



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

Unidad Académica de Ciencias Químicas
Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

**ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO ANTE METALES PESADOS EN
BACTERIAS AISLADAS DE RELAVES MINEROS ZACATECANOS**

Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Química

Presenta:

Q.F.B. Fabián Solano Elías

Director (es):

Dra. en C. Ismailia Leilani Escalante García
Dr. en C. Juan Armando Flores de la Torre
Dra. en C. María Argelia López Luna

Junio 2021

Dedicatoria

A todas las personas que me acompañaron en este camino, de una u
otra manera.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación, se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Farmacia de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química (MCTQ) de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, en el laboratorio de Estudios Ambientales perteneciente al Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes contando con los apoyos financieros otorgados por la Coordinación del Área de Ciencias de la Salud y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de maestría con registro No. 986634

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios y a mis padres, al igual que a mi hermano, quienes me apoyaron todo el tiempo, en el transcurso de tomar la decisión de estudiar un posgrado y seguir mejorando en mi formación académica, y durante la misma. En especial durante el tiempo que realice mi estancia de investigación, sin su apoyo hubiera sido muy difícil.

A mis maestros, quienes tuvieron un rol muy importante durante mis estudios, tanto de licenciatura como de maestría, ya que, gracias a sus enseñanzas y consejos, fui capaz de resolver la mayoría de las situaciones que se me presentaron en el ámbito académico. En especial a mis asesores, la doctora Argelia, la doctora Ismailia y el doctor Armando, muchas gracias por su enorme apoyo

A la Maestría en Ciencia y Tecnología por permitirme demostrarme a mí mismo de que soy capaz de lograr lo que me propongo con un poco de esfuerzo, al admitirme en esta maestría. De igual forma al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido

Un enorme agradecimiento para los integrantes del laboratorio 27 de Estudios Ambientales en el Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, lugar donde realice mi estancia de investigación, en especial a Laurita por haberme ayudado en los experimentos y cálculos realizados, ya que sin su ayuda me habría resultado imposible. Y no puedo no mencionar y agradecer a Marie, Viri y Óscar, por su amistad y por integrarme al maravilloso grupo que forman.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Gracias.

INDICE

LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCION	13
1.1 Panorama de la Minería en Zacatecas	16
1.2 Lugar de estudio.....	18
1.2.1 Mina El Bote	18
1.2.2 Concepción del Oro, Zac.....	19
1.3 Transformaciones mediadas por microorganismos.....	20
1.4 Movilización de metales pesados	20
1.4.1 Biolixiviación.....	20
1.5 Inmovilización de metales pesados.....	21
1.5.1 Biosorción.....	21
1.5.2 Bioacumulación	22
1.5.3 Biomineralización	23
1.5.4 Biotransformación.....	23
1.5.5 Quimiosorción mediada por microorganismos.....	24
1.6 As.....	26
1.6.1 Características fisicoquímicas.....	27
1.6.2 Usos del As en la minería	27
1.6.3 Mecanismo de toxicidad	27
1.7 Pb.....	29
1.7.1 Características fisicoquímicas.....	29
1.7.2 Pb en la minería.....	30
1.7.3 Mecanismo de toxicidad	30
1.8 Zinc	31
1.8.1 Características fisicoquímicas.....	32
1.8.2 Zinc en la minería	32
1.9 Biotecnología y biorremediación	33
1.10 Cambio climático y contaminación minera.....	35

1.11 Evaluación del impacto ambiental	36
1.12 Evaluación del riesgo ecológico y a la salud.....	37
1.13 Evaluación y manejo de sitios contaminados	40
2 JUSTIFICACION	42
3 HIPOTESIS	44
4 OBJETIVOS	44
4.1 <i>Objetivo General</i>	44
4.2 <i>Objetivos específicos</i>	44
5 MATERIAL Y METODOS	45
5.1 Aislamiento de la bacteria.....	45
5.2 Caracterización morfológica.....	46
5.3 Determinación de interacción con metales pesados	46
5.4. Cuantificación de metales pesados por absorción atómica.....	48
6 Resultados	50
6.1 Aislamiento y caracterización morfológica	50
6.2 Interacción con metales pesados.....	54
6.3 Cuantificación de metales pesados	66
7 Discusión	72
8. Conclusiones	75
Bibliografía	78
Anexos	84
Anexo 1. Resultados de cuantificación de metales pesados mediante absorción atómica.....	84
Anexo 2. Producción académica.	87

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Pagina
1	Efectos a la salud de metales pesados	14
2	Características fisicoquímicas del As	25
3	Efectos observados en humanos y animales de laboratorio después de exposición crónica a As	26
4	Características fisicoquímicas del plomo (Pb)	27
5	Límites máximos recomendados de Zn por grupo de edad	29
6	Características fisicoquímicas del Zn	29
7	Cepas aisladas y su muestra de procedencia	48
8	Descripción de la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas	49
9	Cepas seleccionadas para la cuantificación de Pb, Zn y As en medio de cultivo y bacteria mediante absorción atómica	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Vista de la mina El Bote	17
2	Vista panorámica de la Unidad Deportiva de Concepción del Oro	18
3	Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos	23
4	Metodología resumida	44
5	Interacción con metales de la cepa 1	54
6	Interacción con metales de la cepa 2	55
7	Interacción con metales de la cepa 3	56
8	Interacción con metales de la cepa 4	57
9	Interacción con metales de la cepa 5	58
10	Interacción con metales de la cepa 6	59
11	Interacción con metales de la cepa 7	60
12	Interacción con metales de la cepa 8	61
13	Interacción con metales de la cepa 9	63
14	Concentración de Pb en las cepas 2, 6 y 9.	68
15	Concentración de Zn en las cepas 3, 4, 5, 6 y 10	69
16	Concentración de As en las cepas 3, 4, 5 y 8	70

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AN	Agar Nutritivo
Ag	Plata
As	Arsénico
ATP	Adenosín Trifosfato
Au	Oro
CCA	Arsenato de cobre cromado
Cd	Cadmio
CO	Concepción del Oro
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
CV-I	Cristal Violeta- Yodo
ERE	Evaluación de Riesgo Ecológico
Fe	Hierro
GEI	Gas Efecto Invernadero
GSH	Glutati6n
Hg	Mercurio
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informaci6n
MB	Mina El Bote
Mn	Manganeso
Ni	Níquel
nm	nan6metro
NRC	National Research Conseul
Pb	Plomo
PCR	Reacci6n en Cadena de la Polimerasa
Ppm	Parte por mill6n
SEMARNAT	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SOD	Súper Óxido Desmutasa
TG	Tinci6n de Gram
Zn	Zinc

RESUMEN

La contaminación provocada por metales pesados ha resultado ser un tema relevante debido al impacto ambiental y social en el desarrollo y supervivencia de cualquier ser vivo, principalmente para los humanos. La minería en el Estado de Zacatecas tiene gran importancia hoy en día, principalmente en la extracción de oro y plata. El objetivo general del presente proyecto es relacionar el comportamiento bacteriano en presencia de Zn, Pb y As con un posible mecanismo de interacción bacteria-metal realizando el aislamiento bacteriano a partir de muestras de relaves mineros de las zonas de estudio, para así evaluar la tolerancia o resistencia bacteriana dichos metales, así como determinar su concentración en los aislados bacterianos para así proponer un mecanismo de interacción probable, comparando los resultados obtenidos con los reportados en la literatura. Se llevo a cabo el análisis de muestras de suelo, aislando microorganismos e identificándolos con la tinción de Gram. Posterior a ello, se evaluó el comportamiento de dichos aislados frente a los metales, midiendo la densidad óptica de los aislados. Después, se realizó la cuantificación de estos metales mediante espectrometría de absorción atómica para determinar si la mayor concentración se encontraba en el medio de cultivo o en la biomasa. Se logro el aislamiento de nueve cepas, cinco de la mina El Bote y cuatro de Concepción del Oro, de las cuales siete fueron Gram positivo y dos Gram negativo. De estas, las bacterias que crecieron en presencia de Zn tuvieron un mayor desarrollo en presencia de este metal en comparación con el control, así como una mayor concentración en la biomasa que en el medio de cultivo. En el caso del As y Pb, estos metales resultaron ser tóxicos ya que inhibieron el crecimiento y tuvieron una mínima concentración en la biomasa, resultando la mayor cantidad en el medio de cultivo. Comparado con la bibliografía, los resultados son consistentes en el caso de los tres metales, proponiendo para el caso del Zn un mecanismo de bioacumulación, al aprovechar este metal como un cofactor en sus procesos metabólicos. De igual forma, en el caso del As y Pb, se ha propuesto que la interacción con este metal fue nula, pudiendo ser mediante el mecanismo de

biosorción y bioacumulación, pero, resultando tóxicos para las bacterias aisladas en este estudio.

ABSTRACT

Pollution by heavy metals is an issue of vital importance due to the great environmental impact it has on the development and survival of living beings, mainly for the human species. Zacatecas is a state where mining has had great importance today, mainly in the extraction of gold and silver. The general objective of this project is to relate the bacterial behavior in the presence of Zn, Pb and As with a possible mechanism of bacteria-metal interaction, performing bacterial isolation from samples of mining tailings from the study areas, in order to evaluate tolerance or bacterial resistance of said metals, as well as determining their concentration in bacterial isolates in order to propose a probable interaction mechanism, comparing the results obtained with those reported in the literature. The analysis of soil samples was carried out, isolating microorganisms and identifying them with the Gram stain. After this, the behavior of said isolates against metals was evaluated, measuring the optical density of the isolates. Later, the quantification of these metals was carried out by means of atomic absorption spectrometry to determine if the highest concentration was in the culture medium or in the biomass. The isolation of nine strains was achieved, five from the El Bote mine and four from Concepción del Oro, of which seven were Gram positive and two Gram negative. Of these, the bacteria that grew in the presence of Zn had a higher development in the presence of this metal compared to the control, as well as a higher concentration in the biomass than in the culture medium. In the case of As and Pb, these metals turned out to be toxic since they inhibited growth, and had a minimum concentration in the biomass, resulting in the highest amount in the culture medium. Compared with the bibliography, the results are consistent in the case of the three metals, proposing for the case of Zn a bioaccumulation mechanism, by taking advantage of this metal as a cofactor in its metabolic processes. In the same way, in the case of As and Pb, it has been proposed that the interaction with this metal was null, which could be through the biosorption and bioaccumulation mechanism, but being toxic to the bacteria isolated in this study.

1. INTRODUCCION

La industria en general se ha convertido en un importante foco de contaminación para el medio ambiente, siendo los metales pesados uno de los ejemplos más dañinos para los ecosistemas. Particularmente en el caso de los suelos, dichos contaminantes afectan la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos. En tanto, para el caso de los acuíferos y aguas superficiales, comprometen su uso como fuente de agua para consumo humano. El uso de métodos químicos para la remediación de estos lugares resulta en un alto coste debido a su alta especificidad, además de que no es aplicable a métodos de remediación *in situ* debido a la competencia de los contaminantes en el sitio. La aplicación de métodos de remediación efectivos depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, la solubilidad y especiación de los metales pesados, los procesos de atenuación e inmovilización y la medida en que los metales puedan dispersarse tanto horizontal como verticalmente a medida que migran por el suelo. Por otra parte, la utilización de métodos biológicos para remediar un ambiente contaminado (biorremediación) ofrece una alta especificidad en la remoción del metal de interés con flexibilidad operacional, tanto en sistemas *in situ* como *ex situ*. (Vullo DL, 2003)

Debido a que los metales no son fácilmente degradables, solo se distribuyen por medio del aire, agua y suelo, cambiando su estado de oxidación, incorporándose en las cadenas tróficas o directamente en los seres vivos, mediante procesos de adsorción y la formación de complejos en el medio, quedando incorporados en los sedimentos donde se encuentran en mayor concentración. El grupo de los metales pesados, incluidos metales de transición, lantánidos y actínidos, presentan propiedades metálicas, siendo el criterio más importante para su clasificación la densidad específica, la cual debe ser mayor a 5 g/cm³. Sin embargo, algunos autores consideran inapropiada esta definición, ya que la densidad específica no hace referencia a la reactividad o toxicidad de un metal. Actualmente, el término metal pesado se refiere a aquellos metales o metaloides que potencialmente

pueden causar problemas de toxicidad (Vullo DL, 2003; Covarrubias SA & Peña Cabriales JJ, 2017)

El daño causado en la salud debido a la exposición prolongada o por la bioacumulación de metales pesados y a su alta toxicidad, resulta preocupante. Esto debido a las consecuencias que pueden provocar, las cuales van desde enfermedades cutáneas, pasando por daños a órganos vitales, hasta el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Un caso importante es el registrado en Japón durante la década de los años cincuenta, en el cual la población ubicada en las orillas del río Jintsu, cercano a una zona minera de Zn, Pb y Cu, se vio afectada por el consumo de arroz cultivado en zonas contaminadas con Cd, proveniente de los relaves vertidos de las minas. Esto provocó una enfermedad conocida como *Itai-Itai* u *osteoartritis*, la cual afecta al tejido óseo. (Reyes YC et al, 2016)

Los riesgos a la salud debidos al contacto o ingestión de los principales metales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Efectos a la salud de metales pesados. (Pérez Vázquez, 2011)

Metal pesado	Efectos en la salud
Mercurio	Irritación de la piel y mucosa, así como de las vías aéreas. En intoxicaciones fuertes crónicas y a dosis bajas produce debilidad, pérdida de peso, diarrea, inflamación de encías, fatiga, sabor metálico, insomnio e indigestión. En intoxicaciones crónicas y a dosis altas produce: irritabilidad, alucinaciones, llanto, excitabilidad, depresiones, tristeza, psicosis, crisis. En casos de exposición a altas dosis en forma oral, colapsa el aparato digestivo, siendo mortal en horas.
Plomo	Las sintomatologías van desde fatiga, dolores de cabeza, óseos, musculares, trastornos del sueño, trastornos de conducta, y otros, hasta anemia, cólicos intestinales, náuseas y vómitos, enfermedad renal, impotencia sexual, delirio, esterilidad, daños al feto, hipertensión arterial, estreñimiento agudo, afectación de los nervios, enfermedad ósea, y la muerte del individuo, en el peor de los casos
Cromo	Produce afecciones sobre la piel, como dermatitis y las mucosas, principalmente de las vías respiratorias.
Arsénico	Diarrea, pigmentación cutánea, prurito generalizado, lagrimeo, vitíligo, alopecia, hiperqueratosis y edema circunscriptos. Dermatitis y queratosis en las palmas y plantas son comunes. Afecciones en el hígado, pudiendo producir ictericia. Se puede desarrollar una encefalopatía, así como sufrir daños a nivel de medula ósea. La anemia aplásica es el trastorno hematopoyético más común. MUERTE.

La contaminación debida a altas concentraciones de metales pesado es un problema que va en aumento, debido principalmente a actividades antropogénicas, entre las que se encuentran la minería, la metalúrgica, la agricultura, los automotores y el aporte natural de la corteza terrestre y en ciertos mantos acuíferos. De todas estas, la minería es una de las principales causas de contaminación, debido, principalmente al manejo inadecuado de los residuos denominados "jales mineros", lo que ocasiona problemas en el medio ambiente en estados como Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Sonora. (Covarrubias SA & Peña Cabriales JJ, 2017)

1.1 Panorama de la Minería en Zacatecas

Minera Real de Ángeles. La región minera de Noria de Ángeles está ubicada a 80 km al sureste de la ciudad de Zacatecas. El yacimiento explotado por la Minera Real de Ángeles fue aprovechado intermitentemente durante los siglos XVIII y XIX, siendo abandonado en la época de la revolución. Su explotación se llevó a cabo en un sinnúmero de angostas vetas enriquecidas con mineral argentífero, cuyo beneficio se hacía a través del tradicional método de patio.

Una de las minas de plata con mayor desarrollo mundial fue explotada y agotada en 17 años, de 1982 a 1999, aunque no se detonó el desarrollo de la región, sino al contrario, debido a la contaminación de los residuos y el consiguiente impacto ambiental se perdieron alrededor de mil hectáreas de uso agropecuario, al quedar cubiertas de una capa grisácea de Pb, As y otras sustancias tóxicas de diez a quince centímetros de espesor. (Olmos Trujillo et al, 2013).

La Zacatecana. En la época de la cepa se depositó en esta laguna los jales generados de los procesos de amalgamación de minerales conducidos por un arroyo que contenía altas concentraciones de mercurio; las tierras de la Zacatecana han sido objeto de una contaminación creciente, con mercurio, As, F, Pb y otros contaminantes, mismos que representan riesgos a la salud de la población. La laguna del Pedernalillo, como también se le conoce, localizada en el municipio de Guadalupe, Zacatecas, comprende el área central de la subregión del estado, que comprende los municipios de Cuauhtémoc, Genaro Codina, Luis Moya, Morelos, Ojocaliente, Pánuco, Vetagrande y Guadalupe. La minería en la región hasta antes de los años setenta, no fue de grandes volúmenes de extracción, ya que las capacidades de las minas no rebasaban las 100 t/día, por el método de amalgamación. Lo trascendental, fue que, durante esos 400 años, los productos de los jales, terreros y el intemperismo de las rocas, se depositaron en el Valle de Guadalupe, concentrándose los materiales aluviales a partir de 1938 en la presa La Zacatecana (Olmos Trujillo et al, 2013).

