

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
 BACTERIAS TOLERANTES A METALES PESADOS
 PROVENIENTES DE AMBIENTES CONTAMINADOS**

Tesis que para obtener el título de
Ingeniero en Biotecnología.

PRESENTA

MIRTHSA MONSERRAT RODRÍGUEZ ROBLEDO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. Leticia Guadalupe Navarro Moreno

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que aportaron de manera directa o indirecta su apoyo durante mi formación académica y en la realización de esta tesis.

Agradezco a mi directora de Tesis la **Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno** por aceptarme dentro de su grupo de investigación, por brindarme los conocimientos necesarios para realizar este trabajo de tesis, por darme la seguridad que a veces necesitaba y tenerme la paciencia necesaria en los momentos que me desaparecí, por escucharme cuando realmente lo necesite porque realmente me costaba expresarle mis emociones y pensamientos, infinitas gracias por brindarme su cariño, por sus atenciones y por el intercambio de dulces, extrañaré llegar y darle un dulce o dejárselo en su escritorio, las charlas durante la elaboración de la tesis, gracias por permitirme formar parte de esta gran familia en el laboratorio.

Le agradezco a la **Dra. Jeiry Toribio Jiménez** por apoyarme y caracterización e identificación por pruebas bioquímicas y a el Maestro en Medicina Molecular **Luis Uribe Espejo Galicia** por el apoyo en la identificación por pruebas moleculares mediante secuenciación 16s de mis tres cepas bacterianas.

Agradezco infinitamente a mis amigos durante la universidad a mi hermano **Isaac** por brindarme su cariño, cuidado y quererme como una hermana, a **Cecy** por las risas, platicas, consejos y horas de estudio, **Valdo** mi enfermero favorito gracias por apoyarme y darme ánimos tú y tu hermanito son parte de la familia, mi gran **misita** infinitas gracias por ser mi apoyo moral, ser mi paño de lágrimas, estar siempre conmigo y brindarme la confianza necesaria para seguir adelante. Mi **estimado ser misterioso** que no quisiste ser nombrado gracias por darme los ánimos en esto últimos años, por hacer mis días más felices y sentirte orgulloso de mi Gracias a todos aquellos que me brindaron apoyo y a los que me hicieron aprender de mis errores. Gracias a mis amigos del Laboratorio ustedes son una de las cosas más lindas que me llevo de la universidad aunque a veces me salía para tener mi espacio me divertí mucho con ustedes, **Joaco** gracias por ayudarme dentro y fuera del laboratorio, fuiste de mis primeros amigos cuando entre, extraño tus manías y tu risa tan características, **Héctor** gracias por escuchar, por ayudarme y ser un buen amigo extraño compartir mi almuerzo con ustedes, gracias **Brandon** por tener siempre una buena actitud y evitar conflictos,

fue lindo trabajar contigo los días de cinética, **David** eres un amor espero siempre mantengas esa hermosa actitud y mi güerita chula **Sari** gracias por tu apoyo, tus consejos, las tardes de chismes fue muy lindo reencontrarme contigo en la Uní esas horas de estudio, las noches sin dormir y las grandes anécdotas que vivimos jamás las olvidare la uní sin ti no hubiera sido lo mismo, los quiero chicos les deseo siempre lo mejor, gracias por tantas risas le dieron sin darse cuenta a mi corazón las ganas que en su momento le faltaron.

Y por último le agradezco **a mi familia Tía Guille, Manita Lupe** gracias por estar siempre para mí, por aconsejarme y por acompañarme en mis momentos más importantes. **Mamá, Papá, Conchi y Eli** por el apoyo y el esfuerzo brindado son mi impulso para seguir. Mamá, Papá perdón por tardar tanto hay tantas cosas en ese lapso que no les dije pero por fin lo he logrado, Mami y Conchi gracias por esforzarse tanto para que yo culminara sé que me tarde pero sin ustedes no terminaba la carrera, Conchi gracias por apoyarme sé que te detuve por un tiempo pero mírate ya vas tomando tu camino poco a poco discúlpame por todo y me faltara vida para agradeceréte y regresarte lo que hiciste por mi sin ti no hubiera acabado la uní ni mi trabajo experimental, no somos la familia perfecta, aunque nadie lo es realmente pero sin ustedes no estaría aquí gracias por siempre darme las fuerzas, las ganas y estar conmigo en cada proceso, Mami esto principalmente es para ti Te amo infinitamente me has aconsejado, escuchado, te agradezco tanto el que lucharas porque yo culminara que espero me alcance la vida para regresártelo.

DEDICATORIA

*“El futuro pertenece a quienes creen
en la belleza de sus sueños. Eleanor Roosevelt.”*

*A mis padres y a mi hermana Conchi
Sin ustedes esto no sería posible*

RESUMEN

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec el crecimiento acelerado de las industrias y la urbanización constante han generado estragos a los ecosistemas trayendo consigo la contaminación del Río Papaloapan y sus alrededores. Muchos cuerpos de agua presentan altos niveles de contaminación visibles, así como la presencia de microorganismos que pueden ser de importancia clínica y de contaminantes que no son visibles como los metales pesados. Los microorganismos pueden generar procesos adaptativos que les permiten sobrevivir a estas condiciones, dichos procesos podrían servir como un mecanismo de defensa y remoción de contaminantes como los metales pesados. En esta investigación se determinó la tolerancia a metales pesados de tres cepas provenientes de afluentes pertenecientes a la ciudad de Tuxtepec y se utilizaron tanto el crecimiento como la actividad de la enzima Glutación S-Transferasa (GST) como indicadores de daño. La enzima está ampliamente distribuida entre los microorganismos y posee varias actividades celulares dentro del metabolismo de estos. Las cepas aisladas e identificadas fueron *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii*. Los ensayos de tolerancia a los metales mercurio (Hg), cadmio (Cd), cromo (Cr) y plomo (Pb) mostraron que *P. aeruginosa* toleró los cuatro metales pesados, *Staphylococcus sciuri* presentó sensibilidad a plomo y *Staphylococcus stepanovicii* fue la más susceptible al no crecer en cadmio y plomo. Se evaluaron los tiempos óptimos de crecimiento y se determinaron las concentraciones mínimas tolerantes y máximas inhibitorias para poder realizar los análisis bioquímicos de la actividad de GST, los cuales mostraron que *P. aeruginosa* es capaz de aumentar su actividad enzimática y la tolerancia a Plomo en un amplio intervalo de concentraciones [0.24mM a 1.95mM] en los cuales presentó crecimiento y actividad de la enzima similar e incluso mayor a la obtenida por la cepa sin el metal. Por su lado, *Staphylococcus sciuri* presentó crecimiento y actividad de la enzima GST diferencial destacando su tolerancia a cadmio a las concentraciones 0.12 y 0.75mM al indicar un aumento en la actividad enzimática de la GST con respecto a la cepa sin el metal. Finalmente, *Staphylococcus stepanovicii* mostró un crecimiento y una actividad enzimática diferencial, siendo capaz de tolerar la exposición a mercurio [0.05µM], presentando tolerancia a cromo a concentraciones de 0.12 y 0.75mM, siendo en esta última donde se observó un aumento significativo en la actividad de la enzima en respuesta a los efectos que el metal ocasionó. Los resultados indican que *Pseudomonas. aeruginosa* podría ser un candidato para la remoción de mercurio, cadmio y cromo y principalmente de plomo; *S. sciuri* para cadmio y *S. stepanovicii* para cromo de ambientes contaminados, utilizando a la enzima Glutación S-transferasa como un indicador de daño en los procesos de biorremediación.

