



26 de Abril de 2018

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS

Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas en residuos mineros

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Ingeniero Ambiental

PRESENTA:
Mariana del Carmen Rodríguez Galván

DIRECTORA DE TESIS:
Dr. Berenice Noriega Luna

Guanajuato, Gto.

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS
CAMPUS GUANAJUATO

Guanajuato, Gto. 25 de abril de 2018.

Dr. Luis Enrique Mendoza Puga
Director de la División de Ingenierías
P R E S E N T E.

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título “Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas en residuos mineros” desarrollado por la alumna Mariana del Carmen Rodríguez Galván, del programa académico en Ingeniería Ambiental para obtener el grado de Ingeniero Ambiental. El trabajo antes mencionado se desarrolló en los laboratorios de la División de Ingenierías de la Universidad de Guanajuato bajo la dirección de la Dra. Berenice Noriega Luna profesora del Departamento de Ingeniería Civil.

Dra. Berenice Noriega Luna
Directora de tesis

El jurado evaluador para la verificación del Examen Recepcional estuvo integrado por:

Dra. Alma Hortensia Serafín Muñoz
PRESIDENTE

Dra. Norma Leticia Gutiérrez Ortega
SECRETARIO

M.C. Mario Josué Aguilar Méndez
VOCAL

DEDICATORIA

A mi asesora, la Doctora Berenice Noriega Luna, a mi sinodal Mario Josué Aguilar Méndez y a mi compañero de tesis Rodolfo por los consejos y la motivación para continuar con este proyecto; pero sobre todo por la infinita paciencia que tuvieron hacia mi persona. Ha sido un privilegio poder haber trabajado al lado de personas con tanto conocimiento y sencillez.

A mi padre Patricio, en paz descanse, por haberme motivado en cada momento con mis estudios y apoyarme en todo cuanto pudiese. A mi madre Carmen, por dar lo mejor de ella en todo momento para brindar lo mejor a nosotros, sus hijos, pero sobre todo poder dar todo de sí para que lograra concluir mis estudios universitarios cuando mi padre faltó en casa. A mi hermano Omar por enseñarme el equilibrio entre los estudios y la vida, administrar los tiempos ha sido indispensable para ser feliz en este proceso. A mi pareja, Erik, por la comprensión en aquellos días en los que era imposible dormir por las arduas horas de trabajo durante este proyecto y durante mi carrera; gracias también por toda la motivación, por enseñarme lo que la fortaleza y persistencia puede lograr en una persona. Gracias a toda mi familia por apoyarme en todo momento y en todo aspecto.

A mis amigos, Manuel, Oscar, Miguel y Luis, quienes aun estando fuera de mi formación académica, se preocuparon por brindarme todo lo necesario para poder continuar con mis estudios cuando mi padre falleció. A Alejandra por asesorarme con mis dudas en la redacción de mi tesis. Sin ustedes, amigos míos, este momento no sería posible.

A mi profesora Mariana Elorza Tena, por la motivación para estudiar la Licenciatura en Ingeniería Ambiental y por el apoyo en todos proyectos en los que estuvimos involucradas; sobre todo, gracias por luchar en conseguir una beca para mi persona en los tiempos más difíciles. Gracias también a todos mis profesores por los distintos conocimientos brindados.

A todos aquellos que conocí durante esta etapa de mi vida, sé que cada uno fue un grano de arena para fortalecer una montaña de conocimiento.

RESUMEN

La minería es una de las principales actividades que aporta importantes ganancias económicas al estado de Guanajuato. No obstante, la explotación del suelo para la extracción de minerales conlleva procesos que lo contaminan de manera crítica. Además, la minería genera grandes cantidades de residuos, como jales, en donde se encuentran presentes metales pesados los cuales perjudican tanto la salud del hombre como de los ecosistemas. Actualmente se emplean técnicas como la biorremediación para eliminar los metales pesados de las zonas afectadas, la cual se basa en el uso de microorganismos que generan tolerancia o que incluso utilizan a estos metales en sus rutas metabólicas, absorbiendo así el contaminante.

El análisis preliminar cuantitativo y cualitativo con la técnica de espectroscopia de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) de muestras de agua y jal encontradas entre la Mina de Cata y la mina de la Valenciana permitió identificar la presencia de cromo (Cr), cobre (Cu), cadmio (Cd), plomo (Pb), níquel (Ni), zinc (Zn), magnesio (Mg), mercurio (Hg) y arsénico (As).

Se realizaron diluciones decimales seriadas de las muestras de agua y jal para cuantificar unidades formadoras de colonias. Se seleccionaron 14 colonias representativas y se caracterizaron tomando en cuenta su forma, borde, elevación y color. Finalmente se tiñeron con la técnica de Gram para conocer la morfología bacteriana. El análisis morfológico evidencia la presencia de bacilos, cocos y filamentos, asimismo se describen cepas Gram positivas cuya morfología varía de bacilos a filamentos por lo que se sugiere la presencia de Actinobacterias.

Las bacterias evaluadas ante NaAsO_2 a la 4mM, 6mM y 12mM, HgNO_3 a la 0.1mM, 0.5mM y 1mM y AgNO_3 a la 0.1mM, 0.5mM y 1mM logran adaptarse principalmente a mercurio y plata, sin embargo, no se descarta la resistencia de microorganismos ante el arsénico. Los microorganismos han logrado tolerar en algunos casos las concentraciones más altas de metal a las que se les expuso. Los datos de esta experimentación han podido ser corroborados mediante un análisis de variancia (ANOVA).

ABSTRACT

Mining is one of the main activities that contributes with important economic benefits. However, the soil exploitation for mineral extraction entails critical pollution processes. Mining generates great amounts of waste, in which heavy metals are found present and are to be harmful for men and environment. Recently, techniques such as bioremediation seek to eliminate heavy metals of the affected zones, it is based in the use of microorganisms that tolerate and even uses the metal in their metabolism, absorbing this way the pollution agent.

The preliminary quantitative and qualitative analysis with electroscopic technique of optic emission by inductive coupled plasma (ICP-OES) of water and tailing samples found between Cata Mine and Valenciana Mine allowing to identify the presence of chrome (Cr), copper (Cu), cadmium (Cd), lead (Pb), nickel (Ni), zinc (Zn), magnesium (Mg), mercury (Hg) y arsenic (As).

Serial decimal solutions of water and tailing samples were obtained to quantify colony formation units. 14 representative colonies were selected and characterized by their form, edge, elevation and color. Finally they were Gram stained and bacterial morphology was described. The morphologic analysis showed the presence of bacilli, cocci and filaments. Presence of Actinobacteria is suspected due the abundant Gram positive bacilli to filament bacteria.

The bacteria evaluated NaAsO_2 a la 4mM, 6mM y 12mM, HgNO_3 a la 0.1mM, 0.5mM y 1mM y AgNO_3 a la 0.1mM, 0.5mM y 1mM manages to adapt mainly to mercury and silver, however the resistance of microorganisms to arsenic is not discarded. Microorganisms have succeeded in tolerating in some cases the highest concentration to which they were exposed. The data in this experiment was able to be corroborated through the analysis of variance (ANOVA).

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Breve reseña de la minería en México	1
1.2 Distrito Minero de Guanajuato	3
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	5
2.1. Características de los residuos mineros	5
2.2. Metales pesados característicos en los residuos mineros	5
2.3. Impacto de los metales pesados en salud humana	6
2.4. Toxicidad de los metales pesados en bacterias	6
2.5. Mecanismos de resistencia de los microorganismos a metales pesados	6
2.5.1. Microorganismos resistentes a plata.....	7
2.5.2. Microorganismos resistentes a arsénico	7
2.5.3. Microorganismos resistentes a mercurio	9
2.6. Características de microorganismos comunes en suelo	9
2.7. Microorganismos empleados en tecnologías para limpieza de sitios contaminados por metales pesados	10
CAPÍTULO 3. OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN	11
3.1. Justificación	11
3.2. Objetivo general.....	11
3.2.1. Objetivos particulares	11
3.3 Hipótesis	11
CAPÍTULO 4. MÉTODOLOGÍA	12
4.1. Análisis fisicoquímico de muestras ambientales.....	12
4.1.1 Toma de muestra	12
4.1.2. Determinación de pH y humedad en los residuos mineros.....	12
4.1.3 Análisis granulométrico.....	12
4.1.4. Mineralización y cuantificación de metales en las muestras ambientales	13
4.2 Análisis microbiológico de las muestras ambientales.....	13
4.2.1. Toma de muestra	13
4.2.2. Preparación de agar nutritivo y agar nutritivo enriquecido con metales	13
4.2.3. Dilución decimal seriada de las muestras ambientales.....	14
4.2.4. Siembra de muestras.....	14
4.2.5. Análisis de morfología colonial.....	14
4.2.6. Aislamiento de colonias con la técnica de estría cruzada.....	15
4.2.7. Tinción Gram	15
4.3. Cinética de crecimiento de cepas bacterianas expuestas a metales.....	16
4.4. Análisis de varianza (ANOVA)	16
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	17
5.1. Descripción del sitio de estudio	17
5.2. Caracterización fisicoquímica de los puntos de muestreo	19

5.3. Análisis granulométrico	19
5.4. Concentraciones de metales en las muestras ambientales.....	21
5.5. Crecimiento microbiano en agar nutritivo enriquecido	21
5.6. Análisis morfológico colonial.....	23
5.7. Análisis morfológico celular.....	25
5.8. Análisis del crecimiento bacteriano	29
5.8.1. Crecimiento en cepas bacterianas expuestas a AgNO ₃	29
5.8.2. Crecimiento en cepas bacterianas expuestas a HgNO ₃ H ₂ O.....	30
5.8.3. Crecimiento en cepas bacterianas expuestas a NaAsO ₂	32
5.9. Análisis de resistencia a metales pesados a las cepas bacterianas.	34
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	36
6.1. Zona de estudio	36
6.2. Siembra de muestras	36
6.3. Selección de concentraciones para el estudio morfológico.....	37
6.4. Aislamiento bacteriano	37
6.5. Descripción de la comunidad microbiana.....	38
6.7. Resistencia de los microorganismos hacia metales pesados	39
6.8. ANOVA y su importancia en la detección de cepas tolerantes y resistentes a metales pesados.....	41
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales minas en el México Prehispánico..	1
Figura 2. Las minas del siglo XVII.....	2
Figura 3. Las minas del siglo XVIII.	2
Figura 4. Ubicación de la zona del Distrito Minero de Guanajuato e hidrología..	3
Figura 5. Dilución decimal seriada de las muestras ambientales.....	14
Figura 6. Técnica de estría cruzada.....	15
Figura 7. Tinción de Gram.	16
Figura 8. Imágenes satelitales de la zona de estudio. a) Cueva adentro; b) Entrada de la cueva; c) Escorrentía; d) Jales.	18
Figura 9. Puntos de muestreo. a) Cueva adentro (M1); b) Entrada de la cueva (M2); c) Escorrentía (M3); y d) Zona de jales (M4).....	18
Figura 10. Deducción de suelos en las muestras M2 y M4 a través del triángulo textural.....	20
Figura 11. Selección de cepas a aislar.....	23
Figura 12. Cepas aisladas.....	25
Figura 13. Morfología celular de las cepas C1, C2, C3, C4 y C5.....	26
Figura 14. Morfología celular de las cepas C6, C7, C8, C9, C10 y C11.....	27
Figura 15. Morfología celular de C12, C13 y C14.....	28

Figura 16. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a AgNO_3 durante 24h.....	29
Figura 17. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a AgNO_3 durante 48h.....	30
Figura 18. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a $\text{HgNO}_3\text{H}_2\text{O}$ durante 24h.....	31
Figura 19. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a $\text{HgNO}_3\text{H}_2\text{O}$ durante 48h.....	32
Figura 20. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a NaAsO_2 durante 24h.....	33
Figura 21. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a NaAsO_2 durante 48h.....	34
Figura 22. Crecimiento de cepas expuestas a AgNO_3 durante 24h, mostrando su desviación estándar.....	52
Figura 23. Crecimiento de cepas expuestas a AgNO_3 durante 24h, mostrando su desviación estándar.....	53
Figura 24. Crecimiento de cepas expuestas a HgNO_3 durante 24h, mostrando su desviación estándar.....	53
Figura 25. Crecimiento de cepas expuestas a HgNO_3 durante 48h, mostrando su desviación estándar.....	54
Figura 26. Crecimiento de las cepas expuestas a NaAsO_2 durante 24h, mostrando su desviación estándar.....	54
Figura 27. Crecimiento de cepas expuestas a NaAsO_2 durante 48h, mostrando su desviación estándar.....	55

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Niveles de tolerancia a arsénico de cepas bacterianas aisladas de rocas volcánicas, de la Quebrada Camarones, Región Parinacota, Chile.....	8
Tabla 2. Tamices seleccionados para análisis granulométrico.....	12
Tabla 3. Rampa de temperatura para la mineralización de las muestras ambientales.....	13
Tabla 4. Descripción de los puntos de muestreo.....	17
Tabla 5. Valores de potencial de hidrógeno, porcentaje de humedad y compactación de las muestras.....	19
Tabla 6. Análisis granulométrico básico de muestras con contenido de sedimento.....	20
Tabla 7. Concentraciones de metales en muestras ambientales.....	21
Tabla 8. Cepas representativas durante el análisis morfológico colonial en 24h.....	21
Tabla 9. Cepas representativas durante el análisis morfológico colonial en 48h.....	22
Tabla 10. Cepas representativas y cepas seleccionadas durante el análisis morfológico colonial en 115h.....	22
Tabla 11. Características de las colonias bacterianas.....	24
Tabla 12. Morfología bacteriana de las cepas aisladas.....	28
Tabla 13. Valor P de concentraciones significativas según ANOVA.....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Method 3050b. Acid Digestion of sediments, sludges and soils (Método 3050B. Digestión ácida de sedimentos, lodos y suelos).	48
Anexo 2. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.....	48
Anexo 3. NORMA Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-2011, Salud ambiental. Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas.....	49
Anexo 4. NORMA Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.	51
Anexo 5. Crecimiento de cepas expuestas a AgNO ₃ 0.1mM 0.5mM y 1mM; HgNO ₃ H ₂ O 0.1mM, 0.5Mm y 1mM y NaAsO ₂ 4mM, 6mM y 12mM.....	52

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Breve reseña de la minería en México

La minería prehispánica fue una actividad que se realizó a pequeña escala y tenía como finalidad la elaboración de objetos para el culto religioso y de piedras preciosas utilizadas para el comercio (Hultut y Dana, 1960). Desde hace varios años la explotación de minerales como el oro, la plata, el plomo, el cobre, el estaño y el mercurio, entre otros minerales, es una actividad común en México como se muestra en la figura 1 (Bargalló, 1955; Sánchez, 2002).

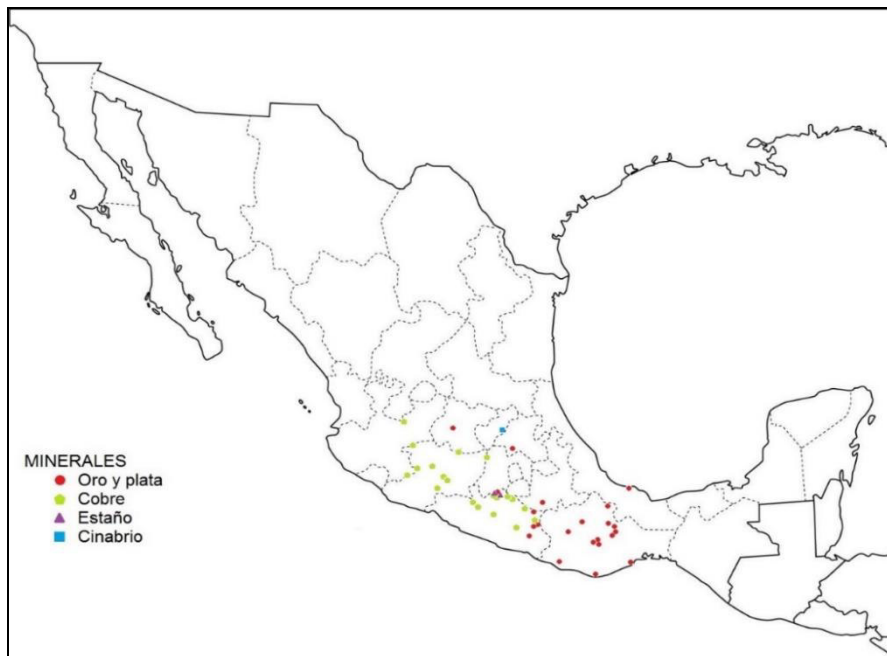


Figura 1. Principales minas en el México Prehispánico. Modificado de Sánchez, 2002. La actividad minera antes de la llegada de los españoles se centraba en la zona centro y sur del país coincidiendo la azteca, la totonaca, olmecas, mayas, zapotecas, teotihuacanas, toltecas, entre otros.

Durante la época de la Conquista, la extracción de metales preciosos como oro y plata fue una de las actividades más comunes en México (Monroy, 1997). En la segunda mitad del siglo XVI la actividad minera se vio afectada por la descapitalización creciente, la falta de técnicos capacitados y el empirismo de los trabajos, por lo que fue necesario explorar nuevas zonas para extraer metales; encontrándose nuevos yacimientos en los estados Zacatecas, Durango, Coahuila (Bargalló, 1955) y San Luis Potosí (Bakewell, 1976). En el siglo XVII se descubrieron nuevos minerales en el Estado de Chihuahua (figura 2) y en el siglo XVIII se fundó el real de minas de Santa Eulalia que dio origen a la actual ciudad de Chihuahua. Hacia el oeste se abrieron minas en Sonora y Sinaloa (Bargalló, 1955) (figuras 2 y 3).

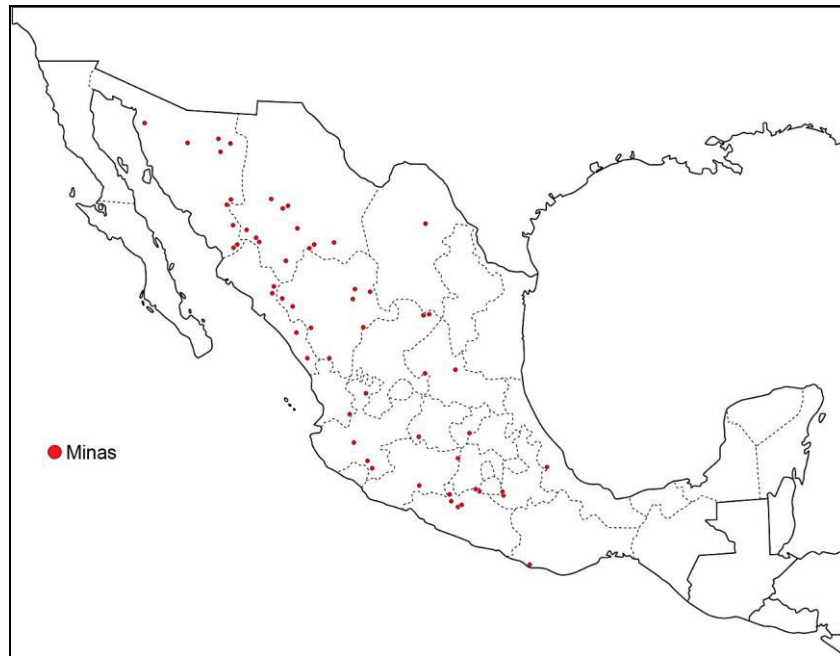


Figura 2. Las minas del siglo XVII. Modificado de Sánchez, 2002. La minería comienza a expandirse hacia el centro, norte y oeste de México a causa del Virreinato, la zona sur del país deja de ser explotada como anteriormente se hacía.



Figura 3. Las minas del siglo XVIII. Modificado de Sánchez, 2002. Mientras el Virreinato continuaba, la minería seguía creciendo principalmente en el centro del país, aunque los trabajos para extraer mineral alrededor del país continuaban.