Vetagrande. Poblado ubicado en el centro del estado de Zacatecas donde se han explotado históricamente yacimientos minerales. En la actualidad, la explotación de vetas, con alto contenido de oro, plata y plomo, generan residuos que son liberados al ambiente durante el transporte del material por camiones descubiertos que propician la dispersión del polvo, provocando la contaminación por plomo en las calles y los patios de las casas que no tienen revestimiento, además a lo largo de la historia minera de esta comunidad se han depositado los jales alrededores de la población. (Olmos et al, 2013)

1.2 Lugar de estudio

1.2.1 Mina El Bote

Fue una mina subterránea en la que trabajaron un promedio de 360 personas en dos turnos; se extraían sulfuros de Pb y Zn, con subproductos de plata, oro y cobre cuyas leyes promedio eran: 0.90-1 % Pb, 1.70 % Zn, 38 g/ton Ag y 1 g/ton Au. Se estima una producción promedio de entre 18 000 y 22 500 toneladas al mes, las cuales se beneficiaban en la planta de la unidad "El Bote", mediante el método de "flotación selectiva". Los concentrados se enviaban a Industrial Minera México, en San Luis Potosí y el Zn a la empresa minera Znamex. Se contaba con reservas cuya suma entre positivas y probables es 2 628 000 ton. Las reservas posibles equivalían aproximadamente al 50 % de la cifra anterior. El yacimiento era de origen hidrotermal, en forma de vetas cuyas dimensiones aproximadas eran de 8 km de longitud por un espesor variable de 2.5 a 3 m encajonadas en rocas metamórficas de edad triásica (esquistos y pizarras). (INEGI, 1981)



Figura 1. Vista de la mina El Bote. (Google Maps, 2019)

1.2.2 Concepción del Oro, Zac.

Aquí opera la Compañía Macocozac, S. A., que explota las minas llamadas "Cabrestante", "El Tajo" y "La Mexicana", con una superficie aproximada de 8 km² de lotes denunciados, con 850 empleados y tres turnos en la planta. Se trata de yacimientos metasomáticos de contacto en forma de diseminaciones, bolsas y chimeneas con espesores variables de 6 a 200 m. La roca encajonante es la caliza. Se extraen sulfuros de oro, plata, y cobre; además se detectan molibdeno y tungsteno. Las leyes son 1 % Cu, 1 5 g/ton Ag y 1 g/ton Au. Se benefician en este distrito 1,200 toneladas diarias mediante el método de flotación selectiva. Los concentrados se envían a San Luis Potosí. Se cuenta con reservas positivas de alrededor de 8 000 000 de toneladas. (INEGI, 1981)



Figura 2. Vista panorámica de la Unidad deportiva de Concepción del Oro. (Tripmondo, 2019)

1.3 Transformaciones mediadas por microorganismos

Un componente fundamental de los ciclos biogeoquímicos son Las interacciones entre microorganismos y metales. Dichas interacciones son estudiadas en profundidad dentro de la biotecnología ambiental, con el objetivo de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de estos contaminantes. Dependiendo de su estado de oxidación y la especie que esté conformando, un microorganismo puede llevar a cabo dos transformaciones posibles. Una corresponde a la movilización del metal, pasando de un estado insoluble (metales asociados a suelos, sulfuros u óxidos metálicos) correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble en fase acuosa. Este proceso se conoce como lixiviación microbiana, mientras que la segunda corresponde a la inmovilización del metal, que consiste en el paso del estado soluble en fase acuosa a uno insoluble en fase sólida. (Vullo DL. 2003)

1.4 Movilización de metales pesados

1.4.1 Biolixiviación

Este mecanismo de solubilización se utiliza en la minería, y es mediante la acción microbiana, que los metales presentes en los minerales resultan extraídos en fase acuosa. Tal es el caso de la obtención de Cu por la oxidación de Cu_2S (calcocita) a CuSO_4 por intermedio de la acción de las bacterias *Thiobacillus ferroxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*. Desde el punto de vista de la biorremediación, el biolixiviado puede utilizarse dentro de la perspectiva de la hidrometalurgia, recuperando metales a partir de materiales sólidos contaminados como suelos, cenizas resultantes de quema de desechos, sedimentos acuáticos, etc. Este proceso se ha aplicado con éxito utilizando bacterias oxidadoras del hierro o sulfuros, como *Thiobacillus ferroxidans* o *Thiobacillus thiooxidans*, respectivamente, en la recuperación de Cu, Ni, Zn y Cd, tanto en condiciones aerobias como

anaerobias, ya que estos microorganismos pueden utilizar el catión Fe^{3+} como último aceptor de electrones en lugar del O_2 .

La biolixiviación se lleva a cabo en un ambiente ácido, con valores de pH entre 1.5 y 3. Estos valores mantienen los iones metálicos en solución, y promueven su lixiviación debido a mecanismos de oxidación y reducción. (Bosecker K, 1997)

Los sideróforos son compuestos orgánicos, tales como péptidos o ácidos orgánicos, con capacidad acomplejante, uniéndose a los metales en un proceso llamado complexólisis, la cual es un mecanismo más lento que la biolixiviación en ambientes ácidos. La biosíntesis de sideróforos también ocurre con el fin de detoxificar el entorno celular. (Vullo DL, 2003; Okoh M, 2018))

1.5 Inmovilización de metales pesados

Dentro de la gran diversidad microbiana, existen microorganismos que poseen resistencia y otros que son tolerantes a los metales. Los resistentes presentan mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, estimulados por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. De este modo, los microorganismos resistentes y tolerantes presentan gran interés al actuar como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos tienen la capacidad de extraer estos contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos se debe en gran medida a la acción de diferentes mecanismos, entre los que se encuentran: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción mediada por microorganismos. (Vullo DL, 2003)

1.5.1 Biosorción

El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente o biosorbente; adsorbente; material biológico) y una fase líquida (solvente, normalmente agua) que contiene una especie disuelta para ser absorbida (adsorbato, metal / colorantes). Debido a la mayor afinidad del adsorbente por las especies adsorbidas, esta última

es atraída y unida allí por diferentes mecanismos. El proceso continúa hasta que se establece el equilibrio entre la cantidad de especies adsorbidas ligadas a sólidos y la porción que permanece en la solución. El grado de afinidad del adsorbente por el adsorbato determina su distribución entre las fases sólida y líquida.

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados. Los microorganismos utilizados como biosorbentes retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. (Vullo DL, 2003; Ramachandra TV et al, 2005)

La biosorción implica esencialmente procesos de adsorción como la adsorción iónica, química y física. Se sabe que una variedad de ligandos ubicados en las paredes de las células bacterianas está involucrada en la quelación de metales. Estos incluyen grupos carboxilo, amina, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo. Los iones metálicos pueden ser adsorbidos formando complejos con los sitios de reacción cargados negativamente en la pared celular. Es un mecanismo de cinética rápida que no presenta una alta dependencia con la temperatura y en muchos casos puede estudiarse en detalle mediante la construcción de los modelos de isotermas de adsorción. (Ramachandra TV et al, 2005)

1.5.2 Bioacumulación

La bioacumulación es un proceso metabólicamente activo que depende de un sistema de importación – almacenamiento. Este consumo energético se genera a través del sistema H^+ - ATPasa, a través de la membrana lipídica hacia el citoplasma. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es captado mediante proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser internalizado en una vacuola, como es el caso en hongos. Además, los mecanismos de bioacumulación pueden deberse a endocitosis, canales iónicos o transporte mediado por portadores. Algunos ejemplos de este proceso son la acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccharomyces*

cerevisiae. Otros casos como el mercurio, plomo, plata cadmio y níquel también han sido reportados (Vullo DL, 2003; Tayang A & Songachan LS, 2021)

1.5.3 Biomineralización

Algunos microorganismos poseen la capacidad de precipitar metales y radio-núclidos en forma de carbonatos e hidróxidos, debido a un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo se debe al funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H^+ hacia el interior celular, así como con ligandos orgánicos tales como amina, carboxilo, hidroxilo, fosforilo y azufre que desprotonan e imparten carga neta negativa sobre la superficie microbiana provocando un aumento de pH, produciendo una alcalinización, y por lo tanto la precipitación del metal pesado. Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular, Los metales potencialmente tóxicos que tienen carga positiva se precipitan de manera no uniforme en productos minerales más estables y compactos⁶¹. (Vullo DL. 2003; Tayang A & Songachan LS, 2021)

1.5.4 Biotransformación

Este proceso genera un cambio químico sobre el metal pesado, principalmente en el estado de oxidación. Este mecanismo, que ha sido desarrollado por los microorganismos para adaptarse a los cambios en el ambiente, es de dos tipos: enzimático y no enzimático. Dentro del tipo enzimático se encuentra la biotransformación enzimática microsomal y no microsomal. En el primero de los casos, las enzimas se encuentran dentro de membrana lipofílicas, mientras que la no microsomal involucra enzimas presentes en la mitocondria. Las transformaciones se pueden clasificar dentro de distintas categorías, como oxidación, reducción, hidrólisis, isomerización, condensación, formación de nuevos enlaces carbon-carbono y la introducción de grupos funcionales. Un caso muy claro

es el ciclo del Hg en la naturaleza, donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg^{2+} a Hg^0 , y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH_3Hg^+ y $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, que son volátiles y aún más tóxicos que el propio Hg. (Vullo DL. 2003; Smitha Ms et al, 2017)

1.5.5 Quimiosorción mediada por microorganismos

Este mecanismo es similar a la biomineralización, ya que los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito primario actúa como núcleo de cristalización, en el cual se depositan los compuestos precipitados por los microorganismos, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización, formando complejos más grandes y de mejor extracción en soluciones acuosas. Estos complejos están formados por los metales que en cuestión se busca extraer y otros que se encuentran en el sitio, actuando así el núcleo de cristalización como una especie de imán. (Pérez Vázquez, 2011)

Los mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos se resumen en la figura 3.

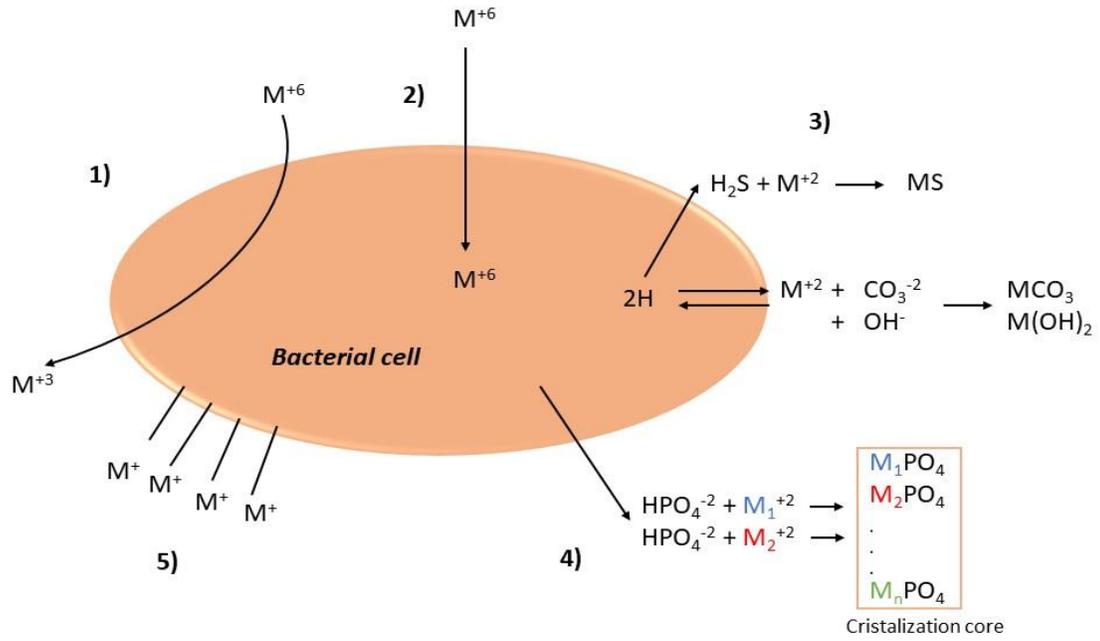


Figura 3. Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos. 1) Biotransformación. 2) Bioacumulación. 3) Biomineralización. 4) Quimisorción mediada por microorganismos. 5) Bisorción. (Vullo DL. 2003)

1.6 As

El arsénico es un Elemento químico, cuyo símbolo es As y su número atómico, 33. Se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza (cerca de $5 \times 10^{-4}\%$ de la corteza terrestre), siendo uno de los 22 elementos conocidos que se componen de un solo nucleído estable, $^{75}_{33}\text{As}$; el peso atómico es de 74.922. Se conocen otros 17 nucleídos radiactivos de As. Es uno de los elementos más tóxicos que pueden ser encontrados. La exposición a arsénico en humanos se puede dar a través de la comida, agua y aire. Además, puede también ocurrir a través del contacto de la piel con suelo o agua que contenga arsénico. (Lenntech, 2015)

La exposición al As inorgánico puede provocar varios daños sobre la salud, desde irritación del estómago e intestinos, así como de los pulmones, disminución en la producción de glóbulos rojos y blancos, cambios en la piel, hasta provocar el desarrollo de cáncer, principalmente en piel, pulmones, hígado y el sistema linfático. Además, la exposición a muy altas concentraciones de arsénico puede causar infertilidad y abortos en mujeres, así como pérdida de la resistencia a infecciones, afecciones cardíacas y en el sistema nervioso, tanto en hombres como en mujeres. Finalmente, es el arsénico inorgánico el que puede provocar daños a nivel del ADN, mientras que el arsénico orgánico no causa cáncer, ni daño al ADN. Aunque una exposición a dosis elevadas puede causar ciertos efectos sobre la salud humana, como lesión en los nervios y dolores de estómago. (Lenntech, 2015)

El arsénico se asocia con ciertos procesos de extracción de minerales, como es el caso del cobre y plomo, pudiendo integrarse al ambiente durante su extracción y fundición. También se pueden liberar a la atmósfera cantidades pequeñas de As desde plantas de carbón y desde incineradores ya que el carbón y sus productos de desecho lo contienen. (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2007).

1.6.1 Características fisicoquímicas

Las características fisicoquímicas del As se muestran a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Características fisicoquímicas del As. (Pino F, 2018)

Estado	Solido
Densidad	5.73 g/cm ³
Punto de fusión	887K (614° C)
Punto de ebullición	1090K (817° C)
Entalpia de vaporización	269.9 kJ/mol
Entalpia de fusión	34.76 kJ/mol

1.6.2 Usos del As en la minería

Las emisiones de arsénico atmosférico a partir de la fundición de cobre representan la mayor aportación de la industria minera y los metales en gran medida, y han sido el foco de las tecnologías de control de la contaminación y cada vez con mayores regulaciones. (SME, 2015)

La producción mundial de As reportada fue de 46,000 toneladas en 2014, sin embargo, la demanda de As ha ido disminuyendo desde la década de 1970, cuando las sales de As inorgánico todavía se usaban ampliamente como pesticidas. A nivel mundial, un estimado del 50% del As producido continúa utilizándose para fabricar insecticidas y herbicidas, y otro 30% se utiliza para hacer conservantes de madera de arseniato de cobre cromado (CCA) ampliamente utilizados en aplicaciones marinas. (SME, 2015)

1.6.3 Mecanismo de toxicidad

El metabolismo del As tiene un rol importante en sus efectos tóxicos, generalmente por la reducción de cationes inorgánicos, principalmente As^V a As^{III}. La reducción puede ocurrir por la presencia de glutatión (GSH), y es la arsenato reductasa, cuya naturaleza es de una glutatión-S-transferasa, la enzima encargada de llevar a cabo dicha reacción en el hígado. Los efectos tóxicos del arsénico se enlistan en la tabla 3. (Hughes. 2002)

Tabla 3. Efectos observados en humanos y animales de laboratorio después de exposición crónica a As. (Hughes, 2002)

Sistema	Efecto
Piel	Lesiones en la piel; quemaduras, queratosis
Cardiovascular	Enfermedad del pie negro (gangrena)
Nervioso	Encefalopatía, neuropatía.
Hematológico	Depresión en la actividad de la médula ósea
Endocrino	Diabetes
Renal	Degeneración del túbulo proximal, necrosis cortical y papilar

Estos efectos se deben a que el arsenato puede reemplazar al fosfato en algunas reacciones bioquímicas debido a su estructura y propiedades similares (Tawfik and Viola, 2011), siendo metabolizado en reacciones de la cadena respiratoria y en la síntesis de ATP a nivel de sustrato. (Hughes. 2002)

1.7 Pb

El plomo (Pb) es un metal pesado, de bajo punto de fusión y de color gris azulado, que se encuentra naturalmente en la corteza terrestre. Los principales usos del Pb se dan en la industria, tal es el caso de la elaboración de pilas, municiones, productos de metal (soldaduras y tuberías) y en aparatos de protección contra los rayos X. Debido a inquietudes relacionadas con la salud, en los últimos años se ha reducido la concentración de plomo en pinturas, productos cerámicos y materiales para calafatear y para soldar tuberías. Su uso como un aditivo en la gasolina se prohibió en 1996 en los Estados Unidos. (ASTDR, 2007)

Los efectos tóxicos del Pb se ven altamente reflejados en el sistema circulatorio en el sentido de alterar los sistemas que regulan la resistencia vascular, el ritmo cardíaco, el flujo y la presión sanguínea, así como alterar la síntesis de enzimas, o inhibirlas, y provocar anemia. En el sistema renal al formar cuerpos de inclusión en el túbulo proximal debido a la unión del Pb con proteínas, así como alterar la tasa de filtración glomerular. A nivel de sistema nervioso el Pb puede mimetizar los receptores de calcio alterando su homeostasis en varias vías de señalización. (Abadin H et al, 2007)

1.7.1 Características fisicoquímicas

Las características fisicoquímicas son presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Características fisicoquímicas del plomo (Pb). (Abadin H et a, 2007)

Característica	
Estado	Solido
Densidad	11. 34 g/cm ³
Punto de fusión	327° C
Punto de ebullición	1740° C)
Entalpia de vaporización	177.7 kJ/mol
Entalpia de fusión	4799 kJ/mol
Peso molecular	207.2 u

1.7.2 Pb en la minería

En 2012 la producción minera de plomo en México aumentó un 6%, alcanzando un nivel de producción no visto en 30 años. Los principales estados productores de plomo, ordenados de acuerdo a las toneladas de producción, son Zacatecas, Chihuahua y Durango, siendo la Minera Peñasquito la principal con 69, 705 toneladas de plomo en 2012. (Perez A, 2015)

1.7.3 Mecanismo de toxicidad

La toxicidad del plomo está directamente relacionada con el estrés oxidativo debido a que juega un rol fundamental en la disminución de los niveles de moléculas antioxidantes como Glutación (GSH), y enzimas como la catalasa, súper oxido desmutasa (SOD), al formar enlaces con los grupos sulfhidrilo de dichas moléculas o sustituyendo a cofactores enzimáticos, como el Zn, inactivándolas. De igual manera, al ser un ion divalente, el Pb puede sustituir a otros cationes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , e incluso al Na^+ , sustituyéndolos en vías de señalización, transporte de sustancias. (Flora G et al, 2012)

1.8 Zinc

El zinc es un oligoelemento indispensable en el metabolismo intermediario, en la multiplicación celular y en los procesos de óxido-reducción, al ser un cofactor para muchas enzimas relacionadas con el uso de energía (ATP), síntesis de proteínas y protección oxidativa. (Taboada Lugo N, 2017)

A pesar de que el Zinc es el menos tóxico de todos los oligoelementos, y aunque su margen de seguridad (diferencia entre la dosis tóxica y la dosis recomendada) es muy amplio, es necesario evaluar su toxicidad. Para el Zinc proveniente tanto de los alimentos, como del agua y suplementos es de 40 mg/día (en adultos). (Rubio C et al, 2007). A pesar de que es un elemento que no es considerado tóxico, una exposición a altas concentraciones puede resultar en efectos adversos como náuseas, vómitos, pérdida del apetito, cólicos, diarrea y dolores de cabeza. (NIH, 2016). En la tabla 5 se muestran los límites máximos recomendados de Zinc.