ABSTRACT

In the city of San Juan Bautista Tuxtepec, the accelerated growth of industries and constant urbanization have wreaked havoc on the ecosystems, bringing with it the contamination of the Papaloapan River and its surroundings. Many bodies of water present high levels of visible contamination, as well as the presence of microorganisms that may be of clinical importance and contaminants that are not visible, such as heavy metals. Microorganisms can generate adaptive processes that allow them to survive these conditions; these processes could serve as a defense mechanism and removal of contaminants such as heavy metals. In this investigation, the tolerance to heavy metals of three strains from tributaries belonging to the city of Tuxtepec was determined and both the growth and the activity of the glutathione S-transferase (GST) enzyme were used as indicators of damage. The enzyme is widely distributed among microorganisms and has various cellular activities within their metabolism. The isolated and identified strains were *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus stepanovicii*. The metal tolerance tests for mercury (Hg), cadmium (Cd), chromium (Cr) and lead (Pb) showed that *P. aeruginosa* tolerated the four heavy metals, *Staphylococcus sciuri* was sensitive to lead and *Staphylococcus stepanovicii* was the most susceptible. by not growing on cadmium and lead. The optimal growth times were evaluated and the minimum tolerant and maximum inhibitory concentrations were determined in order to carry out the biochemical analyzes of the GST activity, which showed that *P. aeruginosa* is capable of increasing its enzymatic activity and tolerance to Lead in a wide range of concentrations [0.24mM to 1.95mM] in which growth and activity of the enzyme were similar and even higher than that obtained by the strain without the metal. For its part, *Staphylococcus sciuri* presented growth and differential GST enzyme activity, highlighting its tolerance to cadmium at concentrations 0.12 and 0.75Mm, indicating an increase in GST enzyme activity with respect to the strain without the metal. Finally, *Staphylococcus stepanovicii* showed differential growth and enzymatic activity, being able to tolerate exposure to mercury [0.05μM], presenting tolerance to chromium at concentrations of 0.12 and 0.75mM, being in the latter where a significant increase in the concentration was observed. enzyme activity in response to the effects that the metal caused. The results indicate that *Pseudomonas. aeruginosa* could be a candidate for the removal of mercury, cadmium and chromium and mainly lead; *S. sciuri* for cadmium and *S. stepanovicii* for chromium from contaminated environments, using the enzyme glutathione S-transferase as an indicator of damage in bioremediation processes.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1.- Contaminación en el medioambiente.....	19
2.1.1.- Contaminación del suelo.....	19
2.1.2.- Contaminación del aire.	21
2.1.3.- Contaminación del agua.....	22
2.2.- METALES PESADOS.	24
2.3.- CONTAMINACIÓN EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS POR METALES PESADOS.....	25
2.3.1.- Mercurio.....	25
2.3.2- Plomo.	25
2.3.3- Cromo.....	26
2.3.4- Cadmio..	26
3.- PROBLEMÁTICA: CONTAMINACIÓN DEL AGUA EN MEXICO Y EN OAXACA.....	27
3.1.- CONTAMINACIÓN DEL RIO PAPALOAPAN	29
3.2.- ESTRATEGIAS DE BIORREMEDIACIÓN EN ECOSISTEMAS CONTAMINADOS	31
4. - BACTERIAS COMO ALTERNATIVA DE BIORREMEDIACIÓN	33
4.1- GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS.....	34
4.2.- METABOLISMO BACTERIANO.....	35
5.3.- RESISTENCIA BACTERIANA A METALES PESADOS.....	46
5.3.1.- Resistencia a mercurio.	46
5.3.2.- Resistencia a plomo.	47
5.3.3.- Resistencia a cromo.	48
5.3.4.- Resistencia a cadmio.....	49
5.4.- IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TOLERANTES DE AMBIENTES CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.....	51
5.5.- GLUTATIÓN S-TRANSFERAS (GST) EN BACTERIAS COMO BIOINDICADOR DE DAÑO.....	53
6.- JUSTIFICACIÓN	55
7.- HIPÓTESIS.....	56
8.- OBJETIVOS.....	57
9.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	57
9.1.- Toma de muestra.	57
9.2.- Procesamiento de la muestra.	58

9.3.- Siembra en agar nutritivo.	58
9.4.- Tolerancia a metales pesados en las cepas seleccionadas.	59
9.5.- Pruebas de viabilidad.	60
9.6.- Curva de crecimiento.	60
9.7.- Cuantificación de proteína.	61
9.8.- Medición de la actividad de la Glutación S-transferasa.	61
9.9.- Identificación de cepas microbianas por pruebas bioquímicas.	62
10.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
10.1.- SITIOS DE RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUA.	64
10.2.- SIEMBRA Y SELECCIÓN DE LAS COLONIAS.	65
10.3.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS.	69
10.3.1.-Pruebas bioquímicas.	69
10.3.2 Identificación por secuenciación 16s	72
10.4. CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.	79
10.4.1.- <i>Pseudomona aeruginosa</i>	79
10.4.2.- <i>Staphylococcus sciuri</i>	80
10.4.3.- <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	82
10.5.- EFECTO DE MERCURIO, CADMIO, CROMO Y PLOMO EN EL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS...85	
10.5.1 Mercurio.	85
10.5.2 Cadmio	88
10.5.3 Cromo.	91
10.5.4 Plomo.	94
10.6. VIABILIDAD	101
10.6.1 EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS METALES MERCURIO, CADMIO, CROMO Y PLOMO	101
10.6.1.1 Mercurio.	101
10.6.1.2 Cadmio.	102
10.6.1.3 Cromo.	103
10.6.1.4. Plomo.	104
10.6.2 EN FUNCIÓN DE LAS BACTERIAS <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> y <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	106
10.6.2.1 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	106
10.6.2.2. <i>Staphylococcus sciuri</i>	107
10.6.2.3 <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	108
10.7.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA	109