Al final de la colonia, la Nueva España contribuyó de manera notable con el oro y la plata para la acumulación de capitales en Europa. Durante la guerra de

independencia la actividad minera tuvo el nivel más bajo de producción. Fue hasta el porfiriato, cuando las empresas extranjeras se interesaron en la extracción de metales preciosos en México. Después de la segunda Guerra mundial, como consecuencia de las nuevas políticas, la industria minera decayó nuevamente, convirtiéndose la agricultura, la industria no minera e incluso el turismo en las principales actividades económicas del país. A pesar de que la actividad minera ha impactado en el desarrollo tecnológico y económico de México, la industria decae día con día a consecuencia de la sobreexplotación y la devaluación de metales (Archivo General de la Nación, 1934; Bakewell, 1976; Sánchez, 2002).

1.2 Distrito Minero de Guanajuato

El Distrito Minero de Guanajuato se ubica entre los 21°05' y 21°00' de latitud Norte y 101°20' y 101°10' de longitud Oeste (Ramos-Arroyo *et al.*, 2004). La mayoría de las minas del distrito se encuentran en la subcuenca del río Guanajuato, perteneciente a la cuenca del río Lerma, como se muestra en la figura 4.

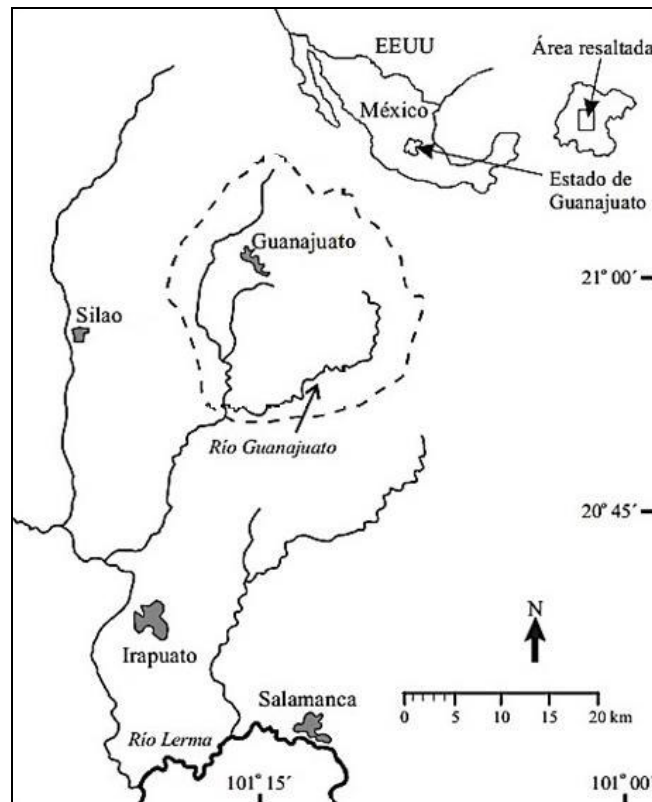


Figura 4. Ubicación de la zona del Distrito Minero de Guanajuato e hidrología. Tomado de Ramos-Arroyo *et al.* (2004). Con líneas punteadas se ha marcado el distrito minero de Guanajuato, el cual se encuentra alrededor de Irapuato, Silao y Salamanca.

En el siglo XVI, el Estado de Guanajuato se convirtió en uno de los principales fondos minerales para la expansión monetaria. La primer mina que comenzó a explotar plata en este siglo fue la Mina de la Valenciana en la ciudad de

Guanajuato (Sánchez, 2002). En el siglo XVIII el Estado de Guanajuato tuvo un auge importante en expansión minera por ser una población predominantemente mestiza, las relaciones industriales favorecieron a la economía desde una visión capitalista. Actualmente, Guanajuato tiene una de las economías regionales más destacables de Hispanoamérica, cuyo nivel de desarrollo industrial es fundamento de una prosperidad demográfica que tipifica la historia social y económica de la entidad (Moraga *et al.*, 2003).

Sobre el Distrito Minero de Guanajuato se han extraído aproximadamente 95 millones de toneladas de roca mineralizada principalmente por flotación bulk y en menor grado por cianuración. En ambos procesos se tiene una recuperación de concentrado metálico menor al 5% del volumen total procesado, el resto del material, jales mineros, es depositado en presas de jales (Sociedad Cooperativa Minero Metalúrgica Santa Fé de Guanajuato S.A. de C.L., 2002). Ramos-Arroyo *et al.* (2004) han descrito que elementos como el arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb), selenio (Se) y zinc (Zn) y el mercurio (Hg) son elementos que se encuentran en jales y que además por su alta toxicidad presentan un riesgo a la salud.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Características de los residuos mineros

La actividad minera genera grandes cantidades de residuos, conocidos como jales mineros o relaves mineros. Estos residuos se caracterizan por su alto contenido de metales los cuales tienen la capacidad de desplazarse tanto hacia aguas subterráneas como superficiales, así como hacia ambientes geológicos, debido a su alta movilidad y solubilidad (Bosecker, 2002; Verstraete, 2002; Mulligan *et al.*, 2001). Los metales pesados se caracterizan por presentar una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 en forma elemental y número atómico superior a 20, sin incluir a los metales alcalinos y alcalino-térreos (García y Dorronsoro, 2001). El impacto que pueda tener un metal pesado en el suelo y sedimento depende de los procesos de adsorción y de la capacidad de acomplejamiento que tengan éstos hacia el ambiente, así como de las condiciones geológicas. Existen metales como el Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au, Hg que se alojan con facilidad en sedimento (Caccia, *et al.*, 2003; Vullo, 2003).

2.2. Metales pesados característicos en los residuos mineros

Existen metales pesados que pueden formarse de manera natural o en consecuencia de la industria, un ejemplo es el mercurio, el cual se puede encontrar tanto en residuos mineros como en el carbón y el cinabar. Cuando el mercurio se libera a la atmósfera, se deposita en forma seca o húmeda en cuerpos de agua en donde es transformado por microorganismos en metil-mercurio, especie química más tóxica que el mercurio elemental.

Otro metal generado durante la extracción de minerales es el arsénico. Su movilidad y distribución en el ambiente dependen de la cantidad de oxígeno, de los microorganismos presentes y del tamaño de las partículas del suelo. Los suelos arcillosos y los suelos limosos, así como los oxihidróxidos de Fe, Al o Mn tienden a almacenar grandes cantidades de As. A pesar de ser un elemento esencial para la vida puede volverse sumamente tóxico en cantidades altas. Las especies químicas más abundantes del arsénico son el As (III), que es la especie más tóxica y As (V), siendo ésta última la especie arsenical más difundida en el ambiente, principalmente en agua y suelos. (Bundschuh *et al.*, 2008).

La plata es un elemento presente en bajas concentraciones en los residuos mineros. Se considera como un elemento relativamente estable en el ambiente, aunque la lluvia ácida es capaz de desplazar al metal hacia el suelo y agua subterránea. La contaminación por plata inhibe la función de algunas enzimas esenciales de los sistemas vivos causando su muerte, pues este metal no experimenta reacciones redox reversibles y logra desplazar algunas metales esenciales en sistemas vivos

(Odermatt *et al.*, 1994; Foye, 1977; Ghandour *et al.*, 1988; Filali *et al.*, 2000; Fortín y Campell, 2001).

2.3. Impacto de los metales pesados en salud humana

Los metales pesados al impactar en suelo y en agua ponen en riesgo la salud de las poblaciones humanas (McGrath *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2002). Altas concentraciones de metales pesados causan enfermedades principalmente cardiovasculares, renales y óseas (Orozco, 2003). Los sitios más vulnerables del cuerpo humano en la intoxicación por metales pesados son el sistema nervioso y el sistema endócrino. Algunas manifestaciones clínicas asociadas a la exposición de metales pesados son autismo, retrasos del desarrollo, esclerosis múltiple, fatiga crónica, neuropatía y demencia. Los síntomas pueden variar debido a otros factores tales como el estrés, cambios hormonales, dieta, exposición a otras sustancias tóxicas y a la presencia de otras enfermedades (Cheikin, 2007).

2.4. Toxicidad de los metales pesados en bacterias

Propiedades del suelo como el pH, el contenido de materia orgánica, el porcentaje de arcillas y la concentración de óxido de hierro son propiedades que facilitan la capacidad de almacenamiento de metales por los microorganismos presentes en el suelo (Kotaš y Stasicka, 2000; Dube *et al.*, 2001; Banks *et al.*, 2006). No obstante, el pH es la propiedad más importante en la solubilidad y especiación de los metales en el suelo (Christensen, 1984; Sanders *et al.*, 1986). Asimismo, el incremento de la concentración de metales en suelo ejerce una presión selectiva capaz de modificar la microbiota y las propiedades del suelo (Hughes y Poole, 1991; Joshi-Tope y Francis, 1995; Lasat, 2002; McGrath *et al.*, 2001; Mergeay, 1991; Montuelle *et al.*, 1994; Nies, 1992; Urrutia y Beveridge, 1993; Rajbanshi, 2008).

Cuando la descarga de contaminantes es de carácter permanente, como sucede con los metales pesados en los residuos mineros, es probable la formación de compuestos que dan lugar a efectos citotóxicos al sustituir por antagonismo un metal esencial con la misma carga, valencia y radio atómico de una estructura o molécula biológica teniendo como consecuencia la pérdida de la estructura y de la funcionalidad de los microorganismos. Algunos metales que limitan las funciones biológicas de los microorganismos por su alta toxicidad son Sb, As, Cd, Pb, Hg, Ag y U (Díaz *et al.*, 1994; Silver y Walderharg, 1992).

2.5. Mecanismos de resistencia de los microorganismos a metales pesados

La *tolerancia* a los metales es la propiedad bioquímica y estructural intrínseca que poseen algunos microorganismos para protegerse de la toxicidad de los metales, siendo así que los microorganismos pueden ser indiferentes a la presencia o

ausencia de metal (Gadd, 2000; Silver y Misra, 1988). Mientras que la *resistencia* a metales es la habilidad de algunos microorganismos para sobrevivir y evitar los efectos tóxicos de metales pesados, por medio de un mecanismo de detoxificación, codificados genéticamente, producido en respuesta al metal con el que están en contacto (García, 2002; Vullo, 2003). Se plantea que tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes, algunos otros pueden incluso utilizar a los metales pesados dentro de sus rutas metabólicas.

Los mecanismos de resistencia y de tolerancia desarrollados por los microorganismos derivan de los mecanismos de adaptación tales como la *biosorción*, que es la capacidad de los microorganismos para retener metales mediante una interacción físicoquímica entre éstos y las paredes celulares de los microorganismos; la *bioacumulación* que es la incorporación del metal al citoplasma celular y posterior modificación de las metalotioneínas; la *biomineralización* que es la precipitación de los metales por medio de la codificación de los plásmidos y alcalinización de la superficie celular externa; la *biotransformación* que son los cambios químicos del metal, y la *quimiosorción* que es la biomineralización del metal a través de la generación de núcleos de cristalización en donde el metal se deposita, estos mecanismos surgen en lapsos de tiempo diferentes, el tiempo varía según la especie (Mergeay, 1991; Hughes y Poole, 1991; Nies, 1992; Urrutia y Beveridge, 1993; Joshi-Tope y Francis, 1995; Gadd, 2000; Vullo, 2003; Sharma *et al.*, 2000; Wang *et al.* 1997; Gadd, 2000; Bréant, *et al.*, 2002; Lebeau *et al.*, 2002; McEldowney, 2000; Lovley, 2000; Coelho *et al.*, 2014).

2.5.1. Microorganismos resistentes a plata

El uso incontrolado de plata genera resistencia en diferentes microorganismos (Silver, 2003) no obstante, la resistencia de éstos al metal varía según las condiciones de la zona, por ejemplo Piimpel y Schinner (1986) detectó bacterias en suelos que en pequeñas concentraciones, como el 0.01mM de plata, se ven afectadas en su crecimiento, sin embargo toleran concentraciones de hasta 0.1mM, más en hongos se ha encontrado una resistencia de 1mM hasta 10mM, concentración a la cual los hongos comienzan a morir. Se ha visto además que algunos microorganismos que generaron resistencia en pacientes que consumieron este metal fueron *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* (Hendry y Stewart, 1979), *Acinetobacter baumannii*, (Deshpande y Chopade, 1994), *Salmonella typhimurium* (McHugh *et al.*, 1975) y *Pseudomonas stutzeri* (Haefeli *et al.*, 1984).

2.5.2. Microorganismos resistentes a arsénico

Los microorganismos se ven obligados a contrarrestar los efectos del arsénico para poder sobrevivir, una de las estrategias de resistencia que han desarrollado es la

oxidación o metilación del arsenito a especies menos tóxicas como el arseniato (Dastidar y Wang, 2009; Yamamura y Amachi, 2014). Rokbani *et al.* (2006) evaluaron dos muestras de suelo, una contaminada con As y otra sin ningún metal; los microorganismos de ambas muestras se expusieron a As_2O_3 7mM y a As_2O_5 20mM. En total obtuvieron 41 cepas resistentes a As, las cuales fueron evaluadas por un periodo total de 48h, se encontraron 22 microorganismos Gram positivos (G+) y 19 Gram negativos (G-). Las cepas identificadas resultaron ser Actinobacterias (14 aislamientos), γ -Proteobacterias (12 aislamientos), Firmicutes (8 aislamientos), α -proteobacterias (5 aislamientos) y β -proteobacterias (2 aislamientos). Tanto en suelo contaminado como en el suelo no contaminado se pudieron identificar los géneros Bacillus, Pseudomonas, Acinetobacter, Arthrobacter y Micrococcus.

Campos (2007) identificaron 10 cepas bacterianas en rocas volcánicas en tres sectores de estudio. En el sector Illapata, aislaron una cepa de *Pseudomonas alcaligenes* y *Wautersia solanacearum*, con niveles de resistencia mayor a 8 y 2mM, para As (III) y As (V) respectivamente. Además, se aisló una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* y una de *Enterobacter cloacae*, donde sus niveles de resistencia a As (III) y As (V), fueron de 2mM y mayor a 8mM respectivamente. En el sector Esquiña se aisló una cepa de *Wautersia solanacearum*, con niveles de resistencia de 8 y 3mM, una cepa de *Pseudomonas alcaligenes* con niveles de resistencia de 8 y 1mM, *Burkordelia cepacia* con niveles de resistencia de 8 y 1mM y una *Enterobacter cloacae* con niveles de resistencia de 8 y 1mM, para As (III) y As (V), respectivamente. Finalmente, en el sector desembocadura aislaron una cepa bacteriana correspondiente a *Wautersia solanacearum* con niveles de resistencia mayores a 8 y 3mM y una cepa de *Burkordelia cepacea* con niveles de resistencia de 1 y mayor a 8mM, para As (III) y As (V), respectivamente. La información se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Niveles de tolerancia a arsénico de cepas bacterianas aisladas de rocas volcánicas, de la Quebrada Camarones, Región Parinacota, Chile. Modificada de Campos (2007). Nótese que la tolerancia de un microorganismo varía según la zona, así se trate de la misma especie. Además, la tolerancia entre As (III) y As (V) también varía en la misma especie.

Cepa Bacteriana	Niveles de Tolerancia (mM)		Lugar de aislamiento
	As (III)	As (V)	
<i>P. alcaligenes</i>	>8	2	Illapata
<i>W. solanaceum</i>	>8	2	
<i>A. calcoaceticus</i>	2	>8	
<i>E. cloacae</i>	2	>8	
<i>W. solanaceum</i>	>8	4	Esquiña
<i>P. alcaligenes</i>	>8	1	
<i>B. cepacia</i>	1	>8	

<i>E. cloacae</i>	4	>8	Desembocadura
<i>W. solanaceum</i>	>8	3	
<i>B. cepacia</i>	1	>8	

Un estudio realizado por Altschul, *et al.* (1997) muestra que en aguas residuales del Distrito de Madurai, Sur de la India detectó microorganismos como *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter radioresistens* que se desarrollan a 30°C a un pH de 7.0, estos microorganismos generan una resistencia ante Na₂As₂O₃ en un rango de 6.5mM a 15mM e incluso ante HgCl₂ (0.75mM).

2.5.3. Microorganismos resistentes a mercurio

Hassen *et al.*, (1998) demuestra que en muestras sólidas de Tunisia existen *Pseudomonas paucimobilisresisten*, *Streptococcus* y *Citrobacter freundii*, de los cuales *Streptococcus* y *Citrobacter freundii* generan resistencia ante el mercurio a una concentración de 10mM y 70mM. Sin embargo *Pseudomonas paucimobilisresisten* sobresale al tolerar el metal a una concentración de hasta 100mM.

2.6. Características de microorganismos comunes en suelo

Estudios como los de Rokbani *et al.* (2006) y Campos (2007) afirman la existencia de Actinobacterias y Pseudomonas son comunes en sedimento y suelo. Marrufo *et al.*, 2015 describen la Actinobacteria como un microorganismo Gram positivo que se desarrolla fácilmente en suelo y agua dulce; la Actinobacteria continuamente es confundida con un hongo, pues al igual que este, está conformada por una estructura filamentosa que produce esporas.

El género Pseudomonas de los bacilos Gram negativos ha sido considerado por Piotrowska-Seget *et al.*, (2005) y Malik (2004) como un indicador para medir la contaminación; sin embargo una bacteria no siempre absorbe el metal para tener una remediación exitosa, por ejemplo cuando *Pseudomonas aeruginosa* se involucra en el ciclo natural del Hg, éste puede pasar de Hg²⁺ a Hg⁰ y una vez ocurrido esto, otros organismos podrían metilar al mercurio a CH₃Hg⁺ o (CH₃)₂Hg, que son compuestos aún más tóxicos (Vullo, 2003).

Se han encontrado enterobacterias en el suelo, las cuales pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Las enterobacterias se pueden encontrar tanto en forma de bacilos como de cocos, estas bacterias Gram negativas no sólo se desarrollan en suelo, sino que crecen con facilidad en agua y vegetación (Puerta y Mateos, 2010).

Otro microorganismo también encontrado en suelo, y además en materia orgánica en descomposición (como el heno húmedo y la paja) es *Actinomyces israelii*, y es

un bacilo Gram positivo anaerobio que no forma esporas y es muy difícil de aislar. (Roque, 2016).

2.7. Microorganismos empleados en tecnologías para limpieza de sitios contaminados por metales pesados

Los microorganismos que logran resistir o tolerar metales pesados para sobrevivir son útiles en los procesos de biorremediación pues contienen propiedades catabólicas capaces de degradar los metales (Pepper *et al.*, 2002; Vullo, 2003). Se han reportado bacterias *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y Actinobacterias radio-resistentes, que se adaptan fácilmente a los altos niveles de metales pesados, generando mecanismos de resistencia que pueden utilizarse en la desintoxicación y eliminación de metales pesados en cualquier zona contaminada (Ahmed y Badar, 2005; Raja *et al.* 2009). Las bacterias con tolerancia y resistencia a metales pesados como el As, Hg, Pb, Cu, Zn, Cd, Ag y Cr, logran desintoxicar los suelos gracias a la generación de agentes quelantes, inmovilizando los metales para reducir su toxicidad (Kavamura y Esposito, 2010). Las Actinobacterias pueden lograr una biorremediación de materia orgánica e inorgánica (Abate *et al.*, 2005; Abate *et al.*, 2007; Amoroso *et al.*, 2010; Solecka *et al.*, 2012). Rokbani *et al.* (2006) recomiendan utilizar Bacilos, *Pseudomonas*, Actinobacterias *Arthrobacter* y Micrococos para la remediación de suelos contaminados con arsénico y/o plomo. La eficiencia que pueda lograr un microorganismo en una bioaumentación celular o genética, depende de la población receptora, así como el grado de contaminación de la zona. Es importante siempre considerar el tiempo en el que se quiere lograr una remediación, pues cada microorganismo se desenvuelve de distinta manera (Ademola *et al.*, 2013).