Tabla 5. Límites máximos recomendados de Zn por grupo de edad. (NIH, 2016)

Edad	Límite máximo (mg/día)
Bebes hasta 6 meses	4
Bebes de 7 a 12 meses	5
Niños de 1 a 3 años	7
Niños de 4 a 8 años	12
Niños de 9 a 13 años	23
Adolescentes de 14 a 18 años	34
Adultos	40

1.8.1 Características fisicoquímicas

Las características fisicoquímicas se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Características fisicoquímicas del Zn. (Lenntech, 2019)

Característica	
Estado	Sólido
Densidad	7.14 g/cm ³
Punto de fusión	419.5 °C
Punto de ebullición	906 °C
Entalpía de vaporización	115,3 kJ/mol
Entalpía de fusión	7 322 kJ/mol
Peso molecular	65.37 g/mol

1.8.2 Zinc en la minería

Las principales fuentes de Zinc se encuentran, principalmente, formando compuestos en la superficie terrestre, tales como blenda de Zinc (sulfuro de cinc o spharelita, ZnS), calamina (ZnCO₃) y Zincita (ZnO), y es encontrado por lo general en depósitos minerales junto con otros metales como el cobre y el Pb. (Greenspec, 2019)

De acuerdo a Zhang et al, 2012, los compuestos formados por el Zinc sufren una descomposición liberándose en forma de metales libres, siendo capaces de movilizarse a mantos acuíferos, suelos y plantas. Además, menciona que el nivel de Zinc en agua, suelo y cultivos exceden los límites permitidos en China, provocando, además de la contaminación del agua, que los suelos no sean viables para su cultivo y que estos acumulen altas concentraciones. (Zhang et al, 2012). Esto es confirmado por Zhou et al, 2010, quienes en un estudio realizado en una región minera en china encontraron que el índice de geo acumulación resultó ser superior a 600 ppm. (Zhou et al, 2010)

1.9 Biotecnología y biorremediación

La modificación genética de microorganismos ha tenido un gran auge, ya que pueden resultar de gran importancia contra los accidentes o los efectos causados por los fenómenos naturales. A lo largo del tiempo, la biorremediación se ha enfocado en utilizar consorcios de microorganismos para el saneamiento del agua, el suelo y otros elementos del medio ambiente. Actualmente, gracias a la biotecnología es posible realizar modificaciones en el ADN de algunas bacterias con el fin de darles la capacidad de degradar compuestos con mayor facilidad o rapidez y así lograr disminuir la contaminación y mejorar las condiciones de los ecosistemas. (Nava A, 2018)

Un estudio realizado por *Quandt et al, 2013*, demostró el papel que tiene la modificación genética en los microorganismos al utilizar *E. coli* con un operon de descafeinización modificado para su uso como biosensor en la detección de los niveles de cafeína en algunas bebidas comerciales, pudiendo tener uso en la contaminación de agua con cafeína proveniente de estas bebidas o de productos farmacéuticos.

Pero la biotecnología no solo ha servido para mejorar a estos microorganismos, ya que gracias a ella y según un estudio realizado por *Prcina M et al, 2015* en proteínas priones de células nerviosas, se logró conocer que dichas proteínas tienen una función importante en el metabolismo de metales pesados como Cu, Mn y Zn, confiriendo cierta resistencia a las células que las expresan. Esto mediante la comparación de células que expresan proteínas prion y células en las que la expresión fue inhibida.

Continuando con las bacterias, las limitaciones que conlleva el que la mayoría de los contaminantes no se encuentren aislados, si no formando complejos de varios de ellos, ha llevado a el desarrollo de diseños biocatalíticos que contienen rutas catabólicas diseñadas artificialmente. Para ello se requiere de un banco de genes que contenga las características deseadas a expresar por el microorganismo para llevar a cabo la degradación eficiente de los contaminantes. (Morad J et al. 2013)

El uso de biomarcadores ha resultado una herramienta molecular muy importante para la identificación de bacterias específicas en la naturaleza. En la actualidad, los avances en el campo de la biología molecular han contribuido al estudio de la dinámica de las comunidades microbianas presentes en el ambiente sin la necesidad de cultivarlas; algunos métodos moleculares utilizados son técnicas basadas en el estudio del ácido desoxirribonucleico (ADN) global de las comunidades, enfocándose en el uso de sondas o amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de genes catabólicos responsables de procesos de biorremediación. (Eleonora M et al, 2016)

1.10 Cambio climático y contaminación minera

La industria minera se encuentra ubicada en el primer lugar a nivel mundial en la producción de plata, además de ser la primera opción de inversión en exploración minera en América Latina y el cuarto en el mundo. Sin embargo, está teniendo un gran impacto dentro del cambio climático, debido, principalmente, a la demanda en los recursos usados por estas actividades, como los energéticos y los hídricos. (Fundar, 2017)

La minería se presenta como la industria de mayor consumo de agua y como la mayor fuente de contaminación de la misma, debido a la alteración del nivel freático y el desplazamiento de las aguas subterráneas, además de la contaminación del agua superficial y subterránea con sales minerales, sulfatos, nitratos, óxidos, aceites, grasas, lubricantes, químicos, explosivos y metales pesados (arsénico, plomo, cadmio, cromo, cianuro y mercurio). Los desechos y las presas de jales almacenan contaminantes que después se evaporan y la absorben los follajes, los árboles y las plantas; otros se vierten a los ríos o arroyos, o se filtran al subsuelo contaminando así aguas y pozos. Todo esto debido a filtraciones, derrames o fugas de aguas contaminadas. (Castro, 2013)

De igual forma, el uso de energía y las grandes cantidades emitidas de gases de efecto invernadero, hacen de la minería uno de los principales emisores de estos contaminantes, siendo las emisiones totales de GEI varían en la industria, dependiendo del tipo de recurso extraído, así como del diseño y la naturaleza del proceso minero. (Fundar, 2017)

La quema de materiales y de combustibles fósiles, la incineración, el uso de maquinaria pesada; las canchas de relaves y los gases tóxicos de la lixiviación, genera contaminación del aire. La contaminación del aire, agua, erosión, deforestación, pérdida de arroyos y agua de los pozos, entre otros factores, disminuye potencialmente la posibilidad de producir diversos cultivos, e incluso intoxicación de organismos vivos (Castro, 2013)

1.11 Evaluación del impacto ambiental

El impacto ambiental (IA) se entiende como el efecto que ocurrió en un espacio y tiempo determinados, y que se manifiesta en forma de variación, alteración, modificación o cambio en el entorno de uno o varios de sus componentes. El impacto de los proyectos de la minería se puede dividir en dos grupos: el impacto ambiental potencial durante la explotación minera y el impacto ambiental posterior al cierre de la mina. Resulta necesario que las empresas mineras consideren el diseño de métodos que tengan un impacto mínimo tanto en individuos como en el ambiente cercano, ya sea previniendo o minimizando los efectos destructivos en el inicio, explotación y al final de los trabajos en dichos lugares con los residuos generados (metales y sustancias químicas, principalmente), los cuales son la principal fuente de contaminación tanto en suelo como en mantos acuíferos. Para minas activas se han identificado tres actividades primarias que potencialmente pueden generar residuos en el medio ambiente: extracción, deshidratación y el almacenamiento de los productos extraídos. De igual forma, para minas subterráneas y a cielo abierto abandonadas, se ha identificado que el movimiento de suelo descontrolado es la mayor causa de propagación de la contaminación, además de las tres actividades mencionadas para minas activas, teniendo un mayor alcance. En México, la evaluación del impacto ambiental ha sido fuertemente influenciada por políticas internacionales, al formar parte de la declaración de Estocolmo, la declaración de Río y el tratado de libre comercio de América del Norte. Sin embargo, el proceso de evaluación de impacto ambiental continúa con su desarrollo. (Perevochtchikova y André, 2013; Namin et al, 2011)

1.12 Evaluación del riesgo ecológico y a la salud

Se define como Evaluación del riesgo ecológico (ERE) a la determinación de la naturaleza y probabilidad de efectos indeseables en animales, plantas, así como en el medio ambiente, provocados por actividades antropogénicas, las cuales causan cambios en el medio ambiente que en algunos casos son de gran importancia y que a largo plazo van en deterioro de los propios seres humanos. (SEMARNAT, 2007)

Una ERE es una forma eficaz de evaluar impactos ambientales y ecológicos derivados de emergencias ambientales, la cual por lo general consiste en los siguientes pasos:

- Caracterización ambiental del sitio donde ocurrió el percance y toda el área de influencia de la emergencia ambiental.
- Selección de contaminantes críticos y evaluación de la toxicidad de los medios ambientales a partir de bioensayos.
- Estimación del Riesgo ecológico a través de modelos matemáticos
- Selección de biomonitores contextualizado al sitio.
- Evaluación de la exposición (metales, hidrocarburos, plaguicidas, etc.) a través de biomarcadores.

Evaluación de los efectos (genotoxicidad, neurotoxicidad, disrupción endocrina, etc.) a través de biomarcadores El riesgo ambiental se estima a partir de la relación entre la exposición y los efectos (con cierto grado de incertidumbre) de un modo similar al que se hace en la evaluación de los riesgos para la salud humana. Estos efectos se estiman a partir de información generada en el laboratorio, calculando las cantidades de tóxicos liberados al ambiente y usando modelos para la estimación del destino y concentración de los químicos en los diferentes componentes del ambiente. (SEMARNAT, 2007; Espinosa Reyes y Ilizaliturri Hernández, 2015)

Zamarreño et al, 2013, realizaron una evaluación de riesgo ecológico por la presencia de mercurio en una zona minera de Chile. En dicho estudio se propone una metodología para calcular la concentración de mercurio que se volatiliza a la atmósfera partiendo de la ecuación de Penman-Monteith modificada, aplicando variables termodinámicas para el mercurio y la climatología de la zona. Dicho modelo les permitió predecir la distribución de dicho contaminante, así como determinar que en la zona pueden existir zonas con altas concentraciones de mercurio, el cual puede ser perjudicial para la población de Andacollo, Chile, cercana a la zona de estudio. (Zamarreño et al, 2013)

Por su parte, la Evaluación de Riesgos a la Salud (ERS) se propone como una metodología que permite predecir y describir la secuencia de eventos resultantes de la acción humana y la forma en que modifica los niveles de exposición de las personas a determinados factores de riesgo, caracterizando a su vez la magnitud y gravedad de las consecuencias en salud resultantes de dicha exposición. (Olmedo P et al, 2016)

El procedimiento más ampliamente aceptado de ERE ha sido propuesto por el Consejo Nacional de Investigación (siglas en inglés, NRC) de los Estados Unidos en 1983 en su documento "Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process" (también conocido como el Libro Rojo), estructurado en cuatro fases:

1. IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO. consiste en la identificación de las situaciones o agentes capaces de generar efectos adversos en la salud debido a la exposición a los mismos.
2. CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO O EVALUACIÓN DE LA DOSIS/RESPUESTA. busca describir la relación existente entre la magnitud y condiciones de exposición a un agente (dosis), así como la probabilidad y gravedad de que se produzca un efecto adverso a la salud (respuestas)..
3. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN. Se caracteriza la intensidad, frecuencia, y duración de la exposición humana a un agente presente en el medio.

4. CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO. En esta fase final, las evaluaciones de la exposición y la caracterización de la relación dosis-respuesta se combinan para estimar la probabilidad, naturaleza y magnitud del riesgo humano de acuerdo con los diferentes escenarios de exposición identificados (Olmedo P et al, 2016)

Un estudio realizado por Mejía et al, 1999 en una zona minera de San Luis Potosí para determinar el riesgo a la salud causado por contaminación de As utilizó como biomarcador el nivel de aspartato transaminasa para la evaluación del daño hepático, y de dopamina para la neurotoxicidad en ratas tratadas con residuos de la zona de estudio. De igual forma analizaron la biodisponibilidad con el nivel urinario de As en niños de la zona. Encontraron que las ratas presentaron daño hepático y neurotóxico, y que la biodisponibilidad fue positiva, ya que el 71% de los niños presentaron niveles superiores a los normales ($50 \mu\text{g}/\text{gr}$ creatinina) (Mejía et al, 1999)

1.13 Evaluación y manejo de sitios contaminados

La evaluación de riesgos en sitios contaminados se enfoca en estimar los efectos adversos y en la obtención de información necesaria para permitir la toma de decisiones respecto a la remediación del sitio, en el cual se pueden involucrar varios contaminantes, cada uno con diferentes propiedades fisicoquímicas que, aunadas a las condiciones físicas del mismo, hacen que dichos contaminantes tengan un comportamiento e incidencia de distinta manera en el medio ambiente. (SEMARNAT, 2009)

La regulación con el propósito de atender la problemática ambiental de suelos contaminados ha ido evolucionando desde sus inicios a finales de los años 1980. Actualmente es responsabilidad del gobierno federal regular y controlar la generación, manejo y disposición final de materiales y residuos peligrosos, incluyendo, específicamente, las responsabilidades, procedimientos y condiciones para la remediación de sitios contaminados. En la gestión que atiende la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) respecto a este tema, los sitios contaminados son clasificados como "Emergencias Ambientales" y "Pasivos Ambientales", según la causa y antigüedad de la contaminación. cuando la contaminación del sitio deriva de una circunstancia o evento, indeseado o inesperado, que ocurra repentinamente y que dé como resultado la liberación no controlada, incendio o explosión de uno o varios materiales o residuos peligrosos que afecten la salud humana o el medio ambiente, se habla de una Emergencia Ambiental. En aquellos sitios contaminados debido a la liberación de materiales o residuos peligrosos que no fueron remediados oportunamente para impedir la dispersión de contaminantes, y que implican una remediación obligatoria, se considera Pasivo Ambiental. También se incluye la contaminación generada por una emergencia con efectos a largo plazo sobre el medio ambiente en esta definición. (SEMARNAT, 2018)

La remediación de suelos contaminados implica diferentes actividades de acuerdo con el grado de dificultad de cada caso. Cada suelo contaminado a remediar representa un caso particular debido a las condiciones del suelo, las condiciones climáticas, el tipo de contaminante y las causas que originaron la contaminación. Sin embargo, estos sitios pueden ser evaluados pudiendo determinarse una solución más efectiva para su remediación. En la elección del proceso de tratamiento para remediar suelos se consideran los siguientes criterios:

- El tipo de contaminante: Las características físicas y químicas del contaminante determinan su tratamiento, ya que son estas propiedades las que determinan en parte la movilidad del contaminante y si tiene o no persistencia en el ambiente.
- Tipo de suelo: Las características naturales del suelo suelen determinar las características de los métodos de tratamiento a aplicar y decretan también si un contaminante podrá diseminarse en el medio ambiente. Por ello, los componentes del suelo (arcillas, arenas, gravas y rocas, entre otros), son un criterio en la selección del tipo de metodología a seguir.
- Localización y uso de suelo: son factores que inciden de manera fundamental en el nivel de remediación y el método que puede emplearse para ser alcanzados. Se debe tomar en cuenta los siguientes aspectos; ubicación geográfica y uso de suelo, fuente de la contaminación, magnitud y distribución del o los contaminantes, acceso al sitio, ubicación de asentamientos humanos, cuerpos de agua, características topográficas, clima, hidrológicas, hidrogeológicas, geológicas, edafológicas y clima.
- Aplicación de la tecnología: Los distintos procesos de remediación pueden actuar, ya sea disminuyendo la concentración del contaminante al transformarlo en compuestos no dañinos para el medio ambiente, separando el contaminante del suelo, asegurando que el contaminante no sea móvil o que la población no esté expuesta a él. La elección y uso de cualquier proceso de tratamiento en particular depende, además de los puntos antes mencionados, de la disponibilidad, confiabilidad, estado de desarrollo de la técnica y de su costo. (SEMARNAT, 2018)

2 JUSTIFICACION

La minería se encuentra entre las industrias más destructivas del mundo, generando aproximadamente 2.7 billones de toneladas de desechos al año, incluyendo los minerales propiamente extraídos, así como otras sustancias usadas en los procesos de extracción, (Young J, 1992) y México no se encuentra exento de esta problemática. Históricamente nuestro país se ha posicionado como uno de los líderes en la extracción de metales, como la plata, oro y zinc, lo que a su vez ha provocado que el impacto de esta actividad en el medio ambiente sea de consideración debido tanto a la disposición de los residuos como a los procesos de extracción. (Tetreault D, 2015)

Zacatecas es considerado como uno de los principales estados en la industria minera, siendo pionero en la producción de plomo y zinc a nivel nacional con una producción aproximada de 13 629 y 28 516 toneladas respectivamente (INEGI, 2018), por lo que la generación de residuos contaminantes de este tipo es de consideración. (INEGI, 2018)

Según un estudio realizado por Santos E et al, 2006, se determinó que en la población de La Zacatecana y Osiris en el municipio de Guadalupe, la contaminación de Pb, As y Hg resultó tener niveles lo suficientemente altos como para justificar estudios de especiación para la evaluación del riesgo de la población en el área, ya que los niveles detectados fueron ocho veces mayores a los límites permitidos (Santos E et al, 2006). Aunado a lo anterior, González D et al, 2012 confirmo las altas concentraciones de estos tres metales, además de Zn, Cu y Mn, en plantas cultivadas en estas zonas. (González D et al, 2012).

