

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN CARRERAS AGRONÓMICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



Bioprospección de bacterias resistentes a metales pesados en Torreón, Coahuila

Por:

**IRMA SALGADO CRISTOBAL**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

Torreón, Coahuila, México

Octubre, 2020.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Bioprospección de bacterias resistentes a metales pesados en Torreón,  
Coahuila

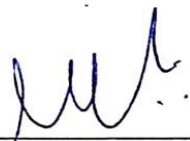
Por:

IRMA SALGADO CRISTOBAL

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito  
parcial para obtener el título de:

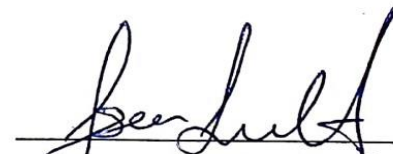
INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES



DR. MIGUEL MEDRANO SANTILLANA

Presidente

Aprobada por:



DR. ISAIAS LÓPEZ HERNÁNDEZ

Vocal



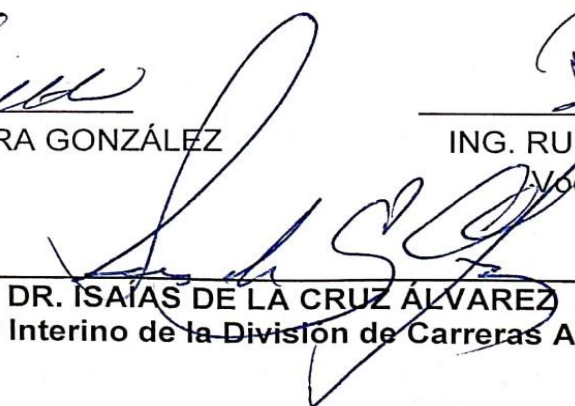
M.C. MARÍA DE JESÚS RIVERA GONZÁLEZ

Vocal



ING. RUBI MUÑOZ SOTO

Vocal Suplente



DR. ISAIAS DE LA CRUZ ALVAREZ

Coordinador Interino de la División de Carreras Agronómicas

Torreón, Coahuila, México

OCTUBRE 2020

Universidad Autónoma Agraria  
ANTONIO NARRO



COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN  
DE CARRERAS AGRONÓMICAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Bioprospección de bacterias resistentes a metales pesados en Torreón,  
Coahuila

Por:

**IRMA SALGADO CRISTOBAL**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
\_\_\_\_\_  
DR. MIGUEL MEDRANO SANTILLANA  
Asesor Principal

  
\_\_\_\_\_  
DR. ISAÍAS LÓPEZ HERNÁNDEZ  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
M.C. MARÍA DE JESÚS RIVERA GONZÁLEZ  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
ING. RUBI MUÑOZ SOTO  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
DR. ISAÍAS DE LA CRUZ ÁLVAREZ  
Coordinador Interino de la División de Carreras Agronómicas

Torreón, Coahuila, México  
OCTUBRE 2020

Universidad Autónoma Agraria  
ANTONIO NARRO



COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN  
DE CARRERAS AGRONÓMICAS

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por ser parte de mi vida, por todos y cada uno de sus sacrificios.

A esa persona especial que otorgo su tiempo y parte de su vida, por su apoyo durante mi estancia estudiantil, por llegar en el momento más adecuado eternamente gracias, Moshan.

Al Dr. Miguel Medrano Santillana por el apoyo incondicional otorgado durante el transcurso de la investigación, experimentación y elaboración del presente trabajo, que más allá de su apoyo docente, agradezco el apoyo moral, por compartir sus conocimientos y experiencias.

A mis coasesores por la orientación brindada.

A mi alma terra mater, por haberme brindado la oportunidad para adquirir los conocimientos requeridos para un buen desempeño laboral.

A mi entrenador Ramón Hernández por permitirme desempeñar en el área del deporte del atletismo, representando y mi alma terra mater, gracias a sus entrenamientos, consejos, por cada carrera que ahora es parte de momentos memorables.

A mis hermanos Alejandro Salgado e Isabel Salgado por todos y cada uno de sus consejos, por el cariño y el apoyo.

A mis amigas Lilia, Briseida, Karla, Edna y amigos Sergio Díaz, Jordi Ruiz por el apoyo, por hacer más amena mi estancia estudiantil, por las experiencias vividas y los buenos momentos, por cada aventura, sin duda buenos recuerdos.

A Gabriela amiga de infancia, por estar en cada momento, por levantarme en los momentos malos y compartir los buenos, cada consejo, cada risa, por cada aliento mil gracias por confiar siempre en mí, una meta más.

A Diana amiga mía, gracias por esa pequeña etapa en mi vida, por las charlas eternas, por cada risa compartida, gracias por las aventuras compartidas, por los consejos, por tanto, gracias.

## DEDICATORIAS

A mis padres, **Gregorio Salgado** e **Hilaria Cristobal**, porque en todo momento han apoyado y respetado mis decisiones, por sacrificarse para hacer de mi una mejor persona, por el impulso que me brindaron en los momentos más difíciles de mi carrera, por ayudarme a vencer estos obstáculos, por haber contribuido en mi educación, por su apoyo, por el simple hecho de ser mis padres, merecen mi más sincero agradecimiento y respeto, pero sobre todo por la confianza brindada. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo y su comprensión en los momentos difíciles, eternamente gracias.

A mi hermana **Aura Salgado** por siempre confiar en mí, por todos y cada uno de sus alientos, una meta más en mi vida se ha cumplido...Gracias por haber alentado en mí, el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida, por compartir mis penas y mis alegrías, mis pequeñas victorias y dolorosos fracasos, siempre recibiendo el consejo adecuado que me dio la fuerza para seguir luchando.

A mi abuela Isabel Severino por el cariño, por ser la mejor, por el trayecto.

A mi familia en general, a ustedes debo este logro y con ustedes lo comparto. Con todo mi cariño.

A **Hilaria Franco**, por permitirme desempeñarme en el área profesional, por el apoyo brindado, el acompañamiento, el cariño, las conversaciones tan amenas, y porque no, por los momentos malos, que nos forjaron, por cada vivencia, eternamente gracias. Gracias por todo, sin duda una persona ejemplar.

## RESÚMEN

Debido al contexto que se vive actualmente; La problemática por la contaminación ambiental ha dado como resultado una investigación más rigurosa, ya que en el transcurso de los años ha ido en aumento, generando un sin fin de consecuencias, ocasionando que la normatividad sea cada vez más estricta. La contaminación del suelo por metales pesados es considerada como uno de los problemas ambientales más severos, además de ser muy difícil de resolver. La refinación del petróleo, las plantas generadoras de energía y los procesos metalúrgicos se contemplan como las fuentes más comunes de contaminación por metales pesados: suelen ejercer un efecto inhibitorio sobre las bacterias. Una solución alterna ante esta problemática es la remediación biológica denominada también biorremediación de esta manera, en el transcurso del proceso de biorremediación intervienen microorganismos como; bacterias, hongos y plantas, donde se aprovecha el potencial metabólico de dichos organismos para limpiar suelos contaminados por metales pesados. Considerando lo anterior, el indagar en las dos zonas de muestreo, siendo aledañas a la metalúrgica de Peñoles, Torreón, Coahuila, aumentan las posibilidades para la aplicación de la técnica de biorremediación. Es así, como en la presente investigación se logró analizar y aislar 17 cepas. Se emplearon diferentes pruebas para la caracterización: Concentración mínima inhibitoria (CMI), tinción de gram y oxidasa. El grupo se sometió a las pruebas antes mencionadas con el fin de apreciar la resistencia a metales pesados como lo es el plomo y el cadmio.

Palabras clave: Metal pesado, Bioprospección, Biorremediación, Investigación, Contaminación.

## **ABSTRACT**

Because of the context currently being lived; The problem of environmental pollution has resulted in more rigorous research, since over the years it has been increasing, generating endless consequences, causing the regulation to become stricter. Soil contamination by heavy metals is considered to be one of the most severe environmental problems, as well as being very difficult to solve. Oil refining, power plants and metallurgical processes are considered to be the most common sources of heavy metal contamination: they often have an inhibitory effect on bacteria. An alternative solution to this problem is biological remediation also called bioremediation in this way, in the course of the bioremediation process microorganisms such as; bacteria, fungi and plants, where the metabolic potential of these organisms is harnessed to clean up soils contaminated by heavy metals. Considering the above, the research in the two sampling areas, being close to the metallurgical of Peñoles, Torreón, Coahuila, increase the possibilities for the application of the bioremediation technique. Thus, as in this research 17 strains were analyzed and isolated. Different tests were used for characterization: Minimum inhibitory concentration (CMI), gram staining and oxidase. The group underwent the above tests in order to assess resistance to heavy metals such as lead and cadmium.

Keywords: Heavy metal, Bioprospecting, Bioremediation, Research, Contamination.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIAS .....	II
RESÚMEN .....	III
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE.....	V
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>IX</b>
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OBJETIVO .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>4</b>
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1 DEFINICIÓN DEL SUELO.....	5
2.2 ANTECEDENTES SOBRE LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO POR METALES PESADOS.....	5
2.3 METALES PESADOS.....	7
2.4 METALES PESADOS DE ESTUDIO: PLOMO, CADMIO Y ARSÉNICO.....	13
2.4.1 PLOMO (PB).....	13
2.4.2 ABSORCIÓN Y TOXICIDAD DEL PLOMO.....	13
2.4.3 CADMIO (CD).....	15
2.4.4 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL CADMIO EN LA SALUD.....	16
2.4.5 ARSÉNICO (AS).....	18
2.4.6. INGESTA DE ARSÉNICO: EL IMPACTO EN LA ALIMENTACIÓN Y LA SALUD HUMANA.....	18



3. DESCRIPCIÓN GENÉRICA DE LA EMPRESA INDUSTRIAS PEÑOLES, S.A.B. DE C.V.....	23
3.1 ANÁLISIS DE LOS HECHOS Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	24
3.2 LA SITUACIÓN DE TORREÓN.....	26
3.3 CASOS DE ENVENENAMIENTO.....	28
3.4 LOS CASOS DE ENVENENAMIENTO RECIENTE QUE INICIARON EL ESCÁNDALO.....	29
4. MECANISMOS BIOQUÍMICOS DESARROLLADOS POR LOS MICROORGANISMOS PARA EL TRATAMIENTO DE METALES PESADOS.....	35
4.1 EFECTO DE LOS METALES PESADOS SOBRE LAS BACTERIAS.....	37
4.2 BIORREMEDIACIÓN.....	39
4.3 ANTECEDENTES DE BIORREMEDIACIÓN.....	40
4.4 APLICACIONES DE LA BIORREMEDIACIÓN.....	41
4.5 VENTAJAS DE LA BIORREMEDIACIÓN.....	42
4.6 LIMITACIONES Y DESVENTAJAS DE LA BIORREMEDIACIÓN.....	43
4.7 PAPEL DE LAS ENZIMAS EN LA BIORREMEDIACIÓN.....	44
5. TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.....	47
5.1 BIOSORCIÓN.....	48
5.2 BIOPRECIPITACIÓN.....	49
5.3 BIOLIXIVIACIÓN (HETEROTRÓFICA Y AUTOTRÓFICA).....	51
5.3.1 APLICACIONES PRÁCTICAS.....	52
5.3.2 VENTAJAS Y LIMITACIONES.....	52
5.3.3. TIEMPO Y COSTOS DE LA REMEDIACIÓN.....	53
5.4. BIOVOLATILIZACIÓN.....	54
5.5. BIOMINERALIZACIÓN.....	54

5.5.1. APLICACIONES PRÁCTICAS.....	55
5.6 RELEVANCIA DE LA BIOPROSPECCIÓN.....	55
5.7. PRINCIPALES TEMAS Y PAÍSES COOPERANTES EN TEMAS RELACIONADOS CON BIOPROSPECCIÓN.....	56
6.TÉCNICAS PARA AISLAR MICROORGANISMOS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.....	59
6.1 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO.....	60
6.1.2 MÉTODOS GENERALES.....	61
6.1.3 MÉTODOS ESPECIALES.....	64
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	65
7.1 ZONAS DE MUESTREO PARA LA BIOPROSPECCIÓN DE METALES RESISTENTES A METALES PESADOS EN TORREÓN, COAHUILA.....	65
7.2. ZONA DE MUESTREO UNO: PISTA DE ATLETISMO DEL TECNOLÓGICO DE LA LAGUNA.....	65
7.3 ZONA DE MUESTREO DOS: CENTRO DE MONITOREO AMBIENTAL, (CEMA). .....	66
7.4 BIOPROSPECCION DE MICROORGANISMOS.....	69
7.5 SIEMBRA.....	69
7.6 DILUCIONES BASE DIEZ.....	70
8. RESULTADOS.....	71
8.1 MORFOLOGÍA BACTERIANA .....	73
8.2. CARACTERIZACIONES MACROSCÓPICAS DE LAS CEPAS ZONA UNO.....	75
8.3 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.....	79
8.4 CARACTERIZACIONES MACROSCÓPICAS DE LAS CEPAS ZONA DOS.....	84
8.5 MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN.....	86

8.6 MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN DE ARSÉNICO POR BACTERIAS. ...	87
8.7. RESISTENCIA MICROBIANA. ....	90
9. DISCUSIÓN.....	90
10. CONCLUSIÓN.....	91
7. LITERATURA CITADA .....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores límites de algunos metales pesados para uso de terrenos residenciales para diferentes países.....	20
Tabla 2. Concentraciones de referencias totales (CRT) por tipo de uso de suelo .....	22
Tabla 3. Principales temas y países cooperantes en temas relacionados con bioprospección .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
TABLA 4. ZONA DE MUESTREO UNO: PISTA DE ATLETISMO DEL TECNOLÓGICO DE LA LAGUNA. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.4</b>
Tabla 5. Caracterización macroscópica de cepas zona de muestreo uno: Pista de atletismo del Tecnológico de la Laguna .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 6. Caracterización de la morfología celular y oxidasa, zona 1 .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 7. Concentración de materia orgánica en suelos no volcánicos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 8. Contenido de nitrógeno total .....	81
Tabla 9. Contenido de fósforo .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos, zona de muestreo 1: Pista de atletismo del Tecnológico de la Laguna .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 11. Caracterización microbiológica zona de muestreo dos: Centro de Monitoreo Ambiental (CEMA) .....	83
Tabla 12. Caracterización macroscópica zona de muestreo dos: Centro de Monitoreo Ambiental (CEMA) .....	<b>¡Error! Marcador no definido.5</b>
Tabla 13. Comparativa de las zonas de muestreo .....	85
Tabla 14. Algunos microorganismos implicados en la biorremediación de metales pesados .....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas potenciales interrelacionadas para la contaminación química sub-superficial. ....	7
Figura 2. Foto tomado de la FAO,2019.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 2
Figura 3. En Defensa del Ambiente, A.C. Torreón, Coahuila .....	27
figura 4. Vista aérea de la fundición de metales Peñoles Met-Mex y comunidades aledañas, alrededor de 1999 .....	3 <b>¡Error! Marcador no definido.</b>
FIGURA 5. Representación de los resultados de la determinación de Cadmio en muestras compuestas de suelo de patios de cinco casas, ubicadas en tres vecindarios: Gómez Palacio, Torreón 1 y Torreón 2.....	<b>¡E</b>
	<b>RROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
Figura 6.. Representación de los resultados de la determinación de Arsénico en muestras compuestas de suelo de patios de cinco casas, ubicadas en tres vecindarios: Gómez Palacio, Torreón 1 y Torreón 2.....	34
Figura 7. Representación de los resultados de la determinación de Plomo en muestras compuestas de suelo de patios de cinco casas, ubicadas en tres vecindarios: Gómez Palacio, Torreón 1 y Torreón 2.....	<b>¡E</b>
	<b>RROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano, (Rojas, 2016) .....	36
Figura 9. Interacciones entre metales y microorganismos .....	45
Figura 10. Diagrama esquemático del proceso de Biosorción en el Raefaez.....	49
Figura 11. Diagrama del proceso de Bioprecipitación biogás que contiene NaOH 1 M.....	50
Figura 12. Diagrama esquemático del reactor de lixiviación química .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 13. Imagen tomada de: INAFED,2020.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

Figura 14. Depósito, foto de la muestra zona 1, 2019.....	63
FIGURA 15. FOTOS TOMADAS EN LA ZONA DE MUESTREO DICIEMBRE 2019.....	66
FIGURA 16. FOTOS TOMADAS EN LA ZONA DE MUESTREO FEBRERO DE 2020 .....	<b>¡ERROR!</b>
<b>MARCADOR NO DEFINIDO.</b>	
Figura 17. Fotos tomadas en el laboratorio de biología.....	<b>¡E</b>
<b>RROR! MARCADOR NO DEFINIDO.2</b>	
FIGURA 18. DETERMINACIÓN DE DENSIDAD MUESTRA 1, MUESTRA 2 Y TESTIGO, LABORATORIO DE SUELOS, 2020 .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.0</b>
Figura19. Reacciones que catalizan microorganismos que metabolizan arsénico (As).....	<b>¡E</b>
<b>RROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>	
FIGURA 20. UBICACIÓN Y FUNCIONES DE LOS SISTEMAS RESPIRATORIOS .....	89

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados se ha convertido en una grave amenaza para el medio ambiente y la seguridad alimentaria debido al rápido crecimiento de las industrias, la agricultura y la alteración del ecosistema natural, debido al enorme incremento de la población mundial (Sarwar, 2017). Los metales pesados son elementos potencialmente tóxicos, cuya presencia en el medio ambiente ha ido en crecimiento fundamentalmente por la acción del hombre. A los metales pesados se le atribuyen determinados efectos de contaminación ambiental y toxicidad, llegando a causar la muerte de personas o desarrollar enfermedades letales como el cáncer (Pérez, 2015). La contaminación metálica supone una amenaza medioambiental importante para los seres vivos, ya que diversos metales que son micronutrientes esenciales, como el cobre y el zinc, resultan tóxicos en concentraciones elevadas, mientras que otros como: cadmio, plomo, mercurio y arsénico, son tóxicos a dosis mínimas (Cárdenas, 2019). Una alta concentración de metales pesados en el suelo pueden provocar cambios que, en el transcurso del tiempo, modifican la estructura del suelo, alterando así sus características fisicoquímicas, debido a esto son asimilados por las plantas y demás eslabones (Pérez, 2015). Es importante considerar la contaminación del suelo por metales pesados debido a que la infiltración de los contaminantes puede dirigirse hacia el acuífero y contaminar el agua, así como por los posibles daños que pueden ocasionar a la vegetación del lugar y porque la toxicidad de algunos de ellos puede causar efectos nocivos a la salud. Los suelos contaminados se han visto en incremento en las áreas urbanas en comparación con las rurales, incluso en áreas alejadas a fuentes de contaminación puede existir la probabilidad de ingesta diaria de metales pesados en exceso, principalmente en niños (González, 2012). Un claro ejemplo es el caso más sonado de la situación de Torreón, Coahuila por el caso del envenenamiento por metales pesados entre la población infantil. Los metales pesados y sus compuestos se encuentran de manera natural en todo el ambiente del suelo ya que algunos son esenciales en menos concentración para que se desarrolle la

vegetación (Hu, 2015). Con el desarrollo industrial en México, se registra un aumento y preocupante contaminación ambiental, sobre todo debido a la poca educación ambiental durante varios siglos de actividad minera y, desde hace décadas, por la intensa explotación petrolera. Cabe resaltar que la industria minera es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, la cual es mayoritariamente metálica y se dedica principalmente a la producción de Cu, Zn, Ag y Pb. Como consecuencia de esta el impacto ambiental ha sido alto, ya que afecta desde el subsuelo hasta la atmósfera, incluyendo suelos y cuerpos de agua. Con el procesamiento de los recursos minerales, se han generado grandes cantidades de residuos sólidos, líquidos y gaseosos que han repercutido en una gran cantidad de sitios contaminados a lo largo de todo el país (Volke, *et al.* 2004). La problemática en la ciudad de Torreón es provocada por el plomo (Pb), el cadmio (Cd) y el arsénico (As), tres elementos altamente dañinos para los seres humanos. Con base a esta problemática una opción de solución son las poblaciones bacterianas que presentan funciones importantes en el suelo debido a su contribución en el ciclo de nutrientes, simbiosis de plantas, descomposición y otros procesos del ecosistema. Como antecedente a esta problemática de envenenamiento por metales pesados se debe en parte al funcionamiento de la cuarta fundidora más importante del mundo, propiedad de la compañía Peñoles, situada en el centro de la ciudad de Torreón (Cabrera, 1999).

La comprensión de las características de contaminación de los metales pesados en los suelos y la identificación de sus riesgos de exposición ambiental no solo son las condiciones previas básicas para la prevención y el control de la contaminación del suelo, sino que también proporcionan información importante para tomar decisiones de acuerdo a la zona para la remediación de suelos contaminados.



## **1.1. Objetivo**

- Aislar y caracterizar poblaciones bacterianas resistentes a metales pesados en la zona aledaña a Peñoles, Torreón, Coahuila.

### **Objetivos particulares**

- Muestrear sitios afectados por la contaminación de metales pesados.
- Aislar bacterias.
- Identificar y caracterizar las cepas bacterianas.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria a metales pesados (arsénico, plomo y cadmio) de las cepas bacterianas aisladas.

## **1.2. Hipótesis**

Demostrar la viabilidad del tratamiento biológico mediante la bioprospección de bacterias resistentes a metales pesados, aumentando así la disposición de las mismas en el suelo.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 DEFINICIÓN DEL SUELO**

El suelo se forma por la interacción de los sistemas atmósfera, hidrosfera y biosfera sobre la superficie de la geosfera. Ocupa la interfase entre la geosfera y los demás sistemas, en la llamada zona crítica, la parte más dinámica de la superficie de la Tierra. La meteorización química y mecánica de las rocas y la influencia de ciertos procesos microbiológicos producen el suelo. La meteorización está controlada esencialmente por la energía solar, que regula el ciclo del agua y alimenta los sistemas vivos, y por circunstancias locales favorables (como la topografía) y propiedades intrínsecas de las rocas (permeabilidad, alterabilidad). Después de un largo periodo de meteorización, y bajo condiciones climáticas estables, el suelo puede alcanzar su equilibrio. Pero cuando uno de los parámetros del sistema varía, el equilibrio se rompe. La interacción con el hombre, un componente singular de la biosfera, puede romper también el equilibrio, debido a su uso (agricultura, industria, minería, ganadería, etc.). Este tipo de modificación negativa del suelo se denomina normalmente degradación (Galán, 2008).

### **2.2 Antecedentes sobre la contaminación del suelo por metales pesados.**

A manera de inducción la razón por la cual se realizó investigación se orienta a la bioprospección de bacterias resistentes a metales pesados es porque la contaminación por metales pesados es un tema de actualidad tanto en el área ambiental como en la salud pública, principalmente debido al impacto negativo que ha dejado en la percepción pública. Metales como el plomo, arsénico y cadmio, mismos que se describirán a la largo de la investigación, han sido utilizados desde hace mucho tiempo en distintas aplicaciones industriales y domésticas, por mencionar algunas áreas, más sin embargo sin tener un conocimiento preciso de los posibles perjuicios que pueden causar. Debido a las investigaciones realizadas hoy en día se conoce mucho más sobre los efectos

que tienen los metales pesados en distintas áreas, si nos remontamos a la década de los setentas, podríamos darnos cuenta de que aún no se les consideraba contaminantes importantes.

La contaminación del suelo es un tema alarmante. Por lo tanto, es considerada como la tercera amenaza más importante a las funciones del suelo en Europa y Eurasia, cuarta en África del Norte, quinta en Asia, séptima en Pacífico del Noroeste, octava en Norteamérica y novena en el África Sub-Sahariana y Latinoamérica. De esta manera la presencia de ciertos contaminantes también puede producir desequilibrios en los ciclos de nutrientes y la acidificación del suelo, dos aspectos importantes en muchas partes del mundo, tal como han sido identificados en el Informe del Estado Mundial de los Recursos del Suelo (FAO y GTIS, 2015).

De acuerdo a las condiciones se define que la presencia de algunos elementos químicos y compuestos (contaminantes) es un tipo especial de degradación que se denomina contaminación. El contaminante está siempre en concentraciones mayores de las habituales (anomalías) y en general tiene un efecto adverso sobre algunos organismos. Por su origen se clasifica en geogénico o antropogénico. Los primeros pueden proceder de la propia roca madre en la que se formó el suelo, de la actividad volcánica o del lixiviado de mineralizaciones. Por el contrario, los antropogénicos se producen por los residuos peligrosos actividades industriales, agrícolas, agroquímicos, mineras, etc. y de los residuos sólidos urbanos. Desde otro punto, los contaminantes antropogénicos son los verdaderos contaminantes que afectan al suelo a mayor escala. La toxicidad de un elemento o compuesto químico es la capacidad que tiene ese material de afectar adversamente alguna función biológica si estos son vertidos al suelo. Los materiales o compuestos tóxicos no tienen origen biológico, excepto el caso particular de las toxinas que son compuestos tóxicos biogénicos (Galán, 2008) En la figura 1 se muestran los medios o rutas potenciales de contaminación en los suelos.