CAPÍTULO 3. OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Justificación

La extensa explotación minera en el municipio de Guanajuato ha promovido la generación de amplias áreas donde se concentran metales pesados. Considerando el enorme periodo de exposición a estos contaminantes las comunidades de organismos que aún prevalecen en estos sitios seguramente deben de haber generado mecanismos de resistencia a las condiciones antes mencionadas. Es por ello que en este trabajo se propone realizar una caracterización microbiológica de cepas resistentes a metales presentes en los jales, con la finalidad de generar información para el desarrollo de tecnologías de biorremediación.

3.2. Objetivo general

Describir la comunidad microbiana cultivable asociada a los jales que se encuentran ente las minas de Valenciana, Mellado y Cata y evaluar su resistencia y tolerancia ante AgNO_3 , HgNO_3 y NaAsO_2 .

3.2.1. Objetivos particulares

1. Identificar una zona de residuos mineros de interés de estudio.
2. Determinar la concentración de metales (arsénico, mercurio y plata) en los residuos mineros.
3. Evaluar el crecimiento de microorganismos aislados de residuos mineros en ausencia de metales pesados y en presencia de arsénico, mercurio y plata.
4. Describir la morfología celular y colonial de las cepas aisladas.
5. Evaluar la resistencia y/o tolerancia de los microorganismos a plata, mercurio y arsénico.

3.3 Hipótesis

Debido a la presión selectiva que han sufrido las comunidades microbianas en los residuos mineros se espera encontrar una baja riqueza específica de microorganismos resistentes a metales pesados.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

4.1. Análisis fisicoquímico de muestras ambientales

4.1.1 Toma de muestra

Se tomaron muestras de jal, sedimento y agua de las zonas de residuos mineros localizadas ente las minas de Valenciana, Cata y Mellado en Guanajuato Capital. Las muestras líquidas se colectaron en frascos de plástico y las muestras sólidas se tomaron en bolsas de plástico Se tomaron aproximadamente 250mL de muestra líquida y 500g de muestra sólida. Los frascos y bolsas se etiquetaron con la clave del punto de muestreo, fecha y nombre del responsable.

4.1.2. Determinación de pH y humedad en los residuos mineros

Se determinaron los principales factores relacionados con la movilidad de metales: pH y conductividad eléctrica medidos en extractos de pastas de saturación con el electrodo HACH 5014 calibrando con estándares comerciales de pH 4, 7 y 10 y con la celda HACH 5070 calibrada con solución estándar comercial de KCl 0.01N con conductividad de 1,413 μ S/cm a 25°C respectivamente, en el equipo HACH sensION MM374; humedad por el método gravimétrico-secado en estufa (Robledo y Maldonado, 1997).

4.1.3 Análisis granulométrico

Se seleccionaron diferentes tamices para conocer la composición de las muestras de suelo en cuanto a contenido de grava, arena y limo. Los tamices se colocaron de menor a mayor tamaño de malla. La selección de tamices se realizó tomando en cuenta la información de la tabla 2 y se consideró un tamiz por cada tipo de material.

Tabla 2. Tamices seleccionados para análisis granulométrico. Modificada de Avilés, 2012. Se muestran el nombre del tamiz seleccionado que hace referencia a la apertura que contiene y por tanto al material que queda almacenado en él.

Tamiz (ASTM)	Abertura real(mm)	Tipo de material
3/8"	10	Grava
N°8	2.38	Gránulos
N°12	1.68	Arena muy gruesa
N°20	0.84	Arena gruesa
N°50	0.30	Arena media
N°70	0.21	Arena fina
N°140	0.105	Arena muy fina
N°325	0.044	Limo grueso

De los tamices seleccionados se consideraron las muestras con una abertura menor a los 2mm para calcular el porcentaje de arenas y limos, y así determinar el tipo de suelo mediante un triángulo textural. Las muestras de grava y gránulos se interpretan como un componente más del tipo de suelo.

4.1.4. Mineralización y cuantificación de metales en las muestras ambientales

Las muestras de agua, sedimento y residuos mineros se procesaron mediante digestión ácida en caliente de acuerdo al método 3050 b de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) que se muestra en el anexo 1 (tabla 3). Se tomaron 1g o 1mL de muestra. Se adicionaron 5mL de HNO₃ concentrado y la solución se mantuvo en condiciones de reflujo durante 1h. Al término de este proceso, la solución se dejó enfriar y se le adicionaron 3mL de H₂O₂, la muestra se sometió nuevamente a condiciones de reflujo durante 1h. El sobrenadante se filtró. La digestión resultante se refrigeró a 4°C hasta su análisis. Para determinar el contenido de arsénico en las muestras ambientales se empleó el método de Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) (Perkin Elmer). Los elementos, arsénico y mercurio, fueron cuantificados haciendo uso del generador de hidruros.

Tabla 3. Rampa de temperatura para la mineralización de las muestras ambientales. Se resume el rango de temperatura tomado en determinado tiempo. Nótese que la temperatura fue aumentando conforme transcurría el tiempo para lograr una mineralización adecuada.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
0 – 60	20
60 – 100	60
100 – 110	30

4.2 Análisis microbiológico de las muestras ambientales

4.2.1. Toma de muestra

Las muestras se colectaron en frasco de vidrio de boca ancha y tapa roscada, previamente esterilizados. Las muestras de agua se tomaron sumergiendo el frasco y una vez dentro del medio se destapó para colectar la muestra, el frasco se cerró dentro del agua hasta que paró el burbujeo. Las muestras de jal y sedimento se colectaron con una espátula esterilizada con fuego, previamente sumergida en alcohol..

4.2.2. Preparación de agar nutritivo y agar nutritivo enriquecido con metales

El agar nutritivo se preparó con 5g de peptona de caseína, 3g de extracto de carne, 15g de agar bacteriológico y 8g de cloruro de sodio, se disolvieron y aforaron a 1L con agua destilada. Para el agar nutritivo enriquecido con metales pesados se empleó la formulación anterior y se emplearon las siguientes sales nitrato de plata (AgNO_3) 0.1, 0.5 y 1.0mM, arsenito de sodio (NaAsO_2) 4.0, 6.0 y 12.0mM y nitrato de mercurio ($\text{HgNO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.1, 0.5 y 1mM.

4.2.3. Dilución decimal seriada de las muestras ambientales

Se tomó 1mL ó 1g de muestra y diluyó en 9ml de solución isotónica de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%. Se generó la primer dilución (1×10^{-1}), de la cual se tomó 1mL y se diluyó nuevamente en 9mL solución para dar lugar a una dilución de 1×10^{-2} , este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de 1×10^{-4} como se muestra en la figura 5.

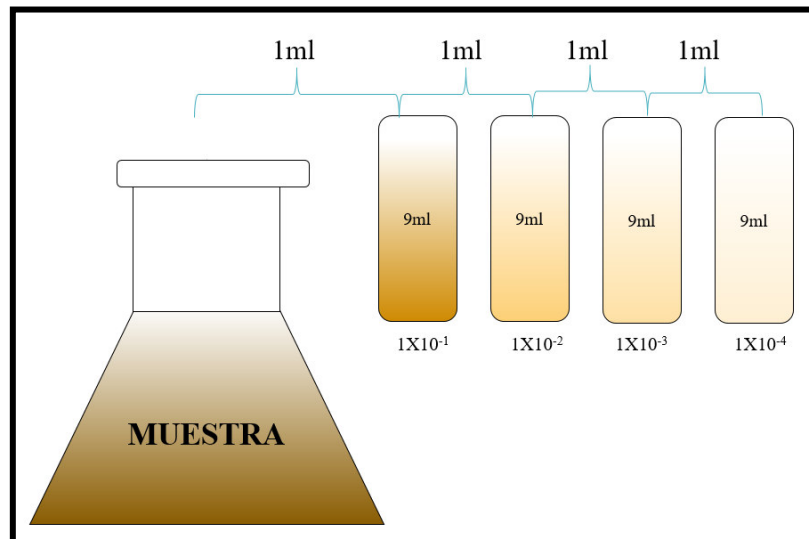


Figura 5. Dilución decimal seriada de las muestras ambientales. Para demostrar que las diluciones se hacen correctamente, la muestra debe hacerse más clara conforme se diluye puesto que el contenido de muestra será menor en cada dilución.

4.2.4. Siembra de muestras

Las muestras se sembraron en agar nutritivo y agar nutritivo enriquecido con metales con la técnica de extensión en placa. Se tomó 1mL de cada dilución y se distribuyó de manera uniforme sobre la caja empleando un espaciador de vidrio estéril. Las cajas se dejaron en incubación a 37°C . Las cajas se monitorearon a las 12, 24, 36 y 48 horas.

4.2.5. Análisis de morfología colonial

Se analizaron los parámetros de tamaño, color, elevación y forma en las colonias bacterianas. Además, se realizó un conteo de colonias. Posteriormente se determinaron las unidades formadoras de colonias por mililitro, el factor de

dilución, la desviación estándar y el error estándar en cada muestra. Finalmente se seleccionaron las colonias para estudio tomando en consideración el número de colonias de acuerdo con la norma NOM-113-SSA1-1994 que se puede observar en el anexo 2.

4.2.6. Aislamiento de colonias con la técnica de estría cruzada

Una vez realizada la selección de colonias se realizó un barrido de cada una en agar nutritivo con la técnica de estría cruzada como se muestra en la figura 6. Las muestras se incubaron a 37 °C y se monitoreo su crecimiento cada 12 horas hasta las 48horas.

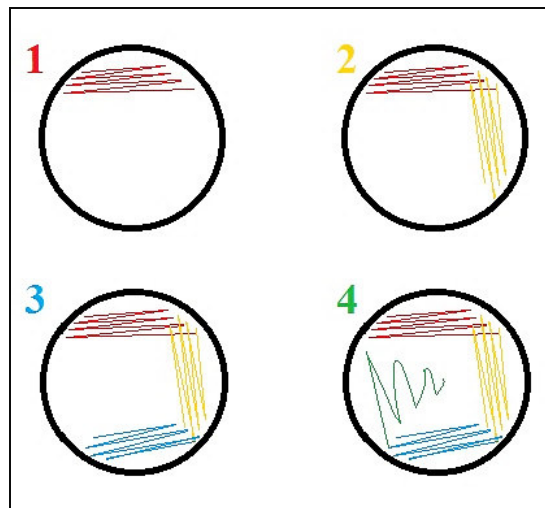


Figura 6. Técnica de estría cruzada. Obsérvese que en cada barrido se trata de tomar una mínima parte del barrido anterior, finalizando el 4to barrido con una “firma” en donde se espera encontrar colonias separadas entre sí.

4.2.7. Tinción Gram

Se tomó muestra de la colonia bacteriana aislada y se extendió sobre un portaobjetos. La muestra se fijó al portaobjetos con calor. Sobre la muestra se adicionó el colorante cristal violeta 0.5%, se dejó actuar durante 1 minuto y posteriormente se enjuago con agua destilada. Enseguida se adicionó la solución de yodo - lugol, se mantuvo en la muestra durante 1 minuto, se enjuago con agua destilada, se enjuago con la solución alcohol-acetona. Finalmente, se usó safranina como medio de contraste y se enjuago con agua destilada. Las muestras se observaron en microscopio electrónico con objetivo 100X. El procedimiento se describe gráficamente en la figura 7.

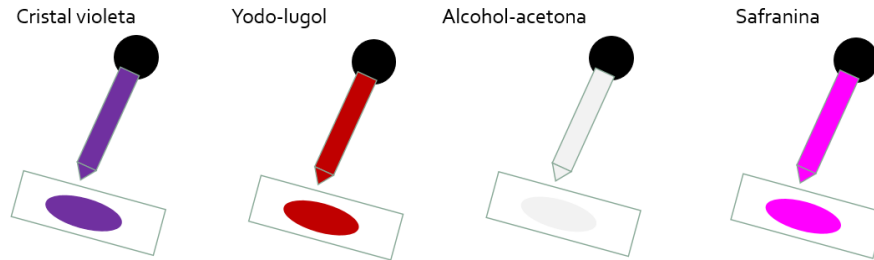


Figura 7. Tinción de Gram. El orden de la tinción, tal y como se muestra en la figura es sumamente importante puesto que el violeta da una primera coloración a las bacterias u hongos, el lugol adhiere, alcohol-acetona elimina el exceso y la safranina definirá los organismos Gram positivos o Gram negativos.

4.3. Cinética de crecimiento de cepas bacterianas expuestas a metales

Se preparó caldo nutritivo enriquecido con las sales de AgNO_3 a la 0.1mM, 0.5mM y 1mM, HgNO_3 a la 0.1mM, 0.5mM y 1mM, NaAsO_2 a la 4mM, 6mM y 12mM (para cada concentración un duplicado) y un control por cada cepa, el control consistió en caldo nutritivo puro. La densidad poblacional de los microorganismos fue estimada en 0h, 24h y 48h en el espectrofotómetro HACH DR 3900 a una longitud de onda de 600nm. Se graficó el comportamiento de la absorbancia respecto al tiempo, los valores de absorbancia de las 24 y 48 horas se ajustaron restando los valores de absorbancia de las cero horas.

4.4. Análisis de varianza (ANOVA)

Una vez ajustados los valores a cero horas, se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA) para todas las cepas en 24h y 48h, por metal y por concentración, es decir, 0.1mM, 0.5mM y 1mM de AgNO_3 , 0.1mM, 0.5mM y 1mM de HgNO_3 y finalmente 4mM, 6mM y 12mM de NaAsO_2 . El análisis tuvo la finalidad de evaluar la capacidad de adaptación de las diferentes cepas bacterias a ambientes extremos con el programa IBM SPSS Statistics 22. El nivel de significancia (P) fue de 0.005, indicando de esta forma que aquellos análisis que arrojan un nivel $P \leq 0.005$ presentan entre sus cepas al menos una con absorbancias que indican tolerancia.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1. Descripción del sitio de estudio

La zona de estudio se ubica entre las minas Valenciana, Mellado y Cata. Este sitio es de interés de estudio por la presencia de pasivos ambientales. Todos los puntos de interés se encuentran cerca de las Minas de Valencia y Cata. El primer punto de muestreo (M1) se ubica dentro de una cueva que corresponde a una bocamina. El segundo punto de muestreo (M2) corresponde a la entrada de una cueva, en donde se observa flujo de agua y filtraciones. El tercer punto de muestreo (M3) es una escorrentía ubicada por encima de la cueva, en donde el agua presenta coloración anaranjada y la formación de un tapete microbiano. El cuarto punto de muestreo corresponde a la zona de pasivos ambientales constituidos por un terrero de baja ley. El quinto punto de muestreo (M5) corresponde a la zona de referencia, donde se observa presencia de vegetación. En la figura 8 se muestra una imagen satelital del sitio de estudio y en la figura 9 se pueden apreciar los sitios de estudio.

Cada uno de los puntos de muestreo presentaba características específicas. Por ejemplo, el punto M1 era la zona más fresca y oscura, con una latitud menor que la de los demás puntos; el punto M2 se encontraba en una zona parcialmente oscura, donde el sol alcanzaba a iluminar a penas una pequeña parte. La temperatura en los puntos M1 y M2 se debió en gran medida a la escasez de luz solar y el alto grado de humedad por encontrarse en una cueva, donde el clima se conserva. El punto M3 se encontraba en una zona en donde la luz solar tampoco hace contacto directo, sin embargo, a diferencia de los puntos M1 y M2 era un lugar abierto, en donde su clima era consecuencia de la variedad de flora que existe alrededor de la escorrentía. Por último, el punto M4 era una zona abierta, en donde el sol hacía contacto directo con los jales mineros, aumentando considerablemente la temperatura. Las características específicas de los puntos de muestreo se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Descripción de los puntos de muestreo. El estudio de la zona es indispensable para futuros estudios que se pudiesen requerir, además de aportar información sobre los microorganismos que se desarrollan.

Zona	Clave	Temperatura (°C)	Iluminación	Coordenadas	
				Norte	Oeste
Cueva adentro	M1	15.5	Oscuro	21° 2'0.92"	101°15'7.14"
Entrada a la cueva	M2	17	Sombreado / oscuro	21° 2'0.87"	101°15'7.19"
Escorrentía	M3	22	Sombreado	21° 2'1.05"	101°15'7.31"
Jales	M4	34	Área abierta, totalmente soleado	21° 2'1.70"	101°15'7.54"



Figura 8. Imágenes satelitales de la zona de estudio. a) Cueva adentro; b) Entrada de la cueva; c) Escorrentía; d) Jales. Nótese que el área evaluada fue amplia y que el punto *d* se encuentra un tanto distante, por lo que puede arrojar resultados que difieran con *a*, *b* y *c*.



Figura 9. Puntos de muestreo. a) Cueva adentro (M1); b) Entrada de la cueva (M2); c) Escorrentía (M3); y d) Zona de jales (M4). Se muestran puntos de muestro con diferentes características dentro de la misma área.

5.2. Caracterización fisicoquímica de los puntos de muestreo

En el análisis de pH se encontraron valores entre 3.5 y 7.0, en donde los valores más ácidos corresponden a los puntos M3 (escorrentía) y M4 (jales). Por otro lado, puntos estudiados en la cueva, M1 y M2, presentan valores de pH cercanos a la neutralidad. Respecto al contenido de humedad los puntos M2 y M3 presentan un alto porcentaje de humedad y por lo tanto una mejor compactación. Los valores de pH, porcentaje de humedad y compactación se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Valores de potencial de hidrógeno, porcentaje de humedad y compactación de las muestras. Se observa que, en efecto, cada una de las zonas seleccionadas cuenta con características singulares para su estudio.

Clave	pH	Porcentaje de humedad	Compactación
M1	6.5	ND	ND
M2	7	28.13%	2mL
M3	4.5	39.38%	10mL
M4	3.5	2.06%	No presenta compactación

ND = No determinado

5.3. Análisis granulométrico

El análisis granulométrico únicamente se realizó en M2 y M4, y después de tamizar y pesar 100gr de M2 y 100gr de M4 se obtuvieron los pesos mostrados en la tabla 6, estos resultados permitieron obtener porcentajes de arenas y limos, ninguna de las muestras contenía arcillas. Al realizar los porcentajes de arenas y limos, se obtuvo que M2 tenía 98.3% de arena y 1.7% de limo, mientras que M4 contenía 66.6% de arcillas y 33.6% de limo. Después de trazar las líneas correspondientes en un triángulo textural se obtuvo que M2 además de contener un alto contenido de granos gruesos (grava y gránulos), también se compone de suelo arenoso y M4 es una muestra compuesta principalmente compuesta de suelo franco arenoso (figura 10).

Tabla 6. Análisis granulométrico básico de muestras con contenido de sedimento. El análisis demuestra los diversos tipos de material contenidos, así como la cantidad de gramos en las muestras M2 y M4.