La contaminación con metales pesados supone un gran riesgo para la salud de la población cercana a estos lugares, ya que metales como el As o el Pb pueden causar enfermedades que van desde sintomatologías como náuseas o mareos, pasando por enfermedades cutáneas como la queratosis, hasta enfermedades del sistema nervioso como psicosis y daño cerebral. De igual forma se ha encontrado

que tienen efectos teratógenos y carcinógenos debido a la exposición crónica a altas concentraciones. (Jaishankar et al, 2014)

El uso de organismos con capacidad de biorremediación supone una nueva estrategia en el tratamiento de áreas contaminadas, principalmente con metales pesados, las cuales son un factor de riesgo latente tanto para la población de zonas aledañas a estos lugares como para la flora y fauna del lugar. Estudios realizados por Flores de la Torre et al, 2018 y Rodríguez Sánchez et al, 2017 en zonas contaminadas cercanas a la ciudad de Zacatecas han servido para demostrar el importante papel del uso de microorganismos y plantas en la biorremediación de dichas zonas a través de distintos mecanismos de resistencia y acumulación. (Flores de la Torre et al, 2018; Rodríguez Sánchez et al, 2017)

En el presente trabajo de investigación se propone determinar la resistencia o tolerancia de las bacterias presentes en residuos mineros, así como el mecanismo de interacción con metales pesados (Pb, Zn y As, principalmente) y la caracterización e identificación de las mismas.

3 HIPOTESIS

Los microorganismos presentes en relaves mineros contaminados poseen mecanismos de interacción metal-bacteria que les permiten adaptarse y sobrevivir a sitios contaminados, mediante la resistencia o tolerancia a concentraciones elevadas de metales pesados.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el comportamiento bacteriano en presencia de Zn, Pb, y As mediante la respuesta a diferentes concentraciones, para relacionarlo con un mecanismo de interacción bacteria metal, y proponer su uso como posible estrategia de remediación.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar el aislamiento bacteriano a partir de muestras de relaves mineros de las zonas de la mina El Bote, en la capital del estado, y en el municipio de Concepción del Oro.
- Evaluar la tolerancia o resistencia bacteriana al Zn, Pb y As.
- Determinar la concentración de Zn, Pb y As en los aislados bacterianos.
- Proponer un mecanismo de interacción probable, contrastando los resultados obtenidos con los reportados en la literatura.

5 MATERIAL Y METODOS

La metodología propuesta en este proyecto se resume en el siguiente diagrama de flujo, siendo descrita a continuación.

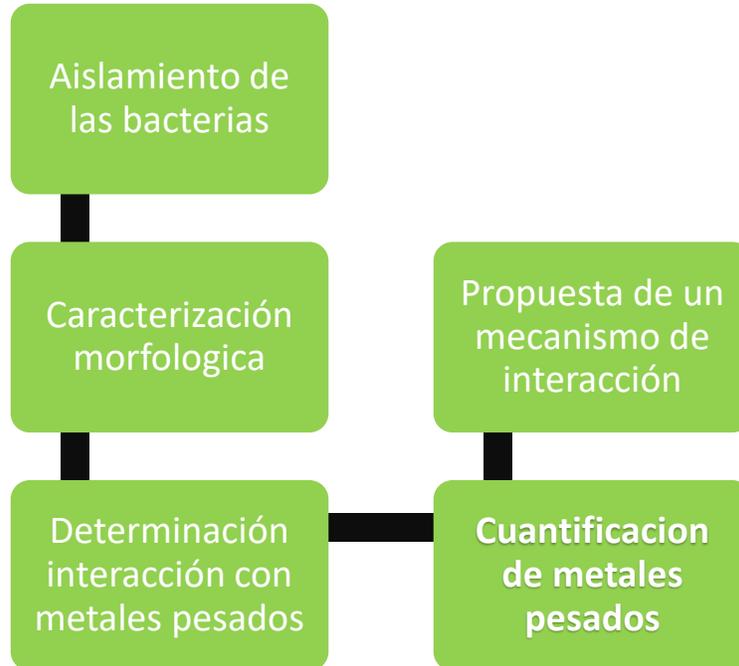


Figura 4. Metodología resumida.

5.1 Aislamiento de la bacteria

Se pesaron 5 g de cada una de las 4 muestras y se diluyeron en solución buffer de fosfatos pH 7, manteniéndose en agitación durante 24 h. posteriormente se realizó el sembrado por triplicado de cada muestra en agar nutritivo, incubándose por 24 h a 37° C en agitación. Se seleccionaron las cepas que presentaron características macroscópicas diferentes y se sembraron individualmente hasta obtener cepas puras de microorganismo (Ruangpan L, 2004)

5.2 Caracterización morfológica

Se llevó a cabo la identificación macroscópica mediante observación directa. Posteriormente se realizó la tinción de Gram para clasificarlos mediante su morfología microscópica, y así descartar las cepas que posean una morfología similar. Esta tinción está basada en la capacidad de la bacteria de retener el colorante primario Cristal Violeta debida a la composición de su pared celular, al poseer una capa de peptidoglucano que interacciona con el complejo formado por el Cristal Violeta y el yodo (complejo CV-I). Las bacterias que retienen dicho complejo se denominan Gram positivas, mientras que a las que se agrega un colorante de contraste (Safranina) se denominan Gram negativas. Éstas últimas contienen una capa de lipopolisacáridos que es alterada por la solución decolorante de alcohol, permitiendo la eliminación del complejo CV-I, haciéndolas incoloras y siendo necesaria la adición del colorante safranina. Esto permitió determinar qué tipo de pruebas que se realizaran posteriormente a las bacterias identificadas, así como saber si se trata de bacterias potencialmente patógenas. (Tortora, 2007)

5.3 Determinación de interacción con metales pesados

Se evaluó el crecimiento de los microorganismos aislados en presencia de concentraciones crecientes de los metales para determinar el desarrollo en comparación con un blanco, mediante la medición de densidad óptica, realizando mediciones a una longitud de onda de 600 nm, basándose en el principio de que la radiación será dispersada debido a la turbidez del medio de manera proporcional a la cantidad de células presentes. Se comparó con un control positivo de cada cepa sin adicionar algún metal pesado. Se basó en el método de determinación de resistencia a metales pesados, modificando las concentraciones utilizadas, únicamente con la finalidad de determinar el desarrollo de los microorganismos, y así evaluar la interacción que estos tienen con los metales. No así determinar la concentración máxima a la que son resistentes. (Maia MRG et al, 2016)

Se prepararon soluciones de Zn, As, y Pb en concentraciones de 10, 20 y 40 ppm, y se incubaron los microorganismos por triplicado para cada metal durante 24, 48 y 72 h, a 37° C. haciendo lecturas a estos mismos tiempos.

5.4. Cuantificación de metales pesados por absorción atómica

5.4.1 Preparación de soluciones madre

Se prepararon soluciones madre que contenían los metales Pb, As y Zn, a partir de sales de $\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, NaAsO_2 , y ZnSO_4 , a una concentración de aproximadamente 500 ppm de cada metal.

5.4.2 Cultivo de cepas en presencia de los metales

Se cultivaron las 10 cepas en presencia de distintas concentraciones de cada metal (10, 20 y 40 ppm) por triplicado en caldo nutritivo (CN) por un periodo de 24 – 48 h, en agitación constante a una temperatura de 37°C, para favorecer el desarrollo de los microorganismos. Posterior a este periodo de tiempo, se separó por medio de centrifugación el medio de cultivo y las bacterias desarrolladas. Dicha centrifugación se llevó a cabo a 5000 rpm durante 10 minutos, para posteriormente registrar los pesos de la biomasa restante en el tubo y almacenar el medio de cultivo.

5.4.3 Digestión acida abierta de muestras

Para la digestión del medio de cultivo se tomaron 10 ml del mismo y se colocaron en un matraz Erlenmeyer, añadiendo 40 ml de HNO_3 al 1% y 5 ml de HNO_3 conc. Instra para cada cepa. Además, se prepararon soluciones control con 45 ml de medio más la bacteria y 5 ml de HNO_3 1%, un estándar de concentración conocida de cada uno de los metales (0.025 $\mu\text{g/L}$ para As, 0.3 mg/L para Zn y 4 mg/L para Pb), y un blanco con HNO_3 1%, y otro con caldo nutritivo (CN). Se colocó una marca de aforo a 50 ml. Se sometió a evaporación por aproximadamente 3h en una campana de extracción hasta que se obtuvo un volumen aproximado de 10 ml, Posteriormente se aforó con HNO_3 1% hasta la marca de 50 ml. Para el caso de la biomasa, se añadió 1 ml de HNO_3 1% al tubo que la contenía, y deposito en un matraz de 10 ml, donde se aforó a 8 ml. Se llevó a evaporación por 2h hasta obtener un volumen aproximado de 1 ml, después se aforo a 8ml con HNO_3 1%

5.4.4 Determinación de la concentración de metales por absorción atómica.

Las muestras digeridas fueron medidas en el equipo Perkin Elmer PINAACLE™ 900T por el método de flama en el caso de Zn y Pb, y por el método de horno de grafito para As. En los casos indicados (tablas 10 y 11) se realizaron diluciones para que la concentración de la muestra estuviera dentro del rango de la curva de calibración, la cual fue elaborada con patrones internos propios del laboratorio.

6 Resultados

6.1 Aislamiento y caracterización morfológica

Se lograron aislar 9 cepas de las dos zonas de muestreo, 5 corresponden a la mina del bote (M.B.) y 4 a la zona deportiva de Concepción del Oro (C.O). Los resultados se muestran en la tabla 7 así como la muestra de procedencia de cada cepa. Del mismo modo, en la tabla 8 se muestra la morfología macroscópica del cultivo en agar nutritivo (AN) y la morfología microscópica obtenida mediante la tinción de Gram. En su gran mayoría se obtuvieron resultados de cocos Gram positivos, lo cual indica que sus paredes celulares tienen una composición más compleja, pudiendo ser donde interaccionan con los metales.

Tabla 7. Cepas aisladas y su muestra de procedencia

Zona	Muestra de suelo	Cepa
M.B.	BR26A ₂	1
M.B.	BR26A ₁ (X1)	2
M.B.	BR26A ₁ (X2)	3
C.O.	P2R2 ₂ (X3)	4
C.O.	SI ₂	5
C.O.	P2R2 ₃	6
C.O.	SI ₁	7
M.B.	BR26A ₃	8
M.B.	BR8R ₂	9

(MB: Mina El Bote; CO: Concepción del Oro)

Tabla 8. Descripción de la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.

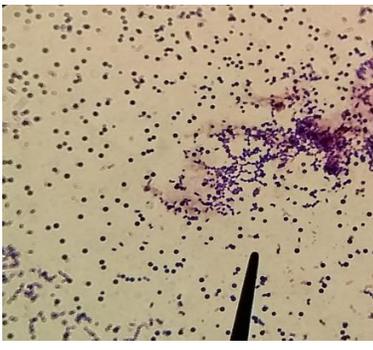
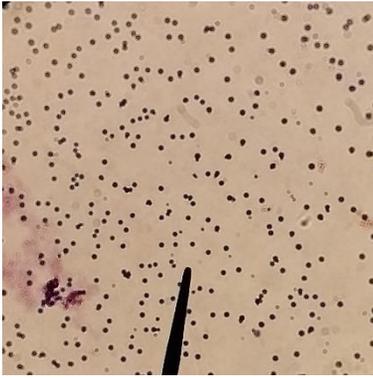
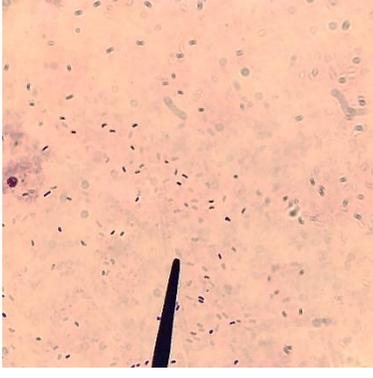
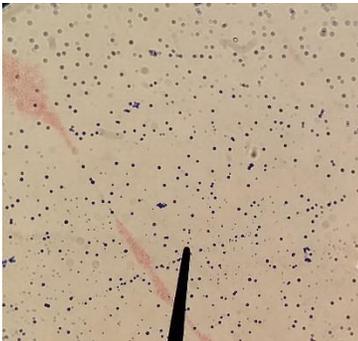
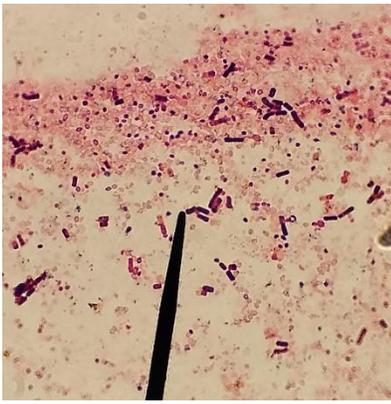
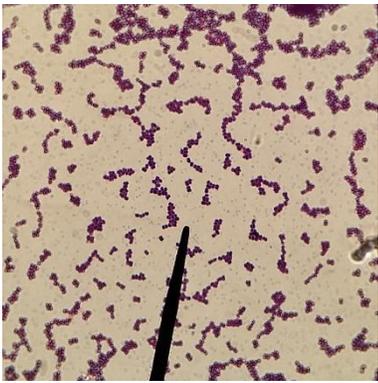
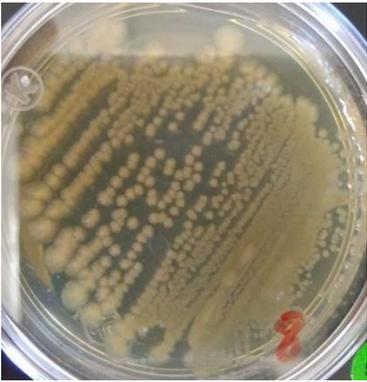
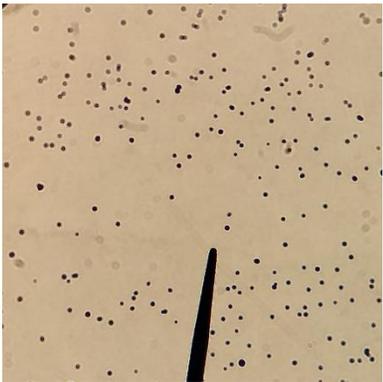
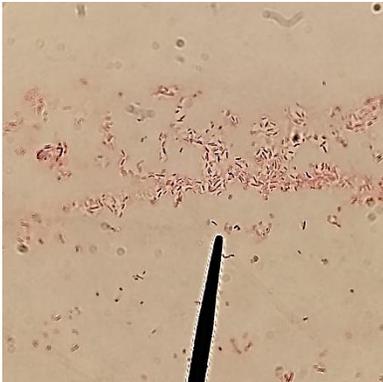
Cepa	Morf. Macroscópica (AN)	Morf. Microscópica (TG)	Descripción
1	<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>A: Cepa circular aislada con borde redondo, blanca y opaca. B: Cocos Gram positivos aislados y en pares.</p>
2	<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>A: Cepas irregulares blanquecinas, brillantes, translúcida. B: Cocos Gram positivos aislados</p>
3	<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>A: Cepas irregulares puntiformes, agrupadas, blanquecinas, translúcidas, B: Bacilos Gram positivos aislados</p>

Tabla 8. Descripción de la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.

Cepa	Morf. Macroscópica (AN)	Morf. Microscópica (TG)	Descripción
4	A 	B 	A: Cepas circulares aisladas, blancas, borde entero. B: Cocos Gram positivos aislados.
5	A 	B 	A: Cepas irregulares y circulares, blancas brillosas. B: Bacilos Gram positivos agrupados en pares y cocos Gram positivos aislados.
6	A 	B 	A: Cepas circulares blancas, opacas. B: Cocos Gram positivos agrupados en estrepto y sarcinas.

(Continuación)

Tabla 8. Descripción de la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.
(Continuación)

Cepa	Morf. Macroscópica (AN)	Morf. Microscópica (TG)	Descripción
7	<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>A: Cepas irregulares, opacas, apariencia lechosa B: Cocos Gram negativos aislados y agrupados en pares.</p>
8	<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>A: Cepas circulares aisladas, opacas B: Cocos Gram positivos aislados</p>
9	<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>A; Cepas irregulares, blancas, traslucidas con borde lechoso. B: Bacilos Gram negativos aislados.</p>

Se obtuvieron 9 cepas del aislamiento de ambos sitios, obteniéndose 5 y 4 cepas de cada lugar, respectivamente. De estas 9 cepas, 4 de las 5 provenientes de la mina el Bote resultaron ser Gram positivas, al igual que 3 de las 4 cepas provenientes de la unidad deportiva de Concepción del Oro, resultando en total 7 cepas Gram positivas y dos Gram negativas. De las 9, 8 tuvieron morfología de cocos.

6.2 Interacción con metales pesados.

Se realizaron las mediciones de los cultivos de las 10 cepas en caldo nutritivo, añadiendo volúmenes tales que se alcanzaran concentraciones conocidas (10, 20 y 40 ppm) partiendo de soluciones madre de $\text{CH}_3(\text{COO})_2\text{Pb}$, NaAsO_2 y ZnSO_4 con una concentración de 500 ppm, a una longitud de onda de 600 nm comparándolos con un cultivo control sin metal. Esto para determinar a qué concentraciones se obtenía un mayor crecimiento de los microorganismos, lo cual es indicativo de que las bacterias, posiblemente, sean capaces de desarrollar mecanismos que les permitan crecer en el medio en presencia de los metales.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas de dos vías, teniendo como variables las distintas concentraciones y los distintos tiempos, obteniendo tanto datos paramétricos como no paramétricos, y encontrando diferencias significativas entre el cultivo control y los cultivos en presencia de los distintos metales pesados en algunas de las cepas. Esto para determinar las condiciones óptimas en las que las cepas que presentaron un mayor crecimiento serán cultivadas para los ensayos posteriores. Los resultados de las mediciones se muestran a continuación en las figuras 2 a 11.