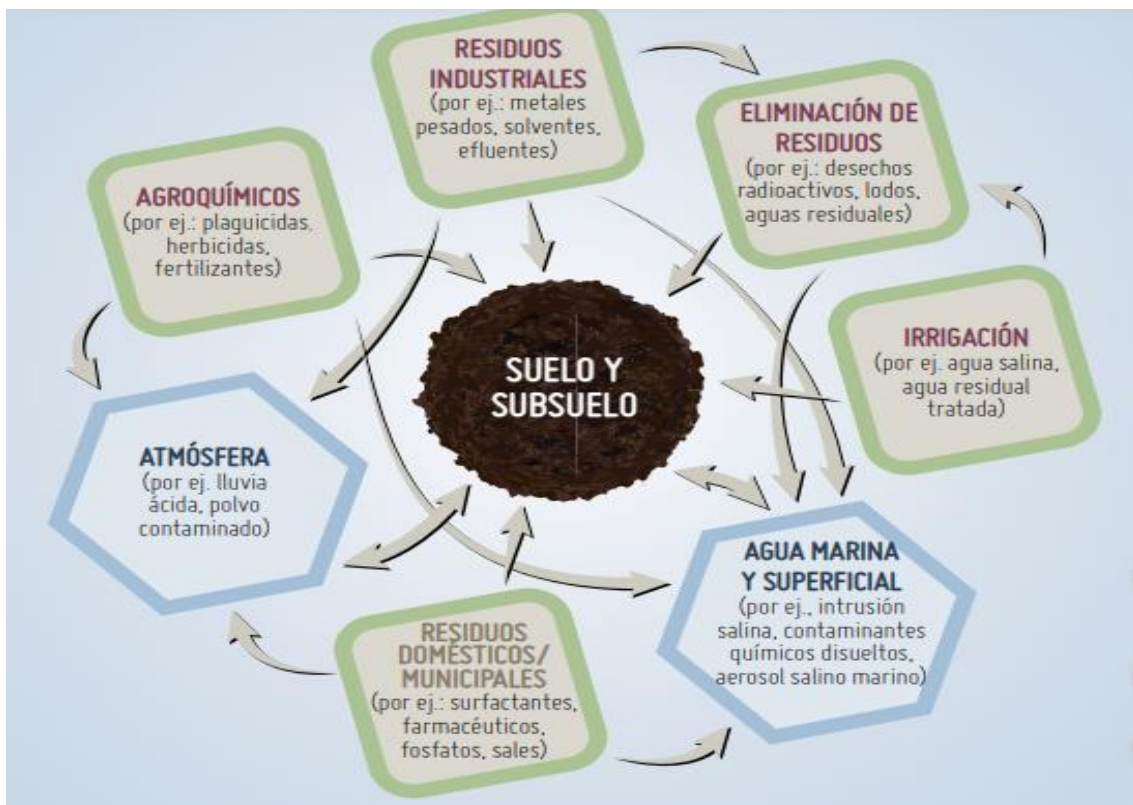


Figura 1. Rutas potenciales interrelacionadas para la contaminación química sub-superficial. (Yaron, Drar y Berkowitz, 2012).

### 2.3 METALES PESADOS.

Definidos como aquellos que tienen una densidad específica de más de  $5 \text{ g/cm}^3$  en su forma elemental, tales como el plomo, mercurio, arsénico, cadmio y níquel. Presentan ciertas propiedades metálicas que las distinguen como ductilidad, conductividad, densidad, estabilidad como catión y especificidad a ligando. Se consideran a un conjunto de 65 elementos de la tabla periódica con un número atómico mayor a 20. Dichos elementos presentan diferentes características fisicoquímicas y biológicas, de esta manera forman complejos como iones libres o participando en reacciones redox que resultan potencialmente tóxicas para los organismos. Su impacto en la salud humana recae principalmente en la exposición ocupacional, contaminación del medio ambiente, y acumulación en alimentos. De acuerdo a estudios realizados con base a evidencia científica, la existencia de metales pesados en el suelo conlleva graves consecuencias como

la degradación de los principales servicios a los ecosistemas provistos por el suelo, disminuyendo la seguridad alimentaria al reducir la productividad agrícola debido a los niveles tóxicos de los contaminantes<sup>[D1]</sup>, ocasionando que las cosechas producidas en suelos contaminados sean peligrosas para el consumo de animales y humanos. Son tóxicos debido a que tienen efectos acumulativos deletéreos, causando así cambios degenerativos crónicos, especialmente en el sistema nervioso central hígado, riñones y, en algunos casos, pueden tener efectos teratogénicos y carcinogénicos. Intervienen en la inhibición enzimática, afectando el metabolismo antioxidante, y el estrés oxidativo. Provocando una serie de efectos en la salud a través de la formación de radicales libres, que resultan en daño al ADN, peroxidación lipídica y depleción de grupos <sup>[D2]</sup>sulfhidrilo de proteínas. Una vez absorbidos en el organismo los metales pesados, son evacuados lentamente y se acumulan en el organismo <sup>[D3]</sup>provocando daño orgánico, además de acumularse en el pelo y uñas. Algunos factores que permiten las manifestaciones clínicas son: La cronicidad de la ingestión, la ruta de exposición y la salud general del huésped.

Una larga exposición en un periodo corto de tiempo resulta una intoxicación aguda por metales, mientras tanto la intoxicación crónica resulta de exposiciones en bajas dosis: medio ambiente y por exposición ocupacional (CITVER, 2020).<sup>[D4]</sup>

Para el desarrollo de microorganismos, plantas y animales los metales pesados son imprescindibles pues ejercen un papel relevante en algunas reacciones bioquímicas y son esenciales para su buen crecimiento y desarrollo. En altas concentraciones pueden formar compuestos inespecíficos creando efectos citotóxicos y letales. Cabe resaltar que, si bien algunos metales no tienen influencia biológica, otros como el cadmio (Cd), el cromo (Cr), y el mercurio (Hg) son tóxicos. La acción tóxica de los metales pesados sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos sulfhídricos (-SH) y otros grupos funcionales de las proteínas y enzimas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos, desplazando otros iones metálicos o

modificando la conformación activa de moléculas biológicas. Al ser emitidos los metales se absorben muy fácilmente a través de las membranas biológicas, por su elevada afinidad química a las proteínas aumentando su bioacumulación, dificultando su degradación y eliminación. Existen estrategias biológicas en donde microorganismos y plantas pueden inmovilizar o transformar el metal in situ, lo cual puede reducir su biodisponibilidad. Las estrategias de remediación basadas en procesos microbianos (microremediación) pueden minimizar la toxicidad y la biodisponibilidad de los metales pesados (Beltrán, 2016).

La única estimación global de la contaminación del suelo fue realizada en la década de los 90 por el Centro Internacional de Referencia e Información sobre Suelos (ISRIC por sus siglas en inglés) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) que estimaba que 22 millones de hectáreas estaban afectadas por contaminación del suelo. Datos más recientes, sin embargo, indican que este número podría subestimar la naturaleza y alcance del problema. Para estimar el alcance de la contaminación ambiental los países desarrollados son los que principalmente se han involucrado. De acuerdo con el Ministerio de Protección Ambiental de China, 19 por ciento de sus suelos agrícolas se considera están contaminados. Existen aproximadamente 3 millones de emplazamientos potencialmente contaminados en la Zona Económica Europea y los países colaboradores de los Balcanes Occidentales y más de 1,300 asentamientos categorizados como contaminados se incluyen en la Lista de Prioridades Nacionales del Super fondo en Estados Unidos de América. En Australia, se estima que el número total de emplazamientos contaminados asciende a 80, 000. Dadas las cifras que son meramente informativas, pero contribuyen a la comprensión de los efectos que ocasionan ciertas actividades en el suelo, por lo tanto, no reflejan el alcance total de la contaminación de suelos en todo el mundo y ponen de relieve la falta de información disponible y las diferencias en el registro de emplazamientos contaminados en las distintas regiones geográficas. Considerando la situación económica de algunos países o los que se encuentran en vías de desarrollo, la falta de información hace que la contaminación por metales pesados que es uno de los mayores problemas

globales sea invisible para la comunidad internacional. Dado este panorama, es más que evidente que existe una urgente necesidad de llevar a cabo una evaluación global de contaminación del suelo (Rodríguez, *et al.*, 2019).

La contaminación del suelo por metales pesados afecta directamente la salud humana. Considerando que las características del suelo juegan un papel importante en reducir o aumentar la toxicidad de los metales en el suelo, la distribución de los metales pesados en los perfiles del suelo, así como su disponibilidad está controlada por parámetros como propiedades intrínsecas del metal y características de los suelos. Los metales tienden a acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles al consumo de las raíces de los cultivos. Las plantas cultivadas en suelos contaminados absorben en general más oligoelementos y la concentración de éstos en los tejidos vegetales está a menudo directamente relacionada con su abundancia en los suelos, y especialmente en la solución húmeda, mencionan que excesivas concentraciones de metales en el suelo podrían impactar la calidad de los alimentos, la seguridad de la producción de cultivos y la salud del medio ambiente, ya que estos se mueven a través de la cadena alimenticia vía consumo de plantas por animales y estos a su vez por humanos. Los metales acumulados en la superficie del suelo se reducen lentamente mediante la lixiviación, el consumo por las plantas, la erosión y la deflación (Puga, 2006).

Los metales pesados como plomo (Pb), arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni) y mercurio (Hg), se adicionan en forma continua a los suelos a través de actividades agrícolas, actividades industriales, incineración y emisiones de los vehículos. Tanto el Cd como el Zn son elementos que poseen propiedades ambientales y geoquímicas similares; donde el procesamiento y la liberación subsecuente de Zn al ambiente se acompañan normalmente por Cd. El Cd es considerado un metal pesado que se libera al ambiente como resultado de una gran variedad de actividades antrópicas. No obstante, dado que no es un elemento esencial para las plantas, este metal se absorbe por las raíces y se



transporta hacia las hojas en muchas especies. Por lo que altas concentraciones de éste ocasionan toxicidad en las plantas por su alta movilidad (Labra, 2012).

Principalmente, los metales pesados en el suelo pueden acumularse por:

- 1) Meteorización natural del material parental.
- 2) Actividad humana directa. Como el vertimiento de desechos mineros denominados jales mineros (Bousen, 2013).

La deposición atmosférica proveniente de emisiones vehiculares e industriales, la aplicación en cultivos agrícolas como fertilizantes, fungicidas y herbicidas con alto contenido de As, Pb y Cu (Alloway, [et al.](#)<sup>[D6]</sup>, 2013).

Retomando otra perspectiva, una alta concentración de metales pesados en el suelo, no necesariamente significa un problema de toxicidad para los seres vivos, ya que, por lo general, una fracción del metal puede encontrarse de forma inerte, en estado sólido, incorporada a rocas. Esta fracción sólo podría solubilizarse por el desgaste natural de las rocas que ocurre, por lo general, en periodos prolongados de tiempo. Solamente las formas químicas de los metales pesados que se encuentran disponibles para los seres vivos resultan tóxicas. Esta fracción denominada biodisponible es determinada por las características fisicoquímicas de cada tipo de suelo (Lu, 2005), además de la afinidad de los iones metálicos por la superficie de adsorción de los componentes del suelo como el humus, los óxidos de fierro (Fe) y manganeso y los aluminosilicatos (Tabak, 2005). Las principales características fisicoquímicas que determinan la biodisponibilidad de los metales pesados son:

- a) Potencial de H (pH): A pH bajo, por lo general, los metales son móviles en forma de especies iónicas libres o como órgano-metales solubles. Dichos metales a pH alcalino forman carbonatos o fosfatos minerales insolubles.
- b) Potencial de óxido-reducción (redox): La oxidación relativa de los metales en una solución acuosa en ambientes anaerobios reducidos (suelo húmedo) conlleva a la precipitación del metal debido a la presencia de iones ferrosos y

carbonatos, mientras que bajo condiciones oxidantes los metales se hacen más solubles (Volke, 2005).

- c) Materia orgánica (MO): La MO presente en el suelo es uno de los principales factores que determinan la biodisponibilidad de los metales pesados (Zeng, *et al.*, 2011) las enmiendas que cuentan con alto contenido de MO disminuyen la disponibilidad de metales pesados por medio de la formación de complejos con las sustancias húmicas presentes en ella. Lo anterior puede ocasionar que los metales pesados cambien de una forma soluble e intercambiable a una forma insoluble asociada con MO o con los carbonatos presentes en la fracción residual del suelo (Clemente, 2006). Además, algunos metales pesados como el selenio (Se), mercurio (Hg) y arsénico (As) pueden ser volatilizados por las plantas a la atmósfera o por algunos grupos microbianos especializados (Valls, 2002).

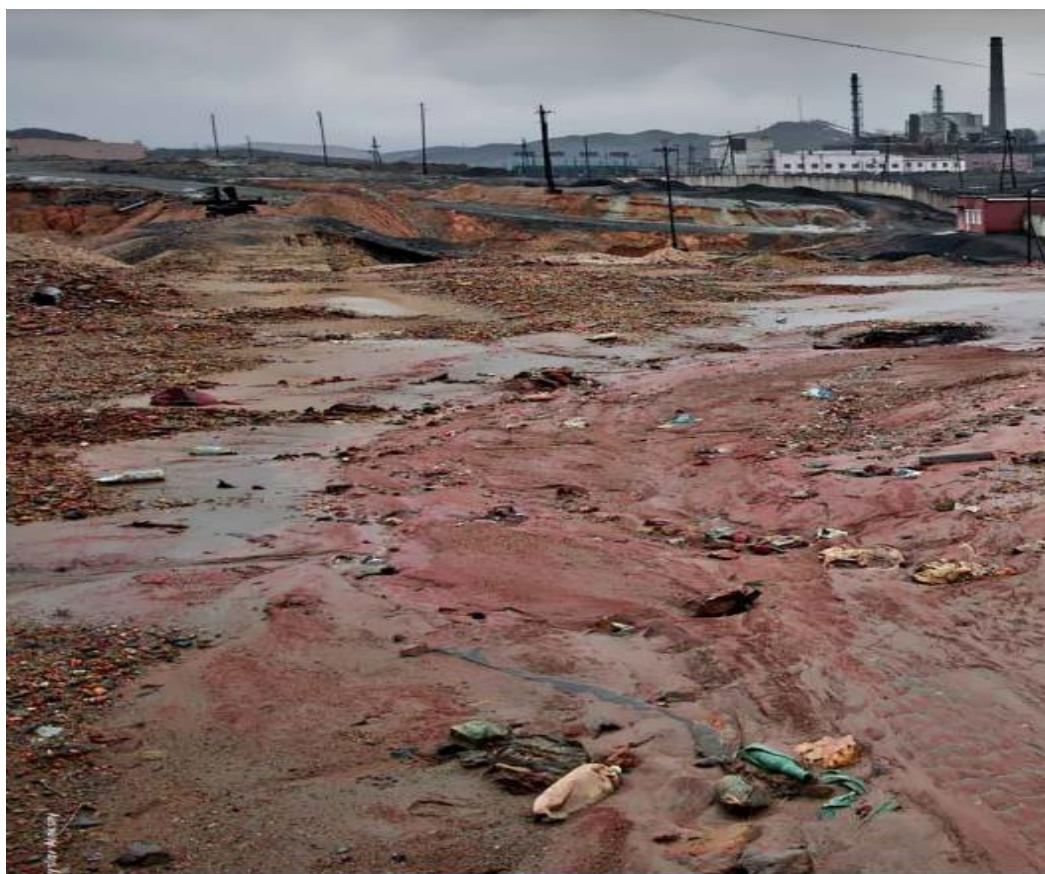


Figura 2. Foto tomado de la FAO,2019.

## **2.4 METALES PESADOS DE ESTUDIO: PLOMO, CADMIO Y ARSÉNICO.**

### **2.4.1 Plomo (Pb).**

El plomo es un metal maleable de color grisáceo el cual se puede encontrar en forma orgánica e inorgánica. Los principales compuestos inorgánicos se presentan como arseniato, carbonato, cromato, cloruro, dióxido, fosfato, monóxido, sesquióxido, tetraóxido, silicato, sulfato y sulfuro de plomo. Los compuestos orgánicos más comunes son acetato, esterato, oleato, tetraetilo y tetrametilo de plomo. El plomo inorgánico se presenta en todos los procesos que supongan su fundición, extracción, manufactura de piezas, fabricación de aleaciones y recuperación de metales. El reciclaje de baterías es una actividad laboral de alto riesgo para los trabajadores y sus familias que habitan en el mismo sitio de trabajo.

### **2.4.2 Absorción y toxicidad del plomo.**

El plomo se absorbe por inhalación, ingestión y por vía dérmica; el grado depende de factores tales como la edad, el estado nutricional, enfermedades previas y la forma de presentación del plomo. El 35 % del total del plomo inhalado se deposita en las vías aéreas y pasa directamente a la circulación, el restante asciende hasta llegar a esófago y es deglutido y absorbido en tracto gastrointestinal, vía principal de absorción e intoxicación en niños. La absorción dérmica es muy baja. El plomo absorbido es transportado por la sangre y distribuido en un 90 % a hueso y el restante a tejidos blandos, hígado y riñón. Atraviesa fácilmente la barrera placentaria. La vida media del plomo en el organismo es variable: 3 a 4 semanas si el metal se encuentra en sangre, 4 semanas si se depositó en tejidos blandos y de 20 a 27 años si está en tejido óseo. Mecanismo de acción Compite con metales esenciales: calcio y zinc. Tiene afinidad por los grupos [sulfhidrilos](#)<sup>[D7]</sup> de las proteínas, alterando su función. Altera el transporte de iones esenciales.

El plomo es un elemento de reconocida capacidad tóxica que afecta a toda la población. Sin embargo, los niños son más susceptibles dado que, en relación con su masa, inhalan más aire e ingieren mayores cantidades de suelo que los adultos; pero, además, la interacción mano-boca, tan común durante la infancia, facilita la ingesta de polvo. Por si estos datos no fueran suficientes, es necesario considerar que la absorción gastrointestinal del plomo en niños es hasta cinco veces superior que en el adulto y la distribución a órganos extra-óseos (incluyendo el sistema nervioso central) también es mayor. Aunque actualmente las alteraciones neurocognitivas destacan como el efecto de mayor preocupación para la población infantil expuesta al metal, también se han demostrado efectos auditivos, cardiovasculares, nefrológicos y hematológicos entre niños expuestos a plomo. La definición de las concentraciones a las cuales este tóxico afecta los diferentes órganos y sistemas del niño todavía requiere de mayores investigaciones, pero existe evidencia que la toxicidad del plomo inicia a concentraciones corporales bajas. Por ejemplo, ha sido demostrada la capacidad del metal para generar cambios neurocognitivos a concentraciones alrededor de 5.0 µg/dL del tóxico en sangre. Con estos antecedentes, se entienden los esfuerzos por controlar la exposición al plomo; así, en la gran mayoría de los países, el metal ha sido eliminado de las gasolinas. Sin embargo, ante la nueva evidencia científica sobre su toxicidad a bajas concentraciones, mayores esfuerzos se realizan para evitar su presencia en pinturas, alimentos y aire. México no escapa a estos esfuerzos, y ya a partir de 1986 y con la participación de diversos científicos, fue posible gestionar la producción de gasolinas libres de plomo. No obstante, ahora se requiere controlar otras fuentes, dado que diversos estudios en distintas entidades del país han mostrado la existencia de niños expuestos al plomo y en diversos casos la exposición ha sido relacionada con efectos en la salud. Entre las fuentes de plomo que habría que controlar, además del barro vidriado, están los sitios contaminados donde el tóxico puede encontrarse en aire, polvo, suelo, agua y alimentos, y que afectan los diversos ambientes infantiles (casa, escuela y áreas de recreación). Los sitios

contaminados con plomo donde los niños juegan, estudian y viven implican un riesgo para la salud infantil (Flores, 2012)<sup>[D8]</sup>.

### **2.4.3 Cadmio (Cd).**

El cadmio (cadmia en latín y en griego kadmeia, significa “calamina”, nombre que recibía antiguamente el carbonato de cinc) fue descubierto en Alemania en 1817 por Friedrich Stromeyer como una impureza en el carbonato de cinc. Desde esa fecha rara vez se utilizó; hasta hace apenas unos 50 años se le encontraron aplicaciones metalúrgicas. Por lo general, el cadmio no se halla en el ambiente como un metal puro, es más abundante en la naturaleza en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos en el cinc, plomo y menas de cobre. El cadmio suave y de color blanco plateado es relativamente barato, ya que es un subproducto del procesamiento de metales más valiosos, como el cinc y el cobre. Las diversas aplicaciones del cadmio en la galvanoplastia, la galvanostelgia y la galvanización, así como su uso en plásticos, pigmentos para crear tintes, pinturas y cerámica de color amarillo brillante (sulfito de cadmio), naranja, rojo (selenito de cadmio) y marrón, y en baterías de níquel y cadmio, se deben a su gran resistencia a la corrosión, a sus propiedades electroquímicas y a otras características químicas provechosas. Se utiliza como pigmentos en 9%; en galvanización y electrodeposición en 7% y como estabilizador de plásticos en 1.2%. Además, puede encontrarse en los conductores eléctricos, productos de cloruro de polivinilo (PVC), fotoceldas, llantas, radiadores para automóviles, componentes electrónicos y elementos calefactores. Asimismo, está naturalmente presente en diversas concentraciones en la roca de fosfato extraída para ser utilizada como fertilizante. Aparte de la fusión de los minerales de cinc, plomo y cobre, el cadmio es liberado por las emisiones volcánicas y por la quema de combustibles fósiles y de biomasa. Este metal ingresa al medio ambiente a través de diversas fuentes naturales y antropogénicas. La producción mundial de cadmio se incrementó en los últimos años. En 2004 se produjeron 18,800 toneladas y en 2007 se llegó hasta 19,900 toneladas. Lo mismo ocurrió con el porcentaje de producción de baterías de níquel-cadmio, mientras que los

porcentajes de producción de las industrias tradicionales disminuyó debido a las presiones medioambientales y de salud. Se calcula que cada año se liberan al medio ambiente entre 25,000 y 30,000 toneladas de cadmio, de las cuales, alrededor de la mitad proviene de la erosión de las rocas que llegan a los ríos y posteriormente a los océanos. Asimismo, se liberan entre 4,000 y 13,000 toneladas de cadmio como consecuencia de actividades humanas como la minería y el consumo de combustibles fósiles. Un dato trascendental es que menos de 5% del metal puede ser reciclado, por lo que es importante considerar la contaminación ambiental que provoca. El cadmio que se encuentra en pequeñas partículas o adherido a ellas puede ingresar al aire y viajar grandes distancias antes de regresar a la tierra como polvo, lluvia o nieve. Además, no se descompone en el medio ambiente, pero puede tomar diferentes formas. La concentración de cadmio en el aire de áreas rurales varía de 0.1 a 5 ng/m<sup>3</sup>,<sup>[D9]</sup> en áreas urbanas de 2 a 15 ng/m<sup>3</sup> y en áreas industriales de 15 a 150 ng/m<sup>3</sup>. El tiempo de permanencia del cadmio en los suelos es de 300 años, aproximadamente, y 90% no se transforma. El cadmio llega a los terrenos agrícolas por deposición aérea (41%), con los fertilizantes fosfatados (54%) y por aplicación de abono de estiércol (5%).

#### **2.4.4 Efectos de la exposición al cadmio en la salud.**

Los metales pesados constituyen un riesgo considerable para la salud por el contacto frecuente laboral y ambiental. Un indicador de su importancia en relación con otros peligros potenciales es el rango que les adjudica la Agencia Estadounidense para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades, que cataloga los riesgos de los desechos tóxicos de acuerdo con su prevalencia y la gravedad de la intoxicación que originan. Entre los más peligrosos se encuentran el plomo, el mercurio, el arsénico y el cadmio; este último ocupa el lugar número 6 de la lista presentada por esa agencia, razón por la cual es de gran interés toxicológico. La comida y los cigarrillos son las principales fuentes de exposición al cadmio en la población general. Esta exposición también puede darse a través de líquidos, ya sea por las cañerías que contienen cadmio en sus soldaduras o

por el agua que ha sido contaminada por las fábricas que tiran sus desechos al río, como las que hacen acabado de metales, electrónica, manufactura de pigmentos (pinturas y agentes colorantes), baterías, estabilizadores plásticos, plaguicidas (fungicidas), electrodeposición, entre otras. Se ha calculado que más de 80% del cadmio ingerido proviene de cereales (especialmente arroz y trigo), verduras (de hoja) y raíces (principalmente papas y zanahorias). Los mariscos, así como el hígado y los riñones de animales son alimentos que contienen concentraciones de cadmio mayores de 0.05  $\mu\text{g/g}$  incluso en circunstancias normales. Es importante saber qué cantidad podría considerarse una ingestión tolerable; la ingestión diaria normal con la dieta (IDD) ha sido propuesta por algunas organizaciones internacionales que establecen como valor límite tolerable 7  $\mu\text{g/semana}$  por kg de peso. Por vía digestiva, consumos de hasta 100 mg producen síntomas gastrointestinales, mientras que a partir de los 350 mg se considera que es potencialmente mortal. Por vía inhalatoria, las concentraciones ambientales superiores a 200  $\mu\text{g/m}^3$  inducen la “fiebre de los metales”; a partir de 500  $\mu\text{g/m}^3$  aparece neumonitis química y más allá de los 5,000  $\mu\text{g/m}^3$  es mortal. En 2009, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria estableció una ingestión semanal tolerable en los alimentos de 2.5  $\mu\text{g}$  por kg de peso corporal. Al año siguiente, el Comité Mixto de la Organización de Agricultura y Comida de Estados Unidos (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) determinaron un insumo mensual tolerable provisional en los alimentos de 25  $\mu\text{g}$  por kg de peso corporal. Mientras tanto, la OMS fijó una ingestión semanal tolerable provisional de 7  $\mu\text{g/kg}$  de peso corporal. Fumar aumenta considerablemente la concentración de cadmio en el ambiente, sobre todo en espacios cerrados. De manera natural, la hoja de tabaco acumula altas concentraciones, por tanto, el fumador está expuesto a cantidades significativamente elevadas. El humo del tabaco arrastra el cadmio a los pulmones. La sangre lo transportará al resto del cuerpo, donde puede incrementar los efectos por potenciación del consumo en alimentos ricos en este metal.

Un cigarrillo contiene de 1 a 2  $\mu\text{g}$  de cadmio y, dada una absorción pulmonar de 10%, al fumar una cajetilla diariamente se genera una dosis de 1 mg de cadmio al año por el solo humo del tabaco. En cuanto a las exposiciones laborales, la inhalación es la ruta principal de ingreso y la absorción a partir de esta vía depende del tipo de compuesto inhalado, del tamaño de las partículas y de su retención en el pulmón. Otro punto a resaltar es que las personas que tienen bajas reservas de hierro son especialmente vulnerables a los efectos adversos del cadmio: la deficiencia crónica de nutrientes puede dar como resultado la regulación alta de los sistemas para optimizar la captación de los nutrientes faltantes, y ello puede ocasionar la captación de cadmio a través de algunos de estos sistemas (Pérez, 2012).

#### **2.4.5 Arsénico (As).**

La contaminación por arsénico (As) es uno de los principales problemas ambientales en todo el mundo. Las fuentes naturales de As incluyen erupciones volcánicas y la meteorización de minerales que contienen As y yacimientos minerales, pero también zonas mineralizadas naturalmente de arsenopirita formadas por la meteorización de rocas con contenido de sulfuros. Muchos de estos minerales presentan una alta variabilidad espacial y muchos de ellos pueden encontrarse en concentraciones más altas en capas más profundas. Sin embargo, el As es poco bioaccesible cuando procede de fuentes naturales (Rodríguez, *et al.*, 2019).