10.7.1.- Concentraciones mínimas inhibitorias para la cuantificación de proteína.....	111
10.7.1.1. Crecimiento microbiano.....	111
10.7.1.2 Concentración total de proteínas.	112
10.7.1.3 Actividad de la enzima Glutación S-transferasa.	113
10.7.2.- Concentraciones máximas tolerables para la cuantificación de proteína.	115
10.7.2.1 Crecimiento microbiano.....	115
10.7.2.2 Concentración de proteína.	117
10.7.2.3 Actividad de la enzima Glutación S-transferasa.	118
11.- CONCLUSIONES.....	122
12.-PERSPECTIVAS.....	124
13.- APÉNDICE I.....	124
14.- APENDICE 2.....	125
15.- APÉNDICE 3.....	127
16.- BIBLIOGRAFIA.....	132

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Características físicas, químicas y biológicas del agua en presencia de contaminantes (Tomado de Encinas, 2011).	22
Tabla 2. Calidad del agua para distintos valores de DBO (Encinas, 2011).....	23
Tabla 3. Calidad del agua para distintos valores de OD (Encinas, 2011).....	23
Tabla 4. Cantidad de aguas residuales (A.R) vertidas por región hidrológica (Garrido López, 2019).	28
Tabla 5. Localización geográfica de los efluentes.	57
Tabla 6. Sitios de recolección de agua ubicados en la zona de Tuxtepec, Oaxaca	64
Tabla 7. Diámetro colonial (cm) de las tres colonias seleccionadas expuestas a 1.2 mM de acetato de plomo.	68
Tabla 8. Efecto de los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo en el crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Estafilococos sciuri</i> y <i>Estafilococos stepanovicii</i> . (n=3).....	97
Tabla 9. Concentraciones máximas toleradas e inhibitoria de cada metal para cada cepa bacteriana. ...	101
Tabla 10. Concentraciones de metales elegidas para medir la actividad de GST.....	110

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los contaminantes según su origen.....	19
Figura 2.- Principales fuentes contaminación del suelo usado o producido por las actividades humanas. 20	
Figura 3. Contaminantes primarios y secundarios del suelo de origen natural o antropogénico.	21
Figura 4.- Ríos que colindan con la región de Tuxtepec.....	29
Figura 5.- Unión de los ríos Papaloapan y Río Blanco en la Laguna de Alvarado.....	30
Figura 6.- Movilización natural de metales pesados por acción del agua y el viento.....	32
Figura 7.- Morfología de una bacteria Gram positiva.. ..	34
Figura 8. Árbol filogenético del origen y evolución de las bacterias basado en la secuencia de RNA.	35
Figura 9.- Metabolismo oxidativo y fermentativo en bacterias.....	37
Figura 10.- Glucólisis anabólica en bacterias.....	38
Figura 11.- Proceso de fermentación en la bacteria <i>Pyrococcus furiosus</i>	39
Figura 12.- Cadena de transporte de electrones en bacterias aerobias y anaerobias.....	40
Figura 13.- Productos finales de la respiración aerobia y anaerobia en bacterias.	40
Figura 14.- Ciclo de Krebs en bacterias aerobias.	41
Figura 15.- Ciclo del glioxalato derivado de la Acetil-CoA en bacterias.....	42
Figura 16.- Integración de las rutas metabólicas relacionadas con el catabolismo de los carbohidratos en bacterias aerobias y anaerobias.	43
Figura 17.- Plásmidos.....	45
Figura 18.- Mecanismo de reducción del Hg^{2+} a Hg^0 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
Figura 19. Prototipo de los principales sistemas de eflujo de iones metálicos.	48
Figura 20.- Sistemas de resistencia a cromato en bacterias.....	49
Figura 21.- Esquema que resume el posible papel de la resistencia a Cd^{2+} <i>A. ferrooxidans</i>	50
Figura 22.- Familia GST presente en bacterias y sus diferentes miembros.....	54
Figura 23. Protocolo de estudio de los procesos de resistencia y susceptibilidad a metales pesados en bacterias.....	56
Figura 24. Colonias obtenidas tras la etapa de siembra y selección.....	65
Figura 25 .- Segunda resiembra de cepas de bacterias con un diámetro mayor a 0.2mm.....	66
Figura 26. Características macro y microscópicas de las cepas.....	67
Figura 27 . Crecimiento de las colonias en un medio de agar nutritivo con 1.2 mM de acetato de plomo.....	68
Figura 28. Identificación por pruebas bioquímicas de la cepa 1.....	69
Figura 29. Identificación por pruebas bioquímicas de la cepa 2.....	70
Figura 30. Identificación por pruebas bioquímicas de la cepa 3.....	71
Figura 31. Prueba de coagulasa de las Cepas 2 y Cepa 3.	71
Figura 35. Cinética de crecimientos de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	79
Figura 36.- Cinéticas de crecimientos de la cepa bacteriana <i>Staphylococcus sciuri</i>	81
Figura 37. Cinéticas de crecimientos de la cepa bacteriana <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	82
Figura 38. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> y <i>Staphylococcus stepanovicii</i> en función del tiempo por los métodos de absorbancia y conteo.....	84
Figura 39. Estudio de la exposición a el metal cloruro de mercurio de las tres cepas bacterianas.	85