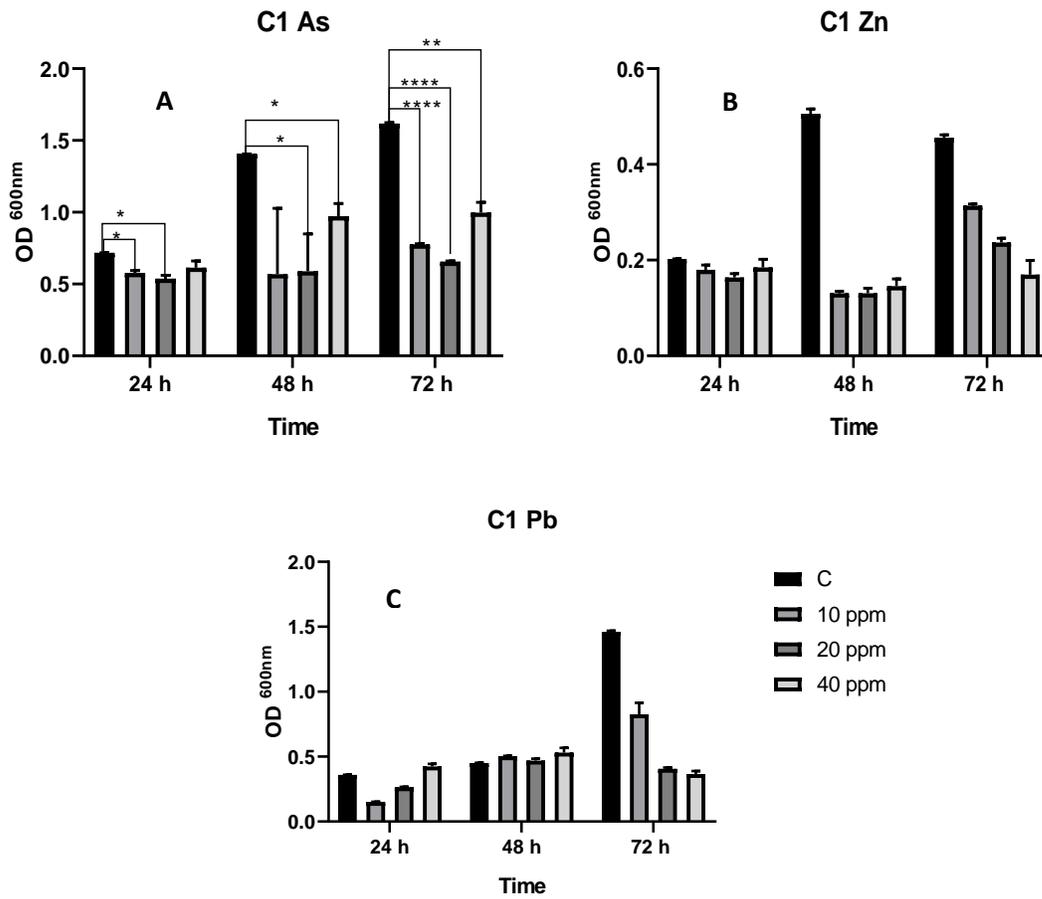


Figura 5. Interacción con metales de la cepa 1. Se muestra poco crecimiento en presencia de los distintos metales.

Para el caso de la cepa 1 se muestra muy poco desarrollo en presencia de los tres metales, siendo claramente mayor el desarrollo en el control sin metal, incluso al mayor tiempo de incubación. (figura 5)

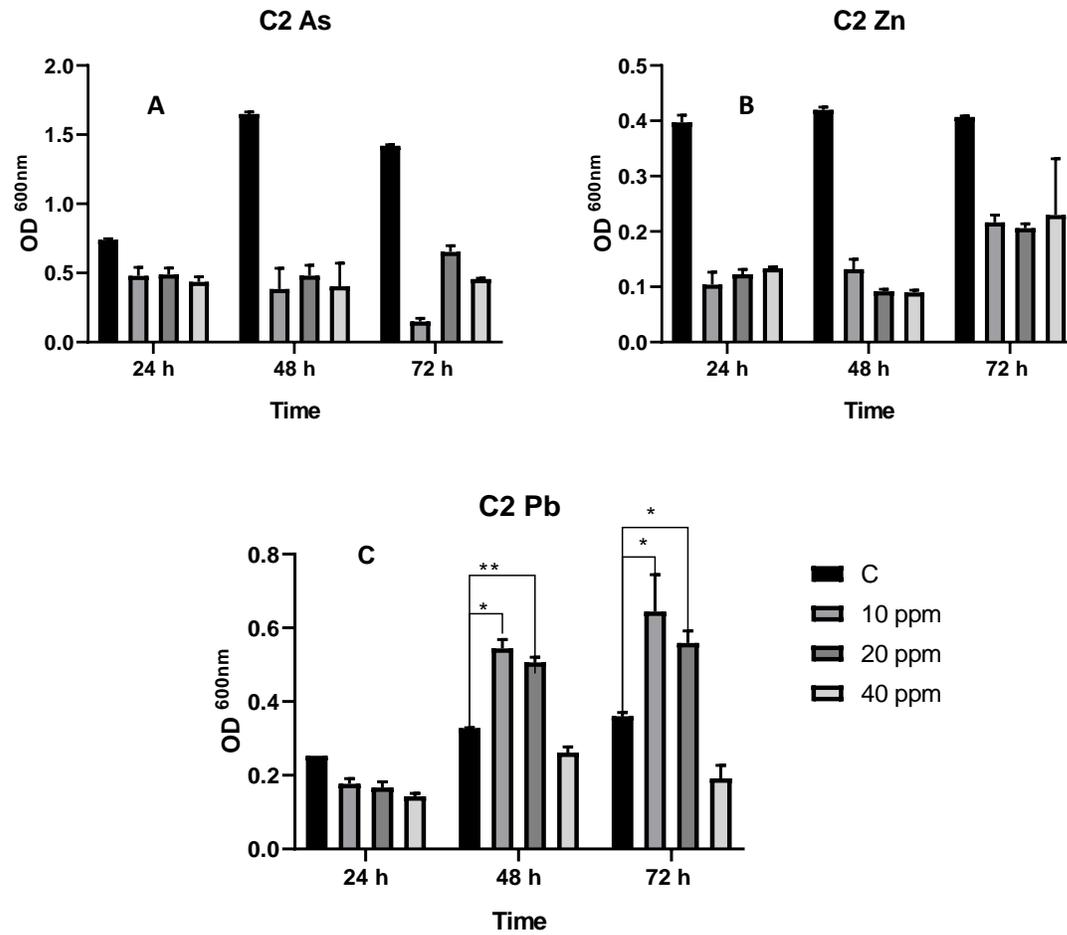


Figura 6. Interacción con metales de la cepa 2. A), se observa un menor crecimiento en presencia de As que en el control B) poco desarrollo en presencia de As y Zn; C) alto desarrollo en presencia de Pb

Para la cepa 2 se observó un mayor desarrollo en presencia de Pb a partir de las 48 h de incubación. De igual forma se observó buen desarrollo en presencia de Zn (figura 6).

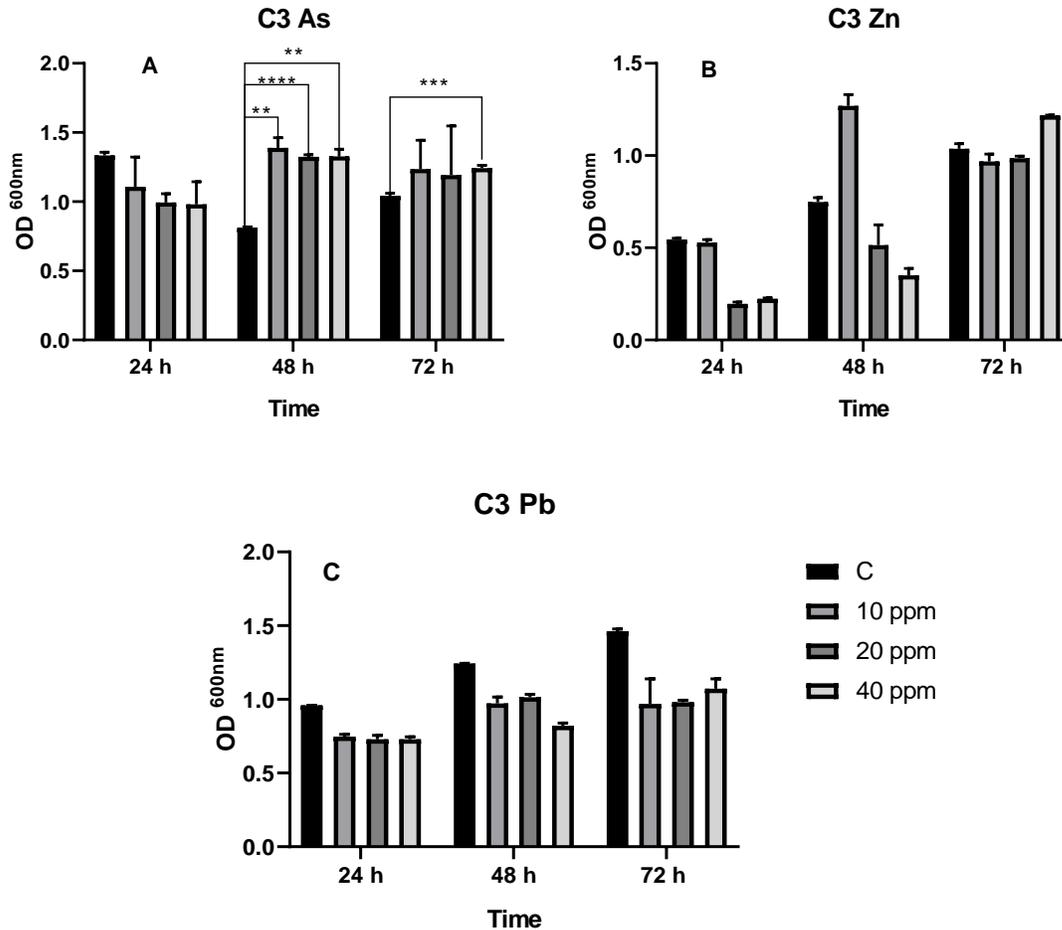


Figura 7. Interacción con metales de la cepa 3. **A.** gran desarrollo en presencia de As a las 48 h de incubación en todas las concentraciones, **B.** Se observa un mayor desarrollo en presencia de; **C.** menor desarrollo en presencia de Pb

Para la cepa 3 se observó gran desarrollo en presencia de As a las 48 h de incubación en todas las concentraciones, a 72 h es menor el desarrollo, pero de igual manera es mayor que el control. De igual forma se observa un mayor desarrollo en presencia de Zn a una concentración de 10 ppm a las 48 h de incubación al igual que a 40 ppm a las 72 h y menor desarrollo en presencia de Pb comparado con el control.

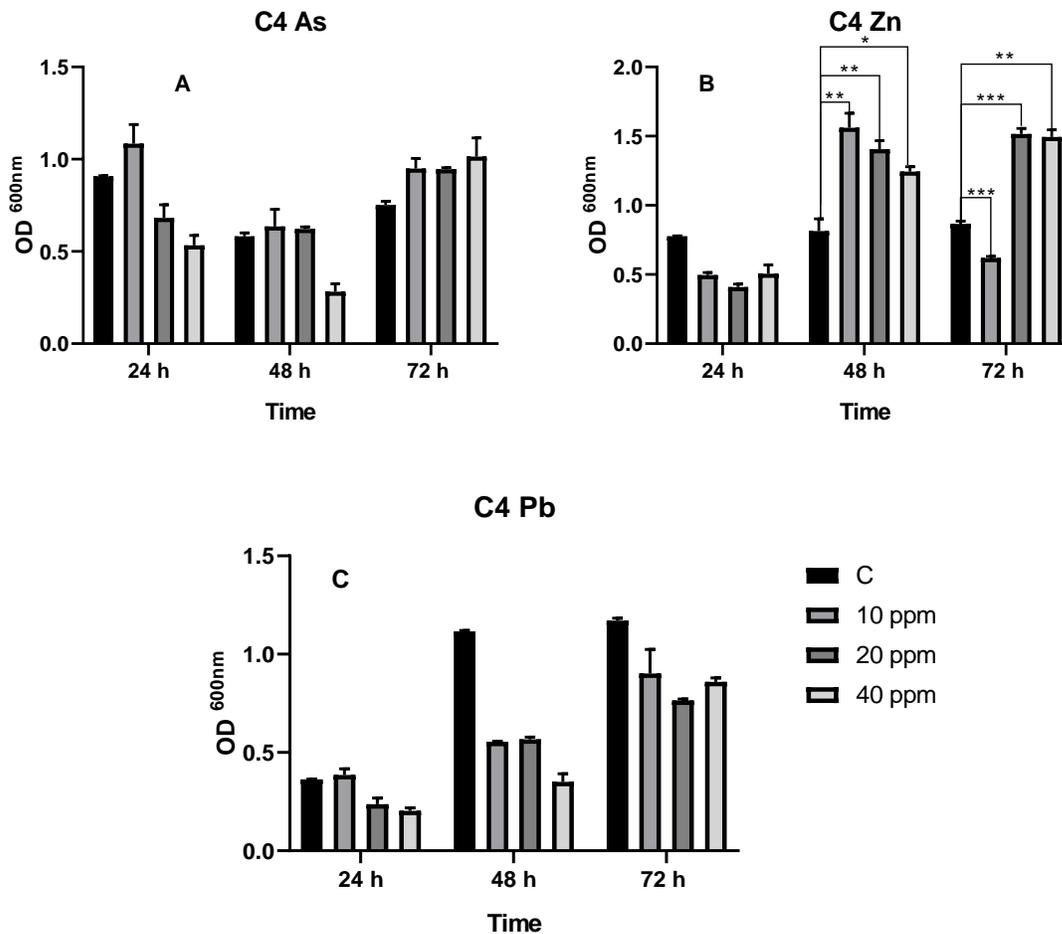


Figura 8. Interacción con metales de la cepa 4. **A.** se observa un mayor desarrollo a las 72 h de incubación, de manera ascendente en las concentraciones usadas. **B.** el mayor desarrollo se dio a las 48 h con 10 ppm de Zn.

Los resultados de la cepa 4 muestran un mayor desarrollo a las 72 h de incubación, de manera ascendente en las concentraciones usadas. Mientras que, en el caso del Zn, el mayor desarrollo se dio a las 48 h con 10 ppm de Zn, sin embargo, a las 72 h se registró un gran desarrollo a partir de 20 ppm. En el caso del Pb el desarrollo fue menor al control (figura 8).

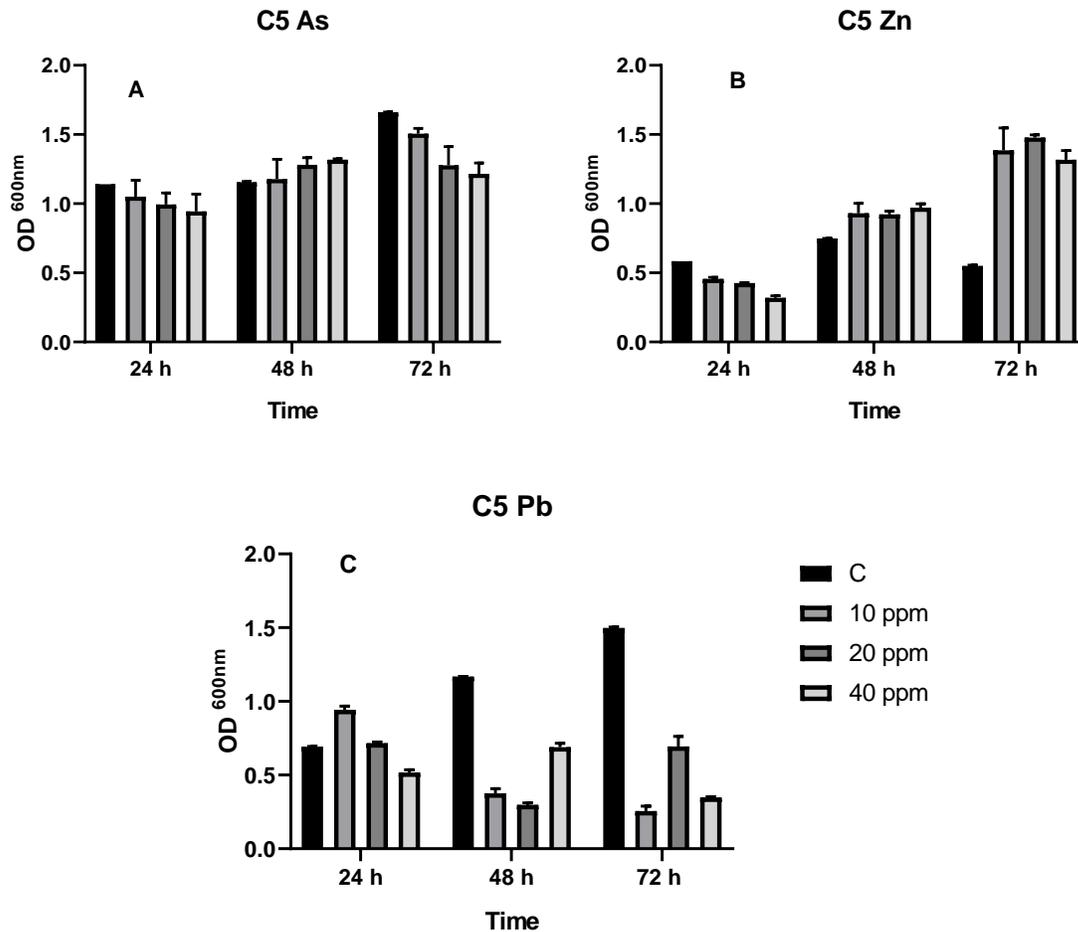


Figura 9. Interacción con metales de la cepa 5. **A.** se observa mayor desarrollo a las 48 h. **B.** el mayor desarrollo se observó a las 72 h **C.** el mayor crecimiento se observó con 10 ppm a 24 h de incubación, sin embargo, es muy pobre en presencia de Pb a las 48 y 72 h.

Para la cepa 5 se observa un buen desarrollo en los tres tiempos de incubación, observándose el mayor a las 48 h, el mayor en presencia de Zn desarrollo se observó a las 72 h, aunque el control fue menor comparado con el de las 48 h, mientras que el mayor crecimiento se observó con 10 ppm a 24 h de incubación, sin embargo, es muy pobre en presencia de Pb a las 48 y 72 h (figura 9).