#### **2.4.6. Ingesta de arsénico: El impacto en la alimentación y la salud humana.**

El As ocupa el lugar 20 en abundancia de los elementos en la corteza terrestre y se distribuye de manera no uniforme por todo el mundo, dependiendo de la región geográfica, características geoquímicas del suelo y actividad industrial. Alrededor de un tercio del arsénico presente en la atmósfera proviene de fuentes naturales como reacciones ambientales, actividad biológica, emisiones volcánicas, y el resto proviene de un amplio rango de actividades antropogénica. El As se



clasifica como uno de los elementos químicos más tóxicos y carcinogénicos, representando un serio problema ambiental en varias regiones de México y el mundo. La Comarca Lagunera se localiza en la parte noreste de México y desde 1963 se reportan elevadas concentraciones de arsénico en el suelo, agua y agua subterránea. El As puede oxidarse mediante procesos químicos o biológicos. La problemática de contaminación por arsénico se localiza principalmente en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Nuevo León, Puebla, Sonora y San Luis Potosí. El área afectada es de aproximadamente 3200  $\text{km}^2$ , siendo la Comarca Lagunera, en los estados de Coahuila y Durango, la región donde se reportan las mayores concentraciones. La primera intoxicación crónica por arsénico en esta región se reportó en 1958, y desde entonces se habla de casos por contaminación endémica. La Comarca Lagunera es una de las áreas más importantes de la agricultura y ganadería; además, es la principal cuenca lechera en el país. El arsénico se acumula en el organismo, en la orina, piel, uñas de los dedos y cabello por exposición crónica, y a ciertas concentraciones ocasiona afecciones severas (Rangel, 2015).

Tabla 1. Valores límites de algunos metales pesados para uso de terrenos residenciales para diferentes países. Modificado de Provoost, Cornelis y Swartjes,2006.

País	Contaminante (mg/Kg dm)							
	Arsénico	Cadmio	Cromo III	Cobre	Mercurio	Plomo	Níquel	Zinc
Bélgica <sup>1</sup>	110	6	300	400	15	700	470	1000
Francia	37	20	130 <sup>11</sup>	190	7	400	140	9000
Alemania <sup>2</sup>	50	20	400	N.A.	20	400	140	N.A.
Gran Bretaña + Planta	20	8 <sup>10</sup>	130	N.A.	8	450	50	N.A.
Gran Bretaña + Planta <sup>4</sup>	20	30	200	N.A.	8	450	75	N.A.
Hungría	15	1	75	30	0.5	100	40	200
Países bajos	55	12	380	190	10	530	210	720
Polonia <sup>6</sup>	2	4	-----	150	---	100	---	300
España	---	1-3	100- 150	50-210	1-1.5	50-300	30-112	150- 450
Suecia	15	0.4	120	100	1	80	35	350
Australia <sup>8-</sup> Residencial + jardín	100	20	100 <sup>12</sup>	7000	200	300 <sup>15</sup>	400	8000
Australia <sup>8-</sup> Residencial + sin acceso al suelo.	500	140	500 <sup>12</sup>	30000	600	1200 <sup>13</sup>	900	60000
Canadá	12	10	64	63	6.6	140	50	200
China	30 <sup>9</sup>	0-43	58.9	31.7	--	37.5	27.5	117.7
Noruega	2	3	25	100	1	60	50	100
Suiza	N.A.	20	N.A.	1000 <sup>13</sup>	N. A	1000 <sup>16</sup>	N.A.	2000

1. Decreto de Remediación de Suelos nombrado Viarebo del 8 de julio de 2002.
2. Normas aplicables como legislación nacional para 'wirkungspad Boden-Mensch' (rutas de exposición suelo – humanos).
3. Zona residencial con huerto.
4. Zona residencial sin huerto.
5. Regulación número 10/2000 del Gobierno Húngaro.
6. Normas polacas de calidad del suelo para la capa superficial del suelo (0-30 cm) establecidas para el grupo B de uso de la tierra (tierras agrícolas, zonas forestales, residenciales y recreativas) Regulación 2002.
7. Decreto Real 1310/1990 del 29 de octubre de 1990 que regula el uso de lodos residuales en la agricultura (B.O.E. Nº 262, 1 de noviembre de 1990). Valores para los suelos con un pH inferior o superior a 7.
8. DIRECTRIZ SOBRE Niveles de Investigación para Suelo y Aguas Subterráneas: Protección Nacional del Ambiente (Evaluación de la Contaminación de Emplazamientos) Medición cuando haya variación 2011.
9. APAE (1995) Normas de calidad ambiental para suelos. Administración de Protección Ambiental Estatal, China, GB 15618-1995.
10. 1/2/8 mg/kg dm relacionado con las normas de limpieza de suelos a un pH de 6, 7 y 8 respectivamente. Se usó la norma de limpieza de 8 mg/ kg dm en esta comparación.
11. Cromo total.
12. Cromo (VI).
13. 1000/4 relacionado con la norma de limpieza de suelo como concentración total y concentración soluble. Se usó la norma de limpieza de 1000 mg/kg dm en esta comparación.
14. 23/6.1 describe el mercurio clorado y el mercurio orgánico. Se usó la norma de limpieza de 23 mg/kg dm en esta comparación.
15. HIL para plomo basado en modelos de plomo en sangre (EUBK para HIL A, B y C y modelo de plomo en sangre para HIL D donde se consideró 50% de la biodisponibilidad oral).
16. 16 1000/0.1 relacionado con la norma de limpieza del suelo como concentración total y concentración soluble. Se usó la norma de limpieza de 1000 mg/kg dm en esta comparación.
17. 2000/5 se relaciona con la norma de limpieza del suelo como concentración total y concentración soluble. Se usó la norma de limpieza de 2000 mg/kg dm en esta comparación[w11].

Tabla 2. Concentraciones de referencias totales (CRT) por tipo de uso de suelo. (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, México).

Contaminante	Uso agrícola / residencial /comercial (mg/kg)	Uso industrial (mg/kg)
Arsénico	22	280
Bario	5400	67000
Berilio	150	1900
Cadmio	37	450
Cromo hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1600	20000
Plata	390	5100
Plomo	400	800
Selenio	390	5100
Talio	5.2	87
Vanadio	78	1000

Se tomo a consideración el Pb, Cd y <sup>[D12]</sup>As ya que son metales altamente tóxicos. En el año de 1900 se funda la Compañía Metalúrgica de Torreón, a fin de operar una fundición ubicada en la ciudad de Torreón Coahuila, actualmente denominada industrias Peñoles, S.A.B. de C.V. Como antecedente este complejo metalúrgico fue un productor importante de arsénico hasta 1976, año en que interrumpió esta rama productiva. Tomando en cuenta los 76 años de producción de arsénico y la característica de biodisponibilidad de este mismo, se considera de suma importancia estudiar dicho metal por los años que se trabajó. Después

de 1976 desarrollaron una capacidad industrial creciente en la producción de plata, zinc, cadmio, bismuto, entre otros metales. La actividad industrial prolongada durante más de 100 años, en el transcurso de este tiempo, 80 años fueron operados prácticamente sin un control ambiental, la legislación se consideró laxa, rezagada y con poca capacidad de operación y supervisión, lo que provocó un impacto ambiental grave y de magnitud no bien estudiada, hasta 1995 (García, *et al.*, 2007).

De acuerdo a Zhang (2019) el cambio dinámico se calcula por formulas clásicas para la acumulación de metales pesados, por lo tanto, el riesgo para la salud humana en el futuro se describe en forma de series de tiempo. De acuerdo a estos cálculos muestran que las tasas de contribución de las fuentes, de los seis metales (Pb, Cd, As, Zn, Ni, Cr) cambian continuamente con el tiempo. El Pb, Cd y As asumen las tasas de crecimiento más altas (400%, 500% y 165%), mientras que Zn, Ni, Cr posee un crecimiento relativamente menor (<130%), en comparación con sus valores de fondo correspondientes. He ahí la relevancia de centrar la investigación en el Pb, Cd y As ya que representan un mayor riesgo en la salud humana.

### **3. DESCRIPCIÓN GENÉRICA DE LA EMPRESA INDUSTRIAS PEÑOLES, S.A.B. DE C.V.**

En el mes de marzo del año de 1887, un grupo de empresarios mexicanos emprendedores fundó la Compañía Minera de Peñoles, con el propósito de explotar tres minas que se encontraban en la Sierra de Peñoles, municipio de San Pedro del Gallo, en el estado de Durango. La Compañía estableció su planta metalúrgica y empezó a crecer de manera acelerada, por lo que fue necesario un ferrocarril de vía angosta, que uniera a Mapimí con Bermejillo, alumbrado eléctrico, red telefónica, comunicaciones subterráneas entre las minas y el famoso Puente Colgante de Ojuela. En 1900, en la todavía Villa de Torreón, un grupo de mexicanos fundó la Compañía Metalúrgica de Torreón, S.A. para establecer una fundición de plomo. El primero de junio de 1901, inicia sus

operaciones la Planta y en un período muy corto duplicó su capacidad original. En 1917 la Compañía de Minerales y Metales adquirió el 80% de la Compañía Metalúrgica de Torreón, y en 1920, la Planta pasó a la Compañía Minera de Peñoles. Al declinar los años veinte el mundo sufrió una profunda crisis económica y cayeron los precios de los metales. Al estallar la Segunda Guerra Mundial, nuestro país se convirtió en un proveedor importante de metales y otras materias que requería la industria bélica.

Esta época fue decisiva para el crecimiento de la industria mexicana y para Peñoles. El Sr. Bernhard Rohe, quien estaba al frente de Peñoles, convenció a los señores José A. García y Sr. Raúl Baillères para iniciar las negociaciones de mexicanización de 1957, culminando en 1961 con la creación de Metalúrgica Mexicana Peñoles, S.A., primera empresa minera que se mexicanizó. En 1961, Peñoles adquirió la mayoría de las acciones de la Compañía Minera Fresnillo, S.A. e inició la construcción de las instalaciones de la nueva empresa Química del Rey, S.A. El 1° de septiembre de 1968 se creó una nueva empresa, Industrias Peñoles, S.A. de C.V. Desaparece Metalúrgica Mexicana Peñoles, S.A. y se transfieren sus operaciones y plantas metalúrgicas de fundición y afinación de metales a una planta filial, METMEX PEÑOLES, S.A. DE C.V. Hoy por hoy, METMEX PEÑOLES, S.A. DE C.V., es una empresa subsidiaria de Industrias Peñoles que genera 2,276 empleos directos en Torreón Coahuila. Cuenta con una Fundición de Plomo, planta Electrolítica de Zinc, Refinería; plantas de Oleum, Sulfato de Amonio, Bióxido de Azufre Líquido, Polvo de Zinc, dos plantas de Tratamiento de Aguas y dos de Ácido Sulfúrico, además instalaciones en Bermejillo, Durango. y Ramos Arizpe, Coahuila.

### 3.1 Análisis de los hechos y definición del problema

Para el año 2005, las condiciones de la infraestructura de automatización de las empresas del negocio Metales eran las siguientes:

1. Algunas áreas de planta tenían sistemas de control que en su momento fueron de vanguardia pero que ya habían llegado a su etapa de obsolescencia.

Intermitentemente se provocaban paros de planta por problemas en los sistemas de control.

2. La mayor parte de los procesos se controlaban en forma manual soportados por instrumentación tradicional y sistemas de control muy limitados.

3. Las redes industriales para los sistemas de control eran obsoletas, poco confiables e inestables, además de que no cumplían estándares industriales. Intermitentemente se provocaban paros de planta por problemas en las redes de datos.

4. La mayor parte de los sistemas de control no guardaban un registro histórico de eventos, lo que no permitía el análisis estadístico de los del proceso, ni análisis de causa raíz en caso de paros de planta o problemas operativos.

5. Los sistemas de energía eléctrica y sistemas de tierras presentaban problemas que provocaban paros de planta 17.

6. En general no se tenía la disciplina de dar un mantenimiento adecuado a la infraestructura de automatización: instrumentos, válvulas, sistemas de control y redes industriales.

7. La mayor parte de los procesos no estaban documentados, ni como proceso operativo ni como proceso automatizado.

8. La mayoría de los cuartos de control no eran funcionales y estaban sucios y descuidados.

9. Se tenía una dependencia excesiva de empresas externas con costos de desarrollo y mantenimiento extremadamente altos.

10. La capacitación, adiestramiento y certificación a personal de operación para el uso de los sistemas de control instalados o no se daba o era muy deficiente. Esto traía como consecuencia que los sistemas automatizados no eran utilizados eficientemente (Morales, 2011).

La contaminación por metales pesados en México es un problema que va en aumento debido a la actividad antrópica, específicamente la minería. Los metales contaminantes más importantes en México, dada su toxicidad y abundancia son: mercurio, arsénico, plomo y cromo. Retomando los puntos anteriores “análisis de los hechos y definición del problema” con la situación de la metalurgia de Peñoles se puede decir que es el origen de la problemática de la intoxicación o casos de envenenamiento que se suscitó en Torreón por la exposición de los metales pesados, la comunidad en general, pero que afecto principalmente a los niños. La problemática que fue expuesta ante los medios que poco se hizo, actualmente aún hay casos mismos que han repercutido de generación en generación dado la alta toxicidad de dichos metales por las actividades que desempeña la metalúrgica. Dado el impacto que genero se indago más<sup>[D15]</sup> sobre el asunto por lo tanto se describe a continuación lo que desencadeno en esos años.

### **3.2 La situación de Torreón.**

El municipio de Torreón se localiza en la parte oeste del sur del estado de Coahuila, en las coordenadas 103°26 '33" longitud oeste y 25°32 '40" latitud norte, a una altura de 1,120 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte y al este con el municipio de Matamoros; al sur y al oeste con el estado de Durango. Se localiza a una distancia aproximada de 265 kilómetros de la capital del estado. Cuenta con una superficie de 1,255.98 kilómetros cuadrados, que representan el 0.82% del total de la superficie del estado. Física y geográficamente está conformado por una planicie semidesértica con un clima caluroso y un alto grado de aridez<sup>[w16]</sup>.



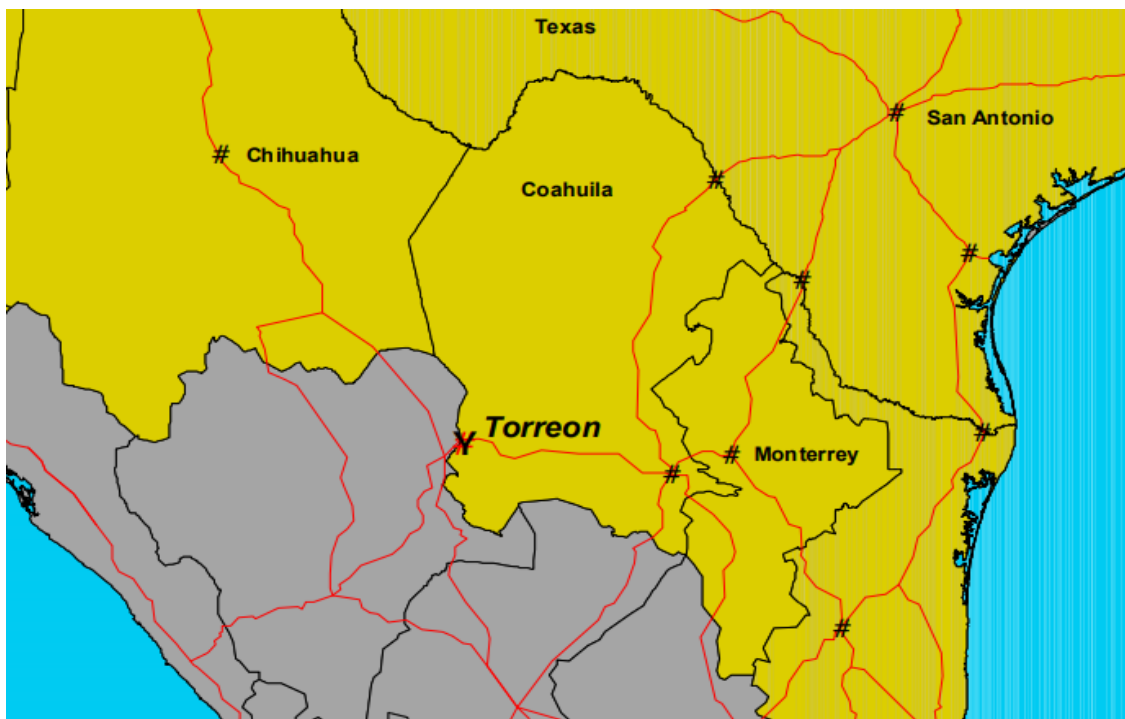


Figura 3. En Defensa del Ambiente, A.C. Torreón, Coahuila, 1999.

Esta planicie con grandes llanuras reseca, bolsones y valles muy extensos, cuenta con pocas prominencias orográficas, pero que tienen mucha importancia no obstante que son sierras y cerros de mediana elevación. El clima en el municipio es de subtipos secos semicálidos; la temperatura media anual es de 20 a 22°C y la precipitación media anual se encuentra en el rango de los 100 a 200 milímetros en la parte noreste, este y suroeste, y de 200 a 300 en la parte centro-norte y noroeste, con régimen de lluvias en los meses de abril, mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre y escasas en noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo; los vientos predominantes tienen dirección sur con velocidades de 27 a 44 km/h. La frecuencia de heladas es de 0 a 20 días y granizadas de 0 a 1 día en la parte norte-noroeste, sur-oeste, y de uno a dos días en la parte sureste. El río Aguanaval entra por el sur del municipio, desplazándose hasta el oeste, sirviendo como límite estatal entre Coahuila y Durango (INAFED, 2019). El río Nazas-Aguanaval se localiza en el norte del municipio y también llega a servir como límite con el estado de Durango; este río se emplea para irrigar a la zona agrícola más importante de la entidad; ambos ríos son los únicos en México

que no desembocan en el mar, sino en la formación de lagunas, de ahí el nombre de Comarca Lagunera.

### **3.3 Casos de envenenamiento.**

La Doctora Lilia Albert realizó los primeros estudios sobre el problema del plomo en Torreón en 1978. Desde entonces sus hallazgos y las denuncias que le siguieron cayeron en oídos sordos. El Dr. Calderón Salinas realizó diversos estudios sobre este tema (Calderón, ,1996). Incluyendo su tesis de licenciatura presentada en 1986. Esta inercia a favor de Peñoles y contra las denuncias ciudadanas está lejos de haber desaparecido a la luz de la controversia actual. A finales de enero de 1999, Felipe Vallejo, Director Municipal de Ecología de Torreón, continuaba exonerando a Peñoles de su responsabilidad en el caso de los niños envenenados (Guadalupe, 1999). Cuando ya se sabía de la gravedad del problema, el diputado local Roberto Garza Garza (PRI) afirmaba, contra la opinión de la ciencia médica, que los niveles de plomo encontrados en la sangre de los niños de Torreón no eran de peligro (Coronado, 1999). Todavía en marzo de 1999, Jesús Nakamichi Aguilar, jefe de la Jurisdicción Sanitaria número 6 de la Secretaría de Salud, declaraba ignorar de dónde provenía el plomo que estaba envenenando a los niños de Torreón. El problema se agrava porque muchos talleres están conectados, lo que hace que la contaminación del área sea frecuente. Estos trabajadores y sus familias tienen mayor riesgo de intoxicación por plomo y enfermedades relacionadas (Caravanos, 2014). La empresa ha dicho a lo largo de los años que cumple con la ley, pero se le olvida precisar que la legislación ambiental mexicana es laxa y que una gran cantidad de normas oficiales simplemente no existen. Incluso, algunas normas que sí existen han sido violadas por la empresa. La propia PROFEPA admite que por varios años se han rebasado las concentraciones máximas de plomo en el aire, rebasando en ocasiones la norma entre once y cincuenta y tres veces (Lopez,1999). Estas declaraciones, en el sentido de estar cumpliendo con una norma imperfecta, han servido de una cortina de humo que ha evitado también que el problema se solucione. Esto indica que los niveles excesivos de Pb, Cd y As causarán un

riesgo inaceptable para los niños en la región estudiada, en las próximas generaciones (Zhang, 2019).

### **3.4 Los casos de envenenamiento reciente que iniciaron el escándalo.**

En 1998, un pediatra local, el Dr. José Manuel Velasco Gutiérrez empezó a ordenar análisis de plomo a los pacientes de su consulta privada. Los resultados que encontró le resultaron alarmantes. De cincuenta y un niños estudiados, veintisiete tenían niveles menores a 10  $\mu\text{g/dL}$  de plomo en sangre, nueve entre 10 y 14  $\mu\text{g/dL}$ , tres entre quince y diecinueve  $\mu\text{g/dL}$ , ocho niños entre veinte y cuarenta y cuatro  $\mu\text{g/dL}$  y cuatro entre cuarenta y cinco y sesenta y nueve  $\mu\text{g/dL}$ . Puestos en un mapa los resultados de los análisis y los domicilios de los pequeños se veía que el nivel de plomo en sangre aumentaba conforme el domicilio estaba más cercano a la fundidora de Met-Mex Peñoles. Los cuatro pacientes con los valores más elevados (45-69  $\mu\text{g/dL}$ ) eran vecinos de la colonia Luis Echeverría.

Estos casos fueron comunicados a la Secretaría de Salud verbalmente y por escrito sin que esta dependencia hiciera nada, ni siquiera responder a las comunicaciones escritas del doctor Velasco como es su obligación de acuerdo con la Ley de Responsabilidades de los Funcionarios Públicos (Cabrera, 1999).

Sin embargo, los seres humanos también pueden estar expuestos al plomo a través de alimentos contaminados, agua, polvo de la casa, pintura, tierra y el aire. Después de que el plomo entra en el cuerpo, la cantidad absorbida depende principalmente de la forma física y química del plomo, particularmente el tamaño de partícula y la solubilidad del compuesto específico. Otros factores muy importantes en el nivel de acumulación en el cuerpo son la edad, el sexo, el estado nutricional y los antecedentes genéticos (ATSDR, 2005). Las diferencias fisiológicas entre niños y adultos representan gran parte de la mayor susceptibilidad de los niños pequeños a los efectos nocivos del plomo. La exposición al plomo en niños pequeños es un grave problema de salud ambiental

en todo el mundo. Para prevenir los efectos del plomo en la salud y reducir los niveles de plomo en la sangre (BL) en niños expuestos al medio ambiente, algunos países han implementado programas de prevención de la exposición al plomo.

Estas actividades actualmente incluyen pruebas de detección de los niveles de plomo en la sangre, programas de educación, comunicación de riesgos, programas de reducción de polvo comunitario, estudios de vías de exposición y ensayos de intervención. Durante 1998-2010 en niños expuestos al medio ambiente de 0 a 15 años y para documentar las estrategias y acciones implementadas para reducir los BLLs por el Secretario de Salud del Estado de Coahuila y por la Compañía Met-Mex Penoles (Recio, 2012). Los efectos tóxicos de la exposición a plomo en los niños, desde la gestación hasta la infancia, 2-7 han sido un problema de salud pública ampliamente estudiado. A pesar de la eliminación del plomo de las gasolinas en 1997, la población mexicana continúa expuesta a este problema por el uso de loza de barro vidriada (LBV) [D17] (Terrazas, 2015). Considerando esta situación se inició una investigación de bioprospección de bacterias resistentes a metales pesados (Pb, Cd y As) con el objetivo de [D18] aislar a largo plazo microorganismos que mitiguen el impacto que dichos metales han generado en el transcurso de los años.

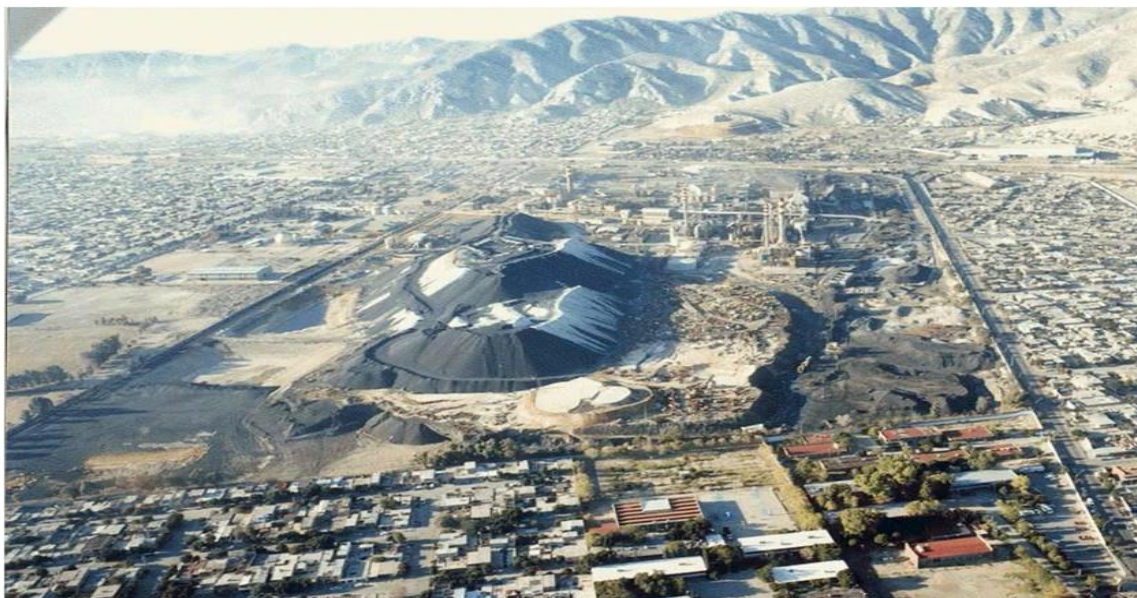


Figura 4. Vista aérea de la fundición de metales Peñoles Met-Mex y comunidades aledañas, alrededor de 1999. La vista es hacia el sur. La pila de desechos de la fundición ocupa el primer plano central, la fundición y las oficinas están en el fondo central, detrás de la pila de desechos. Foto de: Programa para mejorar la calidad del aire en la región de la Comarca Lagunera 2010–2015. SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales), sin fecha, sin derechos de autor.

Las fuentes documentadas de exposición a metales tóxicos y metaloides en Torreón incluyen altos niveles de plomo, cadmio y arsénico en el polvo de los caminos en áreas residenciales a favor del viento y adyacentes a la planta Met-Mex Peñoles, la más grande de plomo-zinc-plata complejo de fundición en América Latina y el cuarto más grande del mundo, y concentraciones de arsénico moderadamente altas en el agua potable en toda la ciudad (8–75  $\mu\text{g} / \text{l}$ ). Aunque los niveles de BPb en niños han disminuido sustancialmente desde 1999 (media de 17,0  $\mu\text{g} / \text{dl}$ ) a 2010 (media de 5,5  $\mu\text{g} / \text{dl}$ ) después de un programa de control de emisiones, remediación ambiental y vigilancia infantil al plomo a principios de siglo, la exposición al plomo sigue siendo un importante problema de salud pública en Torreón (García, 2014).