Tipo de material	Gramos obtenidos por muestra	
	M2	M4
Grava	10.7	2.9
Gránulos	34.1	4.4
Arena muy gruesa	11.2	1
Arena gruesa	22	2.4
Arena media	18.7	12.2
Arena fina	1.6	13.7
Arena muy fina	0.8	32.2
Limo grueso	0.5	22
Limo	0.4	9.2

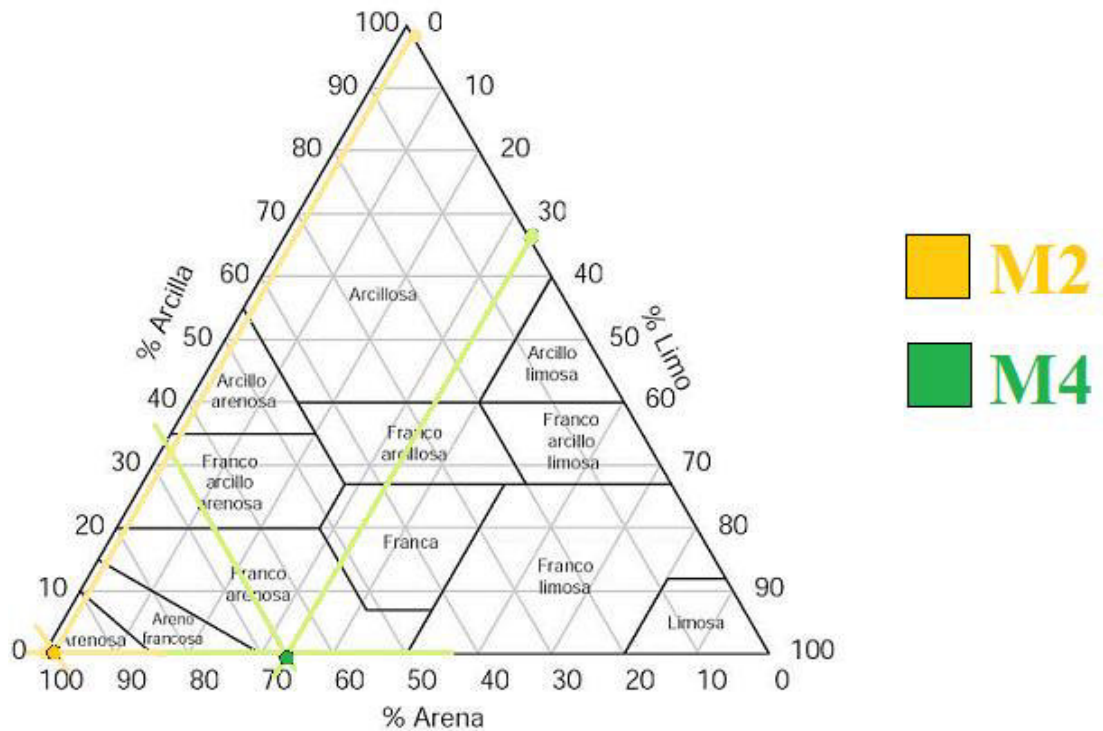


Figura 10. Deducción de suelos en las muestras M2 y M4 a través del triángulo textural. A pesar de que M2 y M4 contienen diferentes tipos de suelo se pueden englobar en uno para hacer más sencilla su interpretación.

5.4. Concentraciones de metales en las muestras ambientales

El análisis de ICP-OES permitió conocer el contenido de metales pesados en las muestras ambientales. Como se puede apreciar en la tabla 7, el contenido de arsénico y mercurio resultan interesantes para proponer la identificación de microorganismos resistentes a estos metales.

Tabla 7. Concentraciones de metales en muestras ambientales. A partir de los datos obtenidos se pudo obtener una referencia para sembrar microorganismos en arsénico y mercurio.

Muestra	As	Hg
	mM	
M1	0.0198	0.0213
M2	0.0188	0.0106
M3	0.1480	0.0139
M4	0.4383	0.0122

5.5. Crecimiento microbiano en agar nutritivo enriquecido

Después de realizar la inoculación de microorganismos en agar enriquecido con sales inorgánicas se apreciaron colonias en M3 y M4 desde las primeras 24h, mientras que en M1 y M2 no se observó crecimiento alguno. En la tabla 8 se puede observar que M3 logró desarrollarse ante HgNO_3 a la $1.3 \times 10^{-5} \text{mM}$ y ante NaAsO_2 a la $2 \times 10^{-4} \text{mM}$. En M4, únicamente se observaron microorganismos en la concentración de HgNO_3 .

Tabla 8. Cepas representativas durante el análisis morfológico colonial en 24h. El crecimiento de UFC/mL era prácticamente nulo en 24h.

Medio de cultivo	Muestra	$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$
AN + NaAsO_2 a la $2 \times 10^{-4} \text{mM}$	M3	7.70
AN + HgNO_3 a la $1.3 \times 10^{-5} \text{mM}$	M3	6.50
	M4	13.50

AN = Agar Nutritivo.

En un lapso de 48h, no se visualizaron microorganismos en M1 y M2. La tabla 9 muestra cómo los microorganismos de M3 y M4 siguieron desarrollándose ante HgNO_3 y NaAsO_2 , y que además se comienza a observar un desarrollo de microorganismos en las concentraciones más bajas de AgNO_3 evaluadas (0.01mM y 0.1mM). La muestra más considerable en 48h fue M3 al someterse a HgNO_3 a la $1.3 \times 10^{-5} \text{mM}$ y posteriormente M4 sometida ante la misma sal.

Tabla 9. Cepas representativas durante el análisis morfológico colonial en 48h. Se aprecia mayor contenido de UFC/mL tanto en las cepas que arrojaron resultados en 24h como en nuevas cepas.

Medio de cultivo	Muestra	$\frac{UFC}{mL}$
AN + NaAsO ₂ a la 2X10 ⁻⁴ mM	M3	10.10
	M4	73.53
AN + HgNO ₃ a la 1.3X10 ⁻⁵ mM	M3	106.95
	M4	91.80
AN + AgNO ₃ a la 0.01mM	M3	11.30
	M4	25.30
AN + AgNO ₃ a la 0.1mM	M3	21.50
	M4	13.50

AN=Agar Nutritivo.

Finalmente, en la tabla 10, muestra que la inoculación en 115h permitió que los microorganismos de M4 se desarrollaran tanto en NaAsO₂ y HgNO₃ como en todas las concentraciones de AgNO₃ (0.01mM, 0.1mM y 1mM). M3 mostró un crecimiento ante todos los metales y concentraciones, a excepción de AgNO₃ al 1mM. Las muestras M1 y M2 continuaron sin mostrar crecimiento alguno.

Tabla 10. Cepas representativas y cepas seleccionadas durante el análisis morfológico colonial en 115h.

Medio de cultivo	Muestra	$\frac{UFC}{mL}$
AN + NaAsO ₂ a la 2X10 ⁻⁴ mM	M3	6.27
	M4	10.07
AN + HgNO ₃ a la 1.3X10 ⁻⁵ mM	M3	3.35
	M4	9.40
AN + AgNO ₃ a la 0.01mM	M3	5.70
	M4	8.10
AN + AgNO ₃ a la 0.1mM	M3	8.70
	M4	3.00
AN + AgNO ₃ a la 1mM	M4	0.20

AN=Agar Nutritivo.

5.6. Análisis morfológico colonial

Se aislaron 14 cepas en total. De M3 se seleccionaron las cepas C1 a C5 y de M4 se seleccionaron las cepas C6 a C14. Se puede observar que C1, C6, C7, C8, C9, C10 y C11 crecieron ante NaAsO_2 , C2, C3, C4, C12 y C14 ante HgNO_3 , y finalmente C5 y C13 ante AgNO_3 (figura 11).

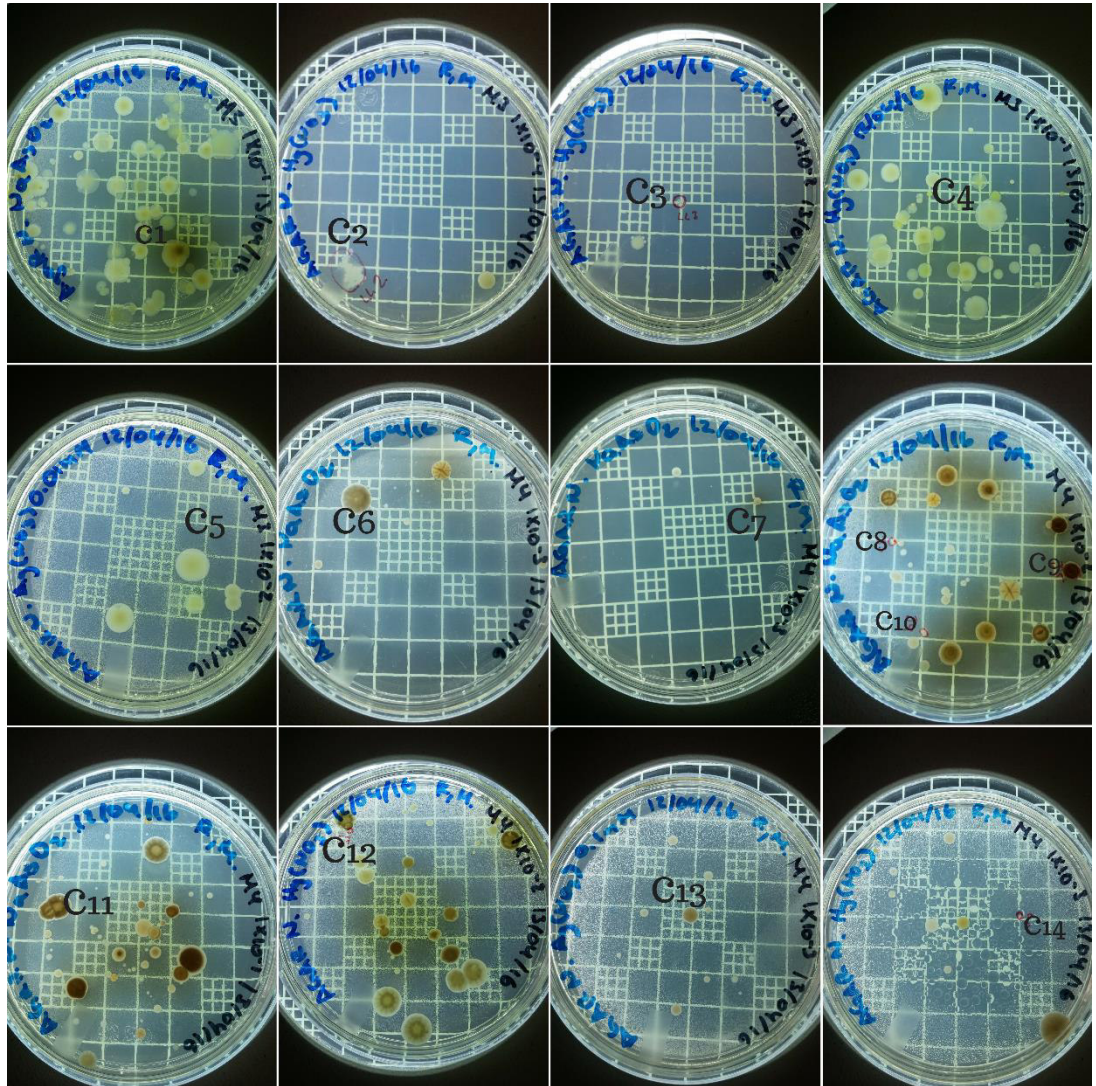


Figura 11. Selección de cepas a aislar. Nótese que la selección de estas cepas fue realizada según singularidades, ya sea por el medio en el que lograron desarrollarse o bien por sus características físicas.

Al aislar las cepas, los resultados indicaron que la mayoría de las cepas crecen en colonias con forma irregular y circular. En cuanto a las características del borde, se observan enteros, ondulados y lobulados. Se registran elevaciones planas y convexas. Respecto a la coloración se observan colonias amarillas, blancas, café, crema, gris e incluso color naranja. Los resultados se resumen en la tabla 11 y se visualizan en las figuras 12.

Tabla 11. Características de las colonias bacterianas. La caracterización física de las colonias es una aportación más para determinar la especie del microorganismo existente.

Clave	Características de las colonias				
	Forma	Borde	Color del margen	Elevación	Color de la colonia
C1	Sin forma	Entero	Amarillo	Plana	Amarillo
C2	Circular	Ondulado	Blanco	Plana	Blanco
C3	Circular	Entero	Blanco	Convexo	Crema
C4	Circular	Entero	Anaranjado	Convexa	Anaranjado
C5	Circular	Entero	Blanco	Cóncava	Café
C6	Circular	Entero	Amarillo	Plana	Amarillo
C7	Circular	Entero	Amarillo	Cóncava	Blanca
C8	Circular	Entero	Amarillo	Plana	Café
C9	Circular	Entero	Blanco	Plana	Amarillo
C10	Circular	Entero	Gris	Cóncava	Café
C11	Circular	Entero	Blanco	Cóncava	Blanco
C12	Puntiforme	Lobulado	Amarillo	Plana	Amarillo
C13	Circular	Entero	Amarillo	Convexo	Amarillo
C14	Circular	Entero	Transparente	Cóncava	Café

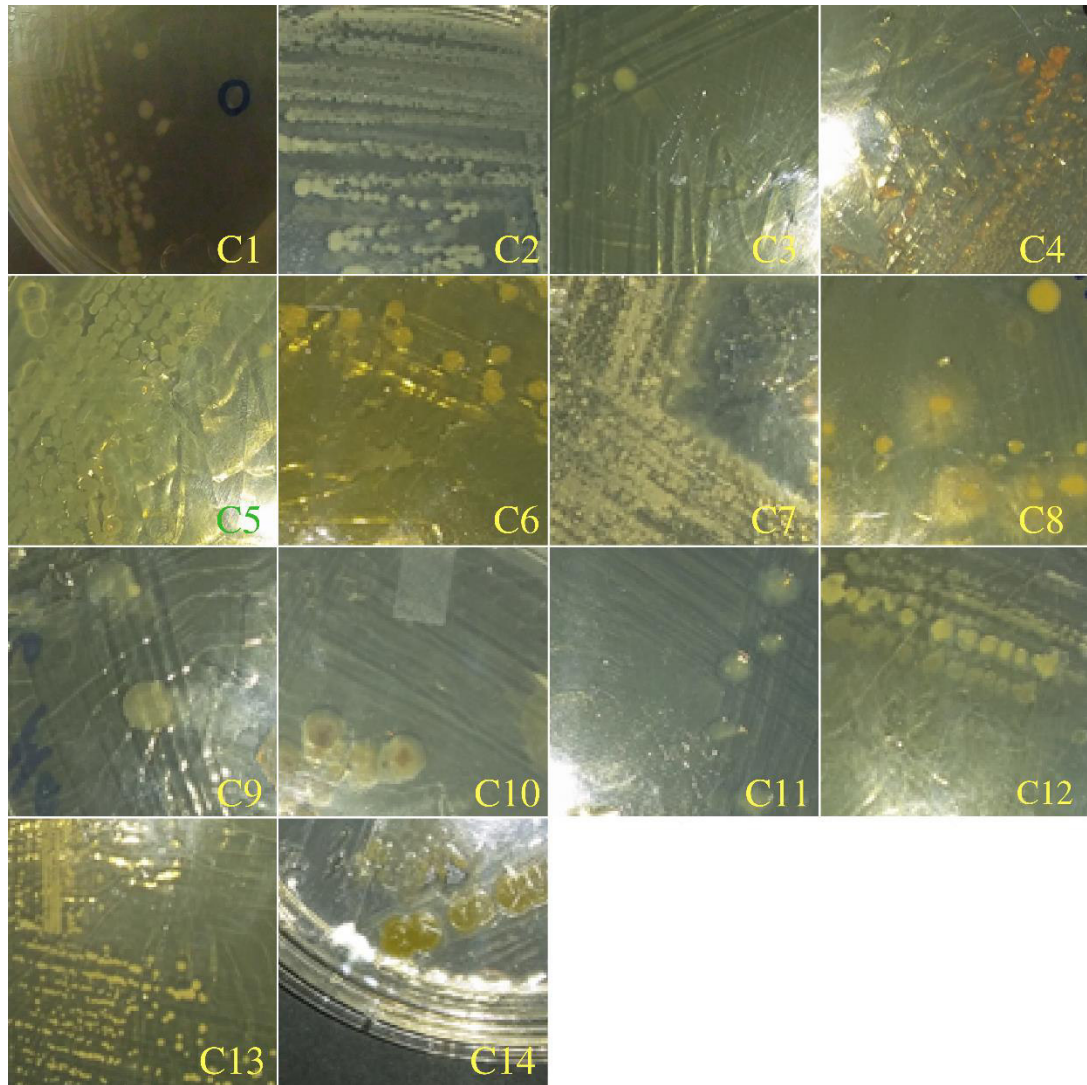


Figura 12. Cepas aisladas. Aun cuando las cepas son aisladas se encuentran características físicas muy similares entre algunas cepas, por lo que se requiere continuar con la experimentación.

5.7. Análisis morfológico celular

En cuanto al análisis de morfología celular bacteriana, las micrografías obtenidas muestran diversas formas microscópicas, tales como cocos, bacilos y filamentos; además de un caso particular en C3, en la cual se encontraron tanto filamentos como bacilos (figuras 13, 14 y 15). Lo anterior hace evidente la presencia de bacterias en el sitio de estudio, previamente caracterizado con presencia elementos potencialmente tóxicos como arsénico, mercurio y plata. Los resultados se resumen en la tabla 12.

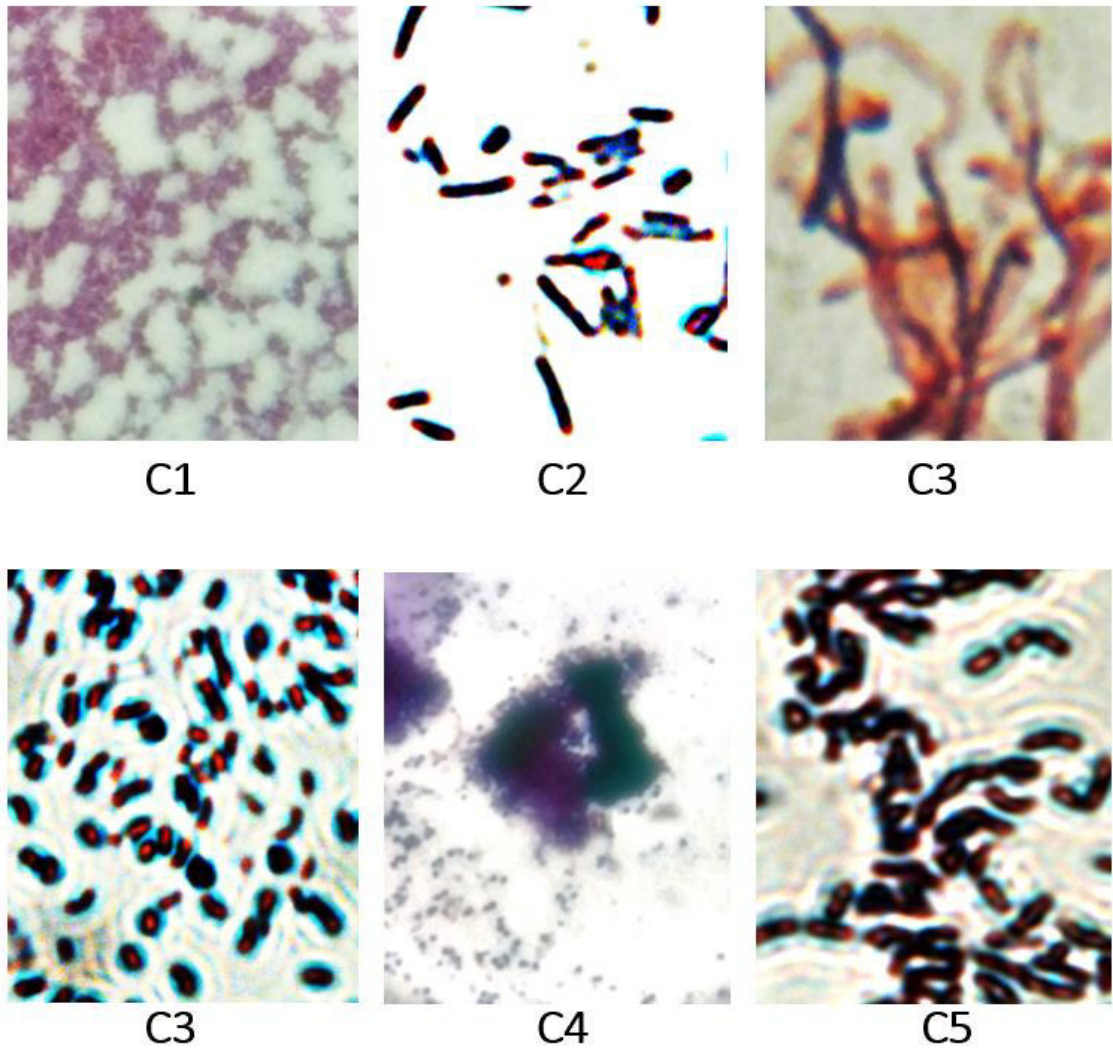


Figura 13. Morfología celular de las cepas C1, C2, C3, C4 y C5. Se observan bacterias Gram positivas y Gram negativas en las cepas C1 a la C5, sin embargo, claramente se nota el caso particular de C3 con filamentos y bacilos.