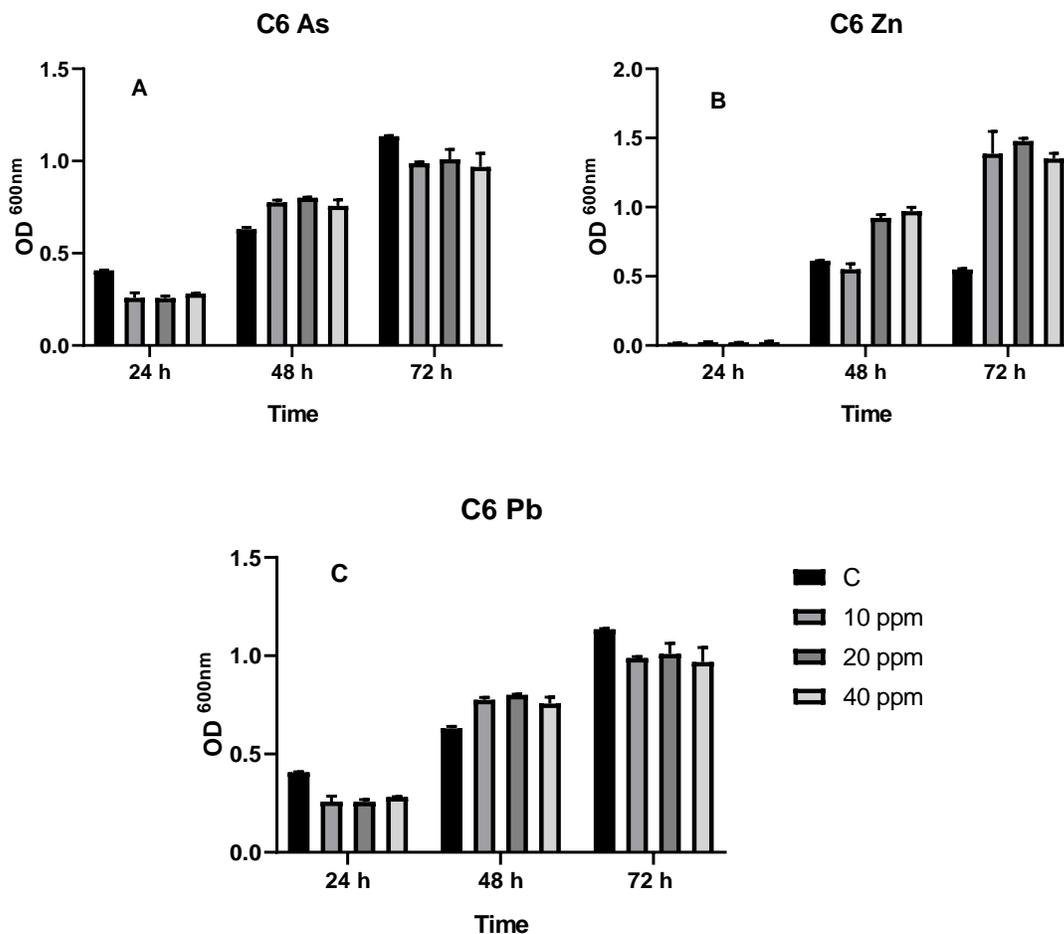


Figura 10. Interacción con metales de la cepa 6. **A.** Se observa un mayor crecimiento a las 48 h con una concentración de 20 ppm. **B.** mayor desarrollo se dio a las 72 h, **C.** se dio un mayor desarrollo a partir de las 48 h de incubación.

En el caso de la cepa 6 Se observa un mayor crecimiento a las 48 h con una concentración de 20 ppm. Mientras que para el Zn mayor desarrollo se dio a las 72 h, teniendo como patron el control, el cual es similar al de las 48 h, donde el desarrollo se dio de mejor manera a partir de 20 ppm. Por último, en el caso del Pb se dio un mayor desarrollo a partir de las 48 h de incubación, continuando a las 72 h, pero siendo menor que el control.

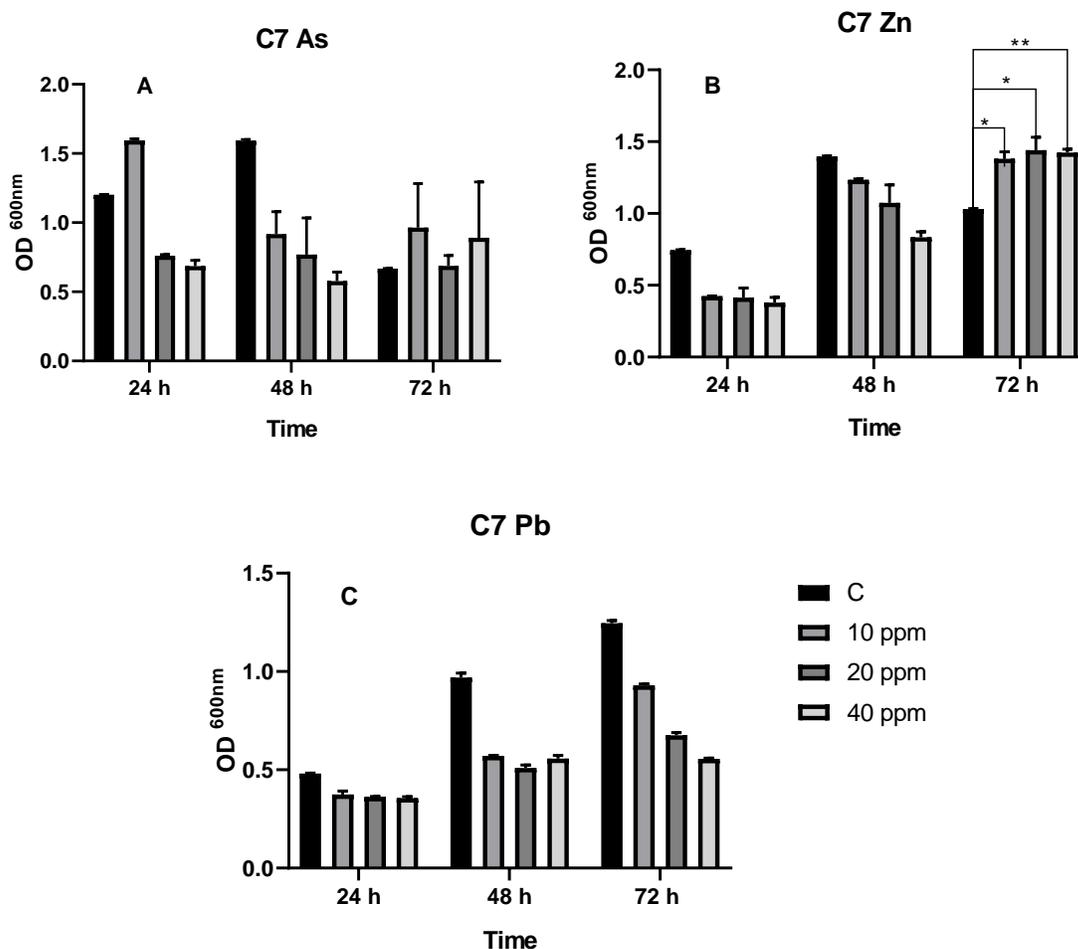


Figura 11. Interacción con metales de la cepa 7. **A.** se observa mayor desarrollo a las 24 h **B.** a partir de las 72 h se obtuvo el mayor desarrollo **C.** poco desarrollo en presencia de Pb.

La cepa 7 tuvo mayor desarrollo a las 24 h, con una concentración de 10 ppm, posteriormente el desarrollo disminuye gradualmente, incluso en el control sin As. En el caso del Zn, a partir de las 72 h se obtuvo el mayor desarrollo, sin embargo, el control disminuyó su densidad óptica, mientras que el desarrollo en presencia de Pb fue pobre en todas las concentraciones utilizadas y tiempos de incubación (figura 11).

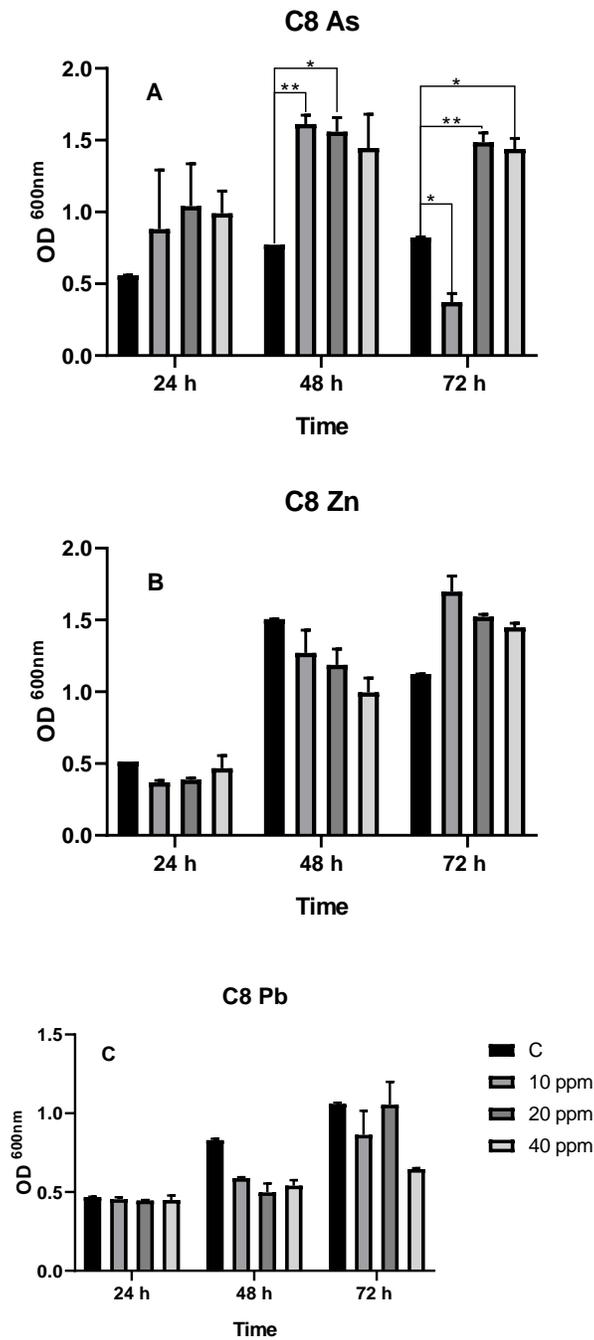


Figura 12. Interacción con metales de la cepa 8. **A.** gran desarrollo desde las 24 h de incubación. **B.** el desarrollo máximo se dio a las 72 h. **C.** el desarrollo fue máximo a las 72 h.

Se observó gran desarrollo desde las 24 h de incubación, siendo máximo a las 48 h con una concentración de 10 ppm, y manteniéndose a las 72 h, salvo a 10 ppm. Para el Zn, el desarrollo máximo se dio a las 72 h, requiriendo así un mayor tiempo en presencia de Zn. Finalmente, el desarrollo fue máximo a las 72 h, siendo máximo a 20 ppm de Pb (figura 12).

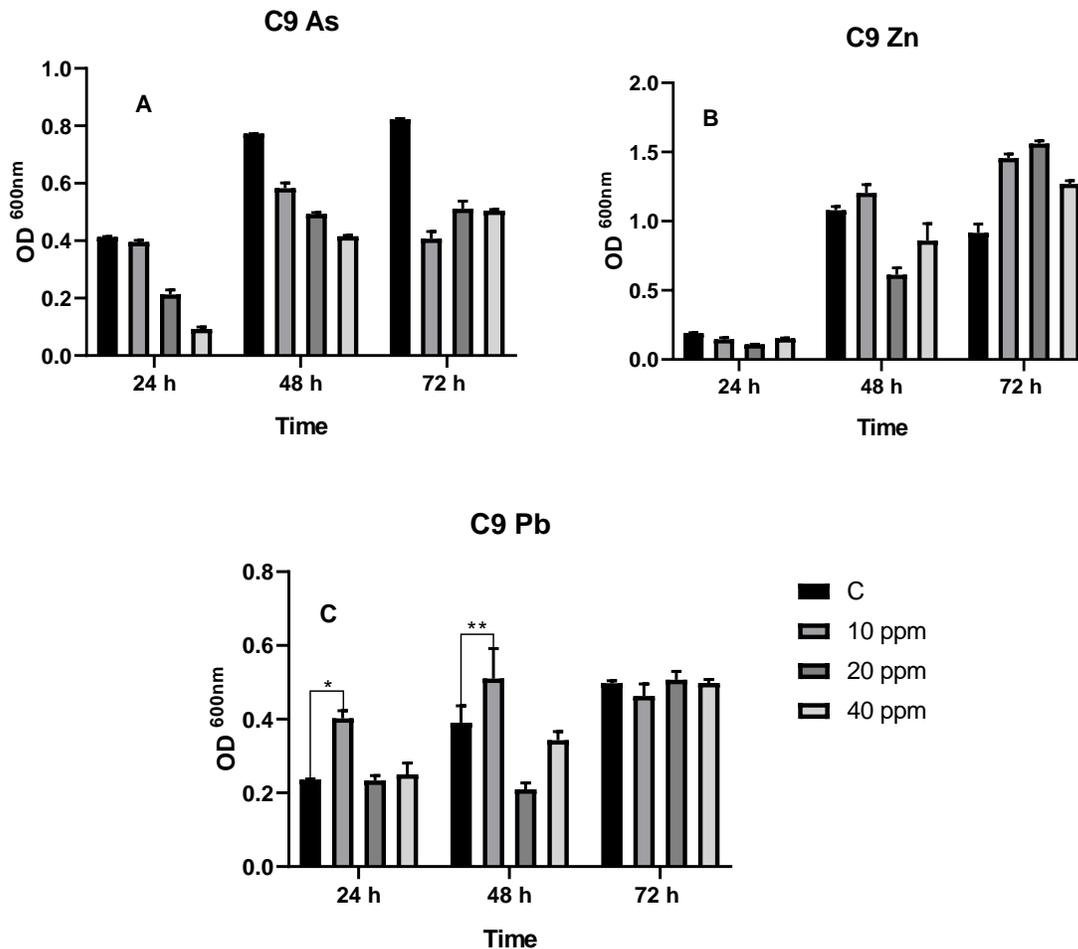


Figura 13. Interacción con metales de la cepa 9. **A.** Se observa poco desarrollo en presencia de As. **B.** El mayor desarrollo se alcanzó a las 72 h. **C.** Se presentó un mayor desarrollo con una concentración de 10 ppm, a los distintos tiempos de incubación, y manteniéndose a las 72 h sin diferencias significativas.

Se observa poco desarrollo en presencia de As, incluso a la mínima concentración empleada. El mayor desarrollo en presencia de Zn se alcanzó a las 72 h, con una concentración de 20 ppm. Se presentó un mayor desarrollo en presencia de Pb con una concentración de 10 ppm, a los distintos tiempos de incubación, y manteniéndose a las 72 h sin diferencias significativas (figura 13).

Se seleccionaron las cepas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 ya que presentaron una mejor interacción con los metales utilizados al registrarse un mayor crecimiento en presencia de las distintas concentraciones de los metales para su posterior análisis y cuantificación mediante espectroscopia de absorción atómica. Dicha determinación se realizará en el medio de cultivo y la bacteria por separado. Las cepas seleccionadas se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Cepas seleccionadas para la cuantificación de Pb, Zn y As en medio de cultivo y bacteria mediante absorción atómica.

Metal	Concentración [ppm]	Cepas
Pb	20	2 y 9
Zn	40	4 y 7
As	40	3
	20	8

6.3 Cuantificación de metales pesados

Cuantificación de metales pesados

Los resultados de las determinaciones se muestran en las tablas 10 y 11, incluyendo el triplicado de las muestras más el triplicado que arrojó el equipo. De igual forma, en las figuras 5, 6 y 7 se muestra la distribución final de la concentración total de los metales en el medio de cultivo y en la biomasa. La concentración final se determinó realizando los siguientes cálculos:

Medio de cultivo

$$Pb \left[\frac{mg}{L} \right] = (lectura \text{ del equipo} - blanco)(5)$$

$$Zn \left[\frac{mg}{L} \right] = (lectura \text{ del equipo} - blanco)(100)$$

$$As \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{(lectura \text{ del equipo} - blanco)(100)}{1000}$$

Bacteria

$$Pb \left[\frac{mg \text{ Pb}}{g \text{ bac}} \right] = \frac{(lectura \text{ del equipo} - blanco)(FD)(2ml)}{1000ml(\text{peso bacteria } (g))}$$

$$Zn \left[\frac{mg \text{ Zn}}{g \text{ bac}} \right] = \frac{(lectura \text{ del equipo} - blanco)(FD)(2ml)}{1000ml (\text{peso bacteria } (g))}$$

$$As \left[\frac{mg \text{ As}}{g \text{ bac}} \right] = \frac{(lectura \text{ del equipo } (\frac{\mu g}{L}) - blanco) (100)(0.25)(2ml)}{(1000 \mu g)(1000ml)(\text{peso bacteria } (g))}$$

Se determinó la concentración por triplicado de los tres metales a determinar, así como la concentración real del metal en el medio de cultivo, obtenida a partir de las fórmulas antes mencionadas. En dichas formulas se contemplan las diluciones realizadas durante la digestión. Así mismo se determinó la concentración en el equipo de absorción atómica para las muestras de biomasa de cada una de las cepas aisladas. De igual forma, se determinó la concentración real de cada uno de los tres metales en estudio, además de realizar el cálculo de la cantidad de metal en relación a la biomasa obtenida. Esto último se llevó a cabo realizando la medición del peso por triplicado de cada cepa y utilizando este valor promedio para realizar la relación entre la concentración real de cada metal multiplicada entre el peso de la biomasa.

Los resultados se muestran gráficamente en las figuras 14, 15 y 16. En estas se muestra, para cada metal, la comparación de la concentración determinada en las cepas analizadas tanto en el medio de cultivo como en la biomasa bacteriana, comparándolas con la concentración total utilizada durante la incubación de las cepas.

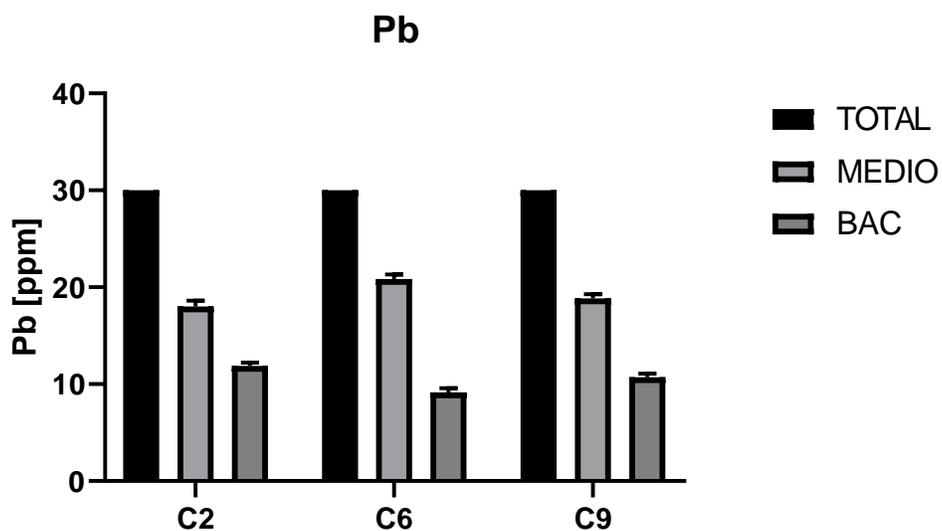


Figura 14. Concentración de Pb en las cepas 2, 6 y 9. Se muestra la comparación entre la concentración en el medio de cultivo y en la biomasa (BAC), comparado con la concentración total utilizada (30 ppm). En los tres casos la concentración de Pb fue mayor en el medio de cultivo que en la biomasa.