Fue un caso muy sonado, esto despertó el interés de varias personas en general como fue el caso de: García Vargas, G. G.; Rubio Andrade, M.; Rosales

González, M. G.; Goytia Acevedo, R.; García Arenas, G.; Candelas Rangel, J. L.; Meza Velazquez, R.; Caravanos, J. [D21] en el año de 2007, quienes realizaron un estudio piloto sobre la contaminación por metales y metaloides en suelos de casas habitación de residentes de la ciudad de Torreón, en dicha ciudad se asienta la empresa metalúrgica Met-Mex, Peñoles. Como se apreció en el texto anterior donde se presenta evidencia sólida que muestra que más del 90 % de los niños escolares residentes en una colonia aledaña a la empresa metalúrgica tienen niveles de plomo en sangre superiores a 10 mg/dL, esto gracias a los estudios que se realizaron en su momento, el valor que se presenta en la sangre es considerado como límite seguro por agencias internacionales (CDC, 1991) y aceptado por la actual normatividad mexicana (NOM-199-SSA1-2000). Estas evidencias provocan el surgimiento de interrogantes sobre la contaminación, en matrices ambientales que pudieran bosquejar el desarrollo de las rutas de exposición, que explicara la intoxicación por plomo en niños de la región. Se seleccionaron tres vecindarios, el primero (Torreón 1) localizado en un vecindario localizado a 250 m al suroeste de la barda perimetral de la empresa, el segundo (Torreón 2) localizado a 1450 m al oeste de la empresa, y el tercero (Gómez Palacio) localizado a 9000 m al noroeste de la empresa (basal). De cada uno de los vecindarios se seleccionaron cinco casas y en cada una se tomó una muestra compuesta del patio, consistente en la toma de 10 gramos de suelo superficial (2.5 cm), en cinco puntos. La muestra se mezcló, se homogenizó y se cribó en un tamiz de malla-100 y se determinó la concentración de metales en suelo por ICP masas (US-EPA, método 3050B).

En primer lugar, se muestran los resultados de la determinación de cadmio en suelos (Figura ), en donde se observa que las muestras de las casas del barrio de Gómez Palacio representan los valores basales, con valores de menos de 10 ppm, estando por debajo de los límites recomendados por EPA para suelos contaminados que son de 20 ppm. Por otra parte, todas las concentraciones obtenidas en las áreas de Torreón 1 y 2 sobrepasan este límite, siendo la menor de 80 ppm y la mayor de 760 ppm. Estos resultados corresponden con los obtenidos por Benin, *et al.*, (1999) donde los valores mayores obtenidos fueron

de 659 a 1497 ppm. En la Figura 6 se muestran las concentraciones de arsénico en suelos, donde de nuevo, el vecindario de la ciudad de Gómez Palacio muestra concentraciones menores al límite de detección (< 10 ppm), mientras que las concentraciones determinadas en los suelos de los vecindarios Torreón 1 y 2 llegaron a ser superiores a 50 ppm, siendo el valor máximo observado de 570 ppm. La mayor parte de los valores de las muestras de la ciudad de Torreón estuvieron por arriba de los valores meta recomendados por US-EPA para sitios contaminados que es de 65 ppm. También, los resultados estuvieron de acuerdo con los obtenidos por Benin, *et al.*, (1999), donde el mayor valor obtenido fue de 788 ppm. En la Figura 7, se muestran las concentraciones de plomo en los suelos de las casas muestreadas. A diferencia de los otros metales, las concentraciones de plomo en el suelo de las casas de Gómez Palacio fueron superiores al límite de detección, con un intervalo de 80 a 210 ppm. Sin embargo, todas estas concentraciones fueron menores al valor meta recomendado por US-EPA para sitios de alto contacto con niños que es de 400 ppm. En contraste, las concentraciones de plomo en suelo obtenidas en las casas de los vecindarios de Torreón 1 y 2, estuvieron por arriba de 400 ppm, con un intervalo de 1640 a 17320 ppm. De nuevo, estos resultados estuvieron de acuerdo con los reportados por Benin, *et al.*, (1999), donde el valor máximo descrito fue de 13231 ppm. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el suelo de las áreas habitacionales cercanas al complejo metalúrgico tiene altas concentraciones de los tres metales estudiados. Estas concentraciones de arsénico, cadmio y plomo superan en uno, dos y hasta órdenes de magnitud los niveles considerados como aceptables para sitios contaminados. El hecho de que el vecindario de referencia (Gómez Palacio) tenga niveles basales bajos, indica que las concentraciones de los metales en los suelos son por naturaleza bajos y que la contaminación observada es de origen derivado de las actividades industriales y humanas. También, los resultados de concentración de plomo en suelo explican los resultados extraordinariamente altos de plomo en la sangre de los niños (García, *et al.*, 2001) residentes de las áreas cercanas de la ciudad. También, se han encontrado concentraciones altas de arsénico y cadmio en los indicadores

biológicos de exposición de estos niños (Reporte anual del Fideicomiso del Programa de metales, 2004). Si bien los resultados mostrados en este trabajo son de 1999, los resultados de estudios recientes continúan siendo preocupantes

### Concentración de Cd en suelos

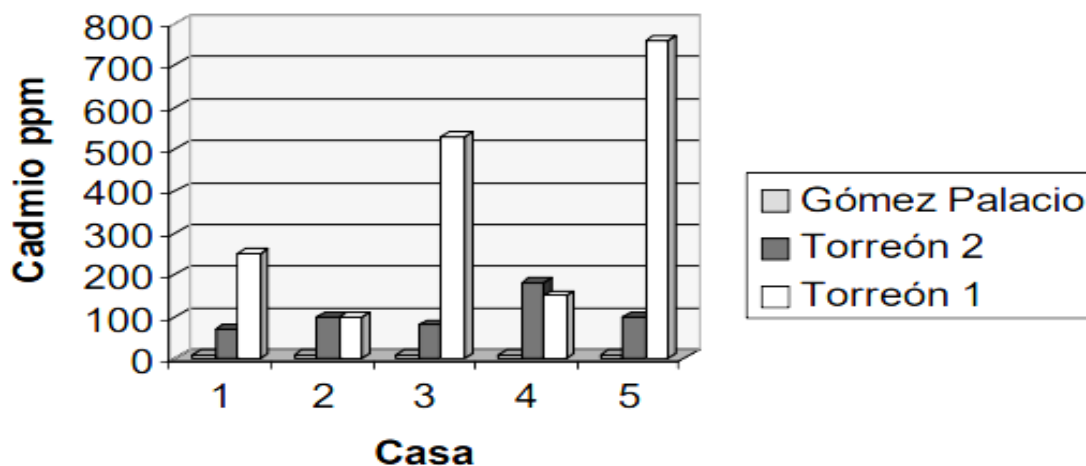


Figura 5. Representación de los resultados de la determinación de Cadmio en muestras compuestas de suelo de patios de cinco casas, ubicadas en tres vecindarios: Gómez Palacio, Torreón 1 y Torreón 2.

### Concentración de As en suelos

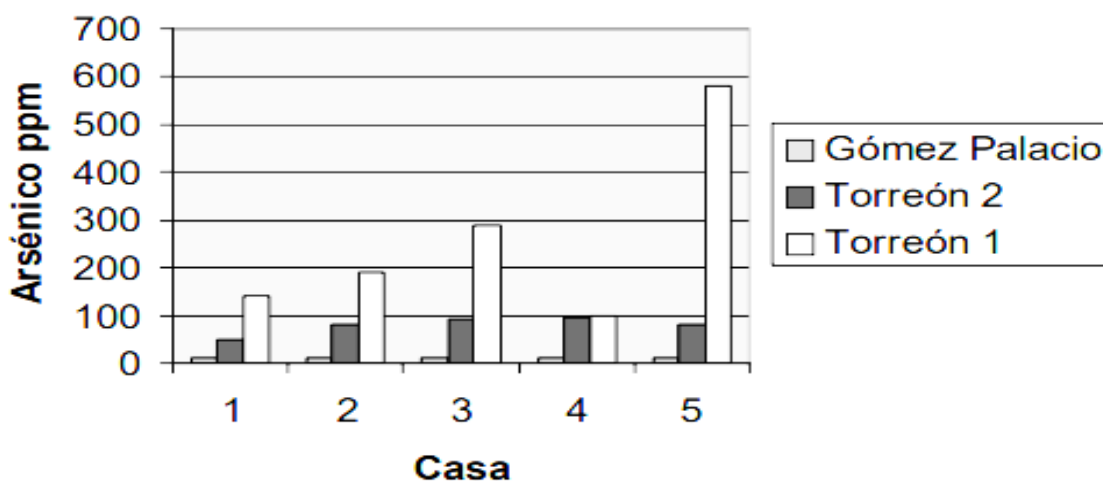


Figura 6.. Representación de los resultados de la determinación de Arsénico en muestras compuestas de suelo de patios de cinco casas, ubicadas en tres vecindarios: Gómez Palacio, Torreón 1 y Torreón 2



## Concentración de Pb en suelos

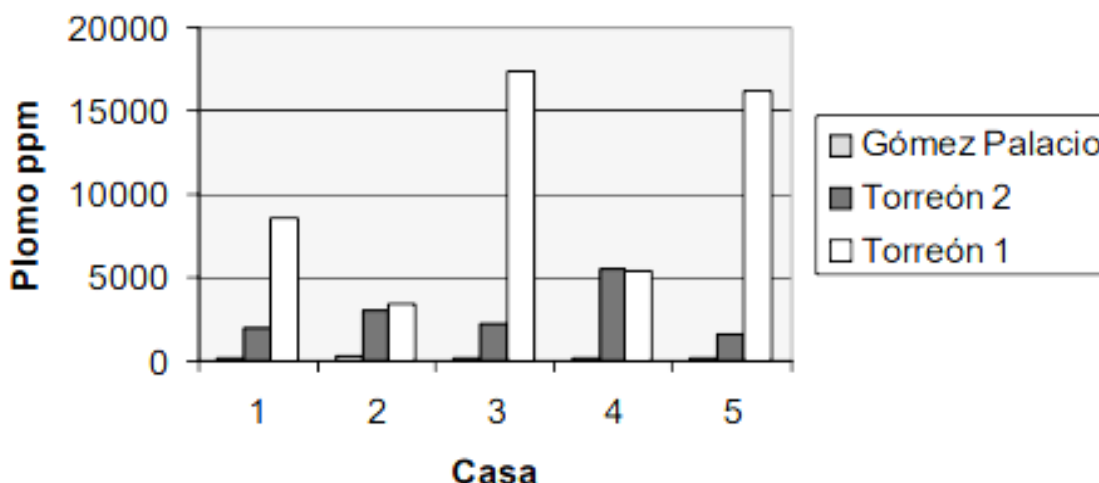


Figura 7. Representación de los resultados de la determinación de Plomo en muestras compuestas de suelo de patios de cinco casas, ubicadas en tres vecindarios: Gómez Palacio, Torreón 1 y Torreón 2.

#### 4. Mecanismos bioquímicos desarrollados por los microorganismos para el tratamiento de metales pesados.

Los microorganismos juegan un rol vital en la transformación de elementos traza incluidos los metales ya que influyen su biodisponibilidad y remediación, pueden alterar la toxicidad, solubilidad en agua y la movilidad del elemento. De esta manera los microorganismos modifican la concentración de metales pesados en el ambiente, pues estos cuentan con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para remover metales en solución. La capacidad de remoción de metales por bacterias, microalgas y hongos es superior a la reportada con métodos fisicoquímicos convencionales, también se conoce que la adquisición y remoción de los metales pesados puede ser selectiva teniendo en cuenta la capacidad metabólica de cada especie biorremediadora y el tipo de metal. Entre las transformaciones enzimáticas de los metales realizadas por microorganismos se incluyen la oxidación, la reducción, la metilación, la de metilación; las cuales

pueden dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Beltrán, 2016).

El aislamiento y la selección de microorganismos resistentes a los metales pesados es un problema crítico que se puede superar seleccionando cepas tolerantes a los contaminantes metálicos aislados de suelos contaminados. Los genes cromosómicos o plásmidos participan en los mecanismos de resistencia a los metales que representan una manipulación genética factible para la mejora de la cepa (Oger, 2003).

Otro aspecto que debe ser cuidadosamente considerado es la fase de crecimiento del microorganismo que generalmente se divide en cuatro pasos:

- 1) Fase de retraso: Tiempo de adaptación al nuevo entorno.
- 2) Fase exponencial: Un período caracterizado por la duplicación celular.
- 3) Fase estacionaria: La tasa de crecimiento es igual a la tasa de muertos [D22]
- 4) Fase de descomposición: Se está muriendo. La duración de cada paso es característica de cada espécimen.

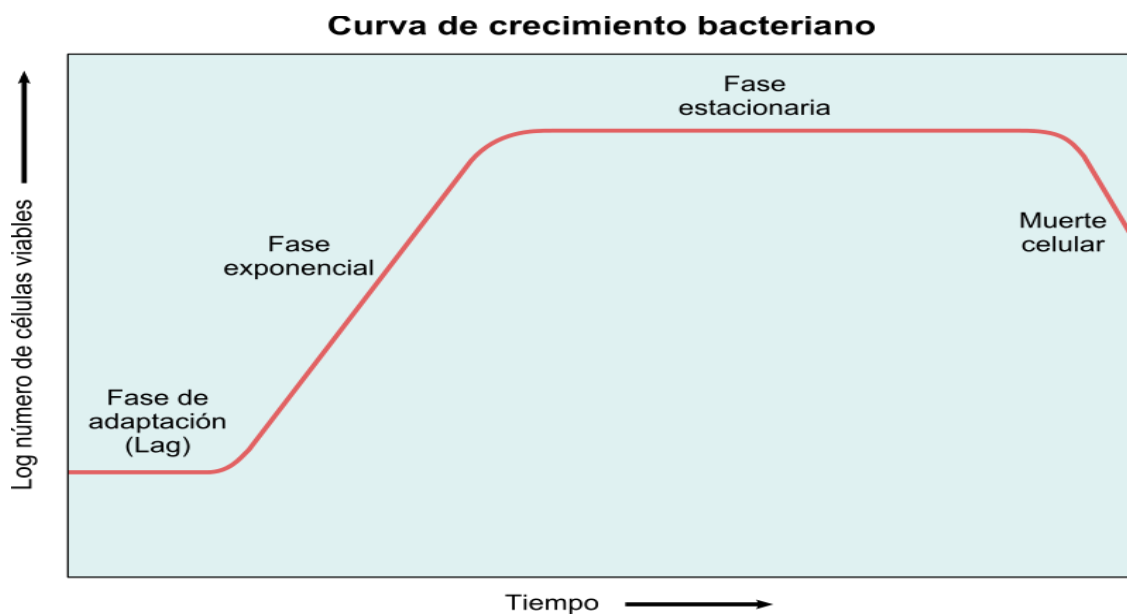


Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano, (Rojas, 2016).

Mientras que todo el ciclo de crecimiento de las bacterias puede tomar un par de días, puede durar semanas para levaduras o algas (Bai, 2009). Un requisito previo para cualquier estrategia operativa de biorremediación con organismos vivos es su confinamiento para evitar la diseminación especímenes exógenos en el medio ambiente, así como para protegerlos de depredadores (Murua, *et al.*, 2008). Por lo tanto<sup>[D23]</sup> el uso de bacterias es una buena opción u estrategia para la biorremediación de suelos contaminados por las características inofensivas.

#### **4.1 Efecto de los metales pesados sobre las bacterias.**

Como ya se mencionó la presencia de metales pesados puede inhibir el desarrollo de las poblaciones bacterianas, pero también posibilita el crecimiento de variantes resistentes a los efectos tóxicos de estos elementos debido a que a manera de selección artificial solo sobreviven aquellas bacterias con la capacidad de soportar el efecto toxico de los metales pesados (Cervantes, 1999).

Los metales pesados en concentraciones excesivas pueden tener un gran impacto en la estructura de la comunidad microbiana del suelo, la biomasa y las actividades. El efecto adverso de los metales pesados se ha observado a menudo como una reducción de la biomasa y la actividad microbiana. La baja biomasa y la actividad microbiana pueden limitar la descomposición de la materia orgánica del suelo y conducir a la acumulación de materiales orgánicos en suelos contaminados con metales pesados (Shi, 2002).<sup>[D24]</sup>

Los metales pesados debido a que tienen una gran afinidad por otros elementos y moléculas son muy tóxicos porque pueden desplazar a los elementos esenciales de sus sitios de unión. Las bacterias por lo general tienen vías de<sup>[D25]</sup> transporte para la obtención de metales esenciales traspasando la membrana celular al interior del citoplasma. Por desgracia los metales pesados pueden también cruzar la membrana celular, por medio de difusión, quimiosmosis incluso a través de las vías de otros metales esenciales (Roane, 2000).

Resistencia bacteriana a metales pesados<sup>[D26]</sup>

La resistencia bacteriana a metales pesados puede ser de tres tipos básicamente:

- Natural.
- Mutaciones cromosómicas.
- Causada por plásmidos.

La resistencia natural es intrínseca y la bacteria la posee como propiedad de su identidad genotípica (D27)(D28)(Fernández, 2002)(D29), la resistencia ocasionada por las mutaciones cromosómicas se debe tanto a cambios espontáneos en el genoma cromosómico bacteriano, como a cambios producidos por agentes físicos o biológicos externos, como por ejemplo las radiaciones y los bacteriófagos respectivamente.

Finalmente, la resistencia causada por plásmidos es la más común, es importante mencionar que los plásmidos son unidades de ADN bicatenario circular extramosómicas que poseen generalmente entre 5 y 5000 kilobases, estos elementos genéticos están estrechamente vinculados con la resistencia bacteriana tanto a metales pesados como a antibióticos, debido a que por lo general los genes encargados de codificar para ambos factores se encuentran en el mismo plásmido (D30)(Cervantes, 1999 a). Algunos mecanismos que poseen ciertas bacterias resistentes a metales pesados les permite sobrellevar el efecto tóxico de estos elementos. Entre estos mecanismos se encuentran principalmente los que involucran:

- a) Componentes celulares que capturan los iones, neutralizando así su toxicidad.
- b) Enzimas que modifican el estado redox de los metales y metaloides convirtiéndolos en formas menos tóxicas.
- c) Transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular.

Estos mecanismos pueden o no trabajar en conjunto, pero irremediablemente los más importantes son los últimos mencionados y de los actualmente de los

cuales se tiene más información gracias al descubrimiento de nuevas especies bacterianas y a la secuenciación completa de muchos genomas bacterianos (Cervantes, 2006<sup>[w31]</sup>).

## 4.2 Biorremediación

La discusión anterior lleva a establecer que el desarrollo sostenible se ha convertido en una prioridad para los responsables políticos del mundo. La necesidad de remediar estos medios ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías que hacen hincapié en la desintoxicación y la destrucción de los contaminantes, en lugar del enfoque convencional de disposición. Dentro de la amplia gama de tecnologías con el potencial de llegar a la meta de la sostenibilidad, la biorremediación, entendida esta como la aplicación de microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para la restauración del ambiente, podría ocupar un lugar importante. Esta tecnología actúa a través de las intervenciones de la diversidad biológica para los propósitos de mitigación (y siempre que sea posible, la eliminación) de los efectos nocivos causados por los contaminantes ambientales en un sitio dado. El término biorremediación acuñado a principios de la década de los 80, proviene del concepto de remediación que hace referencia a la aplicación de estrategias físico-químicas para evitar el daño y la contaminación del suelo. En el caso particular de la biorremediación se centra en la remediación biológica, basada esencialmente en la capacidad de los organismos vivos para degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes; los sistemas biológicos frecuentemente utilizados son microorganismos o vegetales. La biorremediación permite entonces reducir o remover los residuos potencialmente peligrosos presentes en el ambiente y, por lo tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas, dado que su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto de remediación cada uno de los estados de la materia, es decir, sólido (suelos o sedimentos), o bien directamente en lodos, residuos, etc. Líquido, en aguas superficiales, subterráneas y residuales; así como gases, derivados de las emisiones industriales.

### 4.3 Antecedentes de biorremediación

La biorremediación fue usada en una forma no refinada durante muchos años por la industria petrolera de los Estados Unidos. Surgió del conocimiento empírico de los operadores de las refinerías del petróleo, quienes desecharon los lodos de los separadores tipo API (Instituto Americano del Petróleo) y otros residuos aceitosos en forma de una capa delgada sobre la parte superior del suelo en un sitio próximo a la refinería. Esta técnica, llamada “landfarming” fue ampliamente usada sin comprender los procesos que causaban la degradación de los lodos. Posteriormente fue entendida de una manera científica, dado que académicos e industriales comprobaron que algunos microorganismos, sobre todo algunas bacterias, podían utilizar los hidrocarburos del petróleo como alimento y fuente de energía. Luego, investigaciones demostraron que estos microorganismos eran los principales responsables de la descomposición de aceites en el suelo de los “landfarm”. Del mismo modo, la estabilización aerobia de residuos sólidos orgánicos mediante el compostaje tiene una larga historia de uso. Además, los microorganismos y enzimas se han utilizado con éxito en aplicaciones diversas de biorremediación. Los microorganismos y las enzimas han sido el foco principal de los esfuerzos para mejorar la capacidad de biorremediación, asimismo, el uso de las plantas superiores en fitorremediación es un área importante de desarrollo. Hoy en día los procesos de biorremediación se han establecido tanto para tratamiento de suelo y aguas subterráneas contaminados in situ como ex situ. Se ha demostrado en las diferentes experiencias que cuando se adapta correctamente a las condiciones del medio a intervenir, la biorremediación puede ofrecer disminución significativa de costes y beneficios ambientales en comparación con tecnologías alternativas. Sin embargo, a pesar de que la biorremediación es a menudo considerada como un tratamiento efectivo económico y amigable del ambiente, enfrenta un nuevo reto: convencer a las compañías y a los organismos oficiales de su alto potencial, por cuanto se ha venido convirtiendo en una verdadera industria para sanear el ambiente de las afectaciones generadas por las actividades humanas.

#### 4.4 Aplicaciones de la biorremediación.

Las perspectivas para la aplicación de métodos biotecnológicos en la minería de oro, plata, cobre, etc., suelen ser más baratos que las tecnologías convencionales, por ejemplo, en la desintoxicación de efluentes, las bacterias se han venido utilizando en la minería de cobre y oro en Chile, India, Ghana, Uzbekistán y Australia; al menos 34% del cobre y el 15% del oro producido en el mundo proviene de estos países. Numerosas pruebas de laboratorio han demostrado la capacidad de los microorganismos en la biodegradación y biosorción. Sin embargo, su éxito depende de condiciones físicas y químicas estables que en condiciones de campo son fluctuantes como: pH, concentración del contaminante, la presencia de sólidos, entre otras. Ciertos contaminantes industriales no son degradables por procesos conocidos que ocurren naturalmente, como en el caso de biodegradación de bifenilos policlorados (PCB); es un reto para los investigadores desarrollar nuevos procesos de biorremediación. Por su parte, las plantas han demostrado tener la capacidad de absorber, metabolizar, acumular y retener metales pesados y otros contaminantes.

Los ejemplos incluyen *Thlaspi caerulescens* <sup>[w32]</sup> (Cadmio y Zinc), *Zea mays* y *Thlaspi rotundifolium* (Plomo y Diesel), y *Alyssum* (Níquel), *Gnaphalium chartaceum* (Cobre, Manganeso, Zinc y Plomo). Cabe destacar que el nivel de acumulación normal de las plantas varía entre 0,1 y 100 mg (por kg de masa vegetal), aunque en casos excepcionales, un 1-3% puede ser alcanzado, con un récord de 25% en masa seca de níquel acumulando por cada árbol. Es de aclarar, que estas especies presentan condiciones de crecimiento lento, baja biomasa y adaptación a las condiciones ambientales extremas (suelos contaminados), por cuanto el cultivo dificulta su desarrollo. Sin embargo, también se debe tener en cuenta las diferentes posiciones con respecto a las ventajas y desventajas que representa este tipo de tratamiento de orden biológico. A continuación, se reportan algunas de las visiones encontradas al respecto.

#### **4.5 Ventajas de la biorremediación.**

Con relación a otras tecnologías, la biorremediación, suele tener costos más bajos, provoca una menor intrusión en el sitio contaminado y en consecuencia, un daño ecológico menos significativo en el proceso de destrucción de los productos contaminantes. Diversos autores, coinciden en que a menudo, la biorremediación se puede hacer en el lugar, eliminando así los costos de transporte y pasivos, lo cual permite que el uso y fabricación industrial del sitio pueda continuar mientras el proceso de biorremediación se está aplicando. Adicionalmente, la biorremediación puede ser integrada con otras tecnologías en cadena, favoreciendo el tratamiento de los residuos mezclados y complejos y tiene la capacidad de reducir o descomponer de forma segura los contaminantes resultantes del proceso de recuperación. Otra ventaja que se evidencia en el uso de materiales renovables (residuos y subproductos) que ha impulsado la biorremediación de diferentes ambientes contaminados, está relacionada con cáscaras de semillas de girasol, maní, arroz y pipas; tallos y derivados del algodón, hierbas diversas, caña, maíz, sorgo, podas de vid, caña de azúcar, bagazo de tequila, coco y plátano, pulpa de café, papel de desecho, madera, aserrín y virutas. Por otro lado, la biorremediación está también en el centro del debate sobre las posibilidades que ofrece como tecnología en relación con los países en desarrollo.

Defensores de la biotecnología ambiental, argumentan que las tecnologías de lo vivo son más apropiadas para resolver cuestiones críticas que afectan al mundo en desarrollo, dado que prospectivamente la modernización en la aplicación de estas biotecnologías, puede llevar consigo la corrección de las condiciones de pobreza, mejor sanidad, la consecución de mayores cotas de bienestar material y en general, una mejoría en la calidad de vida de los ciudadanos de los países en desarrollo.



#### **4.6 Limitaciones y desventajas de la biorremediación.**

La biorremediación también tiene sus limitaciones y desventajas. Algunos productos químicos, por ejemplo, compuestos altamente clorados y metales pesados, no son fácilmente susceptibles a la degradación biológica y la estabilización. Para algunos productos químicos, la degradación microbiana puede conducir a la producción de sustancias tóxicas o más volátiles que el compuesto de origen. Por ejemplo, en condiciones anaeróbicas, el tricloroetileno TCE experimenta una serie de reacciones mediadas por microorganismos que resultan en la eliminación secuencial de átomos de cloro de la molécula; este proceso se llama deshalogenación reductora. El producto final es el cloruro de vinilo (VC), un conocido carcinógeno. Por lo tanto, si la biorremediación se aplica sin conocer los procesos microbianos involucrados, las vías metabólicas y químicas participantes podrían conducir a una situación peor a la ya existente. De esta manera, la biorremediación es un procedimiento científicamente intensivo que debe adaptarse a las condiciones específicas del lugar para reducir al mínimo los efectos de las restricciones ambientales. Los costos iniciales para la evaluación in situ, caracterización y evaluación de factibilidad para la biorremediación pueden ser mayores que los costos asociados a las tecnologías más convencionales.