C6



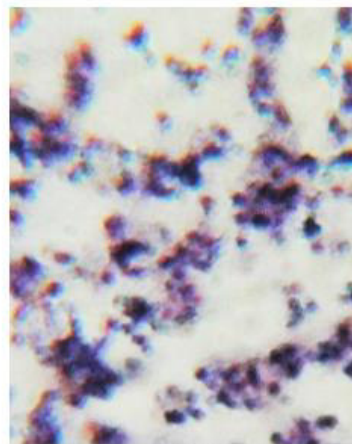
C7



C8



C9



C10



C11

Figura 14. Morfología celular de las cepas C6, C7, C8, C9, C10 y C11. Nuevamente se observa variedad de G+ y G-, más las cepas C6 a la C11 permiten observar el crecimiento de organismos filamentosos.

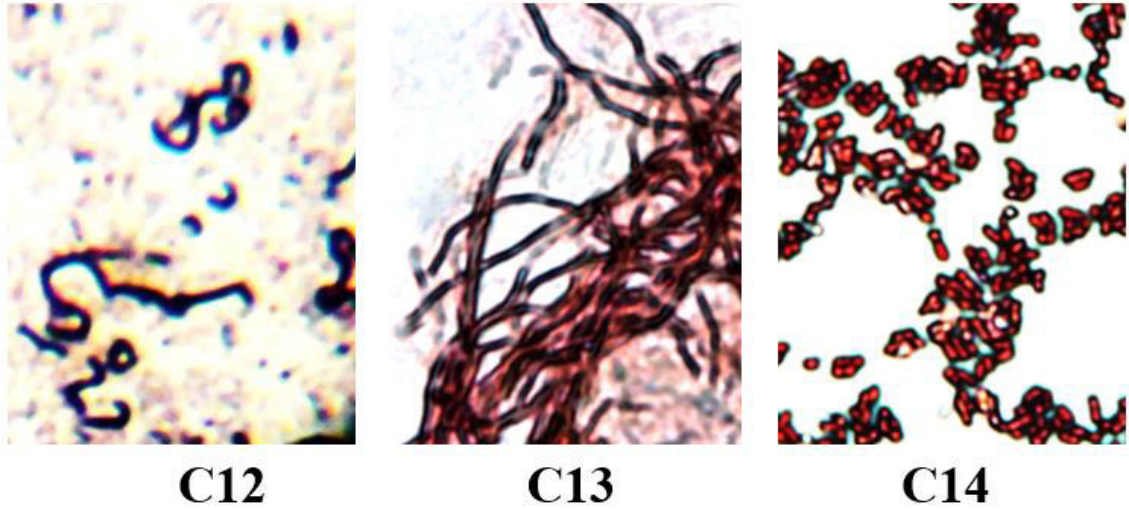


Figura 15. Morfología celular de C12, C13 y C14. Al mirar en conjunto todas las cepas, es clara la diversidad de microorganismos que se desarrollan en la zona de estudio contaminada con metales pesados.

Tabla 12. Morfología bacteriana de las cepas aisladas. La contextualización de las morfologías detectadas en las cepas aisladas permite al lector una deducción de las imágenes más precisa, ya que en consecuencia a la resolución éstas, algunas morfologías son complicadas de interpretar.

Clave	Morfología bacteriana	
	Tinción Gram	Descripción
C1	Positiva	Filamento
C2	Negativa	Filamento
C3	Negativa	Bacilos y filamentos
C4	Positiva	Filamento
C5	Negativa	Filamento
C6	Negativa	Filamento
C7	Positiva	Bacilos
C8	Negativa	Estreptobacilo
C9	Negativa	Filamento
C10	Positiva	Coco
C11	Negativa	Coco
C12	Negativa	Bacilo
C13	Negativa	Bacilo
C14	Negativa	Bacilo

5.8. Análisis del crecimiento bacteriano

5.8.1. Crecimiento en cepas bacterianas expuestas a AgNO_3

Se muestra el crecimiento de las cepas después de 24 horas de cultivo en medio enriquecido con AgNO_3 0.1, 0.5 y 1.0mM en la figura 16. La cepa C1 no presenta crecimiento en ninguna concentración. C2 presenta bajo crecimiento en las primeras dos concentraciones, reflejado valores de absorbancias cercanas a cero, no obstante, para la concentración más alta la absorbancia es mayor 0.5. Para la cepa C3 se registra un valor de absorbancia cercano a cero lo que indica poco crecimiento de microorganismos. En el caso de la cepa C4 únicamente se registra crecimiento para la concentración de 0.5mM. La cepa C5 presenta valores de absorbancia mayores a 0.5 para las concentraciones de 0.5 y 1.0mM, lo que indica crecimiento de microorganismos; esta además destaca de entre el resto de las cepas al tener valores sumamente altos en 0.5mM y tener la mayor absorbancia ante 1.0mM. En C6 sólo se registra crecimiento para la concentración de 0.5mM con una absorbancia menor 0.5. Al observar C7, es evidente el crecimiento en las concentraciones de 0.1 y 0.5mM, sin embargo, no se registra crecimiento para la concentración de 1mM. La cepa C8 únicamente muestra crecimiento en la concentración de 1mM. En el caso de la cepa C9 el crecimiento es evidente en las concentraciones de 0.5 y 1.0mM puesto que las absorbancias obtenidas son mayores a cero, sin embargo, en la concentración de 0.1mM el crecimiento es nulo. Las cepas C10 y C11 tienen un comportamiento similar, se observa crecimiento en las concentraciones de 0.1 y 1.0mM, pero no se registra crecimiento en la concentración de 0.5mM. El crecimiento de la cepa C12 incrementa conforme incrementa la concentración de plata en el medio. En el caso de la cepa C13 sólo se registra crecimiento en la concentración de 0.5mM. Finalmente, en la cepa C14 se registra crecimiento con absorbancia mayor a 0.5 en la concentración de 0.5mM y crecimiento con absorbancia menor a 0.5 en la concentración de 1.0mM.

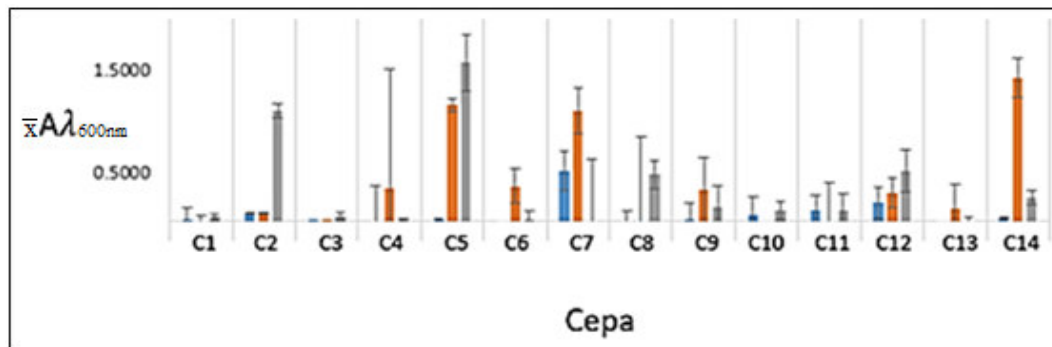


Figura 16. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a AgNO_3 durante 24h. Color azul: AgNO_3 0.1mM; color naranja: AgNO_3 0.5mM; color gris: AgNO_3 1mM. Longitud de onda: 600nm. Nótese las altas absorbancias de las cepas hacia la plata tan sólo en las primeras horas.

La figura 17 permite visualizar el crecimiento de las cepas después de 48 horas de cultivo en medio enriquecido con AgNO_3 0.1, 0.5 y 1.0mM. Se observa que la cepa C1 no presenta crecimiento aparente en ninguna concentración. La cepa C2 presenta una absorbancia mayor a cero en las primeras dos concentraciones, no obstante, para la concentración más alta la absorbancia continúa siendo mayor 0.5. Para la cepa C3 se registra un valor de absorbancia mayor a cero lo que indica bajo crecimiento de microorganismos. En el caso de la cepa C4 se continúa registrando crecimiento únicamente para la concentración de 0.5mM. La cepa C5 presenta valores de absorbancia mayores a 0.5 para las concentraciones de 0.5 y 1.0mM, lo que indica crecimiento de microorganismos, sin embargo, para la concentración de 0.1mM el crecimiento es mínimo. En el caso de la cepa C6 no se registra crecimiento para ninguna concentración. En la cepa C7 es evidente el crecimiento en las concentraciones de 0.1 y 0.5mM, sin embargo, no se registra crecimiento para la concentración de 1mM. La cepa C8 solamente muestra crecimiento en la concentración de 1mM. En el caso de la cepa C9 el crecimiento se registra en la concentración de 0.5mM. En las cepas C10 y C11 el crecimiento resulta nulo a las 48 horas en todas las concentraciones. El crecimiento de la cepa C12 es mayor en las concentraciones de 0.1 y 1.0mM y es menor en la concentración de 0.5mM. En el caso de la cepa C13 sólo se registra crecimiento en la concentración de 0.1mM. Finalmente, en la cepa C14 se registra crecimiento con absorbancia mayor a 0.5 únicamente en la concentración de 0.5mM.

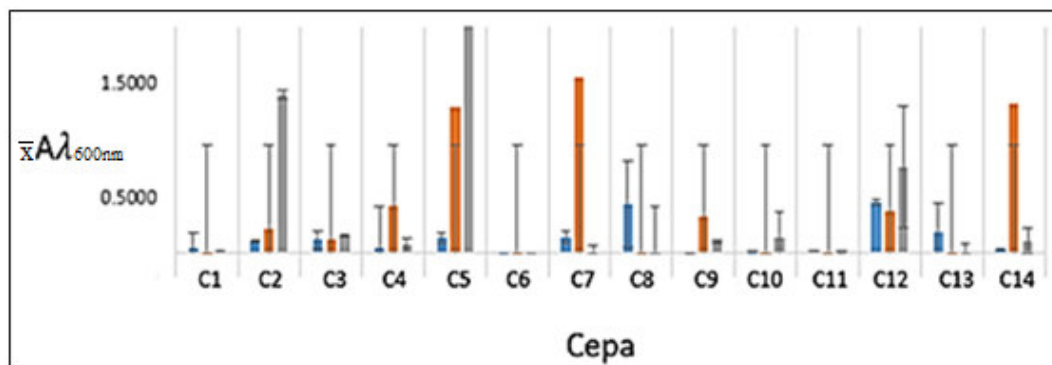


Figura 17. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a AgNO_3 durante 48h. Color azul: AgNO_3 0.1mM; color naranja: AgNO_3 0.5mM; color gris: AgNO_3 1mM. Longitud de onda: 600nm. En general las absorbancias se mantienen y/o aumentan.

5.8.2. Crecimiento en cepas bacterianas expuestas a $\text{HgNO}_3\text{H}_2\text{O}$

En la figura 18 se muestra el crecimiento de las cepas después de 24 horas de cultivo en medio enriquecido con $\text{HgNO}_3\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 0.5 y 1.0mM. Se observa que la cepa C1 presenta crecimiento significativo en la concentración de 0.1mM con una absorbancia mayor a 0.6. La cepa C2 presenta crecimiento evidente en las

concentraciones de 0.5 y 1.0mM con absorbancias menores a 0.2. Para la cepa C3 se registra un valor de absorbancia cercano a cero en las tres concentraciones lo que indica escaso crecimiento de microorganismos. En el caso de la cepa C4 se registra crecimiento en las concentraciones de 0.1 y 1.0mM con absorbancias menores a 0.1. La cepa C5 presenta valores de absorbancia menores a 0.1 para las tres concentraciones, lo cual indica bajo crecimiento de microorganismos. En el caso de la cepa C6 sólo se registra crecimiento para la concentración de 0.1mM con una absorbancia mayor a 0.2. En la cepa C7 sólo se registra crecimiento en la concentración de 0.1mM con un valor de absorbancia menor a 0.1. La cepa C8 solamente muestra crecimiento en la concentración de 0.5mM con un valor de absorbancia mayor a 0.2 y poco crecimiento de microorganismos en la concentración 1.0mM con una absorbancia mayor a cero. En el caso de la cepa C9 el crecimiento es evidente sólo en la concentración de 0.5mM con una absorbancia mayor a cero. Las cepas C10 y C11 tienen un comportamiento similar, no se observa crecimiento en las tres concentraciones. El crecimiento de la cepa C12 se registra en las concentraciones de 0.1 y 0.5mM con absorbancias mayores a 0.2. En el caso de la cepa C13 no se registra crecimiento para ninguna concentración. Finalmente, en la cepa C14 se registra crecimiento con absorbancia menor a 0.2 en las tres concentraciones.

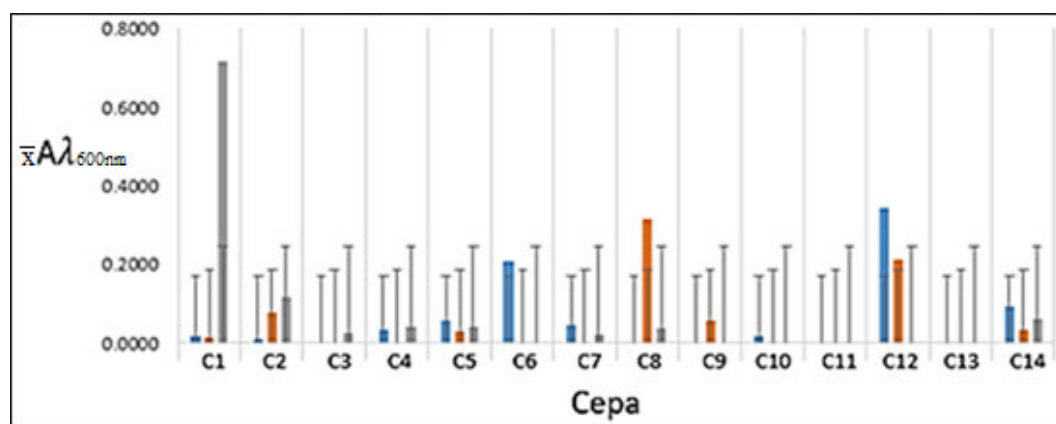


Figura 18. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a $HgNO_3H_2O$ durante 24h. Color azul: $HgNO_3H_2O$ 0.1mM; color naranja: $HgNO_3H_2O$ 0.5mM; color gris: $HgNO_3H_2O$ 1mM. Longitud de onda: 600nm. Las absorbancias para este metal, en general, fueron bajas.

Al observar el crecimiento de las cepas después de 48 horas de cultivo en medio enriquecido con $HgNO_3H_2O$ 0.1, 0.5 y 1.0mM en la figura 19, es notable que C1 presenta bajo crecimiento en las tres concentraciones, registrándose absorbancias menores a 0.1. La cepa C2 presenta crecimiento en las tres concentraciones con absorbancias menores a 0.2. Para la cepa C3 se registran valores de absorbancia inferiores a 0.1 lo que indica bajo crecimiento de microorganismos. En el caso de

la cepa C4 se registra crecimiento en las concentraciones de 0.1 y 1.0mM con absorbancias menores a 0.1mM. La cepa C5 presenta valores de absorbancia menores a 0.1 en las tres concentraciones, lo que indica bajo crecimiento de microorganismos. En el caso de la cepa C6 sólo se registra crecimiento para la concentración de 1.0mM con una absorbancia mayor a 0.3. En la cepa C7 sólo se registra crecimiento en la concentración de 0.1mM con un valor de absorbancia de 0.3. La cepa C8 solamente muestra crecimiento en la concentración de 1.0mM con un valor de absorbancia de 0.1. En el caso de la cepa C9 el crecimiento es evidente en las tres concentraciones con absorbancias mayores a 0.3 para las concentraciones de 0.1 y 0.5 y absorbancia de 0.2 para la concentración de 1.0mM. Las cepas C10 y C11 tienen un comportamiento similar, no se observa crecimiento en las tres concentraciones. El crecimiento de la cepa C12 se registra en la concentración de 1.0mM con absorbancia de 0.2. En el caso de la cepa C13 no se registra crecimiento para ninguna concentración. Finalmente, en la cepa C14 se registra crecimiento con absorbancia de 0.2 para la concentración de 0.1mM y con absorbancias menores a 0.1 para las concentraciones de 0.5 y 1.0mM.

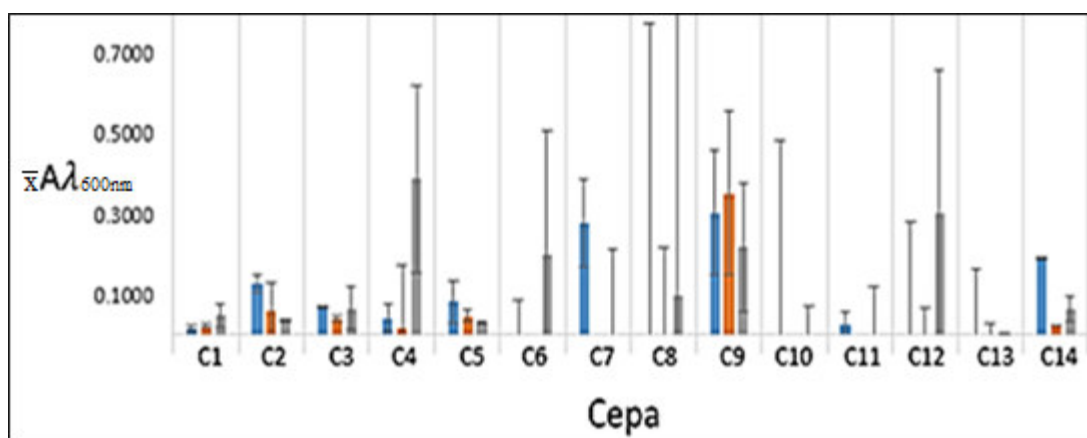


Figura 19. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a $HgNO_3H_2O$ durante 48h. Color azul: $HgNO_3H_2O$ 0.1mM; color naranja: $HgNO_3H_2O$ 0.5mM; color gris: $HgNO_3H_2O$ 1mM. Longitud de onda: 600nm. Las absorbancias hacia el mercurio se disparan en tiempos prolongados.

5.8.3. Crecimiento en cepas bacterianas expuestas a $NaAsO_2$

La figura 20 muestra el crecimiento de las cepas después de 24 horas de cultivo en medio enriquecido con $NaAsO_3$ 4.0, 6.0 y 12mM. C1 presenta crecimiento en las tres concentraciones, sin embargo, el valor de la absorbancia es mayor en la concentración de 6mM. Para las cepas C2 y C3 se registra bajo crecimiento de microorganismos en la concentración de 4mM con una absorbancia mayor a 0.05. En el caso de la cepa C4 únicamente se registra crecimiento para la concentración de 12mM con una absorbancia mayor a 0.25. La cepa C5 no presenta crecimiento de microorganismos en ninguna concentración. En el caso de la cepa C6 se registra

crecimiento en las tres concentraciones con absorbancias de 0.25 para las concentraciones de 6 y 12mM y absorbancia mayor a 0.05 para la concentración de 4mM. En la cepa C7 es evidente el crecimiento en las concentraciones de 6 y 12mM, sin embargo, no se registra crecimiento para la concentración de 4mM. La cepa C8 solamente muestra crecimiento en las concentraciones de 6 y 12mM con absorbancias de 0.15 y 0.05 respectivamente. En el caso de la cepa C9 el crecimiento es evidente en las concentraciones de 6 y 12mM con absorbancias de 0.25 y 0,05 respectivamente. La cepa C10 presenta crecimiento en las tres concentraciones, el mayor crecimiento se registra en la concentración de 4mM con una absorbancia de 0.25. En la cepa C11 el crecimiento se presenta para las tres concentraciones con valores de absorbancia aproximado de 0.35. El crecimiento de la cepa C12 se presenta para las concentraciones de 6 y 12mM con valores de absorbancia de 0.3 y 0.15 respectivamente. En el caso de la cepa C13 se registra crecimiento en las concentraciones de 6 y 12mM con absorbancias de 0.5 y 0.3 respectivamente. Finalmente, en la cepa C14 no se registra crecimiento en ninguna concentración.