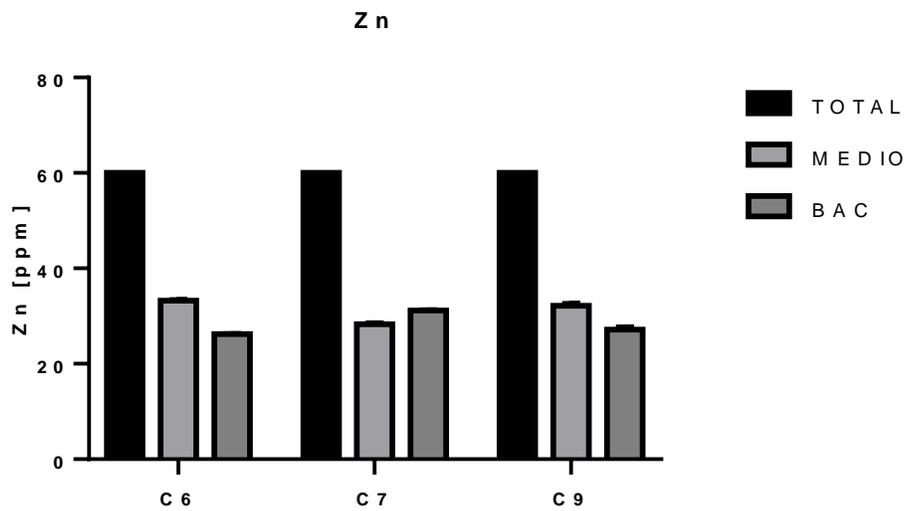
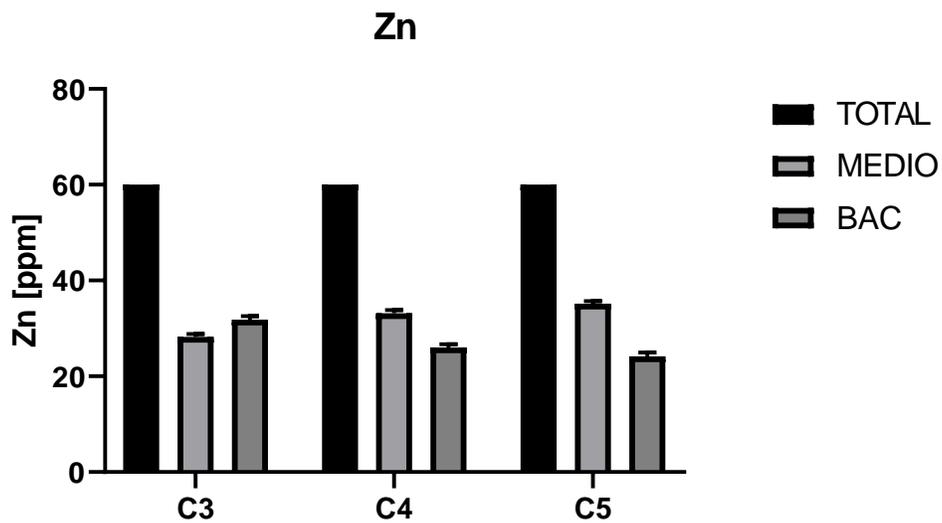


Figura 15. Concentración de Zn en las cepas 3, 4, 5, 6 y 10. Se muestra la comparación entre la concentración en el medio de cultivo y en la biomasa (BAC), comparado con la concentración total utilizada (60 ppm). Se muestra que en la cepa 7 y 3 existe una mayor concentración de este metal en la bacteria.

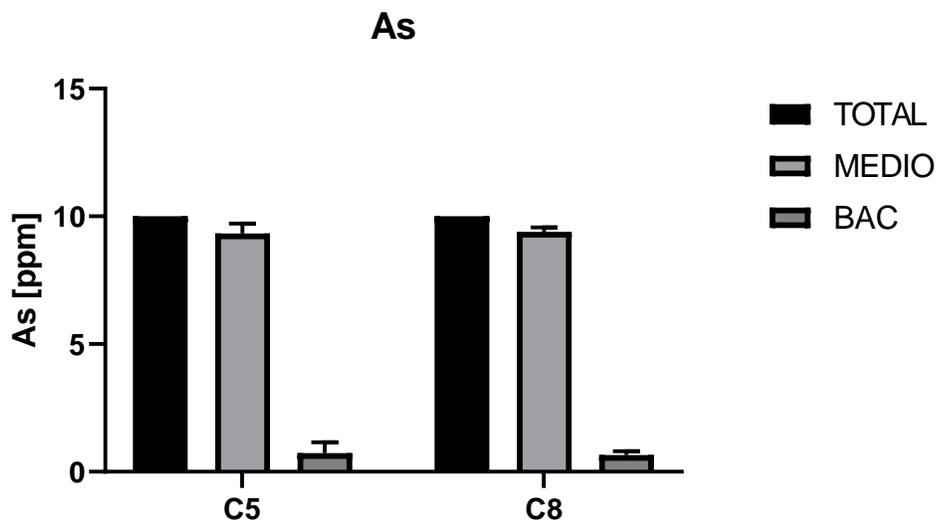
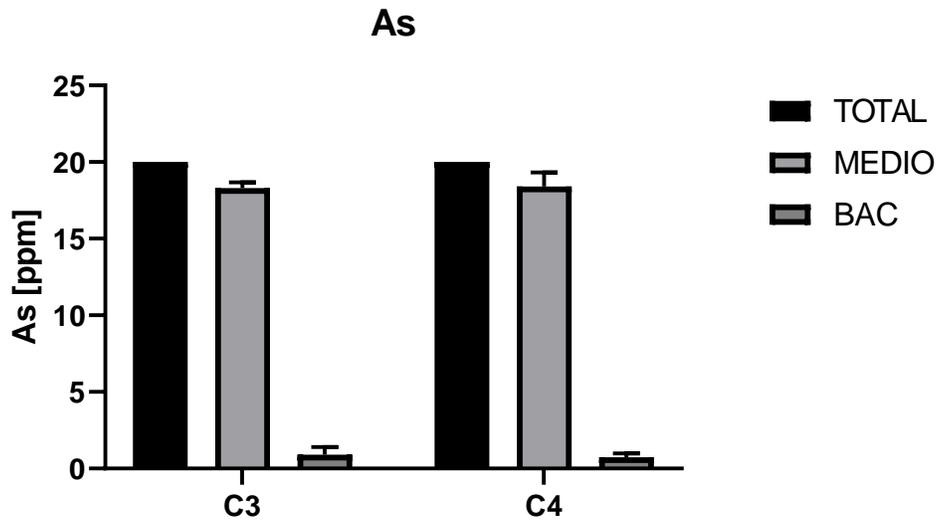


Figura 16. Concentración de As en las cepas 3, 4, 5 y 8. Se muestra la comparación entre la concentración en el medio de cultivo y en la biomasa (BAC), comparado con la concentración total utilizada (10 ppm). La mayor concentración se encontró en el medio de cultivo en todas las cepas.

Los resultados obtenidos muestran que, de las tres cepas seleccionadas para desarrollar en presencia de Pb, cepas 2, 6 y 9, tuvieron una mayor concentración de este metal en el medio de cultivo (figura 14). Sin embargo, la cepa 2 tuvo una mayor concentración de Pb en la biomasa comparada con las cepas 6 y 9.

En el caso de las cepas cultivadas en presencia de Zn, fueron las cepas 3 y 7 las que tuvieron una mayor concentración de este metal comparado con el medio de cultivo (figura 15)

En tanto, para el caso del As, la mayor concentración se determinó en el medio de cultivo, mostrando poca afinidad a este metal por parte de las bacterias que tuvieron un mayor desarrollo en presencia del mismo (figura 16)

7 Discusión

Los resultados obtenidos en el asilamiento coinciden con varios autores que reportan el hallazgo de bacterias del tipo Gram positivos en zonas contaminadas con metales pesados e hidrocarburos (Srivastava et al, 2014; Lazaroaie, 2010; Kumar et al, 2011), que son los encontrados en mayor cantidad en las zonas de estudio (cepas 1, 2, 4, 6 y 8). Durante esta etapa se realizaron aislamientos de manera secuencial, así como una dilución de las muestras, para obtener cepas puras de un mismo microorganismo.

En las pruebas de crecimiento en presencia de metales se encontró que algunas cepas presentaron un mayor crecimiento en presencia de Zn y As principalmente, lo cual coincide con algunos autores como Wolf-Simmon et al (2011), quienes encontraron un tipo de bacterias que utilizaba el As como nutriente en lugar de fosforo al utilizarlo en sus procesos metabólicos como aceptor final de electrones, o Alaniz Andrade et al (2017), Valenzuela et al (2009) y Dey et al (2015), quienes encontraron distintos tipos de bacterias que fueron capaces de desarrollarse en presencia de As a concentraciones por mucho superiores a las utilizadas en este estudio. El hecho de elegir concentraciones menores a las mínimas reportadas por Flores de la Torre et al (2018) en la zona de la mina El Bote y la SEMARNAT en la NOM-147, fue para evitar generar residuos que pudieran ser potenciales fuentes de contaminación.

En el caso del Zn, se encontró que las cepas presentaron un crecimiento aun mayor que en el caso de As, al ser un elemento esencial en los procesos celulares (Taboada Lugo, 2017), y lo cual coincide con lo reportado por Ahemad y Malik (2012), quienes encontraron una bacteria capaz de bioacumular Zn y Cu. De igual forma se tiene una relación con Dinesh et el (2018), Fan et al (2018) y Plociniczak et al (2019), quienes encontraron bacterias resistentes a Zn y que además promueven el crecimiento de distintas especies de plantas, favoreciendo la acumulación de este metal, y que a su vez es una de las perspectivas del presente proyecto en colaboración con otros futuros proyecto en la zona de estudio.

Para el plomo se encontró un pobre crecimiento en la mayoría de las cepas, ya que solo dos presentaron desarrollo en presencia de este metal. Jiang et al (2019) encontraron que el Pb resulto ser toxico para la bacteria *S. pasteurii*. Al inhibir su crecimiento a concentraciones mayores a 30 mM, además de reducir su porcentaje de remoción, el cual era mayor a concentraciones bajas. En dos cepas, C2 y C9 (figuras 3y 10), se encontró gran desarrollo a concentraciones de 10 ppm, correspondiendo a lo reportado por Zhang et al (2011) quienes reportaron el hallazgo de una bacteria aún sin identificar, que es capaz de desarrollarse en plantas que han crecido en ambientes contaminados por Zn y Pb, ayudando al mismo tiempo a incrementar el crecimiento de dichas plantas, y que al igual que en el caso del Zn es una de las perspectivas del presente proyecto.

Durante la cuantificación de los metales en las cepas seleccionadas de acuerdo a su crecimiento en las distintas condiciones que se establecieron en los estudios de desarrollo, la cantidad de biomasa a utilizar fue poca, con un aproximado de 0.2 a 0.4 g, por lo que se decidió utilizar la cantidad total de biomasa generada en cada tubo.

Como se observa en la figura 16, las cepas en presencia de Pb obtuvieron una mayor concentración de este metal en el medio de cultivo en comparación con la biomasa. Sin embargo, la concentración de metal encontrada en esta última muestra que el metal esta interaccionando de alguna manera con las bacterias de las cepas 2, 6 y 9, siendo en la primera de estas la que mayor concentración presentó en comparación con las otras dos. Aunado a lo anterior, en un estudio realizado por Syed & Chinthala (2015), se encontró una variedad de la especie *Bacillus* que era capaz de bioabsorber el Pb a una concentración de 1000 ppm, y cuya determinación se llevó a cabo mediante la espectrofotometría de absorción atómica. En dicho estudio se estudiaron tres metales distintos (Cd, Cu y Pb) siendo el Pb el que se encontró en mayor concentración en tres cepas de distintos bacilos con una reducción de hasta 87% de la concentración inicial de este metal. Siendo contrario a los resultados obtenidos en el caso del Pb, donde la mayor concentración se encontró en el medio de cultivo.

El caso del As fue similar al del Pb, encontrando una mayor concentración en el medio de cultivo, salvo que en este caso la concentración en la bacteria fue mucho menor, lo cual es contradictorio con Taran et al (2019), quienes en sus respectivos estudios encontraron una gran resistencia a este metal logrando una remoción de 77% en una concentración de 150 ppm por parte de la bacteria del genero *Bacillus*, con un máximo de 91% en una concentración de 90 ppm, mientras que es similar a lo reportado por Nath et al (2017), quienes encontraron que las cepas aisladas en un rio de la india tuvieron crecimiento hasta una concentración de 0.5 ppm, y no mostraron una degradación de As en el medio de cultivo, lo que llevo a indicar el desarrollo de tolerancia al metal por parte de estas bacterias. Resulta interesante ya que en el estudio realizado se utilizó una concentración hasta 40 veces mayor.

Para el caso del Zn, un estudio realizado por Vijayadeep & Sastry (2014) mostró que la bacteria *E. coli* tuvo un mayor crecimiento en presencia de Zn, comparado con metales pesados como Cu, Cd y Hg, y a su vez retuvo dicho metal en un 40%. Esto es similar a lo encontrado en este estudio, y lo cual se puede deber a que el Zn es un elemento utilizado por muchos organismos como parte fundamental en sus ciclos metabólicos al actuar como cofactor en muchas reacciones, siendo un nutrimento esencial para el crecimiento y proliferación de los mismos.

Los resultados obtenidos hasta esta etapa son los esperados, ya que se obtuvieron concentraciones mayores de los metales de los cuales se reporta una mayor concentración en la mina de El Bota por Flores de la Torre et al (2017) como lo son el Pb y el Zn.

8. Conclusiones

Se llevó a cabo el aislamiento e identificación de 9 cepas a partir de muestras de la mina El Bote en Zacatecas y de los alrededores de la unidad deportiva del municipio de Concepción del Oro, obteniéndose 5 y 4 cepas de cada lugar, respectivamente. De estas 9 cepas, 4 de las 5 provenientes de la mina el Bote resultaron ser Gram positivas, al igual que 3 de las 4 cepas provenientes de la unidad deportiva de Concepción del Oro, resultando en total 7 cepas Gram positivas y dos Gram negativas.

En presencia de As, tanto de los aislados provenientes de la mina El Bote como de los de Concepción del Oro presentaron una disminución en su desarrollo en un 25% en función del tiempo comparados con el control, en las distintas concentraciones utilizadas, lo cual fue coincidente con los resultados obtenidos en la cuantificación mediante absorción atómica, en los cuales se mostró un mínimo de concentración en la biomasa bacteriana. Con excepción de las cepas 3 y 8 provenientes de la mina El Bote, las cuales mostraron un incremento en su densidad óptica, pero, contrastando con los resultados de la cuantificación, se concluye que no hubo un desarrollo por encima del control, y el resultado obtenido se deba a la presencia de biomasa muerta. Derivado de estos resultados, y contrastando con la bibliografía consultada, para el caso del As, se propone un mecanismo de bioacumulación, señalando que este metal resulta tóxico para las bacterias aisladas en los lugares de estudio para las cepas 3 y 8.

Para el caso del Zn, se encontró un desarrollo mayor al control en un 53% en promedio para 3 de las 5 cepas aisladas en la mina El Bote, y de aproximadamente un 30% en 2 de las 4 cepas coincidió con los resultados de la cuantificación, al tener un mayor desarrollo en las cepas 3 y 7, a una concentración de 10 y 20 ppm respectivamente, las cuales tuvieron una mayor concentración en la biomasa, en alrededor de 53%. En el resto de las cepas la mayor concentración se encontró en el medio, pero basado en los resultados de desarrollo, es probable que dichas bacterias asimilen el metal en su interior, metabolizándolo, y expulsándolo al exterior, por lo cual pudieran ser utilizadas como herramientas de biorremediación.

Finalmente, en el caso del Pb, los resultados obtenidos mostraron que este metal resultó ser tóxico para las bacterias, al igual que el As, al inhibir su desarrollo. Basándose en los resultados obtenidos en la cuantificación se concluye que todo el metal quedó en el espacio extracelular, y, por lo que no se puede proponer un mecanismo posible, comparando los resultados con lo reportado en la bibliografía, en la cual las bacterias resistentes a este metal fueron aisladas de zonas un más contaminadas que las zonas en las que se realizó el muestreo en este estudio, obteniendo resultados más claros que permitieron establecer un mecanismo conciso.

Perspectivas

Se plantea la identificación molecular de dichos microorganismos y el uso de técnicas como la difracción de rayos x y la microscopia electrónica de barrido para confirmar el posible mecanismo de interacción. De igual forma, se busca contribuir al estudio y caracterización de mecanismos de bioremediación, apoyándose en proyectos de investigación realizados dentro de las zonas de estudio en este proyecto, sentando las bases para futuras investigaciones relacionadas con la remediación de estos lugares.

Bibliografía

1. Abadin H, Ashizawa A, Stevens YW, et al. (2007). Toxicological Profile for Lead. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), *CHEMICAL AND PHYSICAL INFORMATION*. [En línea] 11 de febrero de 2019- Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158769/>
2. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2007). Resumen de Salud Pública: As. En: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. [En línea] 15 de enero de 2019. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs2.pdf
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007). Toxicological Profile for Lead (Update). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. [En línea] 11 de febrero de 2019. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts13.pdf
4. Ahemad M & Malik A. (2012). Bioaccumulation of Heavy Metals by Zn resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater. *Bacteriology Journal*. 2(1): 12-21.
5. Alaniz-Andrade AL, Letechipia de León C, Ramirez-Santoyo RM Guzman-Moreno J & Vidales-Rodriguez LE. (2017). Arsenic tolerance in bacterial cultures isolated from metal contaminated soil. *Acta Universitaria*, 27(3), 9-18.
6. Álvarez López CL, Osorio Vega NW, Marín Montoya M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizósfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. 18(2): 293 – 305.
7. Beltrán Pineda ME, Gómez Rodríguez AM. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (cd), cromo (cr) y mercurio (hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 12(2):172 – 197.
8. Bunaciu AA, Udriștioiu EG & Aboul-Enein HY. (2015) X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45:4, 289-299,
9. Castro Soto G. (2013). La minería y consecuencias en México. El escaramujo. 7(30). Disponible en: http://otrosmundoschiapas.org/docs/escaramujo/escaramujo730_mineria_consecuencias_mexico.pdf
10. Covarrubias SA, Peña Cabriales JJ. 2017. Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fotorremediación. *Revista Internacional de Contaminación ambiental*; 33: 7 – 21.
11. Dey J, Chatterjee S & Mondal NK. (2016). Isolation and Characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation. *Biotechnology Reports*. 10:1-7.
12. Dinesh R, Srinivasan V, Hamza S, Sarathambal C, Anke Gowda SJ, Ganeshamurthy AN, Gupta SB, Aparna Nair V, Subila KP, A. Lijina, V.C. Divya, (2018). Isolation and characterization of potential Zn solubilizing

bacteria from soil and its effects on soil Zn release rates, soil available Zn and plant Zn content. *Geoderma*, 321:173-186.