Teniendo en cuenta que los procesos biológicos, en algunas ocasiones son más lentos, la biorremediación no es la primera opción en aquellos sitios donde por razones económicas, políticas o ambientales, es necesaria una rápida limpieza del lugar contaminado. Varios autores consideran que, a pesar de los avances realizados en la biorremediación de suelos contaminados, el uso de residuos orgánicos para fertilización, restauración y su reciclado para aplicaciones industriales, conlleva asociado una gran complejidad en su uso, que requiere precaución en la gestión y uso de técnicas. Sin embargo, en el mercado de productos para la resolución de problemas ambientales suelen comercializarse compuestos microbianos de formulación desconocida, que no son efectivos e incluso pueden aumentar el riesgo de contaminación (Garzón, 2017).

#### **4.7 Papel de las enzimas en la biorremediación.**

Una alternativa para el tratamiento de metales pesados es la remediación biológica o biorremediación, la cual implica la descontaminación por vía biológica. En el caso de los suelos contaminados con metales pesados, se aprovecha la capacidad que tienen algunos microorganismos para movilizar o inmovilizar estos contaminantes (Lovley, 1997).

Se ha demostrado que es posible llevar a cabo la remediación in situ de sitios contaminados con metales por vía microbiana, básicamente a través de cambios en el estado redox, favoreciendo así mecanismos que modifican la solubilidad, movilidad y/o toxicidad de los contaminantes, haciendo posible la remediación del suelo a través de la separación o la disolución del contaminante:

- I. Separación o inmovilización. Implica mecanismos de Biosorción (sorción del contaminante en biomasa) y cambios en el estado redox (reducción de formas metálicas oxidadas solubles a formas insolubles), así como la acumulación, precipitación y/o volatilización de los contaminantes a través de la fitorremediación.
- II. Disolución o movilización. Incluye procesos de biolixiviación de metales y metaloides y cambios en el estado redox (oxidación de formas metálicas reducidas insolubles a formas solubles), que favorecen la disolución o volatilización de los mismos.

Con base en lo anterior, las metas de la remediación de contaminantes inorgánicos pueden alcanzarse conforme a los siguientes principios:

- (I) La precipitación del contaminante y, en consecuencia, su inmovilización;
- (II) La concentración del contaminante con la posterior reducción del volumen de la matriz contaminada;
- (III) La separación de metales a un ambiente en donde su riesgo potencial se reduzca (Volke, T.2005)

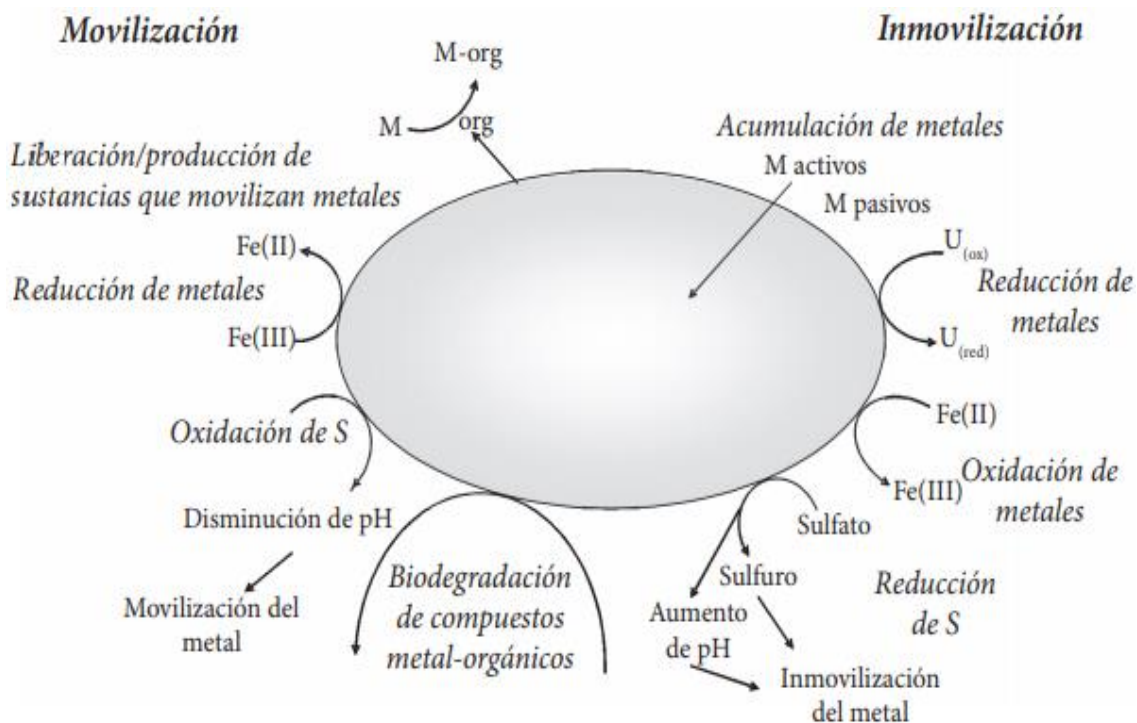


Figura 9. Interacciones entre metales y microorganismos. (I) la sorción o acumulación de metales se lleva a cabo por mecanismos pasivos (M PASIVOS) o activos (M activos); (II) algunos metales pueden transformarse por procesos redox o por alquilación, afectando su movilidad y/o toxicidad; (III) muchos microorganismos pueden producir y liberar sustancias (por ejemplo, sulfuros) que alteran la movilidad de muchos metales; (IV) la degradación microbiana de complejos metalorgánicos (M-ORG) pueden cambiar la especiación del metal. Fuente Ledín 2000.

Los microorganismos están expuestos a la presencia de diversos tipos de metales y metaloides en el ambiente, por lo que no es sorprendente que puedan interactuar con ellos, a través del desarrollo de mecanismos de defensa, a veces para su beneficio y otras para su perjuicio. En la naturaleza, estos elementos existen principalmente como cationes, oxi-aniones en ambas formas en solución, y como sales u óxidos en forma cristalina (mineral) o como precipitados amorfos en forma insoluble. La manera en que los microorganismos interactúan con los metales depende, en parte, de si son procarióticos o eucarióticos.

Ambos tipos de organismos utilizan especies de metales para funciones estructurales y/o catalíticas, y tienen capacidad para unirse a iones metálicos presentes en el exterior de la superficie celular o para transportarlos hacia dentro

de la célula para diversas funciones intracelulares. Por ejemplo, el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) tienen funciones estructurales y catalíticas; el vanadio (V), cromo (Cr), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y en bajas concentraciones, pueden participar en funciones catalíticas. Algunos procariontes pueden utilizar, durante su metabolismo, especies de metales que pueden existir con diferentes valencias, como el cromo (Cr), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto ( $^{60}_{27}\text{Co}$ ), cobre (Cu), arsénico (As) y selenio (Se), ya que estos funcionan como aceptores o donadores de electrones. Es decir, esta serie de mecanismos para la modificación de metales, pueden existir a diferentes niveles de interacción microorganismo-metal. A continuación, se describen dos de las más comunes.

#### A. Interacciones metabólicas-enzimáticas

I. Captación de metales traza para su incorporación a metalo-enzimas o su utilización en la activación de enzimas. Ocurre en todos los microorganismos, los metales deben estar en forma iónica.

II. Utilización de metales o metaloides como donadores o aceptores de electrones en el metabolismo energético (deben satisfacer las demandas energéticas del organismo). Ocurre en eubacterias y arqueobacterias, su utilización por eucariontes no se conoce.

III. Detoxificación enzimática de especies metálicas tóxicas. Las especies tóxicas son convertidas a formas con menor o nula toxicidad por oxidación o reducción enzimática.

IV. Biocorrosión enzimática anaerobia. La superficie del metal es colonizada por bio-películas formadas por diferentes tipos de bacterias, algunos de cuyos productos metabólicos pueden ser corrosivos.

#### B. Interacciones metabólicas-no enzimáticas

I. Los microorganismos eucarióticos y procarióticos (vivos o muertos) tienen la capacidad de acumular metales a través de su unión como cationes a la superficie celular en un proceso pasivo.

II. Algunos hongos y bacterias pueden promover la lixiviación selectiva y no selectiva (biolixiviación) de uno o más constituyentes metálicos de minerales, junto con otros productos metabólicos.

III. Ciertos microorganismos excretan productos metabólicos inorgánicos (sulfuros, carbonatos, fosfatos) en su metabolismo respiratorio y así precipitar iones de metales tóxicos (Volke, 2005).

A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden descomponerse por vía biológica, física o química, de manera que la remediación de suelos contaminados con metales pesados se limita al confinamiento de estos residuos o a la alteración de su solubilidad, movilidad y/o toxicidad a través de cambios en su estado de valencia, lo que favorece su inmovilización (quelación) y/o movilización (disolución<sup>[w34]</sup>).

## **5. Tecnologías de remediación de suelos contaminados con metales pesados.**

Dependiendo de su naturaleza, los métodos de remediación de suelos contaminados con metales pesados se clasifican en:

1) Físicoquímicos: Aquéllos que utilizan las propiedades físicas y químicas de los contaminantes o del medio contaminado para transformar, separar o inmovilizar el contaminante

2) Biológicos: También denominados biorremediación, aquéllos que aprovechan el potencial metabólico de organismos vivos (bacterias, hongos y plantas) para limpiar ambientes contaminados.

Los tratamientos físicoquímicos más empleados consisten en procesos como la oxidación/reducción (transformación) de los metales, el lavado de suelos

(separación de los metales) y la solidificación/extracción (inmovilización de los metales).

Sin embargo, una desventaja de los métodos fisicoquímicos radica en que la mayoría requiere de la excavación del suelo y un proceso secundario de tratamiento o disposición final del contaminante, lo que genera un costo económico y ambiental. Los procesos microbianos utilizados en el tratamiento de suelos contaminados con metales pesados son:

### **5.1 Biosorción.**

Los metales pesados pueden ser absorbidos pasivamente a los componentes celulares de los microorganismos debido a atracciones electrostáticas. Al tener los metales carga positiva son atraídos por las cargas negativas de los grupos carboxilos, fosforilos y aminos presentes en las paredes celulares, membranas y material extracelular de bacterias y hongos. Una vez adheridos a la superficie celular algunos metales pesados se internalizan en la célula, donde los cationes metálicos pueden ser ligados o precipitados dentro de vacuolas u otras estructuras para minimizar su toxicidad. Los hongos filamentosos pueden adsorber metales pesados en soluciones acuosas, su capacidad de biosorción depende del pH, la concentración de biomasa y los metales presentes en la solución.<sup>[D35]</sup> Algunos géneros microbianos utilizados con éxito para remover cadmio (Cd),<sup>[D36]</sup> plomo (Pb)<sup>[D37]</sup> y cobre (Cu) son *Rhizopus*, *Penicillium* y *Phanerochaete* (Covarrubias, 2015).

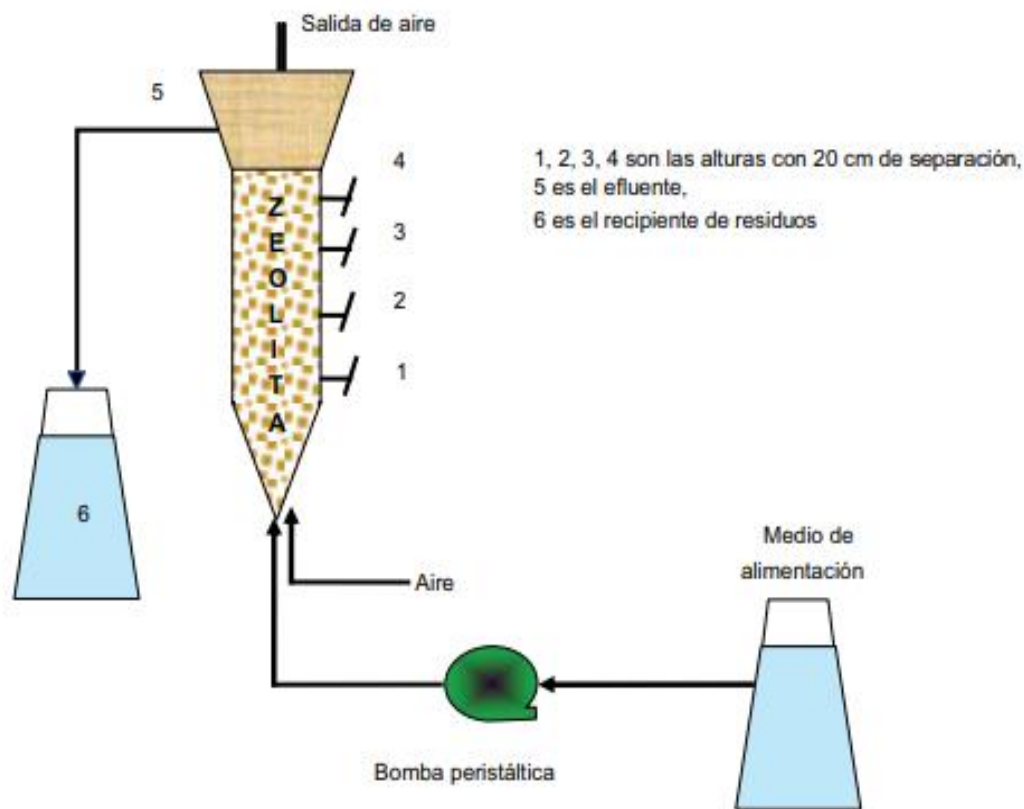


Figura 10. Diagrama esquemático del proceso de biosorción en el RAEFA-EZ (Monge, 2008).

Los microorganismos son una alternativa potencial sobre los procesos convencionales para la recuperación de metales de soluciones industriales, este fenómeno es conocido como biosorción y se refiere a las interacciones fisicoquímicas entre la biomasa microbiana y el metal pesado (Onofre J. *et al.*, 2008).

## 5.2 Bioprecipitación.

Ciertos metales pesados pueden ser inmovilizados eficientemente debido a la acción de bacterias con la capacidad de reducirlos a un estado redox menor, reduciendo la biodisponibilidad de estos elementos (Valls & De Lorenzo, 2002). Este fenómeno se conoce como reducción biológica, y es reconocido como un proceso metabólico importante que controla el transporte y el destino de los

metales pesados en el suelo. La reducción biológica ocasiona que formas oxidadas de metales multivalentes pasen rápidamente a formas reducidas que se precipitan fácilmente en una solución acuosa. En este sentido, un grupo bacteriano muy importante es el de las bacterias sulfato reductoras (BSR), ya que son usadas de manera común para el tratamiento de suelos y aguas contaminados con metales pesados. Bajo condiciones anaeróbicas, las BSR pueden oxidar compuestos orgánicos simples al utilizar sulfato como aceptador de electrones produciendo sulfuro ( $S^{2-}$ ) e incrementando el pH en el proceso. Este sulfuro puede reaccionar con los metales disueltos y formar precipitados metal-sulfuro, los cuales, por lo general, tienen una toxicidad muy baja (Covarrubias, 2015). Se utilizan microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan con muchos de los metales pesados. Un grupo importante de estos microorganismos son las bacterias sulfatoreductoras. Estas bacterias anaeróbicas son capaces de formar sulfuros a partir de la reducción de sulfatos, lo que permite, debido a la habitual baja solubilidad de los primeros, separarlos del medio líquido (Yagnentkovsky, 2011).

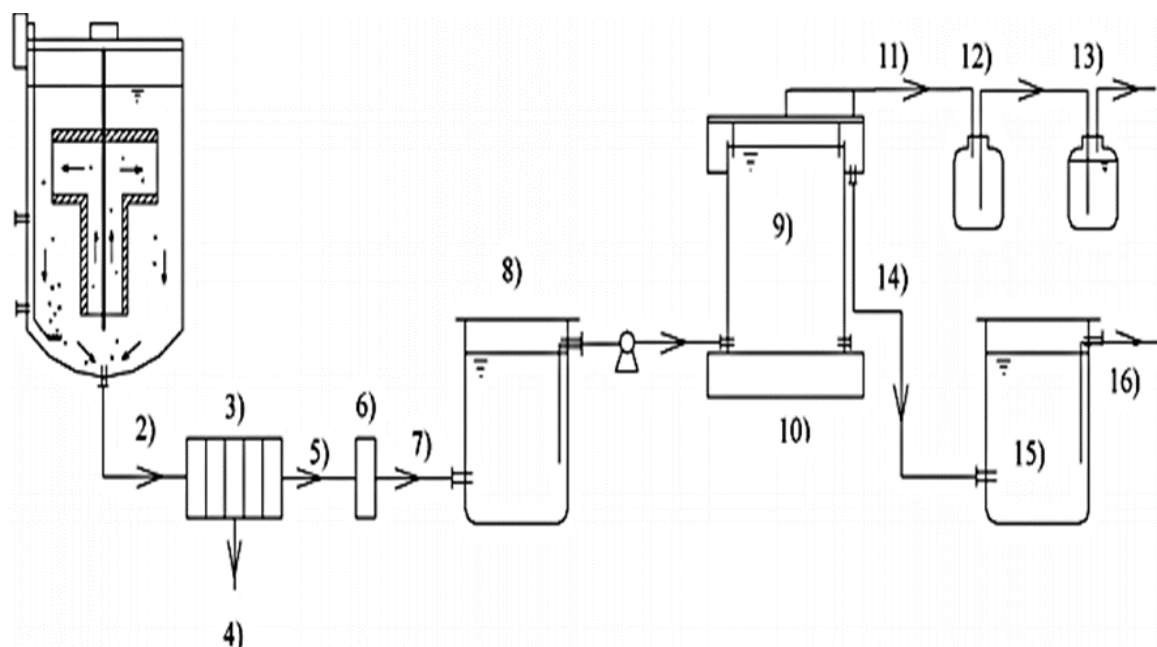


Figura 11. Diagrama del proceso de Bioprecipitación (1) reactor de biolixiviación; (2) sedimento lixiviado; (3) deshidratación de sedimentos utilizando un filtro de presión; (4) alcalinización de sedimentos deshidratados; (5) lixiviado de sedimentos; (6) filtro; (7) lixiviado filtrado; (8) tanque



de retención de influente; (9) reactor de Bioprecipitación; (10) agitador magnético; (11) biogás; (12) matraz de seguridad; (13) depurador de biogás que contiene NaOH 1 M; (14) efluente tratado; (15) tanque de sedimentación de efluentes; (16) efluente final. (Di Fang, 2011).

### 5.3 Biolixiviación (heterotrófica y autotrófica).

La biorremediación de suelos contaminados con metales por lixiviación microbiana o biolixiviación es una tecnología relativamente nueva, simple y efectiva, utilizada para la extracción de metales a partir de minerales y/o concentrados que los contienen. La recuperación a partir de minerales de azufre o de hierro, se basa en la actividad de bacterias quimiolitotróficas que oxidan hierro y azufre (hierro- y sulfooxidantes, respectivamente), *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, las cuales convierten sulfuros metálicos insolubles (SO) [D38]a sulfatos solubles y ácido sulfúrico. Esta disolución hace que los metales puedan recuperarse fácilmente de ambientes contaminados y suelos superficiales, usando estrategias de remediación de bombeo-tratamiento. Otra opción factible para el tratamiento de sitios contaminados y recuperación de metales a partir de minerales que no contienen azufre (como carbonatos y silicatos metálicos), es la biolixiviación heterótrofa. En este caso, la extracción de metales se lleva a cabo, principalmente, por hongos en un proceso mediado por la producción de ácidos orgánicos y de compuestos quelantes y a complejantes excretados al medio, que proveen una fuente de protones y aniones que acomplejan metales. En el suelo, la biolixiviación heterótrofa de metales es más importante que la autótrofa (por bacterias). La lixiviación heterótrofa puede también influir sobre otras tecnologías de tratamiento para suelos contaminados, a través de la translocación fúngica de ciertos metales (Cs, Zn y Cd), lo que puede conducir a su separación y concentración en regiones específicas del micelio y/o cuerpos fructíferos.

El proceso de biolixiviación heterotrófica consiste en la acidificación del medio por la movilización de protones a través de la membrana plasmática, ocasionando una liberación de metales a través de varias rutas; i.e. la competencia entre protones y metales en un complejo metal-anión o cuando se

encuentran en una forma asimilada con algún otro elemento, lo cual genera una liberación de cationes metálicos. También el metabolismo heterotrófico puede ocasionar lixiviación debido a la producción de ácidos orgánicos y sideróforos. Generalmente, la biolixiviación autotrófica es llevada a cabo por bacterias quimiolitotróficas y acidófilas, las cuales fijan bióxido de carbono y obtienen energía de la oxidación de compuestos férricos y sulfuro reducidos, ocasionando la producción de hierro (Fe III) y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### 5.3.1 Aplicaciones prácticas.

La biolixiviación tiene gran potencial para la remediación de materiales contaminados con metales pesados. La lixiviación de minerales por BSO es un proceso bio-industrial establecido [w39]y, aunque el mayor interés surge desde una perspectiva hidrometalúrgica, también es posible la lixiviación de metales que se encuentran como contaminantes de suelos y otras matrices. El principio de la biolixiviación puede aplicarse como bio-beneficio, un proceso en el que un mineral se enriquece en cuanto al contenido de sus componentes metálicos de valor por la remoción selectiva de componentes indeseables. La biolixiviación de Cu a partir de minerales con azufre se ha practicado de manera empírica por muchos siglos con el uso de *T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*. Actualmente, el proceso se emplea a escala industrial para la recuperación de oro a partir de minerales azufrados con *T. ferrooxidans*. La extracción de metales como el Co, Mo, Ni, Pb y Zn a partir de minerales por biolixiviación es técnicamente viable. A partir de 1990, se han registrado cerca de 15 patentes de relevancia a nivel mundial, de las cuales, la mayoría implica procesos de biolixiviación.

### 5.3.2 Ventajas y limitaciones.

- La lixiviación química puede alcanzar altos costos debido al transporte del ácido.
- El sulfuro necesario para la producción bacteriana de ácido se encuentra disponible a bajos costos.

- La remoción de contaminantes del suelo puede disminuir significativamente los costos de disposición y, además, puede permitir la recuperación de metales preciosos.
- Tiene grandes ventajas económicas debido a sus bajos costos en capital y energía, a su alta flexibilidad, puede usarse onsite y no causa contaminación ambiental.
- Como consecuencia de la producción de ácido sulfúrico durante el crecimiento de *T. thiooxidans*<sup>[w40]</sup>, el pH del lixiviado disminuye gradualmente, de manera que los metales que pasan por la solución a diferentes tasas, pueden separarse selectivamente.

En caso de residuos minerales industriales, la biolixiviación convencional puede fallar, debido a que la mayoría de los metales se encuentran como óxidos en lugar de sulfuros. Sin embargo, los óxidos metálicos pueden lixivarse por la producción microbiana de ácidos (como el ácido sulfúrico generado por *T. thiooxidans*). En el caso de la biolixiviación heterotrófica, uno de los principales problemas radica en la búsqueda de sustratos orgánicos más baratos para el crecimiento de los microorganismos, además de que los hongos requieren de una buena aireación, de manera que su utilización generalmente se prevé en biorreactores.

### 5.3.3. Tiempo y costos de la remediación.

Como regla de manejo, los procesos biológicos representan costos entre un tercio y la mitad en comparación con las tecnologías de remediación químicas y físicas convencionales. En general, el equipamiento necesario para procesos de biolixiviación es menos costoso que el requerido para procesos fisicoquímicos. En comparación con la tostación, los costos en capital para una planta de biolixiviación a escala industrial se reducen entre 12 y 20% y los costos de operación, ~10%. Se calculan costos globales de 4.3 USD/ton de mineral para un tratamiento bacteriano, comparado con 4.1 y 4.5 UDS/ton para oxidación por presión y tostación, respectivamente ([D41]Volke, 2005[D42]).

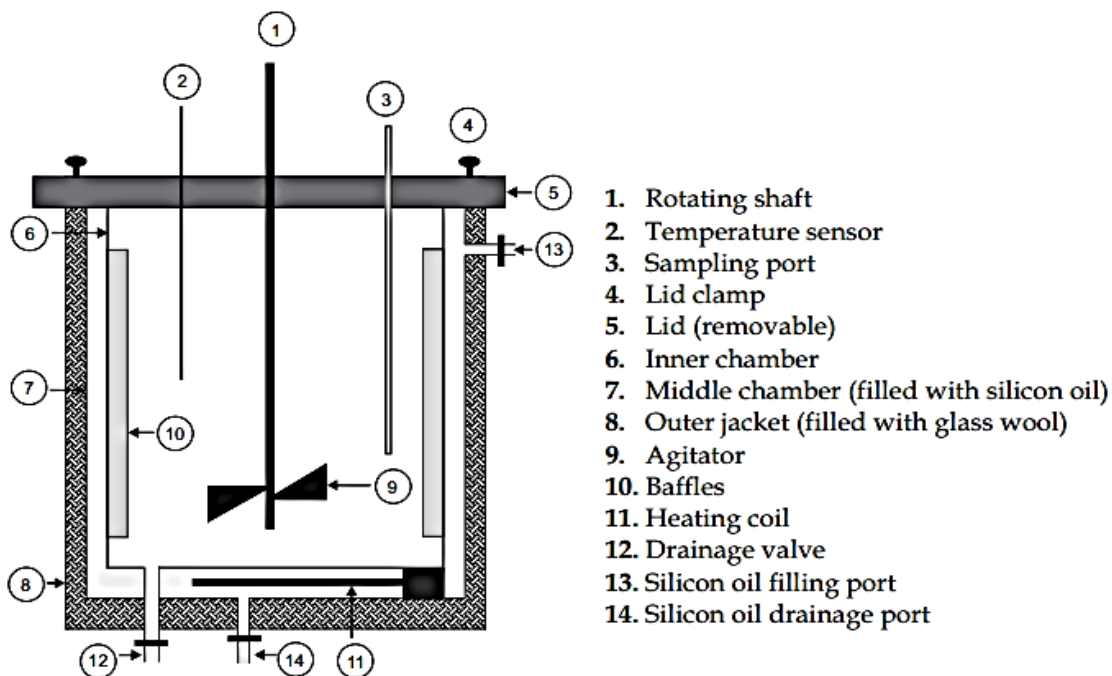


Figura 12. Diagrama esquemático del reactor de lixiviación química (10.0 L). (Shailesh R. Dave, 2014).