Figura 40. Tabla y gráfica del efecto de la exposición a mercurio en el crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> y <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	86
Figura 41. Estudio de la exposición a Cadmio.	88
Figura 42. Tabla y grafica del efecto de la exposición a cadmio sobre el crecimiento de las bacterias <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> y <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	89
Figura 43 .- Estudio de la exposición a Cromo.	92
Figura 44. Tabla y grafica del efecto de la exposición a cromo de las bacterias <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> y <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	93
Figura 45. Estudio de la exposición a plomo.	95
Figura 46. Tabla y grafica del efecto de la exposición a plomo de las bacterias <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> y <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	96
Figura 47. Efecto de los metales mercurio, cadmio, cromo y plomo en el crecimiento de cada cepa bacteriana	98
Figura 48. Porcentaje de viabilidad de las cepas <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> y <i>Staphylococcus stepanovicii</i>	102
Figura 49. Porcentaje de viabilidad de las cepas <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus sciuri</i> expuestas a las concentraciones tolerantes e inhibitorias de mercurio.	103
Figura 50. Porcentaje de viabilidad de las cepas <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Estafilococos stepanovicii</i> expuestas a las concentraciones tolerantes e inhibitorias de cadmio.	104
Figura 51. Porcentaje de viabilidad de <i>Pseudomona aeruginosa</i> expuesta a las concentraciones tolerantes e inhibitorias de plomo.	105
Figura 52. Porcentaje de viabilidad de <i>Pseudomona aeruginosa</i> expuesta a los cuatro metales.	106
Figura 53. Porcentaje de viabilidad de <i>Staphylococcus sciuri</i> expuesta a mercurio y cadmio.	107
Figura 54. Porcentaje de viabilidad de <i>Staphylococcus stepanovicii</i> expuesta a mercurio y cromo.	108
Figura 55. Crecimiento microbiano de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. sciuri</i> y <i>S. stepanovicii</i> expuestas a concentraciones mínimas inhibitorias de los tres metales pesados.	111
Figura 56. Concentración total de proteínas en cepas microbianas expuestas a las concentraciones mínimas inhibitorias de los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo.	112
Figura 57. Actividad de GST en cepas microbianas expuestas a las concentraciones mínimas inhibitorias de los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo.	113
Figura 58. Crecimiento microbiano de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. sciuri</i> y <i>S. stepanovicii</i> a las concentraciones máximas tolerables de los cuatro metales pesados.	116
Figura 59. Concentración de proteína total en cepas microbianas a las concentraciones máximas tolerables de mercurio, cadmio, cromo y plomo.	117
Figura 60. Actividad de GST en cepas microbianas expuestas a las concentraciones máximas tolerables de los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo.	118

ABREVIATURAS

AN: Agar Nutritivo

ARN: Ácido Ribonucleico

Cd: Cadmio

Cepa 1: *Pseudomona aeruginosa*

Cepa 2: *Staphylococcus sciuri*

Cepa 3: *Staphylococcus stepanovicii*

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

CMT: Concentración Máxima tolerante.

CN: Caldo Nutritivo.

Cr: Cromo

GSH: Glutati6n.

GST: Glutati6n S Transferasa

Hg: Mercurio

LIA: Lisina descarboxilasa

MIO: Movilidad y Ornitina

Pb: Plomo

PCR: Reacci6n en Cadena de la polimerasa.

1. INTRODUCCIÓN

En México la contaminación por metales pesados es un problema muy grave el cual no es tomado en serio por gran parte de la población. Esto ha generado múltiples consecuencias en todo el país. Hoy día es muy frecuente escuchar, observar y reconocer daños, a diferente escala, provocados por la contaminación de metales pesados en los diferentes ecosistemas del país.

Dentro de los daños en el ambiente de México se encuentra el provocado en sus aguas. En muchos de los mantos acuíferos y demás cuerpos de agua se han detectado descargas de metales pesados realizadas principalmente por la minería y las industrias textiles, petroquímicas y automotrices entre otras. En este país los sitios más afectados por las altas concentraciones de metales pesados en suelos y aguas son los estados de Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí. Sin embargo y no menos importante, se debe tener en cuenta que México es un país con una gran cantidad de alfareros y por ello en contacto con grandes cantidades de metales pesados como el plomo.

Debido a la existencia de los ciclos biológicos y geoquímicos, existe un constante flujo de materiales en el medio ambiente, ello produce que la distribución de los contaminantes se lleve a cabo en cualquiera de los componentes de los mismos. Es así como los metales pesados se distribuyen en la naturaleza. Cuando los metales pesados son bioacumulados por animales y plantas se pueden generar dos consecuencias. Por un lado, estas especies químicas alterarán su metabolismo y por ello serán interrumpidos sus procesos vitales afectando su desarrollo normal, ocasionando enfermedades.

México cuenta con una gran biodiversidad de plantas y animales. También la tiene en microorganismos. Estos son capaces de adaptarse a condiciones extremas como lo es la contaminación con metales pesados. Es por ello que en este trabajo se aislaron cepas de bacterias originarias de Tuxtepec, Oaxaca, las cuales fueron identificadas y caracterizadas en relación con su resistencia o susceptibilidad a plomo, cromo, cadmio y mercurio, metales que han sido detectados en las aguas de esta región.

2. MARCO TEÓRICO

La introducción de agentes contaminantes puede alterar la composición de los ecosistemas, afectando las características físicas, químicas y biológicas del aire, suelo y agua. Los agentes pueden presentarse en estado líquido, sólido o gaseoso y, debido a sus características químicas, causar inestabilidad y dañar el funcionamiento del ambiente. De esta manera se afectará a los seres vivos que residen en él (Encinas, 2011). Un contaminante es todo compuesto natural o artificial capaz de afectar el sistema ecológico en el que se encuentre al quedarse o disgregarse por todo el entorno.