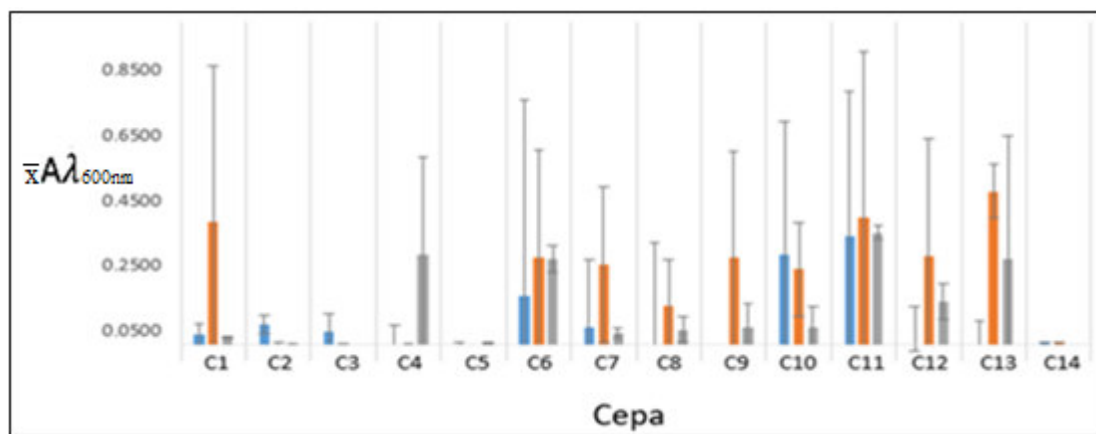


Figura 20. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a NaAsO₂ durante 24h. Color azul: NaAsO₂ 4mM; color naranja: NaAsO₂ 6mM; color gris: NaAsO₂ 12mM. Longitud de onda: 600nm. A pesar de que se obtuvieron absorbancias bajas, prácticamente todas las cepas absorben arsénico.

Al someter a los microorganismos a NaAsO₃ a la 4.0, 6.0 y 12mM se observa que la cepa C1 presenta crecimiento en las tres concentraciones, sin embargo, el valor de la absorbancia es mayor en la concentración de 6mM. Para las cepas C2 y C3 se registra bajo crecimiento de microorganismos en la concentración de 4mM con una absorbancia mayor a 0.05. En el caso de la cepa C4 únicamente se registra crecimiento para la concentración de 12mM con una absorbancia mayor a 0.2. La cepa C5 no presenta crecimiento de microorganismos en ninguna concentración. En el caso de la cepa C6 se registra crecimiento en las tres concentraciones con absorbancias mayores a 0.2 para las concentraciones de 6 y 12mM y absorbancia

mayor a 0.1 para la concentración de 4mM. En la cepa C7 es evidente el crecimiento en las concentraciones de 4 y 6mM, sin embargo, se registra bajo crecimiento para la concentración de 12mM. La cepa C8 solamente muestra crecimiento en las concentraciones de 6 y 12mM con absorbancias de 0.15 y 0.05 respectivamente. En el caso de la cepa C9 el crecimiento es evidente en las concentraciones de 6 y 12mM, que las absorbancias obtenidas son de 0.2 y 0,05 respectivamente. La cepa C10 tienen presente crecimiento en las tres concentraciones, el mayor crecimiento se registra en la concentración de 4mM con una absorbancia de 0.25. En la cepa C11 el crecimiento se presenta en las tres concentraciones con valores de absorbancia aproximado de 0.35. El crecimiento de la cepa C12 se presenta crecimiento en las concentraciones de 6 y 12mM con valores de absorbancia de 0.2 y 0.1 respectivamente. En el caso de la cepa C13 se registra crecimiento en las concentraciones de 6 y 12mM con absorbancias de 0.5 y 0.3 respectivamente. Finalmente, en la cepa C14 no se registra crecimiento en ninguna concentración (figura 21).

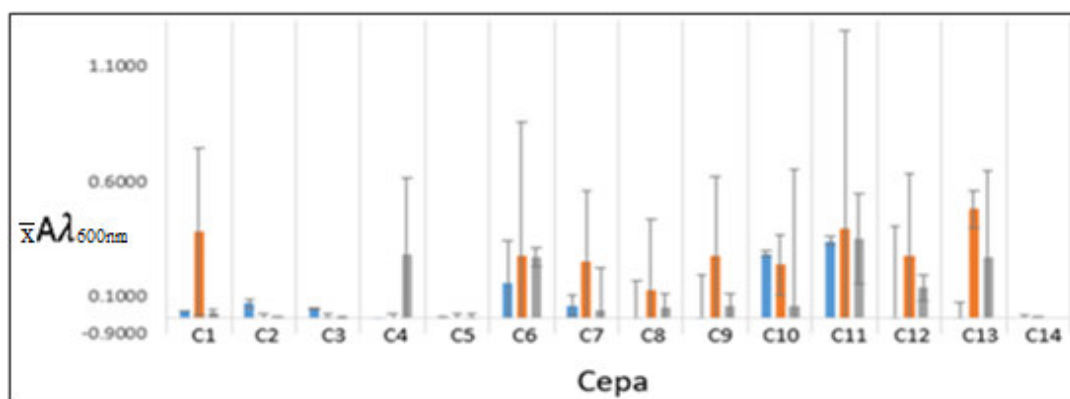


Figura 21. Crecimiento de las cepas C1 a C14, expuestas a NaAsO₂ durante 48h. Color azul: NaAsO₂ 4mM; color naranja: NaAsO₂ 6mM; color gris: NaAsO₂ 12mM. Longitud de onda: 600nm. No se observan altas absorbancias de arsénico por parte de las cepas.

5.9. Análisis de resistencia a metales pesados a las cepas bacterianas.

La tabla 13 muestra que en un transcurso de 0h a 48h se observaron concentraciones que resultan significativas para todas las cepas de AgNO₃ a la 0.5mM (P = 0.003), HgNO₃ al 0.5mM (P = 0.001) y HgNO₃ al 1mM (P = 0.001). No se ha encontrado significancia en un lapso de 0h a 24h, ni para el resto de las cepas evaluadas en 0 a 48h, puesto que sus valores de P resultan mayores a 0.005.

Tabla 13. Valor P de concentraciones significativas según ANOVA. Notar que de 9 ANOVA's realizados, únicamente 3 resultan significativos, las cuales se señalan en amarillo.

Tiempo evaluado (h)	Metal	Concentración (mM)	Valor P de la prueba
24	AgNO ₃	0.1	0.098
		0.5	0.070
		1	0.030
	HgNO ₃	0.1	0.254
		0.5	0.086
		1	0.277
	NaAsO ₂	4	0.814
		6	0.160
		12	0.638
48	AgNO ₃	0.1	0.013
		0.5	0.003
		1	0.619
	HgNO ₃	0.1	0.956
		0.5	0.001
		1	0.001
	NaAsO ₂	4	0.343
		6	0.699
		12	0.400

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

6.1. Zona de estudio

Gracias a las observaciones realizadas en campo y al estudio de Ramos-Arroyo *et al.* (2004) se han podido seleccionar zonas contaminadas con mercurio, arsénico y plata, puesto que es sabido que los procesos de extracción de plata conllevan al uso de Hg y As; y tanto la Mina de Cata, como la Mina de La Valenciana trabajan en la extracción de Ag, por lo que desde un inicio se suponía una zona probable para la detección de microorganismos tolerantes a esos metales. A pesar de que la contaminación por plata no ha podido evaluarse debido a que no se contaba con el equipo necesario para realizar una lectura por espectrofotometría, se sabe que gracias a la facilidad que tiene Ag para desplazarse, la biota se ve afectada (Odermatt *et al.*, 1994) y al comparar con la vegetación, sobre todo en M4, lugar en donde se depositaron jales mineros sobrepasando niveles de As y Hg (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004); la falta de vegetación es muestra de la afección que ha sufrido el suelo (figura 9).

Para el caso del mercurio y el arsénico, de las cuatro zonas evaluadas (M1, M2, M3 y M4), M1 y M2 no contenían concentraciones fuera de los límites de la NOM-047-SSA1-2011 y la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 que se visualizan en el anexo 3 y 4, sin embargo, el resultado ha sido completamente diferente en M3 y M4. Mientras que M1 y M2 contenían principalmente gránulos grandes que no son capaces de retener grandes cantidades metal pesado, se cree que el porcentaje de humedad en M3 y el alto contenido de arena muy fina en M4 hacen que estos sitios retengan con facilidad metales pesados (Kotaš y Stasicka, 2000; Dube *et al.*, 2001; Banks *et al.*, 2006; Bosecker K., 2002; Verstraete, 2002 y Mulligan *et al.*, 2001).

6.2. Siembra de muestras

En la zona de estudio se han desarrollado microorganismos aún en ambientes contaminados con metales pesados, estos metales afectan tanto al desarrollo y comportamiento de los microorganismos como a diferentes especies de flora y fauna (Gadd, 2000; Silver y Misra, 1988; Bundschuh *et al.*, 2008; García, 2002; Vullo, 2003).

Para el arsénico, Rokbani *et al.*, (2006) han encontrado microorganismos que resisten concentraciones de hasta 20mM, y Campos (2007) encontró *Pseudomonas alcaligenes*, *Burkordelia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, y *Wautersia solanacearum* que se reproducen en concentraciones de 8mM o incluso mayores. Al evaluar las muestras M3 y M4 a una concentración de 2×10^{-4} mM de NaAsO₂ se obtuvieron diversas colonias, de las cuales, según los dos autores, hasta este punto se esperaba encontrar en M3 y M4 alguna de las bacterias ya antes

mencionadas y de ser así deberían resistir concentraciones de por lo menos 8mM de arsénico.

Se encontraron cepas creciendo en mercurio a una concentración de 1.3×10^{-5} mM de las cuales, antes de ser aisladas se podría esperar se reprodujeran de manera muy sencilla en ambientes contaminados con HgNO_3 , puesto que tan sólo Hassen *et al.*, (1998) fueron capaces de detectar microorganismos como *Streptococcus*, *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas paucimobilis* que resisten concentraciones de 10mM hasta 100mM.

Finalmente, para plata, a pesar de que no se realizó ninguna lectura en las muestras, se sabe gracias a Piimpel y Schinner (1986) que existen microorganismos en suelo que sobreviven a ambientes contaminados con el metal, aunque no resisten altas cantidades. Sin embargo, autores como Hendry y Stewart (1979), Deshpande y Chopade (1994), McHugh *et al.*, (1975) y Haefeli *et al.*, (1984) observaron en pacientes hospitalizados que consumieron este metal, el desarrollo de bacterias como la *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas stutzeri*, por lo que, se optó por evaluar la siembra de bacterias en concentraciones de 0.01mM, 0.1mM y 1mM, esperando tener un crecimiento mayor en 0.01mM que en 1mM.

6.3. Selección de concentraciones para el estudio morfológico

La detección de microorganismos posterior a la siembra de muestras mostró que los microorganismos podrían crecer más fácil en zonas contaminadas con arsénico y mercurio, y no en plata, ya que desde las primeras 24h fue evidente su crecimiento (Tabla 8). No obstante, a pesar de que no se encontraron colonias en las primeras 24h y 48h en ambientes contaminados con plata, para las 115h se encontraron microorganismos en cada una de las concentraciones evaluadas del metal, y es que en ocasiones los microorganismos requieren de un tiempo mayor para poder crecer (Coelho *et al.*, 2014). Es decir, el hecho de que la mayoría de los microorganismos fuesen aislados desde ambientes contaminados con NaAsO_2 y HgNO_3 no quiso decir que los microorganismos resistiesen únicamente estos metales.

6.4. Aislamiento bacteriano

Obtener en 115h hasta $10.07 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$ en arsenito de sodio, $9.40 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$ en nitrato de mercurio y $8.70 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$ en nitrato de plata, así como el hecho de que varias colonias tuviesen características muy similares (figura 11), hacen pensar en una baja diversidad microbiana. Lo anterior, tampoco resulta perjudicial, ya que encontrar pocas especies, indica que estas en particular pueden desarrollarse en ambientes contaminados con distintos metales. Lo cual, se ha visto en *Pseudomonas* sp. que

se desarrolla en ambientes contaminados con plata, arsénico y mercurio (Haefeli *et al.*, 1984; Campos, 2007; Hassen *et al.*, 1998).

Se aislaron 14 cepas bacterianas, las cuales en su mayoría fueron extraídas de agar nutritivo enriquecido con NaAs₂ (C1, C6, C7, C8, C9, C10, C11). Además, se aislaron 5 cepas de medio enriquecido con HgNO₃ (C2, C3, C4, C12 y C14) y 2 cepas (C5 y C13) de AgNO₃. Basándose en los resultados obtenidos tanto en el muestreo como en la siembra y comparando las morfologías con las reportadas en estudios de microbiología de zonas contaminadas por estos metales, los resultados apuntaban hasta este momento que entre las cepas se encuentre alguno de los siguientes microorganismos: para arsénico podrían ser *Pseudomonas alcaligenes*, *Burkordelia cepacia*, *Enterobacter cloacae* o *Wautersia solanacearum*; ambientes contaminados con mercurio podrían contener *Citrobacter freundii* o *Pseudomonas paucimobilisresisten*; y *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas stutzeri* para ambientes en los que haya plata (Rokbani *et al.*, 2006; Campos, 2007; Hassen *et al.*, 1998; Hendry y Stewart, 1979, Deshpande y Chopade, 1994; McHugh *et al.*, 1975; Haefeli *et al.*, 1984).

6.5. Descripción de la comunidad microbiana

Basándose únicamente en la tabla 12, se observan bacilos G- en C3, C8, C12, C13, bacilos G+ en C7, cocos G+ en C10, cocos G- en C11; además de microorganismos filamentosos G+ (C1 y C4), y filamentos G- en C2, C3, C5, C6 y C9. Según estos datos, los bacilos G- pudiesen ser *Pseudomonas* o *Enterobacterias* (Piotrowska-Seget *et al.*, 2005; Malik, 2004; Puerta y Mateos, 2010). Rokbani *et al.* (2006) reporta que los bacilos G+ de suelo pertenecían al género *Bacillus*, y la morfología coincidente con los aislados en este proyecto, además el autor plantea la existencia cocos G+ como C10, lo que indica la probabilidad de tener *Micrococcus*. Mientras que C11, al ser coco G- se estima sea algún microorganismo como la *Enterobacteria* (Puerta y Mateos, 2010). Para las muestras filamentosas G+, Marrufo *et al.*, 2015 menciona a *Actinobacteria* como un ejemplo sumamente resaltante entre las bacterias que se desarrollan en suelo, este proyecto también detecta microorganismos filamentosos G+ (C1 y C4). Finalmente, los filamentos G- encontrados en C3, según los estudios de Roque (2016) pudiesen ser *Actinomyces*.

Es interesante observar que en la cepa C3 (proveniente de M3 y extraída de agar enriquecido con HgNO₃) se detectan 2 morfologías distintas que hacen pensar en la existencia de *Pseudomonas*, *Enterobacterias* y *Actinomyces*. Sin embargo, únicamente se han encontrado bacilos Gram negativos como *Pseudomonas* y *Enterobacterias* en ambientes contaminados con mercurio, no se han encontrado casos de estudio en los que un filamento gram negativo como *Actinomyces* crezca al exponerse a Hg. (Roque, 2016; Piotrowska-Seget *et al.*, 2005; Malik, 2004;

Puerta y Mateos, 2010), por lo que hasta este punto, no se puede saber si tanto los bacilos detectados como los filamentos resultan de una misma especie o si bien son clases de bacterias diferentes, esta cepa es un buen prospecto para una identificación más profunda.

Otra muestra que coincide al compararse con los resultados obtenidos en la siembra y el aislamiento es C8, la cual fue extraída de M4 y expuesta a NaAsO₂. Al igual que C3, pudiese tratarse de *Pseudomonas* y/o una Enterobacteria, pues se han encontrado especies de estas órdenes microbianas que generan resistencia ante el arsénico (Piotrowska-Seget *et al.*, 2005; Malik, 2004; Puerta y Mateos, 2010; Rokbani *et al.*, 2006; Campos, 2007).

La cepa C12 extraída de M4 y aislada de un ambiente contaminado con HgNO₃ también coincide con lo planteado por Hassen *et al.*, (1998), Piotrowska-Seget *et al.*, (2005) y Malik, (2004) han detectado *Pseudomonas* en sus estudios, siendo este microorganismo reportado como resiste ante el mercurio.

C13, también coincide según datos bibliográficos tanto en siembra como en aislamiento. Esta cepa al igual que *Pseudomonas* o Enterobacterias detectadas en los estudios de Haefeli *et al.*, (1984), Deshpande y Chopade (1994) y Piotrowska-Seget *et al.* (2005); Malik (2004); Puerta y Mateos (2010), fue extraída de AgNO₃ y contiene bacilos Gram negativos.

Finalmente, C14 tiende a tener un comportamiento como el de la *Pseudomonas* encontrada por Hassen *et al.* (1998), incluso ambas se tratan de los bacilos gram negativos que se desarrollan en suelo (Piotrowska-Seget *et al.*, 2005 y Malik, 2004).

6.7. Resistencia de los microorganismos hacia metales pesados

Las figuras 16 y 17 muestran que C5 es la cepa más sobresaliente al exponerse a AgNO₃, este microorganismo filamentoso G- logró resistir en todas las concentraciones evaluadas y además fue el microorganismo que toleró mayor cantidad de metal tanto en 24h como en 48h. Según los antecedentes de microorganismos resistentes a plata, la cepa C5 podría ser *E. Coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium* o *Pseudomonas stutzeri* que son microorganismos resistentes a la plata (Deshpande y Chopade, 1994; McHugh *et al.*, 1975; Haefeli *et al.*, 1984). Además de C5, las cepas C7 y C14 son cepas que, aunque no toleran AgNO₃ al 1mM, si resisten el metal en una concentración de 0.1mM y 0.5mM. C7 se asemeja más a características del género *Bacillus* al comparar su morfología colonial y celular (Rokbani *et al.*, 2006), por lo que este microorganismo también podría resistir el arsénico. C14 puede estar perteneciendo a alguna especie de

Pseudomonas o *Enterobacteria*, que al ser extraída desde una muestra contaminada con HgNO_3 , debería mostrar resistencia ante plata y mercurio (Campos, 2007; Hassen *et al.*, 1998; Haefeli *et al.*, 1984; Hendry y Stewart, 1979). En cuanto a cepas sobresalientes expuestas a plata, se observa que C12 a pesar de crecer muy poco ante este metal, esta no muere al someterse a 0.1mM hasta 1mM de AgNO_3 , por lo que se podría considerar a la plata como un bacteriostático para C12, otro caso podría ser que la cepa únicamente requiera mayor tiempo para poder desarrollarse en un ambiente contaminado con plata (Pepper *et al.*, 2002; Vullo, 2003).

Al comparar la absorbancia media de las cepas expuestas a HgNO_3 se ha podido notar en la figura 18 y 19 que los resultados cambian drásticamente desde las 24 horas hasta las 48 horas. Ejemplo de lo anterior, es la cepa C1, la cual durante las 24h resiste altas cantidades de HgNO_3 al 1mM, sin embargo, en 48h se observa un caso contrario, por lo cual se puede creer que C1 trata de resistir la contaminación ante mercurio sin embargo el metal sigue siendo perjudicial para esta cepa (García, 2002; Vullo, 2003). C4, a pesar de no sobresalir por absorber altas cantidades de mercurio, durante las 24h, al llegar a 48h logra resistir al metal en todas las concentraciones (0.1mM, 0.5mM y 1mM) y principalmente la cantidad más alta evaluada, por lo cual parece requerir únicamente de lapsos de tiempo más largos para adaptarse y tolerar el metal; el mismo caso se presenta para C9, en donde el metal no es absorbido en 24h, más en 48h logra absorber todas las concentraciones evaluadas (Gadd, 2000; Silver y Misra, 1988). Otra cepa que cambia favorablemente es C12, quien en 24h sólo resiste al metal en concentraciones bajas, más en 48h únicamente resiste la concentración de 1mM, este resultado puede significar la tolerancia de la cepa a HgNO_3 puesto que como mencionaron Gadd (2000) y Silver y Misra (1988) algunos microorganismos suelen volverse indiferentes a la presencia de metales al ser tolerantes, siendo así está puede ser la razón por la cual en ocasiones la cepa absorbe concentraciones bajas y/o altas de mercurio, la tolerancia de C12 será determinada más adelante con la inspección de ANOVA. Para C4 y C9 no se han detectado casos de estudio en donde se encuentren microorganismos filamentosos que logren absorber el metal, por lo que es indispensable continuar el estudio de éstas dos cepas.