#### 5.4. Biovolatilización

Algunas bacterias y hongos pueden llevar a cabo la metilación de metales pesados y metaloides como el Hg, As y Se. Los compuestos metilados difieren en su solubilidad, toxicidad y volatilidad.<sup>[D43]</sup> Los metales metilados pueden ser reducidos a otras formas por medio de reacciones enzimáticas bacterianas (Covarrubias, 2015).

#### 5.5. Biomineralización.

Se describe como la formación de precipitados metálicos insolubles por interacciones con productos del metabolismo microbiano. La biomineralización de metales y metaloides en forma de minerales de azufre, hidróxido, fosfato y carbonato, tiene aplicaciones potenciales para la biorremediación. Un ejemplo de este tipo de sistema es el uso de BSR, bacterias heterótrofas anaerobias, que utilizan una serie de sustratos orgánicos (etanol, acetato, butirato, celulosa) y sulfato, como aceptores de electrones. El potencial biotecnológico de las BSR

radica precisamente en la insolubilidad de los sulfuros de metales tóxicos (Cu, Hg, Cd, As, Se y Pb), formados durante la reducción biológica del sulfato, dando como resultado su inmovilización y detoxificación. Los sulfuros metálicos son insolubles a pH neutro, y algunos de ellos, en condiciones ligeramente ácidas. De esta manera, es posible separar algunos de los metales de alta toxicidad de los menos tóxicos con base a tecnologías de remediación en la química del sulfuro. En ciertas circunstancias, sin embargo, la inmovilización de sulfuros metálicos puede ser inapropiada; por ejemplo, en el caso de la inmovilización de mercurio como HgS, que no se considera una práctica ambientalmente segura.

### **5.5.1. Aplicaciones prácticas.**

La inmovilización de metales puede aplicarse en sitios contaminados con cromato o dicromato ( $\text{Cr}^{6+}$ ), estimulando la reducción de  $\text{Cr}^{6+}$  a  $\text{Cr}^{3+}$  por bacterias. Esta reacción es una de las formas más estudiadas de biorremediación de metales. Se conoce una variedad de organismos heterótrofos capaces de llevar a cabo esta reacción, que puede ocurrir en condiciones aerobias o anaerobias. El proceso también puede resultar de mecanismos indirectos de precipitación; por ejemplo, en sistemas con BSR, la reducción de  $\text{Cr}^{6+}$  puede resultar de la reducción indirecta por  $\text{Fe}^{2+}$  y el sulfuro producido. La formación de esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) por bacterias *Desulfobacteriaceae* a partir de concentrados de Zn, y la precipitación de sulfuros metálicos por BSR puede constituir la segunda fase de un tratamiento combinado de oxidación-reducción de azufre para la descontaminación de suelos. La formación, por vía biológica, de piromorfita ( $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ ), un mineral estable de plomo, se ha sugerido como una técnica de remediación para suelos contaminados con plomo debido a que disminuye la biodisponibilidad de dicho metal (Volke, 2005).

### **5.6 Relevancia de la bioprospección.**

La bioprospección es el estudio de la diversidad biológica con el fin de describir organismos con aplicabilidad comercial. La bioprospección ha sido llevada a cabo

desde la época de la conquista española y se prolongó durante nuestra historia (Varea, 1997). La importancia de la bioprospección recae en los problemas que actualmente se sobrellevan ya que a estas alturas no se ofrecen tantas alternativas para la bioremediación de suelos más sin embargo si las investigaciones y estudios trascendieran las soluciones ya se tendrían.<sup>[D44]</sup>

### **5.7. Principales temas y países cooperantes en temas relacionados con bioprospección.**

Tabla 3. Principales temas y países cooperantes en temas relacionados con bioprospección (Duarte, O. 2009).

TEMA	Nº AR T.	% C.I.	OBJETIVO PRINCIPAL	PRINCIPALES PAISES COOPERANTES
Principios bioactivos en vegetales	120	68	Identificación y caracterización de principios con posible actividad alcaloide o antiparasitaria	España, Alemania, Francia Japón
<b>Bacterias</b>	<b>58</b>	<b>47</b>	<b>Identificación y caracterización de <i>Bacillus thuringensis</i> y modelos de crecimiento.</b>	<b>Estados unidos, España, Alemania, Inglaterra, Francia</b>
Principios bioactivos en organismos marinos	24	71	Identificación y caracterización de principios obtenidos de esponja y corales con posible actividad citotóxica antifoulingy bactericida.	Japón España Estados unidos
Sustancias volátiles y aceites esenciales en vegetales	30	47	Aislamiento de sustancias volátiles y aceites esenciales de frutas y arbustos.	Alemania
Síntesis química compuestos	35	77	Síntesis de sustancias con posible aplicación antiparasitaria y aceites esenciales.	Venezuela España
Extracción de compuestos	12	25	Métodos químicos para extracción de sustancias volátiles.	Venezuela, España.
Organismos marinos	10	30	Taxonomía de caracterización de esponjas y corales.	Chile, España.
<b>n 'art.= número de artículos; %c.i.= porcentaje de artículos en cooperación internacional</b>				

En el ámbito que refiere a las bacterias se han publicado 58 artículos lo que representa el 47 % porcentaje de artículos en cooperación internacional donde el tema primordial es la identificación y caracterización de *Bacillus thuringensis* y modelos de crecimiento. Donde los países cooperantes son: Estados Unidos, España, Alemania, Inglaterra, Francia, se observa que la aportación en esta área de investigación ha aumentado en los últimos años más sin embargo no se identificó <sup>[D45]</sup> que se desarrollara en campo para el tratamiento de suelos contaminados por metales pesados por lo que se requiere, así como su aplicación para llevar a cabo un buen avance tecnológico obteniendo un saneamiento ambiental correcto que por ende mejora la salud pública. Se definen como países cooperantes ya que contribuyen en temas como: Principios bioactivos en vegetales, bacterias, principios bioactivos en organismos marinos, sustancias volátiles y aceites esenciales en vegetales, síntesis química compuestos, extracción de compuestos organismos marinos, temáticas poco estudiadas pero que son de gran relevación y son una aportación para las distintas áreas de aplicación.

Retomando la tabla anterior se hace énfasis en <sup>[D46]</sup> el tema de las bacterias a lo que corresponde el 60%, se pueden considerar que abordan aspectos básicos para identificación de bacterias, modelos de crecimiento y producción de endotoxinas; el 40% restante de los artículos denota alguna posibilidad de aplicación industrial de dichas bacterias. Es así, como un 82% de estos estudian y analizan a *Bacillus thuringensis* (Bt) en su actividad antimicrobiana, mosquicida e insecticida y como controladora de plagas y enfermedades agrícolas; el restante 18% de los artículos examinan algunas cepas de bacterias en su efecto para biorremediación en pozos petroleros y capacidad microbiana para producción de biopolímeros. En base a este porcentaje que es mínimo se deduce el poco interés o apoyo en el área. Esta temática, comparada con la anteriormente analizada, guarda la semejanza de enfocarse principalmente sobre aspectos básicos relacionados con identificación y caracterización; pero se diferencia en que en la parte aplicada hay un centro de atracción representado por la bacteria Bt, la cual puede ser considerada como la bacteria más estudiada a nivel mundial. La



cooperación internacional se proporciona tanto para trabajos que abordan aspectos básicos (52% de los artículos), principalmente en colaboración con Estados Unidos; como en trabajos que denotan alguna potencialidad de aplicabilidad (44% de los artículos), destacándose la participación de países europeos como España, Alemania, Inglaterra y Francia y una baja participación de países como Brasil, México, Argentina, Chile y Costa Rica (Duarte, 2009). Las cifras proporcionadas de acuerdo a Duarte (2009) cataloga que el nivel económico interfiere en el tramo de la ciencia lo que respecta la parte de la investigación para con la bioprospección de bacterias resistentes a metales pesados.

## **6. Técnicas para aislar microorganismos con potencial biotecnológico.**

En la parte experimental se requirieron técnicas de aislamiento para los microorganismos como inicio se definió el <sup>[D47]</sup>área de estudio, es de suma importancia: Ciudad de Torreón, Coahuila, se analizaron las áreas circundantes a la metalúrgica de Peñoles donde se eligieron dos zonas de muestreo; la zona uno compete a la pista de atletismo del Tecnológico de la Laguna y la zona dos que corresponde al Centro de Monitoreo Ambiental CEMA ambos circunscritos a la ciudad de Torreón. De esta manera se describen algunas de las técnicas para aislar microorganismos con potencial biotecnológico sin mencionar que hay más variantes mismas que se describirán a lo largo de la literatura. En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos axénicos o puros. Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene un sólo tipo de microorganismo y que procede generalmente de una sola célula; el crecimiento de ésta origina, en medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia. Para obtener cultivos puros a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento, que fueron desarrolladas durante el siglo XIX. En un principio, Lister utilizó diluciones seriadas en medio líquido con esta finalidad, pero la

presencia de contaminación, es decir, de microorganismos no deseados, dificultó el aislamiento.



Figura 13. Imagen tomada de: INAFED, 2020.

### 6.1 Técnicas de aislamiento.

Aislar es separar un tipo de microorganismo a partir de una población heterogénea de microorganismos. En hábitats naturales raramente encontramos un solo tipo de microorganismo en una muestra, por lo tanto, es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar e identificar los distintos tipos de microorganismos presentes. El objetivo del aislamiento es obtener colonias bien separadas (las colonias se forman a partir de una sola “unidad formadora de colonias”) de las que se conseguirá un cultivo puro. Una vez obtenidos los cultivos puros se podrán estudiar las características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas, etc. de un microorganismo en particular. Hay que tener en cuenta que siempre el aislamiento se da en un medio sólido. El medio líquido sirve para enriquecer, pero no para aislar. El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando el o los microorganismos están en una proporción

adecuada. Cuando el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja proporción en la muestra, o interesa un solo tipo de microorganismo, se lleva a cabo un procedimiento que involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos del tipo que se desea aislar en relación al resto de la población (enriquecimiento). Luego se aísla por el método de estrías o por dilución y se identifica. Para aislar se utiliza alguno de los siguientes procedimientos:

A) Métodos generales.

1) Por diseminación en superficie (agotamiento de ansa, depósito y posterior quemado y dilución).

2) Por mezcla.

B) Métodos especiales: (calentamiento, agregado de álcali o ácido, por temperatura de incubación, cambios en el pH y presencia de sales o colorantes).

### **6.1.2 Métodos generales.**

1) Por diseminación en la superficie de un medio sólido en placa de Petri: Es la técnica más utilizada. Con un ansa de siembra, calentada al rojo vivo en el mechero y enfriada cerca del mismo, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre la superficie de la placa con el medio agarizado, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se lleva la placa a incubar a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida lo que evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas. Mediante estas técnicas se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de bacterias.

Existen distintos tipos de trazados tendientes a lograr una buena separación entre los gérmenes sembrados. Se puede sembrar por:

I. Agotamiento de ansa: Se flamea el ansa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se realizan estrías en dos placas en forma consecutiva sin recargar el ansa.

II. Depósito y posterior quemado: Se carga el ansa con la muestra y las estrías se extienden sobre un área pequeña de la superficie de la placa. Se retira el ansa, se quema a la llama, y luego de enfriarla en el interior de la placa se hacen nuevas estrías por otra zona tocando ligeramente la muestra sembrada anteriormente. Este proceso puede repetirse sucesivamente, flameando y enfriando el ansa al comienzo de las sucesivas siembras en estría, de acuerdo a la carga inicial de microorganismos. Tras la incubación, se observarán las colonias aisladas en alguna región de la placa inoculada, donde se puede estudiar la morfología colonial.

III. Dilución previa en solución fisiológica o caldo: Se toma la muestra para aislar y se la resuspende en solución fisiológica o caldo nutritivo, preparando luego diluciones seriadas decimales en condiciones asépticas. Se toman las diluciones y se estría con ellas una placa para cada una. En la dilución adecuada se obtendrán colonias aisladas.

IV. Extensión en superficie con espátula de Drigalski: Aquí también pueden prepararse diluciones decimales. Se deposita sobre la superficie de la placa una gota o 0,1 ml de una determinada dilución del cultivo de microorganismos y se extiende con ayuda de la espátula, previamente esterilizada por flameado, en todas las direcciones hasta que esté completamente seco.



Figura 14. Depósito, foto de la muestra zona 1, 2019.

Tras el período de incubación las colonias aparecen sobre la superficie, distribuidas uniformemente si la siembra se ha realizado de forma correcta. Podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura, etc. Esta técnica de siembra, además de permitir el aislamiento de colonias, permite el recuento de bacterias viables en la muestra, si conocemos exactamente el volumen de muestra sembrado.

2) Por mezcla: Esta técnica tiene la ventaja de permitir el cálculo del número de bacterias presentes en la muestra, si se trabaja con exactitud. Se realizan diluciones seriadas de la muestra y se coloca en tubos estériles, por separado, el mismo volumen de cada una. Luego se vierte en el tubo, medio de cultivo fundido y atemperado aproximadamente a 45°C. El contenido se homogeneiza por rotación, y luego se lo vierte sobre la superficie de una placa de Petri. Tras la homogeneización, se dejan enfriar las placas hasta que se solidifique el medio y posteriormente se incuban a la temperatura adecuada (siempre en posición invertida).

Otra variación de esta técnica consiste en depositar en una placa de Petri vacía un pequeño volumen conocido de muestra y a continuación añadir el medio de cultivo fundido y atemperado, mezclando por rotación suave de la placa. De esta forma los microorganismos se distribuirán homogéneamente en el medio de cultivo, permitiendo el desarrollo de colonias separadas por todo el agar. Las colonias aparecen distribuidas por toda la masa del agar. Aquellas que están en la superficie tendrán distintas características, dependiendo del tipo microbiano, mientras que las colonias que se desarrollan en el interior, bajo la superficie del agar, tienen forma lenticular, aunque los microorganismos que formen las distintas colonias sean de distinto tipo. Por tanto, las colonias que aparecen en la profundidad del agar son siempre biconvexas y no se diferencian unas de otras por su morfología. Aunque con esta técnica se obtienen colonias aisladas, generalmente sólo se utiliza para determinar el número de microorganismos viables en una muestra, cuando éstos son anaerobios facultativos o microaerófilos.

### **6.1.3 Métodos especiales.**

Se basan en las características del germen que se quiere aislar. Hay que tener en cuenta que puede haber gérmenes que poseen idénticos comportamientos frente a un mismo agente físico o químico.

- a) Calentamiento: Se utiliza para el aislamiento de gérmenes esporulados de los no esporulados. Consiste en calentar la suspensión a 100°C durante 10 min. y 85°C durante 15 o 30 min. Luego se siembra en medios sólidos.
- b) Agregado de álcali o ácido: Tratamiento de la muestra con algunos de estos agentes ya que existen microorganismos que los resisten y otros que no.
- c) Variaciones de la temperatura de incubación: Incubando a dos temperaturas distintas

- d) Cambios en el pH: Existen unos pocos gérmenes que pueden crecer en medios con pHs extremos.
- e) Presencia de sales o colorantes: Debido a la capacidad de distintos microorganismos de crecer o no en medios con sales, sustratos.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Zonas de muestreo para la bioprospección de metales [D48]resistentes a metales pesados en Torreón, Coahuila.**

#### **7.2. Zona de muestreo uno: Pista de Atletismo del Tecnológico de la Laguna.**

La zona se tomó como referencia ya que se encuentra a menos de un kilómetro de la metalúrgica de Peñoles, de esta manera se logrará apreciar mejor los datos obtenidos zona de muestreo uno: Pista de Atletismo del Tecnológico de la Laguna. Ubicado en Boulevard. Revolución y, Av. Instituto Tecnológico de La Laguna s/n, Primero de Cobián Centro, 27000 Torreón, Coahuila. Datos obtenidos en el lugar de muestreo.

Temperatura del aire 24° C.

Temperatura del suelo 20 ° C [D49].

Latitud: N 25°31.887 W 103°26.233



Altitud:1102.766



Figura [15]<sub>[D50]</sub>. Fotos tomadas en la zona de muestreo diciembre 2019.

### 7.3 Zona de muestreo dos: Centro de monitoreo ambiental, (CEMA).

Para esta zona se retomó para visualizar el alcance de la contaminación de los metales pesados en base a esto realizar una conclusión de acuerdo a la distancia que hay de zona a zona entre la metalúrgica de Peñoles, zona de muestreo dos: Centro de Monitoreo Ambiental, (CEMA). Ubicado en Calle de las Piedras #350,



Colonia Residencial del Norte. Se registraron algunos datos obtenidos en la zona de muestreo.

Temperatura del aire 24 °C[D51].

Temperatura del suelo 20 °C[D52].

Latitud: N 25030.747 W 103023.031[D53]

Altitud:1098.499





Figura 16. Fotos tomadas en la zona de muestreo febrero de 2020.

Como base de inicio en la fase de campo se da inicio al muestreo. El muestreo fue selectivo a juicio ya que se presentó cuando los elementos fueron seleccionados mediante un criterio personal de manera empírica y científico sin olvidar la orientación del Dr. Medrano quien en base a su experiencia colaboro en dicho muestreo. La zona de muestreo es una zona heterogénea de pequeña extensión de manera que se eligieron puntos con base en diferencias típicas, como cambios notorios en relieve, textura, color superficial, vegetación, etc. Cabe mencionar que, en los estudios ambientales, el muestreo selectivo, a menudo, constituye la base de una investigación exploratoria. Sus principales ventajas son la facilidad de realización y sus bajos costos, además de que se puede llevar a cabo en zonas heterogéneas como en zonas homogéneas. El presente estudio se efectuó mediante un muestreo selectivo (Volke, 2005).

En el desarrollo del experimento se designaron selectivamente varios puntos de muestreo para el estudio de suelo y otras matrices, situadas a lo largo y ancho de los alrededores de la Planta Peñoles. Se colectaron muestras con la

finalidad de estudiar la biodiversidad bacteriana. Las muestras [colectadas fueron] [D59] en un tiempo mismo, representaron las condiciones puntuales de una muestra de la población en el tiempo que fue colectado.

#### **7.4 Bioprospeccion de microorganismos.**

Se realizó la bioprospección de microorganismos de la siguiente manera: Las muestras de suelo se colectaron con recipientes estériles apropiados (bolsas ziplok) considerando la norma oficial mexicana [NOM-001-ECOL] [D60]-1996 y los métodos básicos en microbiología (inoculación directa en medios de transporte o amortiguamiento). Las muestras de suelo fueron de aproximadamente de [1] [D61] kilogramo las cuales se depositaron en bolsas ziplok estériles con cierre hermético para así evitar contaminación de las muestras y el estrés que [pudiese] [D62] causar [D62] la desecación de la tierra y la luz solar. Una vez tomadas las muestras, estas se llevaron al laboratorio de biología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, ubicada en Torreón, Coahuila.

#### **7.5 Siembra.**

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Para sembrar en microbiología es necesario mantener la habitación sin corrientes de aire y estar al lado de la llama de un mechero (no más de 15 cm. de distancia). También se puede trabajar bajo campana, o en flujo laminar, previa esterilización con luz UV. La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando ansa, hilo, o bien hisopo o pipeta estéril. Se debe esterilizar en la llama (hasta que todo el filamento se haya puesto al rojo vivo) el ansa o el hilo y enfriar, antes y después de realizada la siembra. Para transferir los microorganismos, se recomienda:

- a) Medio líquido a medio líquido: Utilizar pipeta Pasteur o graduada, ansa o hilo.
- b) Medio líquido a medio sólido: Utilizar pipeta Pasteur o graduada, ansa o hilo, e hisopo.

c) Medio sólido a medio sólido: utilizar ansa o hilo.

d) Medio sólido a medio líquido: ansa o hilo.

En este caso para sembrar se utilizó la llama de un mechero (no más de 15 cm. de distancia) y el medio <sup>[D63]</sup>utilizado fue sólido en este caso agar nutritivo. La concentración que se utilizó en cada caja Petri fue de 25 ml donde se esterilizó en la autoclave. Es un hecho que, en la mayoría de los ambientes, la densidad microbiana suele ser demasiado elevada o baja por <sup>[D64]</sup>esto para poder realizar una siembra directa de la muestra que de buenos resultados en la enumeración de microorganismos.

### **7.6 Diluciones base diez.**

Esta situación hace necesaria la dilución o la concentración de la muestra previa a la realización de cualquier estudio. Además, las muestras sólidas requieren su dilución para facilitar la manipulación y permitir trabajar con ellas como si fueran muestras líquidas. En la mayoría de los casos, se trabaja con diluciones decimales. El caso más sencillo es la preparación de 10 g de la dilución 1/10 de la muestra. Para ello, se añade 1 g de muestra a 9 ml de diluyente; es decir de cada 10 ml de esta dilución 1/10, 1 g corresponde a la muestra. Una vez en el laboratorio, se realizaron las diluciones seriadas para así probar diversos medios sólidos y líquidos para bacterias aerobias. Para esto se utilizó <sup>[D65]</sup>agua destilada como el diluyente y 1 g de la zona de muestreo.

Con las diluciones ya <sup>[D66]</sup>preparadas y las cajas Petri esterilizadas, se procedió a sembrar. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incubó a una temperatura adecuada para el crecimiento. Las cajas se incubaron de 24 a 48 horas a 35 grados centígrados y se efectuó el conteo de colonias de las cajas con un número adecuado de las mismas, para posteriormente analizar los resultados y determinar la concentración mínima inhibitoria en la cual si hubo crecimiento y desarrollo bacteriano. Todas las colonias fueron resembradas, pero solo se seleccionaron aquellas con un patrón de resistencia interesante

Los microorganismos aislados fueron identificados y caracterizados (Medrano, 2017). Para la determinación de las bacterias, las cepas bacterianas fueron sometidas a las siguientes pruebas, basados en el esquema de identificación de Koneman (1998) y McFaddin (1984).

1. Morfología macroscópica.
2. Morfología microscópica.
3. Tinción de Gram.
4. Prueba de la oxidasa.

## **8. RESULTADOS**

Contabilizando entre la zona uno y la zona dos de muestreo se realizaron 32 muestras de suelo de los cuales se logró aislar 16 cepas de la zona uno y una cepa de la zona dos, entre ambas zonas de muestreo se aislaron 17 cepas. Se registraron las cajas más sobresalientes, ya que el grupo se redujo considerablemente debido a que presentaron poca resistencia. Para la zona de muestreo uno se contabilizaron 16 cepas con población bacteriana incontable y para la zona dos con una sola cepa con la misma característica, mismas que se dieron a conocer mediante su morfología macroscópica, morfología microscópica, tinción de Gram y prueba de oxidasa.

El grupo se sometió a las pruebas antes mencionadas con el fin de apreciar la resistencia a metales pesados como lo es el plomo y el cadmio. De las 17 cepas en total aisladas 10 presentaron resistencia al plomo, 7 fueron muestras testigo. Las cepas se etiquetaron de acuerdo al número de resiembra y su zona de muestreo.

Plomo: En el desarrollo de las pruebas se empleó acetato de plomo ( $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ) las 17 cepas fueron sometidas a diferentes concentraciones de acetato de plomo en un rango de 0.1g/L (4000 ppm) a 0.4 g/L (16000 ppm), obteniéndose así 10 cepas resistentes al ion metálico antes citado. 7 de estas

cepas (70% ) presentaron un valor de resistencia de 0.2 g/L (8000 ppm), 3 cepas(30 %) tuvo una resistencia intermedia de 0.1g/L (4000 ppm).

Cadmio: En esta prueba se utilizó el nitrato de cadmio ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ) las 17 cepas fueron sometidas a cuatro concentraciones diferentes (0.2 g/L, 0.3 g/L, 0.4 g/L y 0.5 g/L). En todas las cepas no se apreció el desarrollo de colonias a excepción de una muestra testigo. Cabe resaltar que en ambas zonas no se desarrolló alguna colonia en una caja con el metal del Cd, a excepción de una caja que estaba como testigo de la zona dos, se repitieron dos ocasiones el cultivo en cajas para ambas zonas, pero en ambos casos sucedió lo mencionado previamente.

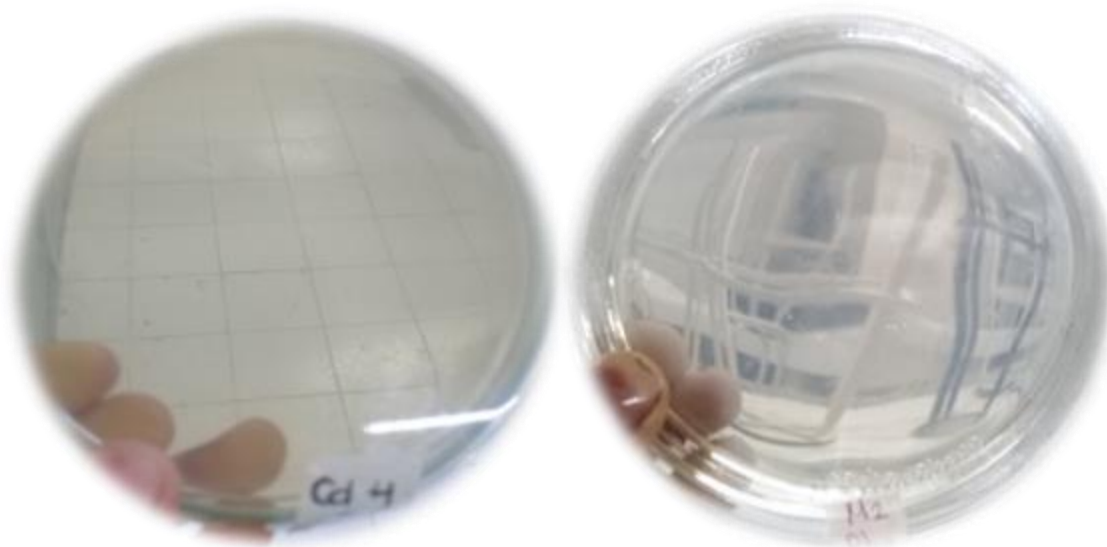


Figura 17 . Fotos tomadas en el laboratorio de biología.

La foto de la izquierda muestra una concentración de Cd en la zona de muestreo uno como se mencionó anteriormente no se desarrolló colonia alguna, en la foto de la derecha muestra una caja sin colonia de la zona de muestreo dos con concentración de Pb.