Villasante (2000), mencionó que la contaminación se puede clasificar, según su origen, en cinco grupos (figura 1). Dentro del primer grupo se encuentra la *contaminación natural*, la cual se lleva a cabo por factores presentes en la naturaleza que afectan el aire, las aguas y el suelo. Se da por distintas vías, como, por ejemplo, cuando la erupción de un volcán o la descomposición de materia orgánica arrojan a la atmósfera ciertas partículas que pueden alterar su equilibrio natural. El grupo dos es el *efecto invernadero* el cual se da por la acumulación de diversos gases en la atmósfera como el dióxido de carbono, el metano, el vapor de agua, los óxidos de nitrógeno y los clorofluorocarbonados los cuales absorben las radiaciones ultravioletas emitidas hacia la tierra. Por el aumento acelerado de contaminantes, la concentración de estos gases ha aumentado mucho debido a la actividad humana, trayendo consigo el rompimiento del equilibrio natural y el calentamiento de la tierra. El tercer grupo es la *lluvia acida*, la cual consiste en la precipitación de altas concentraciones de ácidos sulfúrico y nítrico presentes en la atmosfera, esta se puede presentar en forma de niebla y partículas con grandes cantidades de ácidos. El cuarto grupo corresponde a las alteraciones en la *capa de ozono*. La exposición a altos niveles de ozono provoca importantes problemas a la vegetación y la disminución en el rendimiento de los cultivos (Ceballos, 2021). En último lugar se encuentra la *actividad antropogénica*. Normalmente se usa para describir contaminaciones ambientales en forma de desechos químicos o biológicos como consecuencia de las actividades económicas, tales como la producción de dióxido de carbono por consumo de combustibles fósiles.

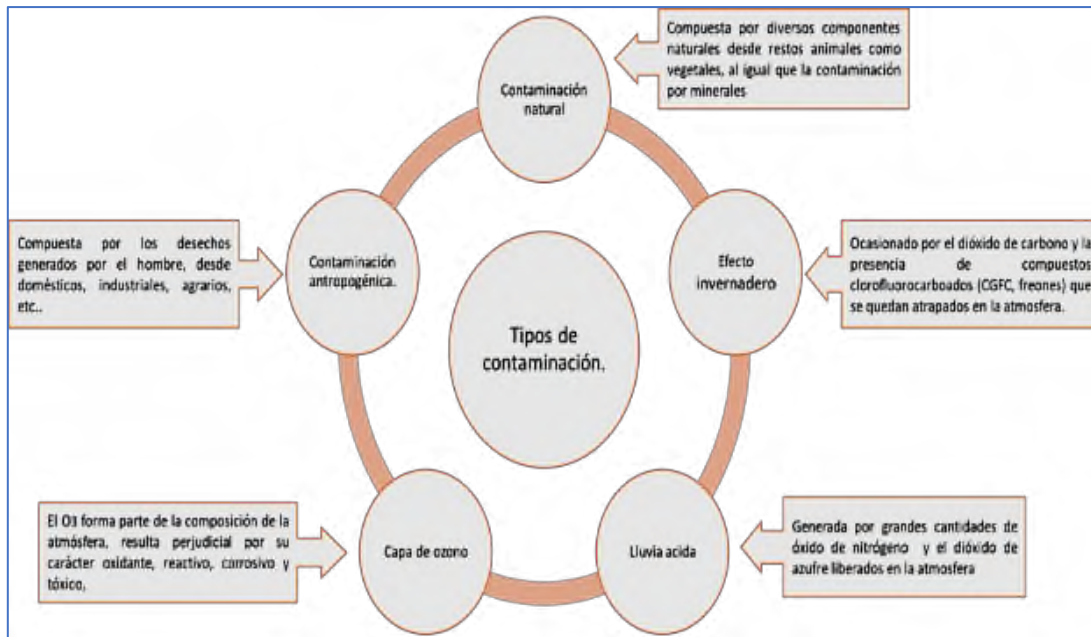


Figura 1. Clasificación de los contaminantes según su origen (Modificado de Villasante, 2000).

2.1.- Contaminación en el medioambiente.

La contaminación es un proceso que se extiende a lo largo de los diferentes ecosistemas y a través de la historia de la humanidad. Carlos Vázquez y Alma Orozco (2004), en su libro "La destrucción de la naturaleza" manifiestan que a través de los años se nos ha enseñado que la historia de la humanidad ha relacionado el descubrimiento de la agricultura y la domesticación de algunos animales como dos de los grandes avances de la raza humana. No obstante, ellos han manifestado que no están de acuerdo con dicha afirmación, ya que al pensar en la ecología y en la salud humana opinan que estos descubrimientos fueron el inicio de la destrucción de las comunidades, la erosión de los suelos, la extinción inducida de especies, además de iniciar la explosión demográfica, la cual constituye una amenaza para la misma especie y otras más al aumentar los problemas de contaminación, hacinamiento y falta de respeto por la naturaleza. Las características de la contaminación del suelo, el agua y el aire se detallan a continuación.

2.1.1.- Contaminación del suelo.

La superficie terrestre ha sufrido, en los últimos años, graves afectaciones por los contaminantes de origen natural o antropogénico, generando desequilibrios y provocando la pérdida de organismos y de suelos productivos (Encinas, 2011). Si algunos elementos y compuestos se encuentran de forma natural en los suelos, la intervención humana constituye la principal causa de la contaminación del suelo. A continuación, se mencionan los principales contaminantes que han sido detectados.

Plaguicidas: Pueden ser moléculas sintéticas orgánicas o inorgánicas. Sus efectos toxicológicos sobre las plagas dependen de su composición química, que a su vez afecta su interacción con los componentes del suelo; algunos plaguicidas también están asociados a la contaminación de suelos por metales pesados. Su modo de acción se basa en su efecto sobre las plagas en función de su composición química, que a su vez afectará su interacción con los componentes del suelo (Rodríguez, 2019).

Metales pesados: Estos elementos aparecen de forma natural a bajas concentraciones en suelos. Muchos de ellos son micronutrientes esenciales para plantas, animales y humanos, pero en concentraciones altas pueden causar toxicidad en todos los seres vivos. Degradan la calidad de la atmósfera, de los cuerpos de agua y de los cultivos de alimentos, también amenazan la salud y bienestar de animales y seres humanos. Entre los metales pesados, los elementos Zn, Ni, Co y Cu son más tóxicos para las plantas, mientras que As, Cd, Pb, Cr y Hg resultan especialmente tóxicos para los animales superiores (Rodríguez, 2019). La figura 2 muestra las principales fuentes de contaminación del suelo y subsuelo. Los contaminantes son liberados al ambiente de forma “accidental” al no contar con el conocimiento ni el equipo necesario para el tratamiento de los desechos antes de su liberación al ambiente, un ejemplo de esto lo constituyen las actividades industriales quienes liberan contaminantes a la atmósfera, el agua y el suelo. Los contaminantes gaseosos son liberados a la atmósfera y pueden ingresar al suelo directamente a través de la lluvia ácida o la deposición atmosférica.