La resistencia de las cepas hacia el arsénico, según los estudios de Campos (2007) está presente, puesto que algunos microorganismos detectados en su estudio resistieron concentraciones incluso mayores al 8mM. Al observar las figuras 20 y 21 se muestra que efectivamente hay una diversidad de cepas resistentes a las concentraciones evaluadas (4mM, 6mM y 12mM). Entre las cepas que destacan en 24 horas están la cepa C11 y C13 que logran una absorbancia media ante NaAsO_2 a la 6mM por encima de 0.4500 en una longitud de onda de 600nm, sin descartar, que además resisten concentraciones de 12mM de este metal. Durante las siguientes 48 horas C11 y C13 se postulan nuevamente como las cepas más

resistentes, sin embargo, C13 se muestra indiferente a la concentración de 4mM (Gadd, 2000; Silver y Misra, 1988). C6, C7 y C10 logran resistir también las 3 concentraciones evaluadas, sólo que no se desarrollan con tanta efectividad como C11. Siendo así, C11 pudiese ser una buena candidata que apunta a ser alguna Enterobacteria, puesto que una vez más Campos (2007) muestra que, entre las bacterias encontradas en su caso, se encuentra la *E. cloacae*, la cual ha resistido concentraciones mayores a 8mM de As (V).

6.8. ANOVA y su importancia en la detección de cepas tolerantes y resistentes a metales pesados

Para poder diferenciar entre la resistencia y tolerancia de los microorganismos, es necesario primeramente visualizar el ANOVA realizado, el cual detecta tres concentraciones significativas en el estudio, es decir casos en los que P resultó ser menor a 0.005, AgNO₃ al 0.5mM, HgNO₃ al 0.5mM y HgNO₃ al 1mM en 48h.

Lo anterior, dirige a mencionar que en general, las cepas logran tolerar altas concentraciones de plata y mercurio. Más, al no encontrar una significancia en los análisis de NaAsO₂, no se tienen suficientes pruebas para demostrar que las cepas son tolerantes ante él; y es que la mayoría de las cepas fueron aisladas desde un inicio de muestras contaminadas con arsénico, y además según el análisis en HACH DR 3900 las figuras 20 y 21 indican que la mayoría de las cepas logran resistir el metal a una concentración de 4, 6 y 12mM, estos resultados deberían arrojar por lo menos una concentración significativa para el NaAsO₂. Las cepas parecen ser resistentes al arsénico, más no tolerantes. Lo anterior puede deberse a algún cambio durante el procedimiento, por ejemplo, pequeñas diferencias de tiempo en las mediciones realizadas en HACH DR 3900, ya que como se muestra en el anexo 5, se tuvieron grandes desviaciones estándar, siendo así, las absorbancias medidas pueden ser un poco más altas o bajas que las detectadas, otra probabilidad es que las cepas únicamente resistan concentraciones menores a la 4mM de NaAsO₂.

Se deduce gracias a ANOVA que aquellas cepas que lograron crecer considerablemente en concentraciones de HgNO₃ al 0.5mM y AgNO₃ al 0.5mM son cepas definitivamente tolerantes, tal es el caso de C5, C7, C12 y C14 en AgNO₃ al 0.5mM, C4, C9 y C12 toleran hasta 1mM de HgNO₃. C12 es un microorganismo que logra resistir y tolerar tanto al mercurio como a la plata y puede ser utilizado en una biorremediación de suelo (Pepper *et al.*, 2002; Vullo, 2003).

Para el resto de las cepas que absorbieron altas cantidades de metal y no resultaron significativas para ANOVA, incluyendo las cepas expuestas a diferentes concentraciones de NaAsO₂, se consideran cepas resistentes que deben seguir

siendo estudiadas. En el caso de las cepas expuestas a NaAsO_2 , se propone trabajar en un futuro con concentraciones menores al 4mM puesto que para el arsénico, no se puede hablar de tolerancia, más si se puede hablar de resistencia en cepas como C6, C7, C11 y C13.

Por otro lado, se demuestra que C1, C4, C6, C9 y C12 podrían resistir concentraciones aún mayores al 1mM de HgNO_3 y sería interesante que un estudio posterior trabajase con estos microorganismos para ver qué tanto se desarrollan ante el metal, especialmente C6 y C12 que crecen únicamente la concentración de 1mM del metal en lapsos de tiempo largo (a partir de 24h). En cuanto a C5, C7 y C14 que logran absorber con facilidad a AgNO_3 al 0.5mM se pueden considerar como cepas resistentes que podrían estar también dentro de una biorremediación.

Según los estudios realizados en este proyecto, se deduce que las cepas tolerantes y resistentes encontradas son candidatas para seguir estudiandolas y deducir su especie, ya que al ser tolerantes y/o resistentes, se muestran como candidatas para remediar suelos contaminados con los metales estudiados. Para encontrar las bacterias existentes en las cepas estudiadas, será necesario realizar pruebas bioquímicas o genéticas, de esta forma, los microorganismos pueden reproducirse en grandes volúmenes para absorber arsénico, mercurio y plata.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Se detectaron altos niveles de arsénico y mercurio en el área estudiada, 0.4383mM de As y 0.0213mM de Hg, tales niveles sobre pasan la NOM-047-SSA-2011; por tanto, afectan las propiedades del suelo. Los niveles de plata en sedimento no pudieron ser evaluados.

Se lograron aislar 14 cepas microbianas, que en su mayoría eran bacilos y filamentos, G+ y G-, también se detectó una cepa con doble morfología (C3).

Se evaluó la el crecimiento de los microorganismos en ausencia de metales para usarlo como blanco al observar el crecimiento de las bacterias en ambientes contaminados con AgNO_3 a la 0.1mM, 0.5mM y 1mM, NaAsO_2 a la 4mM, 6mM y 12mM, y HgNO_3 a la 0.1mM, 0.5mM y 1mM.

Gracias a los análisis de varianza realizados, se encontraron 4 cepas tolerantes a concentraciones de 0.5mM de AgNO_3 (C5, C7, C14 y C12) y 3 cepas que toleran hasta 1mM de HgNO_3 (C4, C9 y C12). No se detectaron cepas tolerantes a NaAsO_2 .

Al final se obtuvo una baja densidad microbiana ocasionada por los altos niveles de contaminación, muy pocos microorganismos lograron resistir o tolerar los metales evaluados, lo cual es normal en ambientes contaminados con metales pesados.

REFERENCIAS

- Abate C. M., Amoroso M. J. y Polti M. A. (2007). Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. *Chemosphere*, 67(4) 660–667.
- Abate C. M. Louis M. S., Albarracín V. H., Benito J. M. y Lebeau, M. J. (2005). Heavy-metal resistant actinomycetes,”in *Heavy-Metal Resistant Actinomycetes*, E.Lichtfouse, J. Schwarzbauer, and D. Robert, Eds. Springer, Berlin, Germany.757–767.
- Ademola O. O., Adhika B. y Balakrishna P. (2013). Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial. *Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies*. 14, 10197-10228.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). (1990). *Reseña Toxicológica de la Plata (en inglés)*. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). (2007). *Reseña Toxicológica del Arsénico (versión actualizada) (en inglés)*. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). (2010).
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). (2016).
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR) (2016). *Mercurio (Azogue) metálico (Metallic Mercury) (2010)*.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2016). *Resúmenes de Salud Pública - Mercurio (Azogue) (Mercury). (2006)*.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) (2016). *Resúmenes de Salud Pública - Plata (Silver) (2016)*.
- Ahmed, N. N. y Badar A., U. (2005). Screening of copper tolerant bacterial species and their potential to remove copper from the environment. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology*. 74, 219–226.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zang, J., Zang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programmes. *Nucleic Acids Research*. 25, 3389-3402.
- Amoroso M. J., Benimeli C. S., Cuzzo S. A. y Fuentes M. S. (2010) Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64, 434–441.
- Archivo General de la Nación (AGN). (1934) Expediente 434.1/211. Se declara el agotamiento de la veta en la mina “La Valenciana”: Dirección del Archivo Histórico Central. 30.

- Áviles, M. J. (2012). Manual de prácticas de sedimentos y rocas sedimentarias silicilásticas. Guanajuato, Guanajuato, México: Universidad de Guanajuato.
- Bakewell, P. J. Minería y sociedad en el México colonial, Zacatecas, 1546 – 1700. (1976) México, Fondo de Cultura Económica. Biblioteca “Manuel Orozco y Berra” (BMOB). Dirección de Estudios Históricos de INAH, Anexo al Castillo de Chapultepec. 388.
- Banks, M.K., Schwab, A.P., Henderson, C. (2006). Leaching and reduction of chromium in soil as affected by soil organic content and plants. *Chemosphere* 62, 255–264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.05.020>.
- Bargalló, M. La minería y metalurgia en La América Española durante la época colonial. México. Fondo de Cultura Económica. 1955, 355-442 pp. BMNA (Biblioteca del museo Nacional de Antropología e Historia) – BMOB.
- Bosecker K. (2001). *Hydrometallurgy* 59(245) 2–3.
- Bréant D., Jézéquel K., y Lebeau T. (2002). Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd²⁺: influence of Cd²⁺, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics. *Biotechnology Letters* 24: 1237-1241.
- Bundschuh J., Pérez C. A. y Litter M. (2008). Distribución del arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana. Argentina: CYTED.
- Caccia, V. G., Millero, F. J. y Palanques, A. (2003). The distribution of trace metals in Florida Bay sediments. *Mar. Pollut. Bull.*, 46, 1420–1433
- Campos, V., Valenzuela, C., Alcorta, M., Escalante, G., y Mondaca, M. a. (2007). Aislamiento De Bacterias Resistentes a Arsenico Desde Muestras De Rocas Volcanicas De La Quebrada Camarones, Region Parinacota: Chile. *Gayana Concepción*, 71(2), 150–155.
- Cheikin, M. (2007). Heavy Metals: The Trump Card of Toxicity. *Holistic Medicine and Physiatrist*.
- Coelho, C., Branco, R., Natal-da-Luz, T., Paulo Sousa, J., y Morais, P. (2014). Evaluation of bacterial biosensors to determine chromate bioavailability and to assess ecotoxicity of soils. Elsevier.
- Dastidar, A. y Wang Y. (2009). Arsenite oxidation by batch cultures of *Thiomonas arsenivorans* strain b6. *J. Environ. Eng.* 135:708-715.
- Deshpande, L.M. y Chopade, B.A. (1994). Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Biometals*, 7, 49–56.
- Díaz, B., Yáñez, L., Carrizales, J., Mejía L., Batres y Ramos, O. (1994). La importancia Biológica de los iones inorgánicos. Ed. Universitaria Madero Ote. Michoacán, 172.
- Dube, A., Kowalkowski R., Cukrowska E. y Buszewski, B. (2001). Adsorption and migration of heavy metals in soil. *Pol. J. Environ. Stud.* 10 (1).
- Filali, K. B., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, Z. F., Talbi, M y Blaghen, M. (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr. Microbiology*, 41, 151–156.
- Fortín, C., y Campbell, P. (2001). Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: Role of anion transporter in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.* 35(11), 2214–2218.
- Foye, W. O. (1977). Antimicrobial activities of mineral elements, in microorganisms and minerals. (F.D. Weinberg, de.) New York, Basel: Marcel Dekker, 387–419.
- Gadd, G. M. (2000). Heavy metal pollutants: Environmental and biotechnological aspects En: *Encyclopedia of Microbiology*. Vol. 2. 2da. Ed. New York, E.U.U. Ed. Joshua Lederberg, 697–617.
- Gadd G.M. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 271–279.
- García, A. (2002). Análisis molecular de la resistencia a plata de una cepa de *Moraxella sp.* aislada de jales mineros. Facultad de Ciencia Química. Instituto de Investigación en Biología Experimental. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Guanajuato, México.
- García, I. y Dorronsoro, C. (2001). Contaminación por metales pesados. España: Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada, España.

- Ghandour, W., Hubbard A. J., Deistung, J. Hughes, N. M., y Poole K. R. (1988). The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12: Toxic effects and interaction with copper ions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 28, 559–565.
- Haefeli, C., Franklin C. y Hardy K. 1984. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* 158:389–92.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. y Boudabous, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64(1), 7–15.
- Hendry, A.T. y Stewart, I.O. (1979). Silver-resistant Enterobacteriaceae from hospital patients. *Can J Microbiol*, 25, 916–921.
- Hughes, M.N. y Poole R.K. (1991). Metal speciation and microbial growth, the hard and soft facts. *Journal of General Microbiology*, 137, 725–734.
- Hultut, D. y Dana, J. (1960). *Manual de Mineralogía Dana*, 2ª ed. Barcelona: Reverté S.A. 3–4.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2004). IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Drinking Water Disinfectant and Contaminants, Including Arsenic. Vol. 84. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Joshi-Tope, G. y Francis, A.J. (1995). Mechanisms of biodegradation of metal-citrate complexes by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*. 177, 1989–1993.
- Kavamura, V. N. y Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*. 28(1). 61–69.
- Kotaš, J. y Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* 107(3), 263–283.
- Lasat M. M., (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual*, 31, 109–120.
- Lebeau, T., Bagot, D. Jézéquel, K. y Fabre B. (2002). Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *The Science of the Total Environment* 291, 73–83.
- Lovley D.R. (2000). *Environmental Microbe-Metal Interactions*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.*, 30, 261–278.
- Marrufo Gutiérrez, Z. A., González Sandoval, M. d., Beltrán Hernández, R. I., Reyes Gómez, L. M., y Coronel Olivares, C. (2015). Aislamiento y caracterización de grupos bacterianos en jales y rizosfera en los municipios de Zimapán y Mineral de la Reforma, Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- McEldowney, S. (2000). The Impact of surface attachment on cadmium accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 121–128.
- McHugh G.L., Moellering R.C., Hopkins C.C. y Swartz M.N. (1975). Salmonella typhimurium resistance to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet*, 1, 235–240.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J. y Lombi, E., (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant Soil*. 232, 207–214.
- Mergeay, M. (1991). Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends in Biotechnology*, 9, 17–24.
- Monroy, Pedro (1997). MEMORIA histórico-descriptiva del distrito minero de Guanajuato escrita por disposición de la Secretaría de Fomento. *Anales del Ministerio de Fomento de la República Mexicana*. T. X., 69. BSMGE (Biblioteca de la Sociedad Mexicana de Geografía y Estadística).
- Moraga, R., Merino, C. y Mondaca, M.A. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Departamento de Ciencias del Mar, Universidad Arturo Prat, Casilla 121, Iquique, Chile. Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción, Casilla 162C, Concepción, Chile. 31(1). 91-95.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N. y Gibbs, B.F., 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: An evaluation. *Eng. Geol.* 60, 193–207.
- National Research Council (NRC). (2000). *Arsenic in Drinking Water*. Washington, DC: National Academy Press.
- Nies, D.H. (1992). Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid* 27, 17–28.

- Odermatt, A., Krapf, R. y Solioz, M. (1994). Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺, and Ag⁺ extrusion by CopB. *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 202, 44–48.
- Orozco, C. (2003). Contaminación Ambiental, una visión desde la química. España: International Thomson Editores.
- Pepper, I.L., Gentry, T.J., Newby, D.T., Roane, T.M. y Josephson, K.L. (2002). The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 110, 943–946.
- Piimpel, T., y Schinner, F. (1986). Silver tolerance and silver accumulation of microorganisms from soil materials of a silver mine. *Applied microbiology and biotechnology*. Springer-Verlag.
- Piotrowska-Seget, Z., Cycon, M. y Kozdroj, J. (2005). Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl. Soil Ecol.*, 28, 237–246.
- Raja, C. E., Selvam G. S., y Omine K (2009). Isolation, identification and characterization of heavy metal. Resistant Bacteria from sewage, 205–211.
- Rajbanshi, A. (2008). Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant. *Our Nature*, 6(1), 52–57.
- Ramos-Arroyo, Y. R., Prol-Ledesma, R. M. y Siebe-Grabach, C. (2004). Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del Distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*.
- Rokbani, A. A., Pascale B. y Patrick B. (2006). Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Institute Pasteur. Research in Microbiology* 158, 128–137.
- Roque, M. (2016). Actinomycosis in Ophthalmology. *Medscape*.
- Sánchez, M. T., Morales J (2002). La minería en México. Geografía, historia, economía y medio ambiente. 9–49 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía.
- Sharma, P.K., Balkwill, D.L. Frenkel, A. y Vairavamurthy, M.A. (2000). A new *Klebsiella planticola* Strain (Cd-1) Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and Precipitates Cadmium Sulfide. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7) 3083–3087
- Shi, W., Bischoff, M., Turco, R. y Konopka, A., (2002). Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Appl. Soil. Ecol.* 21, 169–177.
- Silver S. (2003) Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev.*, 27, 341–353.
- Silver, S. y Misra, T. (1988). Plasmid-mediated Heavy Metal Resistances. *Annual Reviews on Microbiology* 42, 717–43.
- Silver, S. y Walderharg M. (1992). Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 56(1), 195–228.
- Sociedad Cooperativa Minero Metalúrgica Santa Fé de Guanajuato S.A. de C.L. (SCMMSFG). (2002). Archivos de producción 1977–2001: Guanajuato, México, 1460.
- Solecka J., Zajko J., Postek M., y Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology*, 7(3), 373–390.
- Urrutia, M.M. y Beveridge T.J. (1993). Remobilization of heavy metals retained as oxyhydroxides or silicates by *Bacillus subtilis* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4323–4329.
- Verstraete W. J. (2002). Environmental biotechnology for sustainability. Elsevier. *Journal of biotechnology* 94(1) 93.
- Vullo D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*, 2(3).
- Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A., Keasling, J.D. y Clark, D.S. (1997). Cadmium Removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10) 4075–4078.
- Yamamura, S. y Amachi S. (2014). Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation. *J. Biosci. Bioengineer.* 118: 1-9.

ANEXOS

Anexo 1. Method 3050b. Acid Digestion of sediments, sludges and soils (Método 3050B. Digestión ácida de sedimentos, lodos y suelos).

Este método se ha escrito para proporcionar dos procedimientos de digestión separados, uno para la preparación de sedimentos, lodos y muestras de suelo para el análisis por absorción atómica de llama espectrometría (FLAA) o espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y uno para la preparación de sedimentos, lodos y muestras de suelo para el análisis de muestras mediante horno de grafito AA (GFAA) o espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Los extractos de estos dos procedimientos no son intercambiables y sólo deben usarse con determinaciones analíticas resumidas en este método. Las muestras preparadas con este método pueden ser analizadas por ICP-AES o GFAA para todos los metales enumerados, siempre que los límites de detección sean adecuados para el uso final de los datos. Se pueden usar técnicas determinantes alternativas si son científicamente válidas y se pueden lograr los criterios de control de calidad del método, incluidos los que se ocupan de las interferencias. Otros elementos y matrices se pueden analizar con este método si se demuestra el rendimiento para los analitos de interés, en las matrices de interés, a los niveles de concentración de interés.

Anexo 2. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. 10. Expresión de los resultados

10.1 Cálculo del método

10.1.1 Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características

Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes. Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente,

tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

10.1.2 Placas que contienen menos de 15 colonias características

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

10.1.3 Placas con colonias no características

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución.

Anexo 3. NORMA Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-2011, Salud ambiental. Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas.