## 8.1 Morfología bacteriana

Las bacterias son microorganismos que se reproducen mediante fisión binaria, y que presentan tres formas básicas: las bacterias esféricas o cocos, las alargadas o bacilos y las bacterias curvadas o espirilos que pueden ser también comas, espiroquetas y vibrias. Algunos cocos, reciben otro nombre, por ser achatados se denominan cocobacilos. Las bacterias pueden presentar ciertas variaciones morfológicas, entre estas se encuentran las que tienen forma de estrella, las planas y rectangulares, las alargadas en forma de pera y por último aquellas que forman pedúnculos no celulares. Las células pueden ser observadas macroscópicamente cuando se encuentran en grupos, mientras que las colonias celulares son agrupaciones formadas por la reproducción de las bacterias incubadas alrededor de 24 horas aproximadamente, entretanto que otras bacterias requieren un mayor tiempo para formar colonias de millones de bacterias. El tamaño de las colonias puede variar desde 0,5 a 4,0 milímetros de diámetro llegando a tener una forma circular, puntiforme, irregular, rizoide o fusiforme. Las bacterias pueden ser observadas a través de un microscopio óptico o electrónico con una adecuada tinción puesto que son incoloras, sin embargo, también pueden ser vistas sin tinción, siendo colocadas en soluciones no acuosas para aumentar el índice de refracción (Vargas, 2014).

Caracterización de muestras: A continuación, se muestra tabla con los datos obtenidos a través del muestreo y la parte experimental desarrollada en el laboratorio de biología mediante las técnicas: Por diseminación en la superficie de un medio sólido en placa de Petri, diluciones base diez, con lo se obtuvo un esquema de identificación del pH, temperatura (T), concentración del medio (C), caracterización microbiológica (CMI-UFC) , resiembra parte 1 (RS<sup>1</sup>) , resiembra parte 2 (RS<sup>2</sup>), morfología celular (MC) y oxidasa. Zona de muestreo uno: Pista de Atletismo del Tecnológico de la Laguna. La muestra analizada presento un pH de 9<sub>[D67]</sub> y las cajas Petri se sometieron a la caja de incubación del laboratorio a una temperatura de 35 °C, retomando que para plomo y cadmio se sometieron al

mismo proceso de siembra, así como a la misma temperatura a la hora de incubar las cajas Petri. De esta manera los datos obtenidos se reflejan en la tabla 3.

Tabla 4. Zona de muestreo uno: Pista de Atletismo del Tecnológico de la Laguna.

M	MEDIO-C	CMI / UFC	RS <sup>1</sup> / UFC	RS <sup>2</sup> /UFC
T1	25 ml agar nutritivo/1 g suelo	Incontables		
T2	25 ml agar nutritivo/1 g suelo	Incontables		
T3	25 ml agar nutritivo/1 g suelo	Incontables		
T4	25 ml agar nutritivo/ 1 g suelo	100	(1) RT 4 - 200	(1) RT 4(1) - Incontables (1) RT 4(2) - 50 (1) RT 4(3) - Sin población bacteriana
Pb1	25 ml agar nutritivo/0.1 g Acetato de Pb	Incontables	(1) RPb - 50	(1) RPb - 50
Pb2	25 ml agar nutritivo/0.2 g Acetato de Pb	Incontables	(2) RPb - 250 3) RPb - Incontables	(2) RPb 2 - 250 (2) RPb 2 (1) - 200 (3) RPb 2 - incontables (3) RPb 2 (1) Incontables (3) RPb 2 (2) Incontables (3) RPb 2 (3) - 100
Pb3	25 ml agar nutritivo/0.3 g Acetato de Pb	No hay población bacteriana		
Pb4	25 ml agar nutritivo/0.4 g Acetato de Pb	No hay población bacteriana		
T1	25 ml/ 1 g suelo	Incontables	Incontables	
T2	25 ml/ 1 g suelo	Incontables		
T3	25 ml/ 1 g suelo	Incontables		
T4	25 ml/ 1 g suelo	300		
Cd1	25 ml/ 0.2 g Nitrato de Cadmio.	No hay población bacteriana		
Cd2	25 ml/ 0.3 g Nitrato de Cadmio.	No hay población bacteriana		
Cd3	25 ml/ 0.4 g Nitrato de Cadmio	No hay población bacteriana		



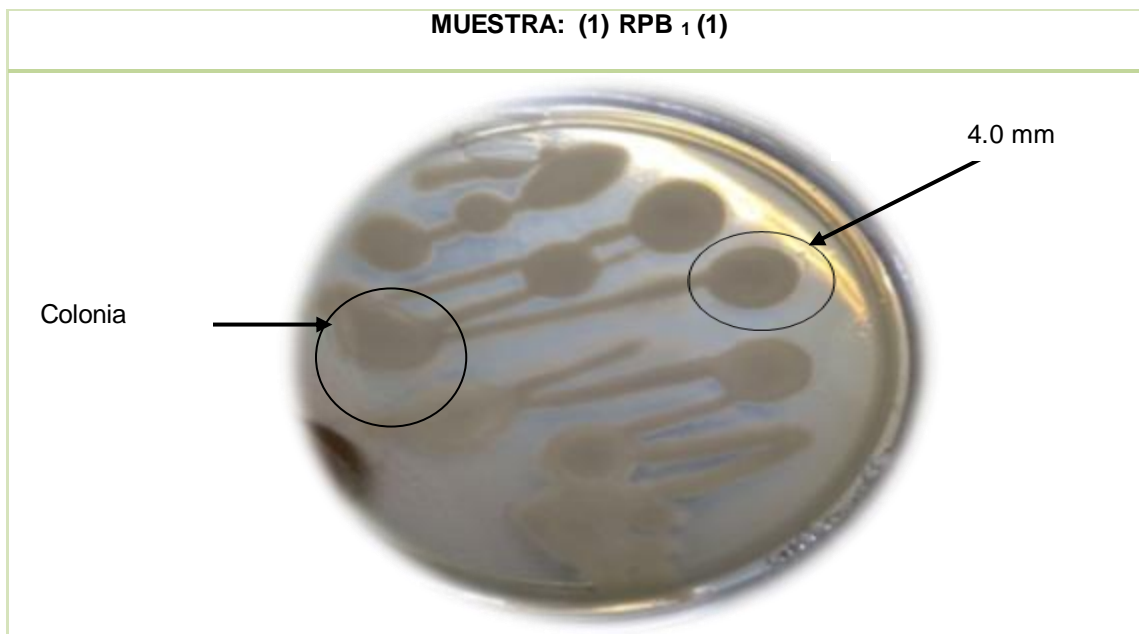
Cd4	25 ml/ 0.5 g Nitrato de Cadmio.	No hay población bacteriana		
-----	---------------------------------	-----------------------------	--	--

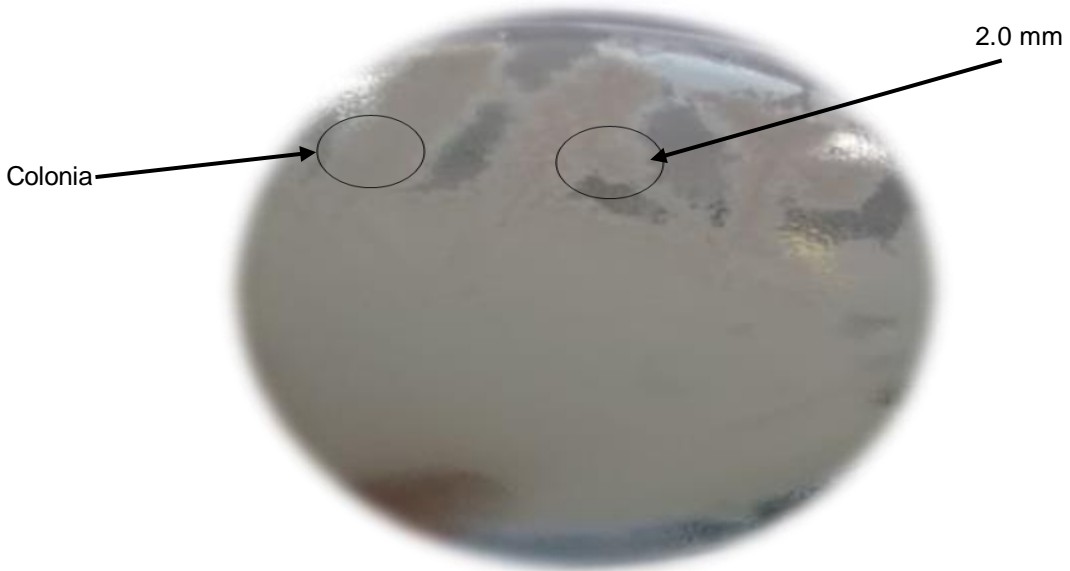

NOTAS: Resiembra parte 1: De las cajas con Pb y testigos solo se resembraron aquellas donde se apreció el crecimiento de bacterias Pb 1 (3 muestras), [D70] Pb2 (3 muestras) y T4 (1 muestra).

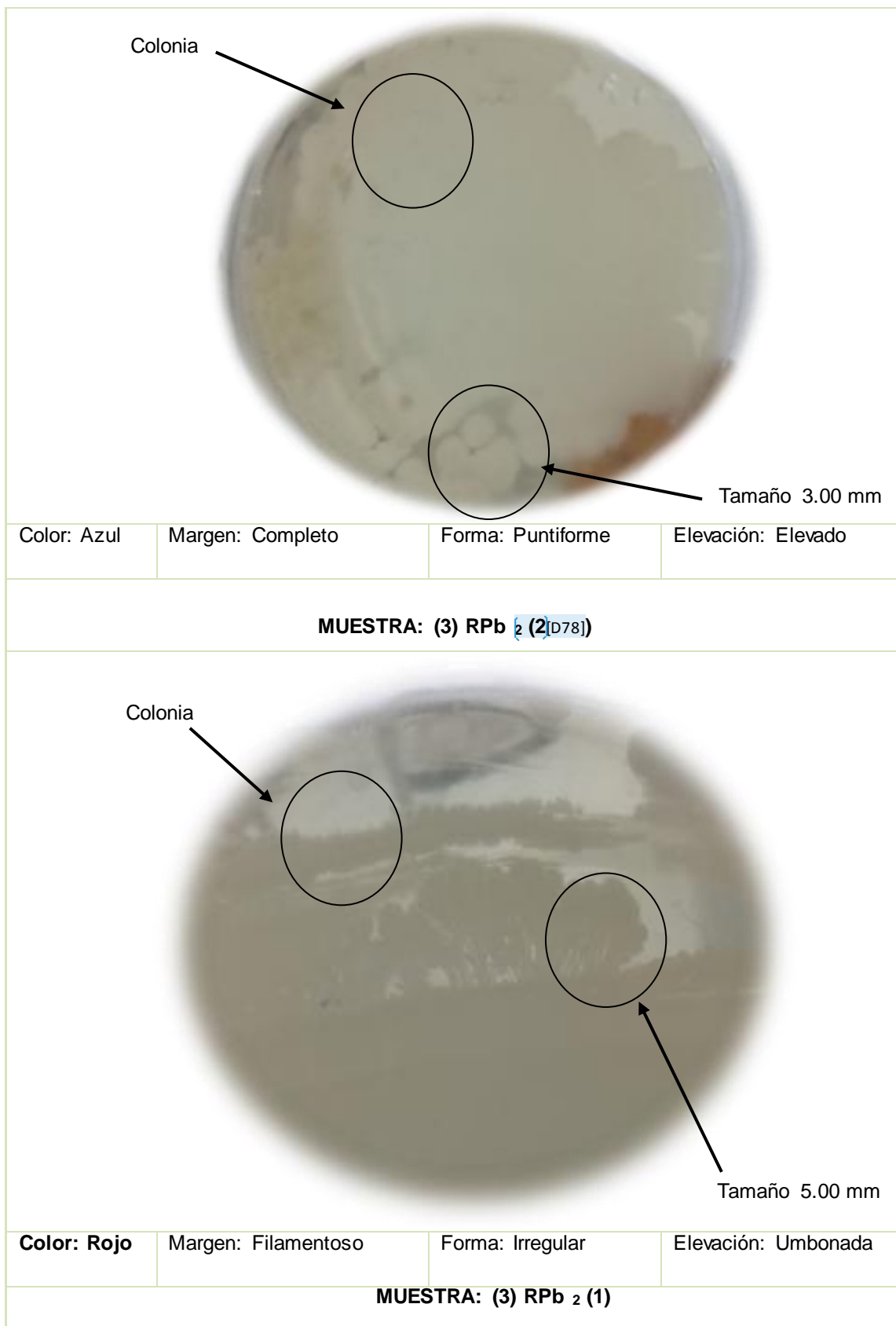
## 8.2. Caracterizaciones macroscópicas de las cepas zona uno.

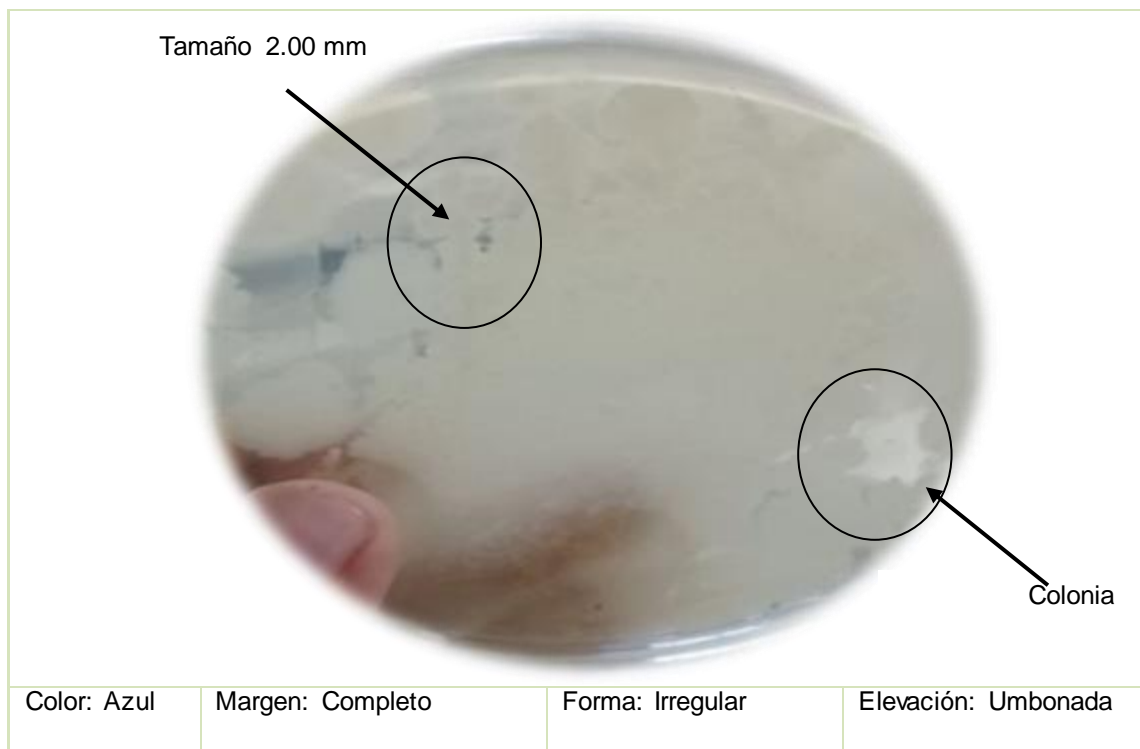
Las colonias son masas visibles de células que se forman por división de una o varias células. El desarrollo de colonias sobre superficies de agar permite al microbiólogo identificar las bacterias porque las especies forman a menudo colonias con una forma y aspecto característico. El tamaño, forma, textura y color de una colonia es propio de cada organismo. La morfología de la [colonia de] [D71] una bacteria puede variar según el medio en que crezca la bacteria. Considerando lo anterior al término de la incubación se observaron las colonias que se desarrollaron en las cajas Petri. Se describen las más sobresalientes y así como las que se resembraron, las que mostraron mayor tolerancia a los metales a los que se les expuso.

Tabla 4. Caracterización macroscópica de [cepas zona] [D72] de muestreo uno: Pista de Atletismo del [Tecnológico de] [D73] la Laguna.



Color: Azul	Margen: Entero	Forma: Circular	Elevación: Convexa
<b>MUESTRA: (1) RT<sub>4</sub>(1)</b>			
			
Color: Rojo	Margen: Erosionado	Forma: Umbonada	Elevación: Umbonada
<b>MUESTRA: (1) RT<sub>4</sub>[D74](2)</b>			
			
Color: azul	Margen: Filamentos[w75]o	Forma: Pulvinada[w76]	Elevación: Irregular
<b>MUESTRA: (4) [D77]RPb<sub>2</sub>(3)</b>			





Al término de la caracterización de cepas se procedió con la caracterización de la morfología celular de las cajas más sobresalientes, como dato curioso las cajas donde se adiciono Cd no se logró apreciar el desarrollo [del](#) alguna colonia de bacterias, lo poco que se observo era muy nulo.

Prosiguiendo al siguiente paso se colocan resultados obtenidos mismos que se describen en la tabla 5.

Tabla 6. Caracterización de la morfología microscópica y oxidasa, zona uno.

MUESTRA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	GRAM	OXIDASA		
			X	XX	XXX
RT1	Coco	Positivo			✓
RT 2	Bacillo	Negativo	✓		✓
RT 3	Bacillo	Positivo	✓		
RT 4	Coco	Positivo			
(1) RPb 1 (1)	Cocos	Positivos			
(1) RT 4 (1)	Cocos	Negativos			✓
(1) RT 4 (2)	Bacilos	Positivos			✓
(1) RT 4 (3)	Bacilos	Negativos			✓
(2) RPb 2 (1)	Cocos	Negativo			✓
(3) RPb 2 (1)	Bacillo	Positivo		✓	
(3) RPb 2 (2)	Bacillo	Negativo			✓
(3) RPb 2	Cocos	Positivo			✓
(3) <sub>[D80]</sub>					

### 8.3 Parámetros fisicoquímicos.

También se procedió a la determinación de los diferentes parámetros fisicoquímicos: Determinación de materia orgánica (MO),<sub>[D81]</sub> nitrógeno (N), carbón orgánico (CO), conductividad eléctrica (CE), Ca+ Mg, Ca, P, textura, densidad, pH y temperatura. A fin de establecer una correlación entre estos parámetros y la biodiversidad microbiana observada. De cada parámetro se contempla una tabla que se compara o los resultados obtenidos de cada prueba,

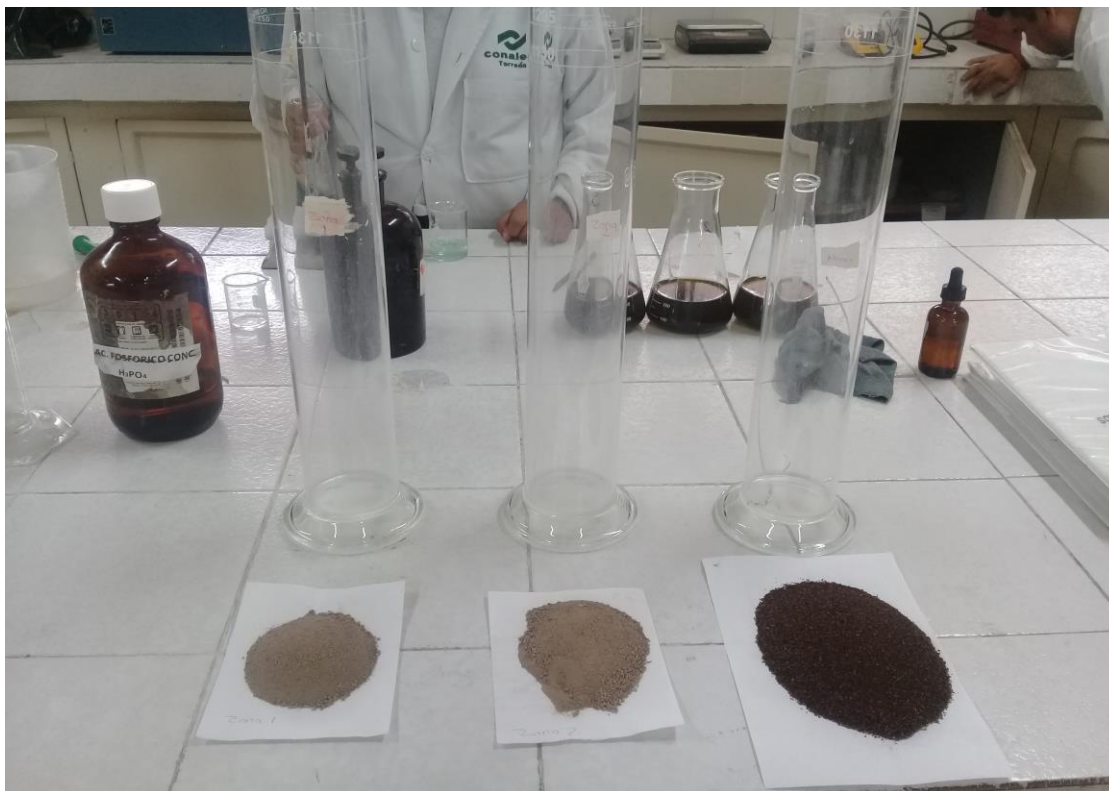


Figura 18. Determinación de densidad muestra 1, muestra 2 y testigo, laboratorio de suelos, 2020.

La determinación de la materia orgánica se llevó a cabo en el laboratorio de suelos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna se determinó por el método AS-07 de la NOM-021-RECNAT-2000, la determinación de la materia orgánica del suelo se evalúa a través del contenido del carbono orgánico con el método de Walkey y Black.

Los valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en suelos no volcánicos se representan en la [tabla siguiente](#) [D82]:

Tabla 7. Concentración de materia orgánica en suelos no volcánicos (Etchevers *et al.*, 1971).

<b>CLASE</b>	<b>MATERIA ORGÁNICA (%) SUELOS NO VOLCÁNICOS</b>
Muy bajo	Menor de 0.5
Bajo	0.6 – 1.5
Medio	1.6 – 3.5
Alto	3.6 – 6.0
Muy alto	Mayor de 6

Determinación del nitrógeno total por el método de Kjeldahl, este método nos da una idea de las reservas del suelo en nitrógeno y obtenemos una relación carbón/nitrógeno para conocer el grado de evolución de la materia orgánica y la disponibilidad del nitrógeno total para los microorganismos y las plantas. Los resultados de los análisis de nitrógeno total se pueden interpretar en la siguiente tabla:

Tabla 8. Contenido de nitrógeno total (Tavera, 1985).

<b>CLASE</b>	<b>NITRÓGENO TOTAL</b>
MUY BAJO	MENOR DE 0.05
BAJO	0.05 – 0.10
MEDIO	0.10 – 0.15
ALTO	0.15 – 0.25
MUY ALTO	MAYOR DE 0.25

Determinación de fósforo por el método de OLSEN [Los resultados obtenidos se comparan con la siguiente tabla, para determinar la clase en la que se encuentra el P del suelo analizado (CSTPA,1980).]<sup>[D83]</sup>

Tabla 9. Contenido de fosforo.

CLASE	MG/KG DE P
Bajo	Menor de 5.5
Medio	5.1 – 6.5
Alto	Mayor de 11

Considerando los datos de los cuadros anteriores se concentran los resultados de los [D84] parámetros fisicoquímicos que se obtuvieron de la zona de muestreo 1 en la tabla 9.

Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos, Zona de muestreo 1: Pista de atletismo del Tecnológico de la Laguna.

PARÁMETROS	MUESTRA	MUESTRA TESTIGO	RESULTADOS / VALORES DE REFERENCIA	
			MUESTRA	MUESTRA TESTIGO
Materia orgánica	0.125	1.86	Muy bajo	Medio
Nitrógeno	0.09	1.386	Bajo	Muy alto
Carbono orgánico	0.073	1.08		
Conductividad eléctrica	6.52	9.48		
pH	7.80	8.56	Acido	Alcalino
Ca + Mg	8.4		33.6	
Ca	10		40	
Fosforo	389 mg	379 mg	Bajo	Bajo
Densidad	1.21	0.38		

De acuerdo a todos los resultados obtenidos mediante los distintos procesos realizados se concluye que las bacterias (cocos-bacilos) son resistentes al plomo ya que se desarrollaron muy bien en las pruebas testigos y las que se les colocó el metal de igual manera, no se puede decir lo mismo del cadmio ya que en las pruebas testigo se observó una población bacteria muy baja, y a los que se



adiciono el metal aún más [D85]pobre eso quiere decir que el proceso de biorremediación era nulo [w86]. Cabe mencionar que faltó [analizar distintas ] [D87]concentraciones de metales (Pb y Cd).

Continuando con los procesos de laboratorio. Se realizo el mismo proceso de la zona uno para con la zona dos, se describe a continuación los datos recabados en la tabla 10.

Tabla 11. Caracterización microbiológica Zona de muestreo dos: Centro de Monitoreo Ambiental, CEMA: Calle de las Piedras #350, Colonia Residencial del Norte.

M	MEDIO-C	CMI UFC	RS <sup>1</sup> / UFC	MM	O
<b>T1</b>	25 ml agar nutritivo/1 g suelo	Incontables	M2RT <sub>1</sub> - Incontable	Cocos	x
<b>T2</b>	25 ml agar nutritivo/1 g suelo	Incontables			
<b>T3</b>	25 ml agar nutritivo/1 g suelo	Incontables			
<b>T4</b>	25 ml agar nutritivo/ 1 g suelo	Incontables			
<b>Pb1</b>	25 ml agar nutritivo/0.1 g Acetato de Pb	No hay población bacteriana			
<b>Pb2</b>	25 ml agar nutritivo/0.2 g Acetato de Pb	No hay población bacteriana			
<b>Pb3</b>	25 ml agar nutritivo/0.3 g Acetato de Pb	No hay población bacteriana			
<b>Pb4</b>	25 ml agar nutritivo/0.4 g Acetato de Pb	No hay población bacteriana			
<b>T1</b>	25 ml/ 1 g suelo	No hay población bacteriana			
<b>T2</b>	25 ml/ 1 g suelo	No hay población bacteriana			
<b>T3</b>	25 ml/ 1 g suelo	No hay población bacteriana			
<b>T4</b>	25 ml/ 1 g suelo	No hay población bacteriana			
<b>Cd1</b>	25 ml/ 0.2 g Nitrato de Cadmio.	No hay población bacteriana			

<b>Cd2</b>	25 ml/ 0.3 g Nitrato de Cadmio.	No hay población bacteriana			
<b>Cd3</b>	25 ml/ 0.4 g Nitrato de Cadmio	No hay población bacteriana			
<b>Cd4</b>	25 ml/ 0.5 g Nitrato de Cadmio.	No hay población bacteriana			

De acuerdo a la tabla anterior se puede decir que la zona que por cierto está más retirado de la metalúrgica de Peñoles se apreció <sup>[D88]</sup> la carencia de microorganismos se puede decir que por la poca exposición de metales no ha <sup>[D89]</sup> desarrollada resistencia de metales por lo tanto es más susceptible y vulnerable.