Figura 2.- Principales fuentes contaminación del suelo usado o producido por las actividades humanas (Modificado de Yaron, Dror y Berkowitz, 2012).

2.1.2.- Contaminación del aire.

Es la alteración de manera perjudicial de la atmósfera, esta puede ser producto de factores naturales como emisiones de gases y cenizas volcánicas; humo de incendios no provocados; polvo, polen y esporas de plantas, hongos y bacterias. También puede ser producto de la actividad humana en forma de emisiones industriales, humo proveniente de los escapes de autos, calefacciones domésticas y aerosoles, entre otros.

Las causas de la contaminación atmosférica pueden provenir de dos fuentes distintas. Las primarias son aquellas que proceden directamente del lugar que los produce y las secundarias se originan en el aire por reacciones químicas entre dos o más contaminantes primarios o entre contaminantes primarios y constituyentes naturales de la atmósfera. La figura 3 muestra algunos contaminantes primarios que son llevados directamente a la atmósfera por algunas fuentes de emisión. Los contaminantes secundarios son los originados en el aire como consecuencia de la transformación y las reacciones químicas que sufren los contaminantes primarios en la atmósfera. (Encinas, 2011, Semarnat 2013).



Figura 3. Contaminantes primarios y secundarios del suelo de origen natural o antropogénico (Fuente: elaboración propia).

2.1.3.- Contaminación del agua.

La contaminación del agua se define como cualquier cambio químico, físico o biológico en la calidad del agua que tiene un efecto dañino en la flora y fauna presente en ella. El ciclo natural del agua contiene una fase de purificación. Pero esta fase y su facilidad de regeneración además de su aparente abundancia hace que el agua se convierta en el vertedero habitual de residuos como pesticidas, desechos químicos, metales pesados, residuos radiactivos, desechos industriales y domésticos (Gil, 2012).

Para determinar la calidad del agua, se miden algunos parámetros químicos, físicos y biológicos mismos que, cuando el agua se encuentra contaminada, pueden cambiar. La tabla 1 muestra algunos parámetros que pueden ser afectados por contaminantes dependiendo del compuesto y el tipo de contaminante. Los cambios generados pueden ser físicos y, por ello, cambiar las propiedades que lo constituyen y a su vez generar la muerte y/o cambio de la flora, fauna y los microorganismos que ahí habiten. Las propiedades químicas también se ven afectadas de forma sinérgica por los cambios físicos de los contaminantes que estén depositados, ocasionando que la flora, la fauna y los microorganismos lleguen a presentar cambios a nivel celular, cambios físicos, así como aumento o disminución poblacional (Encinas, 2011).

Tabla 1.- Características físicas, químicas y biológicas del agua en presencia de contaminantes (Tomado de Encinas, 2011).

FÍSICAS.	QUÍMICAS	BIOLÓGICAS
Color, olor y sabor. Conductividad, Temperatura. Materiales en suspensión. Radiactividad, espumas.	pH, O ₂ disuelto (OD), DBO ₅ , DQO, COT, Nitrógeno total, Fósforo total. Aniones: Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , S ²⁻ , CN ⁻ , F ⁻ . Cationes: Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , NH ₄ ⁺ Metales pesados y compuestos orgánicos.	Bacterias coliformes, Virus, Microorganismos, Animales y Plantas.

Existen una gran variedad de contaminantes del agua, por lo que a continuación se muestran algunos de los principales.

Microorganismos patógenos. Son los diferentes tipos de bacterias, virus, protozoos y otros organismos que transmiten enfermedades. Estos microorganismos llegan al agua principalmente por medio de los desechos residuales y de hospitales. Su presencia en agua, para poder considerarla aceptable, debe ser igual a cero colonias de coliformes por cada 100 ml de agua. Lo anterior ha sido establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Gíl, 2012; Ríos, 2017).

Desechos orgánicos. Son el conjunto de residuos orgánicos producidos por los seres humanos, el ganado y demás organismos vivos. Incluyen heces y otros materiales que pueden ser descompuestos por bacterias aeróbicas, es decir en procesos con consumo de oxígeno. Para poder medir y clasificar los índices de contaminación por desechos orgánicos se utiliza la DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) la tabla 2 la cual se define como la cantidad de oxígeno disuelto que necesitan los microorganismos aerobios para oxidar la materia orgánica biodegradable y la OD (Demanda de oxígeno) la tabla 3, que de la misma forma es la cantidad de oxígeno disuelto necesaria para oxidar químicamente toda la materia orgánica indicando la calidad del agua. Esta se mide valorando el exceso de oxidante añadido a la muestra (Encinas, 2011).

Tabla 2. Calidad del agua para distintos valores de DBO (Encinas, 2011).

DBO ₅	CALIDAD DEL AGUA
1-2 mgl-1	Muy buena
3-5 mgl-1	Aceptable.
5-9 mgl-1	Mala.
> 100 mgl-1	Muy mala.

Tabla 3. Calidad del agua para distintos valores de OD (Encinas, 2011).

OD	CALIDAD DEL AGUA.
1-5 ppm.	No contaminada.
< 50 ppm.	Poco contaminada.
240-600 ppm.	Residual contaminada.

Sustancias químicas inorgánicas. En este grupo están incluidos ácidos, sales y metales tóxicos como el mercurio y el plomo. Si están en cantidades altas pueden causar graves daños a los seres vivos; disminuir los rendimientos agrícolas y corroer los equipos que se usan para trabajar con el agua (Encinas, 2011).

Nutrientes vegetales inorgánicos. Las sales de nitratos y fosfatos son sustancias solubles en agua que las plantas necesitan para su desarrollo, pero si se encuentran en cantidad excesiva inducen el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos provocando la eutrofización (Malacalza, 2013; Encinas, 2011).

Compuestos orgánicos. Muchos tipos de moléculas orgánicas que constituyen compuestos como el petróleo, la gasolina, los plásticos, los plaguicidas, los disolventes, los detergentes, etc. acaban en el agua y por lo general permanecen en ella por largos períodos de tiempo. Esto es debido a que se encuentran conformados por estructuras moleculares complejas difíciles de degradar por los microorganismos (Rodríguez 2019; Encinas, 2011).

