycxEcq310F9SMBa6a03HXfNqgj8/U2natd/1ol6EWZxmzObg7nWblaTT1cp2mwdNwNFAGuwl3iJE1tJrvm+qhJN39NFPU4B5nUzEKUYFTxd+3dbwJrwacj1MMnLH1d9eEkIT83Wkees+EFK4Mn95APaCO3/R8sn47slnNTw8uhk0/yqpmqm2v+qUf68Hj2Y4g73D8dhicw3CPZ7ppCGkmgPvn5vVXD5HMNyCFZSFLrJZxX6L4CNDgD2pleA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[QEi2xD8uT](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FKhEh9ZvykyONEzmtSmuU2CPOFEhp0i>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dra. María Luisa Castrejón Godínez (FCB UAEM)

Tesis: **"Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias tolerantes a metales pesados asociadas a raíces de plantas que habitan en los jales mineros de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Manuel Isaac Morales Olivares**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2022-03-23 07:35:12 | Firmante

m0SMI157VvUGN2Wv3oGG9xnqwid2cMTqAFpeIHPHv/vuhHS6pApXcQk0yK5PpI985Hm6lftNkZ6V22jrjd7XZmj5uXfYopjWCfJcw9qOEBYzSgHdVWz+FO45aVE5Ob8JoxU5g
LJGPwwt9nNCsHcvNK28NZmWChFEwXieY1lhjma4FLJukcCV9WbJMjlo7PhenVvRQTOXpjSceEBV6YSYirX5VO0z846+xe8YZPLM6p38OANf6UPWkL9ezg4KYhmdwqkYvekML
/ng61ylUekE058ZnmyD7wTh1v7dN7I8MIGE8c1iszbYyd054Pil87H2sWvHj60GpY5nHLPKMZnA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[iBe0Lf7K6](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/q3q2czyl4GpSBbbgFGSrPTSNhqUfPq8E>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dra. María Luisa Castrejón Godínez (FCB UAEM)

Tesis: **"Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias tolerantes a metales pesados asociadas a raíces de plantas que habitan en los jales mineros de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Manuel Isaac Morales Olivares**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2022-03-23 09:21:00 | Firmante

S725OumFy2Hn4nTidymeTzrXRKhvaZX0JhHp2lO4jpCpfK73zgtzSFGLwNYWSyTp4HXLi5pwh/ejFCchptsYJ4t1HTwiSup6S3O3P1lgjengFkXmf2KWSh/RraMTbrcl9UAAtvj2XJZB5ZEEKHMsc6LlgkRd0NIM6AfDkWagFJes672WBkuu+vxQOE/7DklMCiQxge3FDGw7tV0ycNU+m7a3U8q9A+RWOzMJ4leUivRv49RQYhcTW6bnR11+q2dnsYOisz9JRGQo08a ml1CB+Qj5S7CeUUub8LaOd6KPtDexWAD4cLSwc4vPX8/mcAlv/iP00URqR/TeWJG0gidR16XA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[tlLsoE5jA](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LNW6HR2BhBuqqOHM0Q8YdbxD0iFvKck8>