13. Espinosa Reyes G e Ilizaliturri Hernández CA. (2015). Evaluación de riesgo ecológico en emergencias ambientales. *Ambiente, nutrición y alimentación*. 4(3): 5 – 7.
14. Flora G, Gupta D and Tiwari A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdiscipl Toxicol*. 5(2): 47 – 58.
15. Flores de la Torre JA, Mitchell K, Ramos Gómez MS, Guerrero Barrera AL, Yamamoto Flores L, Avelar González F. (2018). Effect of plant growth on Pb and Zn geoaccumulation in 300-year-old mine tailings of Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences*. 77:386.
16. Fundar, Centro de Análisis e Investigación, A.C. (2017). Las actividades extractivas en México: estado actual. *Anuario 2016*. Capítulo 5.3: El sector minero frente a los compromisos y obligaciones de cambio climático. Pp 209 – 212.
17. González Dávila O, Gómez Bernal JM, Ruiz Huerta EA. (2012). Plants and Soil Contamination with Heavy Metals in Agricultural Areas of Guadalupe, Zacatecas, México. Chapter 3. Environmental Contamination.
18. Greenspec. (2019). Zn production & environmental impact. En: Metals: production and environmental impact. [En línea] 09 de marzo de 2019. Disponible en: <http://www.greenspec.co.uk/building-design/Zn-production-environmental-impact/>
19. Hughes MF. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicological Letters*. 133: 1- 16.
20. INEGI. (1981). Síntesis geográfica de Zacatecas. Disponible en: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/2104/702825220686/702825220686_2.pdf
21. INEGI. (2018). Minería. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/temas/mineria/>
22. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). (2007). La evaluación del riesgo ecológico. En: SEMANAT. [En línea] 15 de noviembre 2007. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/400/cap4.html>
23. Jafari M, Danesh YR, Goltapeh EM, Varma A. (2013). Biorremediation and Genetically Modified Organisms. Chapter 19. Fungi as Biorremediators.
24. Jaishankar M, Tsenten T, Anbalgan N, Mathew BB, Beeregowda KN. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*. 7(2): 60 – 72.
25. Jiang NJ, Liu Rui, Du YJ. Bi YZ. (2019). Microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Pb contaminants: Toxic effects on bacterial activity and immobilization efficiency. *Science of the Total Environment*. 672:722-731-

26. Kumar A, Bisht BS & Joshi VD. (2011). Bioremediation potential of three acclimated bacteria with reference to heavy metal removal from waste. *International Journal of Environmental Sciences*. 2(2): 896 – 908.
27. Lazaroaie MM. (2010). Multiple responses of Gram-negative and Gram-positive bacteria to mixture of hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 649 – 667.
28. Lenntech. (2015). As. En: Lennech Water Purification. [En línea] 15 de enero de 2019. Disponible en: <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/as.htm>
29. Lenntech. (2019). Zn – Zn. Tratamiento y purificación del agua. [En línea] 07 de marzo de 2019. Disponible en: <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/zn.htm>
30. Maia MRG, Marques S, Cabrita ARJ, Wallace RJ, Thompson G, Fonseca AJM and Oliveira HM (2016) Simple and Versatile Turbidimetric Monitoring of Bacterial Growth in Liquid Cultures Using a Customized 3D Printed Culture Tube Holder and a Miniaturized Spectrophotometer: Application to Facultative and Strictly Anaerobic Bacteria. *Front. Microbiol.* 7:1381
31. Martín-Olmedo P, Carroquino Saltó MJ, Ordóñez Iriarte JM, Moya J. (2016). La Evaluación de riesgos en salud. Guía metodológica. Aplicaciones prácticas de la metodología de Evaluación de riesgos en salud por exposición a químicos. Madrid. Sociedad Española de Sanidad Ambiental y Escuela Andaluza de Salud Pública. Serie “De aeribus, aquis et locis”, nº 3.
32. McKiernan HE y Danielson PB. 2017. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science En: *Molecular Diagnostics* 3ª ed, pp 371 – 394. Elsevier, EU.
33. Mejía J, Carrizales L, Rodríguez VM, Jiménez-Capdeville ME, Díaz-Barriga F. (1999). Un método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. *Salud Pública Mex.* 41(2):132-S140.
34. Miao Chun Fan, Zhenshan Liu, Lijun Nan, Entao Wang, Weimin Chen, Yanbing Lin, Gehong Wei. (2018). Isolation, characterization, and selection of heavy metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria from root nodules of Robinia pseudoacacia in a Pb/Zn mining area. *Microbiological Research*. 217: 51-59.
35. Namin FS, Shahriar K and Bascetin A. (2011). Environmental impact assessment of mining activities. A new approach for mining methods selection. *Gospodarka Surowcami Mineralnymi* (Polonia). 27(2): 113 – 143.
36. Nath A, Singh CK, Behera S, Priyanka, Anshu AK, Lal N & Singh JK. (2017). Isolation of bacteria with arsenite mobilization capacity from culture and water sample from arsenic area of Bihar, India. IOSSR-JESTFT.
37. National Institute of Health. (2016). Datos sobre el Zn. Office of Dietary Supplements. [En línea] 07 de marzo de 2019. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Zn-DatosEnEspanol.pdf>
38. Nava A. (2018). Organismos genéticamente modificados, aliados contra los desastres naturales. En Agencia Informativa CONACYT [En línea] 17 de

enero de 2019. Disponible en:
<http://newsnet.conacytprensa.mx/index.php/documentos/56051-organismos-gene-ticamente-modificados-aliados-contra-los-desastres-naturales>

39. Okoh, Michael. (2018). Bioleaching, a technology for metal extraction and remediation: Mitigating health consequences for metal exposure. *Int Jour of Dev and Sust.* 7(7):2103-2118
40. Olmos Trujillo S, Bluhm Gutiérrez J, Núñez Peña EP y Escalona Alcázar FJ. (2013). Reseña histórica y situación actual de la minería en Zacatecas; aspectos sociales, económicos y ambientales. Unidad Académica de Ciencias Sociales. UAZ. Zacatecas, México.
41. Perevochtchikova M and André P. (2013). Environmental Impact Assessment in Mexico and Canada: Comparative Analysis at National and Regional Levels of Federal District and Quebec. *International Journal of Environmental Protection.* 3(8):1 – 12.
42. Pérez A. (2015). The Mineral Industry of Mexico. US Geological Survey. 2012 Minerals Yearbook Mexico. Pp 12.1.
43. Pérez Vázquez, Ramón G. (2011). Efecto de los metales pesados en el medio ambiente y la salud humana. Departamento de Geología. Universidad de Pinar del Río "Hermanos Saíz Montes de Oca". Pinar del Río. Cuba
44. Pino F. (2018). Características del As. En: Elementos, [En línea] 15 de enero de 2019. Disponible en: <https://elementos.org.es/arsenico>
45. Prcina M, Kontseková E, Novák M. (2015). Prion protein prevents heavy metal overloading of cells and thus protects them against their toxicity. *Acta virológica.* 59:179 – 184.
46. Quandt, E.M., Hammerling, M. J., Summers, R. S., Otoupal, P. B., Slater, B., Alnahhas, R. N., Dasgupta, A., Bachman, J. L., Subramanian, M. V., y Barrick. J. E. (2013). Decaffeination and Measurement of Caffeine content by addicted *E. coli* with refactored N-Demethylation operon from *P. putida* CBB5. *ACS Synthetic Biology.* 2(6):301 – 307
47. Radulescu C, Dulama ID, Stihi C, Ionita I, Chillan A, Necula C, Chelarescu ED. (2014). Determination of heavy metal levels in water and therapeutic mud by atomic absorption spectrometry. *Romanian Journal of Physics.* 9-10(59): 1057 – 1066.
48. Raja CE, Selvam GS and Omine K. (2009). Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. 205 – 211
49. Ramachandra, T V & N, Ahalya & RD, Kanamadi. (2005). Biosorption: Techniques and Mechanisms. CES Technical Report 110.
50. Reyes YC, Vergara I, Torres OE, Diaz M, González EE. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo.* 2 (16): 88 – 77.
51. Rodicio MC & Mendoza MC. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(4):238-45.
52. Rodríguez Sanchez V, Guzman Moreno J, Rodríguez Gonzalez V, Flores de la Torre JA, Ramirez Santoyo RM, Vidales Rodríguez LE. (2017). Biosorption

- of lead phosphates by lead-tolerant bacteria as a mechanism for lead immobilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 33:150.
53. Rosas Hernández I. (2012) Identificación y caracterización de microorganismos con resistencia a compuestos mercuriales. Centro Interdisciplinario de Investigaciones y estudios sobre el medio ambiente y desarrollo, CIEMAD, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. pp 7 – 145.
 54. Rubio C, González Weller D, Martín-Izquierdo RE, Revert C, Rodríguez I y Hardisson A. (2007). El Zn: oligoelemento esencial. *Nutrición Hospitalaria*. 22(1): 101 – 107.
 55. Santos-Santos E, Yarto-Ramírez M, Gavilán-García I, Castro-Díaz J, Gavilán - García A, Rosiles R, Suárez S, López-Villegas T. (2006). Analysis of Arsenic, Lead and Mercury in Farming Areas with Mining Contaminated Soils at Zacatecas, Mexico. *Journal of Mexican Chemistry Society*; 50(2): 57 - 53.
 56. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas. (2009). Guía Técnica para Orientar la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgo Ambiental de Sitios Contaminados. [En línea] 21 de marzo de 2019. Disponible en: <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/CD01086.pdf>
 57. Smitha MS, Singh S, Singh R. (2017). Microbial bio transformation: a process for chemical alterations. *J Bacteriol Mycol Open Access*.;4(2):47-51
 58. Society for Mining, Metallurgy & Exploration. (2015). The Role of Arsenic in the Mining Industry. [En línea] 15 de enero de 2019. Disponible en: <http://me.smenet.org/docs/Publications/ME/Issue/TheRoleofArsenicintheMiningIndustry.pdf>
 59. Srivastava J, Naraián R, Kalra JS & Chandra H. (2014). Advances in microbial bioremediation and the factors influencing the process. *Int. J. Environ. Sci. Technol*. 11: 1787 – 1800.
 60. Syed S & Chinthala P. (2015). Heavy Metal Detoxification by Different *Bacillus* Species Isolated from Solar Salterns. *Scientifica*.
 61. T. Płociniczak, M. Chodór, M. Pacwa-Płociniczak, Z. Piotrowska-Seget. (2019). Metal-tolerant endophytic bacteria associated with *Silene vulgaris* support the Cd and Zn phytoextraction in non-host plants. *Chemosphere*. 219: 250-260.
 62. Taboada Lugo N. (2017). El Zn y el cobre: micronutrientes esenciales para la salud humana. *Acta Medica del Centro*. 11(2): 79 – 89.
 63. Tawfik DS and Viola RE. (2011). Arsenate replacing phosphate – alternative life chemistries and ion promiscuity. *NIH. Biochemistry* 50(7):1128 – 1134.
 64. Tortora GJ, Funke BR y Case CL. 2007. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. pp 69 – 70. Editorial medica Panamericana. México
 65. Treteault D. (2015). Social Environmental Mining Conflicts in Mexico. *Latin American Perspectives* 42(5): 48 – 66
 66. Valenzuela C, Campos VL, Yañez J, Zaror CA & Mondaca MA. (2009). Isolation of Arsenite-Oxidizing bacteria from Arsenic-Enriched Sediments

from Camarones River, Northern Chile. *Bull Environ Contam Toxicol.* 82:593-596.

67. Vijayadeep C & Sastry PS. (2014). Effect of Heavy Metal Uptake by *E. coli* and *Bacillus* sp. *J Bioremed Biodeg*
68. Vullo DL. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química viva*; 2 (3): 93 – 104.
69. Vullo DL. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química viva*; 2 (3): 93 – 104.
70. Wolfe-Simon F, Blum JS, Kulp TR, Gordon GW, Hoefft SE, Pett-Ridge J, Stolz JF, Webb SM, Weber PK, Davies PCW, Anbar AD & Oremland. (2011). A Bacterium That Can Grow by using Arsenic Instead of Phosphorus. *SCIENCE.* 332(3): 1163 – 1166
71. Young JE. (1992). Mining the Earth. En: Sustainable Development, [consulta de 5 febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.uow.edu.au/~sharonb/STS300/sustain/mining/impactarticle1.html>
72. Zamarreño RA, González PN, Hanshing EX, Amar GA y Pizarro CM. (2013). Evaluación del riesgo ambiental por la presencia de mercurio en relaves mineros dentro de la ciudad de Andacollo, Chile. *Av. Cien. Ing.* 4(4): 75 -83.
73. Zhang YF, He LY, Chen ZJ, Zhang W, Wang Q, Qian M & Sheng X. (2011). Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape. *Journal of Hazardous Materials.* 186: 1720-1725.
74. Zhanh X, Yang L, Li Y, Li H, Wang W & Ye B. (2012). Impacts of lead/Zn mining and smelting on the environment and human health y China. *Environmental Monitoring and Assessment.* 184(4): 2261 – 2273.
75. Zhou X, Zhao Z & Juanxia Z. (2010). Characteristics of heavy metal pollution in the soil around lead-Zn mining área.

Anexos

Anexo 1. Resultados de cuantificación de metales pesados mediante absorción atómica

BACTERIA								
	MUESTRA	[equipo (mg/L;ug/L)]	PROMEDIO	SD	[real mg/L]	g bacteria	mg de metal	[mg metal/g bacteria]
C2	C2A 10	3.247	3.855	0.5515	38.5527	0.3426	0.0771	0.2251
	C2B 10	4.322						
	C2C 10	3.997						
C6	C6A	9.509	6.161	3.9170	6.1609	0.2734	0.0123	0.0451
	C6B 10	1.853						
	C6C	7.120						
C9	C9A 10	1.432	1.018	0.3902	10.1850	0.5716	0.0204	0.0356
	C9B 10	0.656						
	C9C 10	0.967						
C3	C3A 1:100 5	0.307	0.334	0.0358	29.7155	0.3247	0.0594	0.1830
	C3B 1:100 5	0.321						
	C3C 1:100 5	0.375						
C4	C4A 1:100 5	0.237	0.280	0.0375	24.2760	0.2371	0.0486	0.2048
	C4B 1:100 5	0.308						
	C4C 1:100 5	0.294						
C5	C5A 1:100 5	0.261	0.282	0.0265	24.4618	0.1937	0.0489	0.2526
	C5B 1:100 5	0.272						
	C5C 1:100 5	0.312						
C6	C6AZn 1:100 5	0.236	0.253	0.0233	21.5505	0.3396	0.0431	0.1269
	C6BZn 1:100 5	0.242						

	C6CZn 1:100 5	0.279						
C7	C7A 1:100 5	0.457	0.351	0.0955	31.4167	0.8245	0.0628	0.0762
	C7B 1:100 5	0.323						
	C7C 1:100 5	0.273						
C10	C10A 1:100 5	0.370	0.289	0.0711	25.2093	0.3481	0.0504	0.1448
	C10B 1:100 5	0.238						
	C10C 1:100 5	0.259						
C3	C3 A 100	28.852	37.115	7.2035	0.8700	0.2609	0.0017	0.0067
	C3 B 100	40.426						
	C3 C 100	42.068						
C4	C4 A 100	13.974	12.599	1.5561	0.2571	0.8737	0.0005	0.0006
	C4 B 500	12.913						
	C4 C 500	10.910						
C5	C5 A 100	12.644	11.597	1.2295	0.2320	1.3610	0.0005	0.0003
	C5 B 200	10.243						
	C5 C 200	11.904						
C8	C8 A 200	11.551	13.501	2.6580	0.2796	0.3699	0.0006	0.0015
	C8 B 200	16.529						
	C8 C 200	12.424						

		MEDIO				
muestra	[equipo (mg/L;ug/L)]	PROMEDIO	SD	[real mg/L]		
C2	C2A	3.375	3.375	0.185	16.873	Pb
	C2B	3.190				
	C2C	3.559				
C6	C6A	3.763	3.715	0.047	18.575	
	C6B	3.715				
	C6C	3.668				
C9	C9A	3.662	3.613	0.104	18.064	
	C9B	3.494				
	C9C	3.682				
C3	C3A 1:20	0.256	0.292	0.033	27.487	Zn
	C3B 1:20	0.303				
	C3C 1:20	0.318				
C4	C4A 1:20	0.378	0.336	0.039	31.899	
	C4B 1:20	0.302				
	C4C 1:20	0.328				
C5	C5A 1:20	0.428	0.365	0.057	34.796	
	C5B 1:20	0.352				
	C5C 1:20	0.316				
C6	C6A 1:20	0.236	0.304	0.063	28.676	
	C6B 1:20	0.315				
	C6C 1:20	0.361				
C7	C7A 1:20	0.338	0.303	0.031	28.592	
	C7B 1:20	0.294				
	C7C 1:20	0.278				
C10	C10A 1:20	0.327	0.323	0.012	30.588	
	C10B 1:20	0.310				
	C10C 1:20	0.333				
C3	C3 A 100	39.313	36.992	2.27675047	18.1011011	As
	C3 B 100	34.762				
	C3 C 100	36.899				
C4	C4 A 100	36.889	37.424	1.17463454	18.3172313	
	C4 B 100	38.771				
	C4 C 100	36.612				
C5	C5 A 100	17.718	20.144	3.5893228	9.67747305	
	C5 B 100	18.447				
	C5 C 100	24.267				
C8	C8 A 100	20.266	18.362	1.72175569	8.78652814	
	C8 B 100	16.915				
	C8 C 100	17.906				