La presencia de los contaminantes mencionados anteriormente tiene como consecuencia un severo impacto en los ecosistemas y en la salud. El agua constituye un medio ideal para el flujo de contaminantes al interconectar la biósfera con la atmósfera en el “ciclo del agua”. Debido a lo anterior, todo aquel contaminante natural o antropogénico es arrastrado dentro del ciclo en cualquiera de sus fases (evaporación, condensación y precipitación) (Malacalza, 2013).

2.2.- METALES PESADOS.

Existen varias definiciones, por lo general, se acepta que son aquellos elementos cuya densidad es mayor a 5 g/ml. Según Nieboery Richardson (1980), los metales pueden dividirse en cuatro clases de acuerdo con su reactividad con los grupos funcionales de las biomoléculas, así como dentro de los metales pesados se distinguen dos grupos. Estas se explican a continuación.

Clase A: aquellos que reaccionan con mayor afinidad con el oxígeno (reactividad $O > N > S$) como aluminio, calcio, estroncio, bario y lantano.

Clase B: son los que reaccionan más con el azufre (reactividad $S > N > O$) como cobre (I), mercurio y plata.

Clase C: se encuentran los metales con afinidad intermedia como fierro, cobalto, níquel, arsénico, cadmio, plomo y cobre (II) (Moreno-Sánchez y Devars, 1999).

2.2.1.- Oligoelementos o micronutrientes. Son aquellos requeridos en pequeñas cantidades o cantidades traza, por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Pasado cierto umbral de concentración se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo se encuentran: arsénico, boro, cobalto, cromo, cobre, molibdeno, manganeso, níquel, selenio y zinc.

2.2.2.- Metales pesados sin función biológica conocida. Cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos conlleva a disfunciones en sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Ellos son, principalmente: cadmio, mercurio, plomo, antimonio y bismuto (Navarro-Aviñó, 2007).

2.3.- CONTAMINACIÓN EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS POR METALES PESADOS.

Desde la década de los 70's se ha establecido que el incremento de la concentración de metales pesados en los sistemas acuáticos es consecuencia de las perturbaciones generadas por el hombre en el medio ambiente. Desde entonces se ha reflejado el incremento de la contaminación en la atmósfera, los ríos, los océanos y los suelos por los metales que, debido a la actividad industrial, han sido mal desechados (Nriagu, Pacyna 1988). Se investigaron los efectos en la salud y las características de los cuatro metales de interés para este trabajo de investigación.

2.3.1.- Mercurio. El mercurio (II) constituye el estado de oxidación más común y frecuente en la naturaleza, además de que es el estado en el cual este metal ocasiona su mayor toxicidad (Lominchar, 2010). La contaminación por mercurio no afecta solamente al suelo, este problema se presenta también en ambientes acuáticos debido a las descargas antrópicas. Hallazgos científicos recientes muestran que el uso de compuestos derivados de este metal está ocasionando aumentos cuantificables del mercurio en los océanos del mundo cada año. Como consecuencia de lo anterior, se ha sugerido que el nivel de mercurio en el océano Pacífico se incrementará en un 50% para el año 2050 (Sunderland, 2009; De la Rosa, 2004; Li 2015).

Enfermedades: La intoxicación crónica por mercurio presenta temblores, hipertrofia de tiroides, taquicardia, gingivitis, cambios en la personalidad, eretismo (exaltación de las propiedades vitales de un órgano), pérdida de memoria, depresión severa, delirios y alucinaciones, se presentan daño renal por exposición crónica y efectos reversibles que cesan cuando la persona evita exponerse. Los vapores de mercurio se absorben en la circulación sanguínea pulmonar y sistema nervioso central. Los principales efectos del metilmercurio en adultos son neurológicos y se sabe que la exposición durante el embarazo provoca la aparición de lesiones congénitas del sistema nervioso (SOO, 2013).

2.3.2- Plomo. El plomo se encuentra presente en la corteza terrestre de forma natural y en pequeñas cantidades como sulfuro de plomo; forma aleaciones con muchos metales y, en general, se emplea en esta forma en la mayor parte de sus aplicaciones (ATSDR, 2007). Debido a la aplicación del plomo en diferentes industrias, se han establecido ya ciclos biológicos que lo contienen. Las partículas grandes de plomo precipitarán en el suelo o la superficie de aguas, mientras que las pequeñas viajarán largas distancias a través del aire y permanecerán en la atmósfera. Este elemento no puede ser degradado, pero puede convertirse en otros compuestos (Volke-Sepulveda, 2005; Quispe, *et.al*, 2017).

Enfermedades: La absorción de plomo es un grave riesgo de salud pública; provoca retraso del desarrollo mental e intelectual de los niños, causa hipertensión y enfermedades cardiovasculares en adultos, El

plomo absorbido se distribuye en riñón, hígado, encéfalo y huesos por semejanza con el calcio. El mayor depósito de plomo son los huesos hasta por 20 años; interfiere en la función del calcio, inhibe la síntesis de hemoglobina y causa daño neurológico (ATSDR, 2011, Rey, *et.al.*, 2013).

2.3.3- Cromo. Se emplea en el cromado de objetos para hacerlos inoxidable, en refractantes, en la creación de aleaciones de hierro, níquel y cobalto, en la fabricación de herramientas de corte y en el acabado de vehículos (Devlin, 2004). Puede existir en diferentes formas. Dependiendo de su estado de oxidación, puede encontrarse en estado líquido, sólido o gaseoso. Las formas químicas más comunes son el Cr (0), Cr (III) y Cr (VI), siendo esta última su forma más tóxica (ATSDR 2012).

Enfermedades: La absorción de cromo se hace fundamentalmente por tres vías: oral, respiratoria y dérmica. Al entrar en el organismo es distribuido a la médula ósea, pulmones, ganglios linfáticos, bazo, riñón e hígado. El compuesto que más fácilmente se absorbe es el cromo VI, ya que es tomado por los eritrocitos e integrado a otras células por el sistema transportador de sulfatos. (ATSDR, 2007; Cuberos, Rodríguez y Prieto, 2009). Presenta efectos cancerígenos pues el cromo VI produce muerte celular al generar un daño en el núcleo donde se presenta fragmentación y marginación de la cromatina, condensación citoplasmática con conservación de la membrana celular y los organelos citoplasmáticos, incluye daños en la síntesis del ADN y cambios en los ciclos celulares (Ellingsend, 1993).