La presente Norma establece los Índices Biológicos de Exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas, responde a la necesidad de contar con una guía para apoyar la evaluación del riesgo a la salud del personal ocupacional que labora con estas sustancias, a partir de conocer los Índices Biológicos de Exposición, con el fin de implementar y evaluar las medidas de control dirigidas a la conservación de la salud y a la prevención de efectos nocivos en este personal. Así mismo, responde al cumplimiento tanto del Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012 que plantea en su objetivo 8 Garantizar que la salud contribuya a la superación de la pobreza y al desarrollo humano en el país, y en su estrategia 8.3 Promover la productividad laboral mediante entornos de trabajo saludables; como del Programa Nacional de Salud, que establece en su objetivo 5. Garantizar que la salud contribuya al combate a la pobreza y al desarrollo social del país, en su estrategia 1. Fortalecer y modernizar la protección contra riesgos sanitarios, en su Línea de acción 1.5 Fortalecer las políticas y acciones de protección contra riesgos sanitarios atendiendo las evidencias científicas, y dentro de sus actividades la de "mantener actualizadas las estrategias para el análisis de los riesgos sanitarios a los que se enfrenta la población y establecer las acciones que deberán ser incorporadas a los Proyectos que para su atención opera el Sistema Federal Sanitario en materia de Salud Ocupacional". Es importante considerar que para mejorar las condiciones de salud de la población es necesario proteger la salud del personal ocupacionalmente expuesto mediante medidas preventivas y de promoción a la salud, atención integral de los accidentes laborales y modernización del marco legal en materia del trabajo.

Apéndice Normativo "A"

Tabla 1 Índices Biológicos de Exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas.

Sustancia química [Número CAS] Determinante y/o Parámetros Biológicos	Momento del Muestreo	IBE	Observaciones
ACETONA [67-64-1] Acetona en orina	Al final del turno de trabajo	50 mg/l	Ne
ACETILCOLINESTERASA INHIBIDA POR PLAGUICIDAS Actividad de colinesterasa en eritrocitos	Se deben conocer los niveles basales de los trabajadores antes de la exposición Discrecional	70% de línea basal individual	Ne
ANILINA [62-53-3] Anilina en orina * Anilina suelta en hemoglobina en sangre p-aminofenol* en orina	Muestra control al inicio del turno de trabajo Muestra de Exposición al final del turno de trabajo Muestra de Exposición al final del turno de trabajo Muestra de Exposición al final del turno de trabajo	50 mg/L 1.5% de hemoglobina	Nq B, Ns, Sc
ARSENICO ELEMENTAL [7440-38-2] y COMPUESTOS INORGANICOS SOLUBLES Arsénico inorgánico más metabolitos metilados en orina	Al final de una semana de trabajo	35 µg As/l	B
BENCENO [71-43-2] Acido S-fenilmercaptúrico en orina Acido t,t-mucónico en orina	Al final del turno de trabajo Al final del turno de trabajo	25 µg/g creatinina 500 µg/g creatinina	B B
1, 3 BUTADIENO [106-99-0] 1, 2 Dihroxi-4-(N-acetilcisteinil)- butano en orina mezcla de N-1 y N-2(hidroxibutenil) valina hemoglobina (Hb) aductos en sangre	Muestra de exposición al final del turno de trabajo No crítico	2.5 mg/L 2.5 pmol/g Hb	B, Sc Sc
2- BUTOXIETANOL [111-76-2] Acido butoxiacético (BAA) en orina*	Muestra de exposición al final del turno de trabajo	200mg/g creatinina	-

Anexo 4. NORMA Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.

De conformidad a lo dispuesto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, con fecha 11 de noviembre de 2005 se publicó el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, que establece Criterios para determinar las Concentraciones de Remediación de Suelos Contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y vanadio, en el Diario Oficial de la Federación, mismo que fue elaborado de manera conjunta con la Secretaría de Salud con el fin de que los interesados en un plazo de 60 días naturales posteriores a la fecha de su publicación presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales sito en Boulevard Adolfo Ruiz Cortines 4209, cuarto piso, Fraccionamiento Jardines en la Montaña, Delegación Tlalpan, código postal 14210, de esta Ciudad. Durante el mencionado plazo, la manifestación de impacto regulatorio del citado Proyecto de Norma, estuvo a disposición del público para su consulta en el domicilio antes señalado, de conformidad con el artículo 45 del citado ordenamiento. De acuerdo con lo establecido en el artículo 47 fracciones II y III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, los interesados presentaron sus comentarios al proyecto de Norma en cuestión, los cuales fueron analizados por el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales y por el Comité Consultivo Nacional de Normalización, de Regulación y Fomento Sanitario, realizándose las modificaciones procedentes al proyecto; las respuestas a los comentarios y modificaciones antes citados fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación. Una vez cumplido el procedimiento establecido en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización para la elaboración de normas oficiales mexicanas el Comité Consultivo Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales en sesión de fecha 26 de abril de 2006, aprobó la presente Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

5.1.1. Cuando el suelo que se presume contamina tiene una superficie menor o igual a 1000m², el responsable a remediar a las concentraciones de referencia totales (CRT) señaladas en la Tabla 1 o seguir cualquier de las mitologías descritas en la presente Norma.

TABLA 1 Concentraciones de referencia totales (CR _T) por tipo de uso de suelo.		
Contaminante	Uso agrícola/residencial /comercial (mg/kg)	Uso industrial (mg/kg)
Arsénico	22	260
Bario	5 400	67 000
Berilio	150	1900
Cadmio	37	450
Cromo Hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1 600	20 000
Plata	390	5 100
Plomo	400	800
Selenio	390	5 100
Talio	5,2	67
Vanadio	78	1000

NOTA:

- En caso de que se presenten diversos usos del suelo en un sitio, debe considerarse el uso que predomine.
- Cuando en los programas de ordenamiento ecológico y de desarrollo urbano no estén establecidos los usos del suelo, se usará el valor residencial.

Anexo 5. Crecimiento de cepas expuestas a $AgNO_3$ 0.1mM, 0.5mM y 1mM; $HgNO_3H_2O$ 0.1mM, 0.5mM y 1mM y $NaAsO_2$ 4mM, 6mM y 12mM

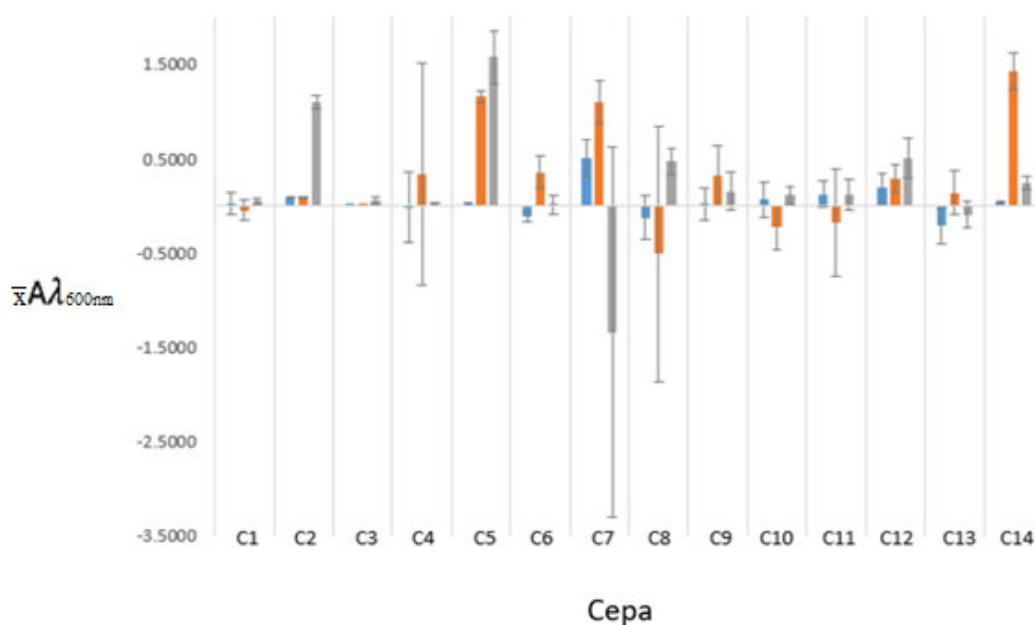


Figura 22. Crecimiento de cepas expuestas a $AgNO_3$ durante 24h, mostrando su desviación estándar. Color azul: 0.1mM $AgNO_3$; color naranja: 0.5mM $AgNO_3$; color gris: 1mM $AgNO_3$. Longitud de onda: 600nm.

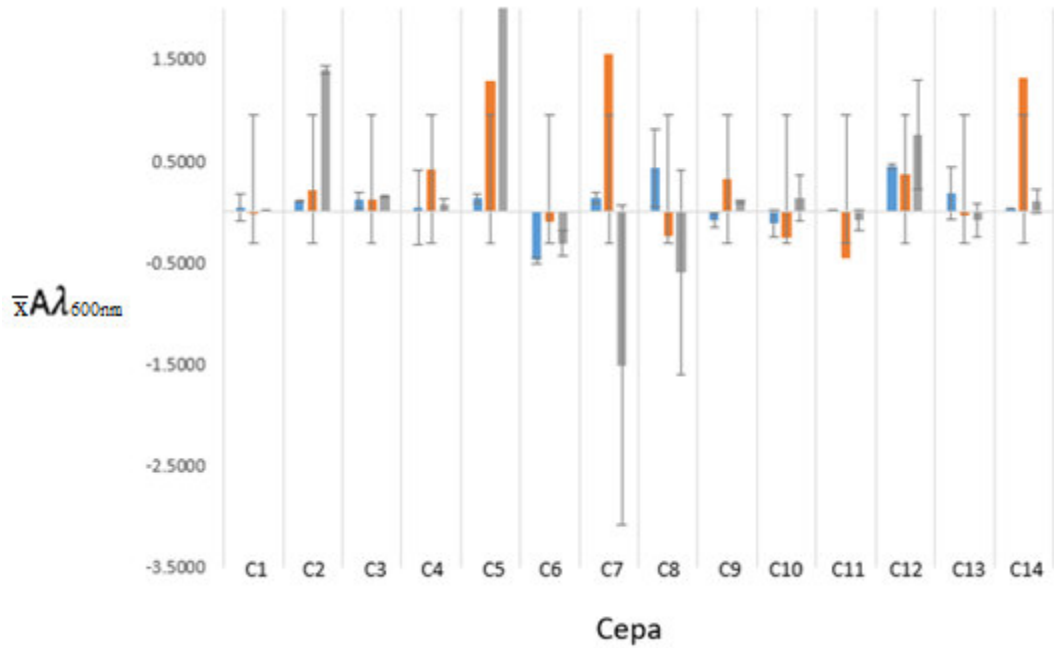


Figura 23. Crecimiento de cepas expuestas a AgNO_3 durante 24h, mostrando su desviación estándar. Color azul: 0.1mM AgNO_3 ; color naranja: 0.5mM AgNO_3 ; color gris: 1mM AgNO_3 . Longitud de onda: 600nm .

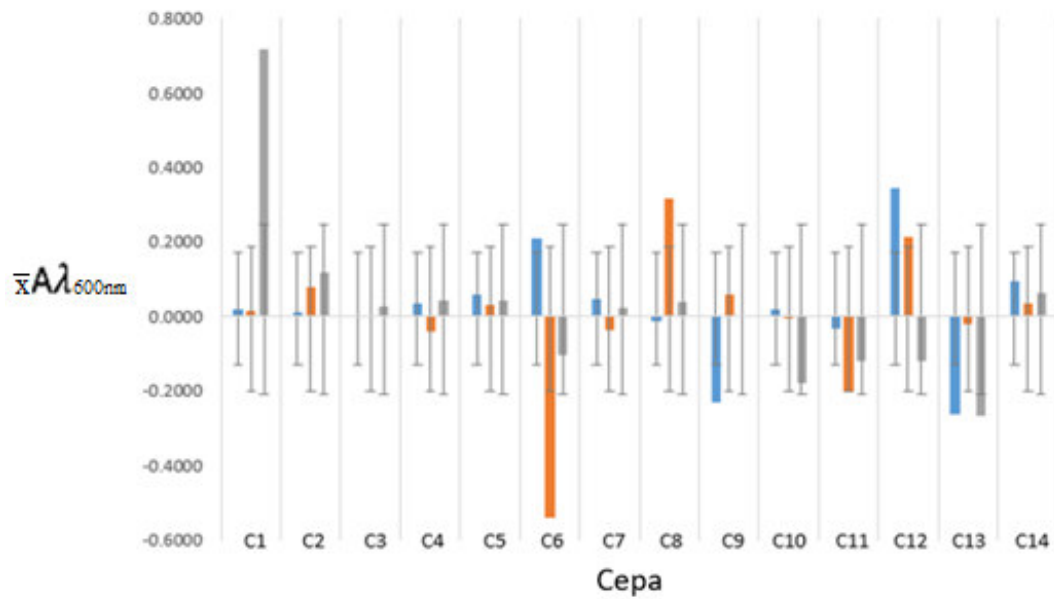


Figura 24. Crecimiento de cepas expuestas a HgNO_3 durante 24h, mostrando su desviación estándar. Color azul: 0.1mM HgNO_3 ; color naranja: 0.5mM HgNO_3 ; color gris: 1mM HgNO_3 . Longitud de onda: 600nm .

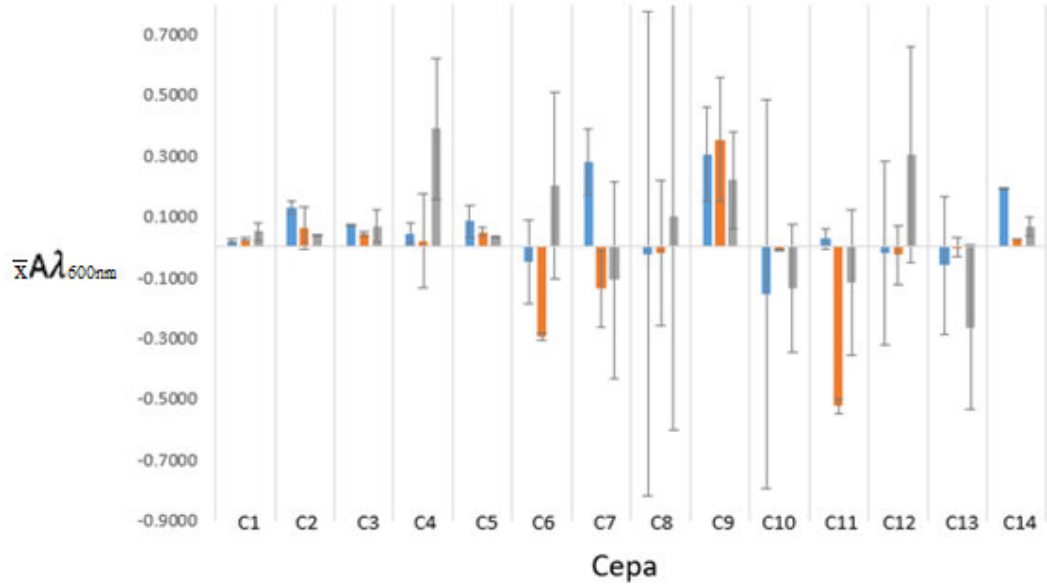


Figura 25. Crecimiento de cepas expuestas a HgNO₃ durante 48h, mostrando su desviación estándar. Color azul: HgNO₃ 0.1mM; color naranja: HgNO₃ 0.5mM; color gris: HgNO₃ 1mM. Longitud de onda: 600nm.

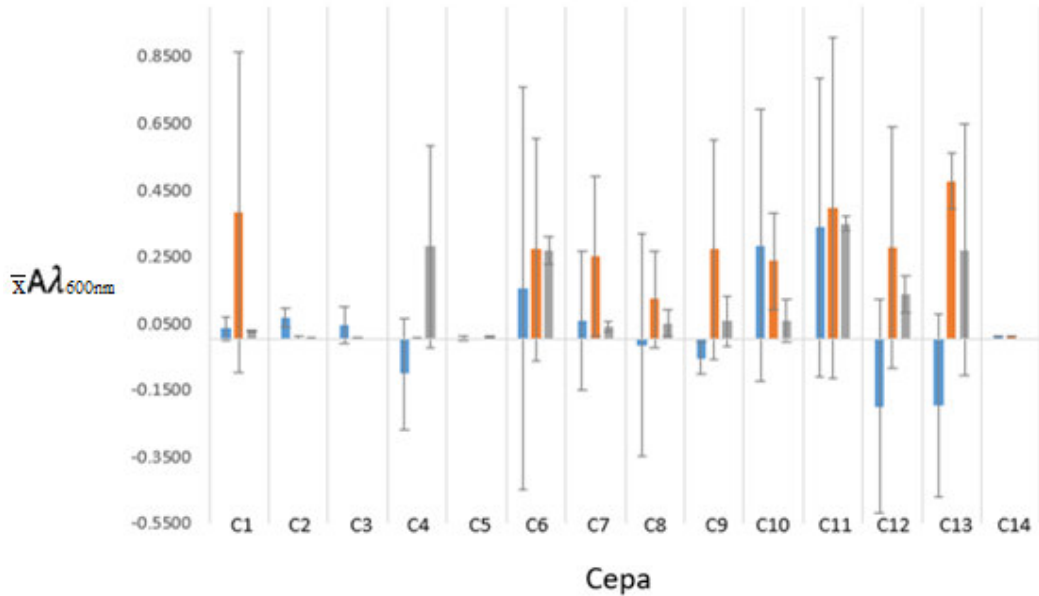


Figura 26. Crecimiento de las cepas expuestas a NaAsO₂ durante 24h, mostrando su desviación estándar. Color azul: NaAsO₂ 4mM; color naranja: NaAsO₂ 6mM; color gris: NaAsO₂ 12mM. Longitud de onda: 600nm.

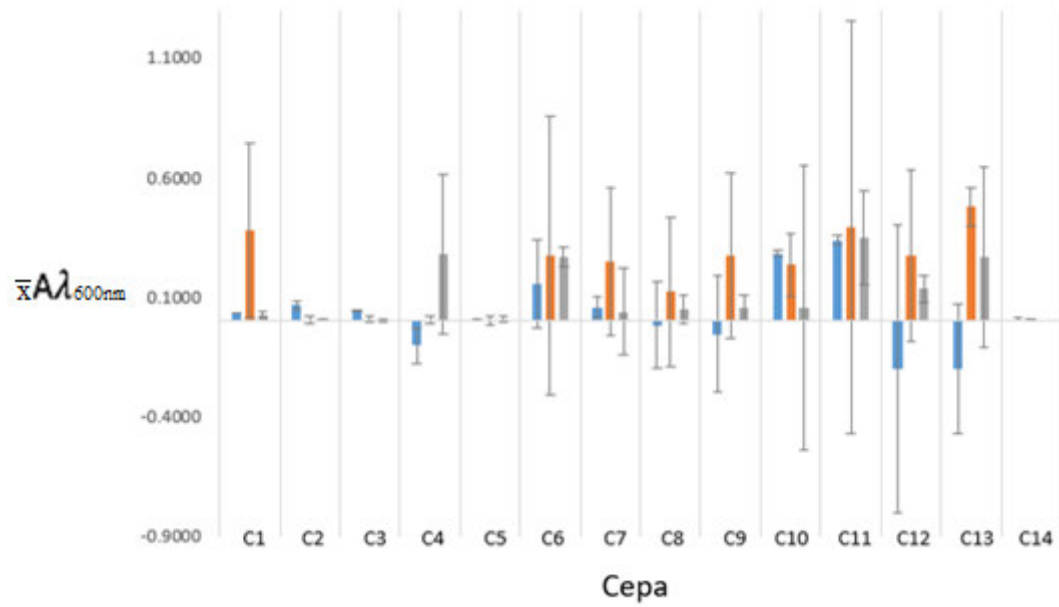


Figura 27. Crecimiento de cepas expuestas a NaAsO₂ durante 48h, mostrando su desviación estándar. Color azul: NaAsO₂ 4mM; color naranja: NaAsO₂ 6mM; color gris: NaAsO₂ 12mM. Longitud de onda: 600nm.