#### **8.4 Caracterizaciones macroscópicas de las cepas zona dos.**

De igual manera se procede a la caracterización de las cepas son masas visibles de células que se forman por división de una o varias células. El desarrollo de colonias sobre superficies de agar fue muy pobre se describen de acuerdo al margen, forma, elevación y color de una colonia es propio de cada organismo. La morfología de la colonia de una bacteria puede variar según el medio en que crezca la bacteria. <sup>[D90]</sup>

Tabla 12. Caracterización macroscópica zona de muestreo dos: Centro de Monitoreo Ambiental (CEMA).

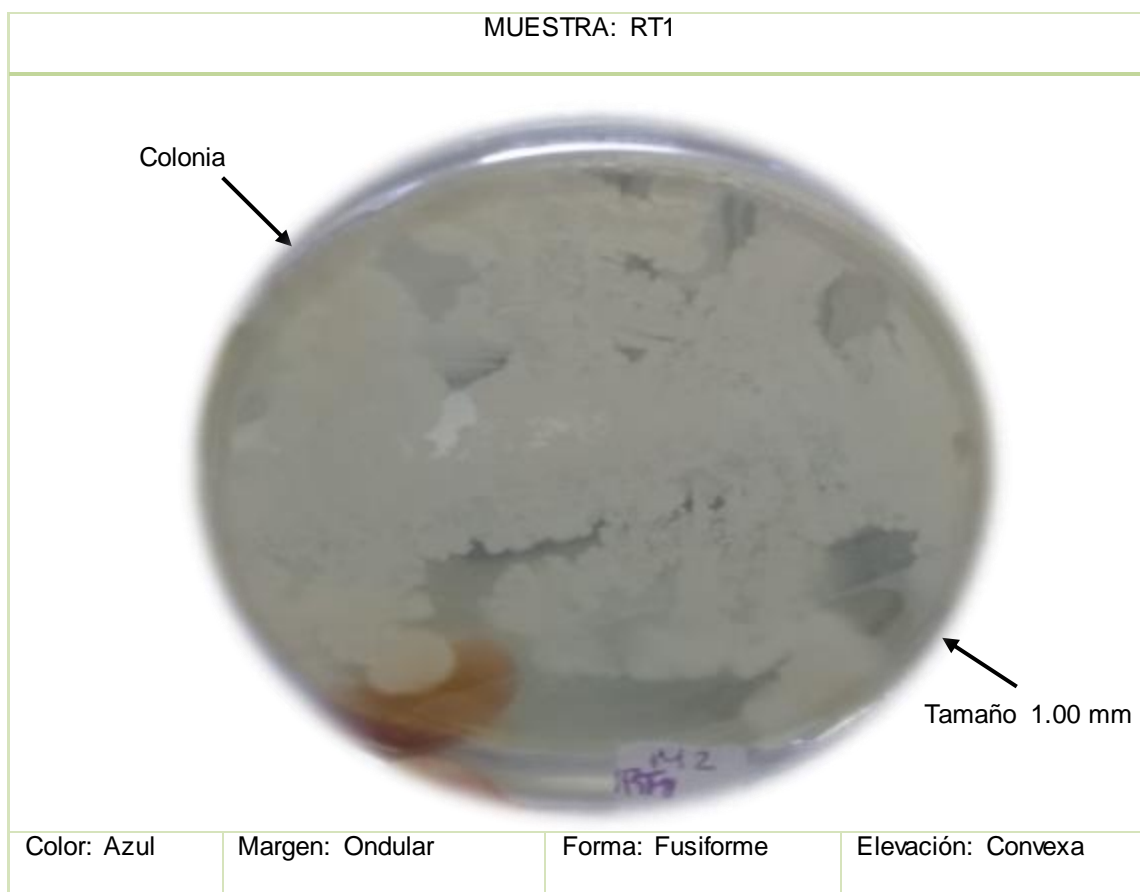


Tabla 13. Comparativa de las zonas de muestreo.

Metal Zona 1 UFC		Concentración	Metal Zona 2 UFC	
<b>T1 Incontables</b>	- T1- Incontables	25 ml/ 1 g suelo	T1 Incontables	- T1 - No hay población bacteriana
<b>T2 Incontables</b>	- T2- Incontables	25 ml/ 1 g suelo	T2 Incontables	- T2 - No hay población bacteriana
<b>T3 Incontables</b>	- T3 - Incontables	25 ml/ 1 g suelo	T3 Incontables	- T3 - No hay población bacteriana
<b>T4 - 100</b>	T4 - 300	25 ml/ 1g suelo.	T4 Incontables	- T4 - No hay población bacteriana

<b>Pb 1 - Incontables</b>	Cd 1 - No hay población bacteriana	25 ml/0.1 g	Pb 1 - No hay población bacteriana	Cd 1 - No hay población bacteriana
<b>Pb 2 - Incontables</b>	Cd 2- No hay población bacteriana	25 ml/ 0.2 g	Pb 2 - No hay población bacteriana	Cd 2 - No hay población bacteriana
<b>Pb 3 - No hay población bacteriana</b>	Cd 3 - No hay población bacteriana	25 ml/ 0.3 g	Pb 3 - No hay población bacteriana	Cd 3 - No hay población bacteriana
<b>Pb 4 - No hay población bacteriana</b>	Cd 4 - No hay población bacteriana	25 ml/0.4 g	Pb 4 - No hay población bacteriana	Cd 4

Esta pequeña comparativa es de la primera siembra de ambas zonas de muestreo como se puede apreciar en la tabla anterior el Pb es el que más desarrollo población bacteriana de acuerdo a los años de exposición y [D92] a la cercanía de la metalúrgica, referente al Cd se puede decir que es aún más [D93] tóxico ya que no se desarrolló [D94] ninguna población bacteriana en ninguna zona de muestreo.

### 8.5 Microorganismos implicados en los procesos de biorremediación.

Los metales son compuestos recalcitrantes, persistentes y biomagnificables (Cañizares, 2000). Se indaga, por lo tanto, se muestran algunos microorganismos que están implicados en el proceso de biorremediación, se conoce la capacidad de transformación de metales pesados como el Cr, el Cd y el Hg por parte de bacterias y ciertas especies de hongos que se muestran en la tabla 13.

Tabla 14. Algunos microorganismos implicados en la biorremediación de metales pesados. (Beltrán, 2016).

MICROORGANISMO	METAL	REFERENCIA
<i>Cunninghamella echinulata</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Cd	Babich y Stotzky, 1977
<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>S. carnosus</i>	Cd	Samuelson et al, 2000
<i>Trichoderma reesei</i>	Cd	Kim et al, 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cd	Juwarkar et al, 2007
<i>Deinococcus radiodurans</i> , <i>Thermus thermophilus</i> , <i>Acidiphilium angustum</i> , <i>Flavobacterium aquatile</i> y <i>Flavobacterium hibernum</i> .	Cd	Ginn y Fein ,2008
<i>Fusarium oxysporum</i>	Cd	Akpor y Muchie, 2010
<i>Glomus sp</i> , <i>Gigaspora sp</i> , <i>Acaulospora sp</i> .	Cd	Sambandan et al, 1992
<i>Bacillus sp</i> .	Cd, Cr y Hg	Cañizares, 2000
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria sp</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. eutrophus</i> , <i>P. putida</i> .	Cr y Cd	Roane y Pepper, 2000
<i>Aeromonas sp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Micrococcus sp</i> , <i>Bacillus sp</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Acinetobacter sp</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>	Cr y Cd	Ali et al, 2009

## 8.6 Mecanismos de transformación de arsénico por bacterias.

Las bacterias poseen una gran diversidad metabólica, debido a su capacidad de obtener energía empleando diferentes reacciones de óxido-reducción; por lo tanto, un número importante de microorganismos son capaces de utilizar arsénico, ya sea en su forma oxidada de arseniato o en la forma reducida de arsenito, para su metabolismo. Las bacterias pueden superar los efectos tóxicos del arsénico por medio de un decremento en las concentraciones de sus iones o modificándolo químicamente a especies relativamente menos tóxicas (Rangel, 2015).

Metabolismo	Reacción
Reducción de arseniato mediante la oxidación de lactato	$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{HAsO}_2^- + 3\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{HAsO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^-$
Reducción de arseniato mediante oxidación de acetato	$\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{HAsO}_4^{2-} + 7\text{H}^+ \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 4\text{HAsO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$
Oxidación de arsenito dependiente de oxígeno	$2\text{HAsO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{HAsO}_4^{2-} + 4\text{H}^+$

Figura19. Reacciones que catalizan microorganismos que metabolizan arsénico (As) (Stolz y Oremland, 1999).

De acuerdo a investigaciones recientes en la India se concluyó sobre la [D95] habilidad natural de las bacterias nativas para reducir y detoxificar de plomo, cadmio y cromo. Después de hacer una caracterización bioquímica se encontró que *Micrococcus sp* y *Hafnia sp* tienen gran potencial de biorremediación de los citados metales (Castebianco, 2018).

Existe una diversidad [D96] de microorganismos que transforman el As (V) y As (III) son diversos en su filogenia y fisiología. Para la transformación del arsénico existen tres principales sistemas enzimáticos: arsenito oxidasa, arseniato reductasa y arseniato reductasa citoplasmática. Un gran número de bacterias Gramnegativas y Gram positivas emplean un mecanismo común de resistencia a arsénico basado en el operón arsRDABC que codifica cinco genes, el cual corresponde al sistema de desintoxicación de arsénico más estudiado e implicado en la reducción del arseniato a arsenito mediante la enzima arseniato reductasa que expulsa el arsenito fuera de la célula usando una bomba de expulsión de arsénico Se concluyo [D97] que un ciclo de oxidación-reducción entre As (III) y As (V) es necesario para garantizar la supervivencia de las bacterias que habitan nichos contaminados por arsénico. Se probaron la resistencia de 6 cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de la planta hiperacumuladora *Pteris vittata* al arsenito o arseniato y la relación que existe entre ésta, el transporte de fósforo y la producción de sideróforos. Aunque la mayoría de las cepas aisladas reducían As (V), la existencia de bacterias capaces

de oxidar As (III) eran necesarias para establecer un equilibrio entre las concentraciones de ambas especies de arsénico y, de esta forma, evitar la acumulación de arsénico dentro de la célula. Por lo tanto, es preciso reconocer que debe existir una cooperación entre los diferentes sistemas y mecanismos para transformar el arsénico que se encuentra en los microorganismos con el fin de aprovechar dicha relación para optimizar las técnicas de biorremediación, sobre todo aquellas que se aplican in situ. En el año de [1918 se] [D98] describió por primera vez la oxidación de la Enzima Arsenito Oxidasa Green por medio de las bacterias en *Bacillus arsenoxydans*; actualmente se han descrito y reportado un gran número de bacterias oxidantes de arsenito, en su gran mayoría se tratan de organismos heterótrofos. Algunas procariontas heterótrofas pueden oxidar el As (III) a As (V) bajo condiciones aerobias o anaerobias. Entre este grupo se encuentran miembros de la clase *b-Proteobacteria* y especies de los géneros *Alcaligenes*, *Thermus*, *Hydrogenophaga*, *Arthrobacter*, *Ralstonia* y *Pseudomonas*. Algunas bacterias quimiolitotótrofas también pueden utilizar el As (III) como un donador de electrones y obtener energía de la oxidación de éste, las cuales incluyen microorganismos de las clases *a-g-Proteobacterias*, y de los géneros *Rhizobium/Agrobacterium* y *Thiomona* (Rangel, 2015).

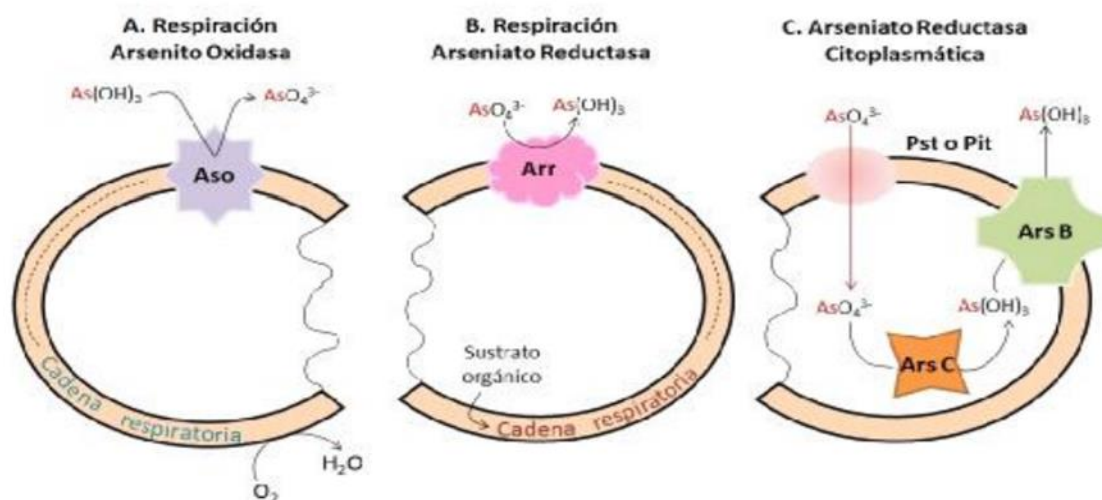


Figura. Ubicación y funciones de los sistemas respiratorios arsenito oxidasa y arseniato reductasa, así como del sistema arseniato reductasa citoplasmática (Silver y Phung, 2005).

### **8.7. Resistencia microbiana.**

En otros metales pesados se ha observado que los plásmidos aislados de diferentes bacterias grampositivas y gramnegativas codifican la resistencia a los metales pesados. Cabe resaltar que ciertos plásmidos que confieren resistencia a antibióticos de igual manera contienen genes para la resistencia al mercurio (Hg) y al arsénico (As). Dado que cada metal cuenta con distintas características el mecanismo de resistencia varía para cada uno en concreto. Retomando un ejemplo, las resistencias al cadmio y al arseniato se deben a la actividad de enzimas que expulsan el arseniato o el cadmio que entre en la célula, lo que evita la acumulación de estos metales y que desnaturalicen las proteínas. En otras resistencias intervienen cambios redox en el metal. Las bacterias que son resistentes por naturaleza a cantidades elevadas de diferentes metales contienen a menudo varios plásmidos que codifican las resistencias (Michael, 2009).

## **9. DISCUSIÓN**

Retomando el objetivo principal: Aislar y caracterizar poblaciones bacterianas resistentes a metales pesados en la zona aledaña a Peñoles Torreón y la hipótesis: Demostrar la viabilidad del tratamiento biológico mediante la bioprospección de bacterias resistentes a metales pesados, aumentando así la disposición de las mismas en el suelo. Y de acuerdo a los resultados obtenidos se define que para lograr los aspectos que se mencionan se requiere de una investigación más profunda, pero, sobre todo que de acuerdo a los resultados se lleve a la práctica, que se ofrezcan alternativas de solución ante la problemática de la contaminación de metales pesados para tratar los suelos.

La similitud entre el trabajo experimental presentado y los estudios previos en la temática representan un avance en comparación con la información con la que se contaba en los años 90. Mas sin embargo se observa también que las soluciones alternas no se mencionan, los metales de estudio, en este caso cadmio, arsénico y plomo demuestran tener gran repercusión en la salud humana, así como ambiental contemplando los parámetros fisicoquímicos. Sé



aislaron algunas bacterias resistentes a los metales mencionados previamente dado que el tiempo no fue suficiente y la situación por la que atraviesa la humanidad no se concluyó en su totalidad la parte experimental. Considerando que los límites máximos permisibles de cada metal de estudio se rebasan y sobre todo si se trata de la cercanía de la metalúrgica.

Cabe resaltar que no se habían realizado estudios experimentales más actuales como el trabajo presentado, analizando los resultados aún persisten altas concentraciones de los metales mencionados anteriormente, reconsiderando la hipótesis, lo más viable es el tratamiento biológico por medio de bacterias para rescatar los suelos contaminados por metales pesados para preservarlos, además de disminuir las repercusiones en la salud de la población en general de la ciudad de Torreón.

## **10. CONCLUSIÓN**

De acuerdo a lo investigado a lo largo del presente trabajo además de haber realizado los experimentos y con los resultados obtenidos en las zonas mencionadas anteriormente mismos que se explicaron a lo largo del trabajo se puede concluir que la presencia de altas concentraciones de metales pesados en suelos se debió a actividades humanas, en este caso a la metalúrgica de Peñoles quien basa sus actividades en la obtención de metales, Peñoles que está situada en Torreón, el lugar de estudio, la contaminación por metales pesados representa una oportunidad para una investigación continua y profunda con importancia y enfoque medioambiental, ya que ha se puede contribuir al aislamiento, reproducción y dispersión de nuevos genotipos microbianos que determinen la resistencia a metales para ello optar por medios de remediación biológica. De manera general México en el tema de bioprospección aún es muy joven ya que no cuenta con fuentes de información, país como no es representativo en las gráficas o tablas que se obtuvieron.

Se puede definir de igual manera que los microorganismos expuestos a los metales pesados (Pb-Cd) en un largo periodo de tiempo generan cierta

resistencia a estos mismos ya que la zona de muestreo uno reflejo una basta población bacteriana a diferencia de la zona de muestreo dos que fue muy carente.

Esta más que claro que para la biorremediación de suelos contaminados por metales se requiere aplicar la parte biológica por las ventajas que esta representa, como todo tiene limitantes más sin embargo es una estrategia que disminuye la degradación del suelo.

Por otro lado, la situación de Torreón en cuanto al Pb y el Cd en la población infantil las concentraciones han disminuido en su organismo más sin en cambio las consecuencias por las exposiciones a lo largo de los años aún se pueden apreciar, debido a las demandas se logró minimizar esta problemática.

## **PERSPECTIVAS**

Cabe mencionar que debido a la pandemia por la que esta pasando la humanidad no se culminó en su totalidad la investigación ya que se cerraron los laboratorios de la universidad como medidas de prevención, en dichas instalaciones se llevaba a cabo la investigación,

Algunos procedimientos que faltaron fueron completar los parámetros fisicoquímicos de la zona uno e iniciar con los mismos, pero para la zona dos. La parte microbiológica que faltó realizar la prueba de catalasa, Solo se sometió a investigación Pb y Cd, faltó realizar las pruebas fisicoquímicas del As, si como las pruebas microbiológicas: en este caso; tinción de gram, prueba de oxidasa, pruebas de concentración mínima inhibitoria y pruebas de inducción en la resistencia, así como algunas pruebas in-situ.

## 7. LITERATURA CITADA

1. Alloway et al 2013. "Heavy metals in soils, trace metals and metalloids in soils and their bioavailability." Reading, UK: Springer.
2. Abhishek, R. 2018. "Heavy Metal Pollution and Remediation." CHAPTER
3. Bai, e. a. 2009. "Colloids Surf." B: Biointerfaces 70: 142-146
4. Beltrán-Pineda Mayra Eleonora (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión, universidad militar nueva granada, ISSN 1900-4699, Volumen 12, Número 2, Páginas 172-197.
5. Boussen, e. a. 2013. "Boussen et al." Geoderma. 192: 227-236.
6. Cabrera, V. Y. 1999. "La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila, México." Primera edición.
7. Calderón-Salinas, J. V. 1996. Lead exposure in a population of Mexican children .Human & Experimental Toxicology 15: 305-311.
8. Cárdenas, e. a. 2019. "Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes ríos de la Huasteca Potosina." Tlatemoani. Revista académica de investigación.
9. Caravanos, J. 2014. "Blood Lead Levels in Mexico and Pediatric Burden of Disease Implications." Annals of Global Health 80: 269-277.
10. Castebianco, F. 2018. Técnicas de remediación de metales pesados con potencial aplicación en el cultivo de cacao. la granja: Revista de Ciencias de la Vida 27(1) 2018:21-35.
11. Cervantes C., e. a. 2006. "Interacciones microbianas con metales pesados." Revista latinoamericana de microbiología. 48: 203-2010.
12. Cervantes, C. y. M. R. 1999b. "Contaminación ambiental por metales pesados." AGT, Editores, S.A México.: 41.
13. CITVER ,2020. Guía de manejo intoxicación por metales pesados.
14. Coronado, R. 1999. "Niveles de plomo en sangre no son de peligro".
15. Covarrubias, Sergio Abraham; García Berumen, José Abraham; Peña Cabriales, Juan José. El papel de los microorganismos en la biorremediación

- de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, vol. 25, núm. 3, octubre, 2015, pp. 40-45 Universidad de Guanajuato, México.
16. Clemente, R., Escobar, A., & Pilar, B., M. 2006. " Heavy metals fractionation and organic matter mineralisation in contaminated calcareous soil amended with organic material." *Bioresource Technology* 97: 1894-1901.
  17. Duarte O. T. 2009. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ci. Inf.*, Brasilia, DF, v. 38, n. 3, p.96-110, set./dez.
  18. Fernández, R. e. a. 2002. "Resistencia bacteriana." *Revista cubana de medicina militar*. 33: 45.
  19. Flores-Ramírez, R. 2012. Exposición infantil al plomo en sitios contaminados. *Salud pública de México / vol. 54, no. 4, julio-agosto de 2012.*
  20. García-Vargas, G., Rothenberg, S., Silbergeld, E. *et al.* Agrupación espacial de oligoelementos tóxicos en adolescentes alrededor de la fundición de plomo-zinc de Torreón, México. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 24, 634–642 (2014). <https://doi.org/10.1038/jes.2014.11>
  21. Galán, E. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola. Facultad de Química. Apartado 553. Universidad de Sevilla. Sevilla 41071.
  22. García Vargas, G. G.; Rubio Andrade, M.; Rosales González, M. G.; Goytia Acevedo, R.; García Arenas, G.; Candelas Rangel, J. L.; Meza Velázquez, R.; Caravanos, J. CONTAMINACIÓN POR METALES EN SUELOS DE LA CIUDAD DE TORREON, COAHUILA, MEXICO *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, vol. VI, núm. 2, 2007, pp. 165-168 Universidad Autónoma Chapingo Durango, México
  23. Garzón, 2017. Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*.
  24. González, A. 2012. "Contaminación por metales en el suelo urbano industrial y en la vegetación del sitio." *Revista AIDIS de ingeniería y ciencias ambientales*. 5: 1-10.

25. Gutiérrez Cárdenas, Óscar G. et al., 2007. Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. *Nova Scientia*, N° 19, Vol. 9 (2), 2017. ISSN 2007 - 0705. pp: 97 - 112 - 98.
26. Hu, Y., Cheng, H. 2015. "Contamination features and health risk of soil heavy metals in China." *Science of the Total Environment* 47: 3752–3760. INAFED 2019.
27. Labra, D. 2012. "Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo" *Revista Internacional Contaminación Ambiental* 28: 7-16.
28. López, D. 1999. "“Ignora Jesús Nakamichi de donde sale el plomo”."
29. Lovley, D. R., & Coates, 1997. "Bioremediation of metal contamination." *Current Opinion in Biotechnology* 8: 285-289.
30. Lu, A., Zhang, S., y Shan, X 2005. "Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. ." *Geoderma*. 125: 225-234. M. Guadalupe, B. 1999.
31. Medrano, M. 2009. "Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a metales pesados en el oriente de Torreón, Coahuila, México." Monografía.
32. Michael T. Madigan; John M. Martinko; (2009) Brock. biología de los microorganismos Paul v. Dunlap; David p. Clark Pearson educación, s.a., 2009, pág. 1297.
33. Monge, O. 2008. "Biosorción de cobre por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita)." *Revista Internacional Contaminación Ambiental* 24: 107-115.
34. Morales, 2011. "Automatización, control y optimización de los procesos de producción de un complejo metalúrgico" México, D.F
35. Murua et al. 2008. "Control." *Release* 132: 76-83.
36. NOM-001-ECOL,1996.
37. Oger, e. a. 2003. "FEMS Microbiol. ." *Ecol.* 43: 173-183

38. Onofre, 2008. Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita), *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24 (3) 107-115, 2008.
39. Pérez C. A. 2015. Resistencia a níquel en bacterias endófitas aisladas a partir de *Oriza sativa* en Colombia, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2015; 35:20-25, Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas, Grupo de Investigaciones en Bioprospección Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre, Colombia<sup>[w99]</sup>.
40. Pérez García, Perla Esmeralda; Azcona Cruz, María Isabel. Los efectos del cadmio en la salud *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, vol. 17, núm. 3, julio-septiembre, 2012, pp. 199-205 Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado México, México.
41. Recio, R. 2012. "Surveillance of elevated blood lead levels in children in Tlaxiaco, Coahuila, Mexico, 1998–2010." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215: 507-513.
42. Roane, T. y. I. L. P. 2000. "Microorganisms and Metal Pollutants." *Environmental Microbiology*: 403.
43. Sarwar, e. a. 2017. "Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives." *Chemosphere* 171: 710-721.
44. Shi, e. a. 2002. "Association of Microbial Community Composition and Activity with Lead, Chromium, and Hydrocarbon Contamination." *Appl Environ Microbiol.* 68: 3859-3866.
45. Silver, S. y. M. W. 1992. "Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic transport in bacteria." *Microbiol. Rev.*, 56: 195-228.
46. Tabak, H. H., Lens, P., van Hullebusch, E. D., & Dejonghe, W 2005. "Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides–1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 4: 115-156.

47. Téllez, e. a. 2017. "Intoxicación por plomo y nivel de marginación en recién nacidos de Morelos, México." *Salud Publica Mex* 59: 218-226.
48. Terrazas, M. 2015 "Uso de cerámica vidriada como fuente de exposición a plomo en niños indígenas de zonas marginadas de Oaxaca, México." *Salud pública, México*. 57: 260-264.
49. Valls, M., y De Lorenzo, V. 2002. " Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution." *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 327-338.
50. Vargas-Flores, T. & Kuno- Vargas, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de actualización clínica*. 49(2), 2594-2598.
51. Volke, S., et al 2005. " Suelos contaminados por metales pesados y metaloides." México: INE-SEMARNAT.
52. Walkey y Black, 1934. An examination of the degtjareff method for, determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method, *soil SCI*, 34:29-39.
53. Yagnentkovsky, N. 2011. "Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados". Tesis doctoral: 40-50.
54. Yamamura, S. y A., S. 2014. "REVIEW: Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation." *journal of Bioscience and Bioengineering* 118
55. Young, S. D. 2013. " Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and Their Bioavailability." Springer, Dordrecht: 51-95.
56. Zeng et al. 2011. " The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants." *Environmental Pollution*. 159: 84-91.
57. Zhang, Y. 2019. "Predicting future contents of soil heavy metals and related health risks by combining the models of source apportionment, soil metal accumulation and industrial economic theory." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171: 211-221.