2.3.4- Cadmio. El cadmio no es esencial para los organismos vivos, puede ser tóxico en concentraciones muy bajas y tener un efecto negativo directo en diversos procesos bioquímicos en los organismos acuáticos. En el ambiente, es peligroso porque muchas plantas y algunos animales lo absorben eficazmente y lo concentran dentro de sus tejidos, una vez absorbido se combina con las metalotioneínas y se acumula en los riñones, el hígado y los órganos reproductores (Navarro-Aviñó, 2007). La Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR), tiene al cadmio catalogado entre los 275 materiales más peligrosos en Estados Unidos (ATSDR 2007).

Enfermedades: Entre los casos de envenenamiento por cadmio mejor conocidos y documentados se encuentra el sucedido en Japón y conocido como enfermedad de Itai-Itai (Navarro-Aviñó, 2007). En casos de exposición crónica se puede observar anemia, disfunción renal, cálculos renales, osteoporosis, osteomalacia, trastornos respiratorios, hipertensión, trastornos nerviosos (cefalea, vértigo, alteración del sueño, temores, sudoración, contracciones musculares involuntarias), pérdida de peso y apetito, cáncer de próstata y pulmón. En riñón (túbulos renales) se puede acumular hasta por 30 años (Díaz, *et.al.*2017).

Entre los problemas que enfrenta la sociedad actual destacan, por la magnitud y diversidad que presentan, los relacionados con la contaminación del agua. Como parte de ellos, la contaminación con metales

pesados (MP) constituye una de las principales amenazas por su alta toxicidad y persistencia en el ambiente (CONAGUA 2014).

3.- PROBLEMÁTICA: CONTAMINACIÓN DEL AGUA EN MEXICO Y EN OAXACA

En México, según la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), la industria y la agricultura constituyen las principales actividades responsables de la generación de la mayoría de los contaminantes. Carabas (2016) mencionó que, en México, solo el 35 % de las descargas domésticas y el 18 % de las industriales reciben tratamiento. Como resultado de lo anterior, el 27 % de las cuencas cuentan con calidad aceptable o excelente; 45 % están poco contaminadas y 25 % contaminadas y altamente contaminadas. La presa Endhó, en Hidalgo, está catalogada como fuertemente contaminada debido a que recibe y almacena gran parte de las aguas residuales no tratadas de la Ciudad de México (Jiménez, *et.al.* 2010).

En México uno de los sitios afectados por la contaminación de metales pesados es la laguna “La Zacatecana”, en el municipio de Guadalupe, Zacatecas en donde, desde la época virreinal, fueron depositados a través de los ríos que desembocaban en el área los desechos del proceso de amalgamación de la plata, los cuales contenían altas concentraciones de plomo, arsénico y mercurio. Se estima que existen en el lugar entre 10 y 20 millones de toneladas de residuos mineros acumulados (Zetina-Rodríguez 2012). En San Luis Potosí existe el poblado minero de Villa de la Paz en donde se han detectado concentraciones elevadas de plomo y arsénico en sangre y orina de los niños del lugar (Yañez *et al.*, 2003). En un estudio realizado en la ciudad de San Luis Potosí, se determinó la cantidad de arsénico, cadmio, plomo y mercurio en suelo, encontrándose que en todos los sitios estudiados la concentración de arsénico rebasó los límites permitidos por las normas (Pérez-Vázquez *et al.*, 2015). Académicos reportaron la presencia de mercurio y plomo en agua potable en varios municipios del estado de Sonora, a concentraciones por arriba de los límites máximos establecidos por la Normatividad Mexicana y la Organización Mundial de la Salud (Jiménez, *et.al.* 2010, CNDH 2018).

Con respecto a los cuerpos de agua, en el país el 26% de los ríos, lagos y embalses que monitorea la CONAGUA resultan de buena calidad, mientras que el 74% restante contiene diferentes grados de contaminación. Los principales contaminantes detectados son: materia orgánica, nutrientes (nitrógeno y fósforo) y microorganismos (coliformes totales y fecales), pero hay otros como los metales y los derivados de hidrocarburos, que se presentan en áreas con actividad industrial en el país (CNDH, 2018)

En Oaxaca, al igual que en muchas otras partes del país, el panorama del agua muestra una condición dramática en relación con la contaminación de los ríos y mantos acuíferos. Los malos hábitos, como la imprudencia al ensuciar el agua, tanto superficial como subterránea, han comenzado a provocar

enfermedades epidémicas. Algunos ejemplos pueden mostrar con elocuencia esta crítica condición: el Río Papaloapan, principal del estado, está considerado como uno de los más contaminados del país. Los desechos industriales provenientes de la ciudad de Tuxtepec, además de las deficiencias de drenaje y la ausencia de sistemas de tratamiento de basura, son las causas principales (Consejo ,2014). La tabla 4 presenta los desechos provenientes de aguas residuales domésticas, industriales y agropecuarios en las regiones hidrológicas, en la cual es posible observar que la cuenca hidrológica de la región del Papaloapan es la que presenta los mayores valores de descarga de desechos (Garrido López, 2019).

Tabla 4. Cantidad de aguas residuales (A.R) vertidas por región hidrológica (Garrido López, 2019).

Región hidrológica	Nombre	Extensión	Nº de municipios	Descargas de A.R. Pub. Urbano (mm ³ /año)	Descargas de A.R. industrial (mm ³ /año)	Descargas de A.R. agropecuaria (mm ³ /año)
RH20	Costa chica-rio verde	23020.90	15	34.77	0.1	46075
RH21	Costa de Oaxaca	10118.10	5	11.13	7.112	6643.4
RH22	Tehuantepec	18338.50	7	11.53	3.75	131249.2
RH23	Costa de Chiapas	1230.2	1	1.46	-	-
RH28	Papaloapan	23240.2	11	24.56	23927	37457.2
RH29	Coatzacoalcos	9917.90	3	5.8	0.04	-
RH30	Grijalva-Usumacinta	972.7	1	0.97	-	-

Como resultado del estudio técnico de las aguas nacionales superficiales en las cuencas hidrológicas Río Salado, Río Grande, Río Trinidad, Río Valle Nacional, Río Playa Vicente, Río Santo Domingo, Río Tonto, Río Blanco, Río San Juan, Río Tesechoacán, Río Papaloapan, Llanuras de Papaloapan, Río Jamapa, Río Cotaxtla, Jamapa-Cotaxtla y Llanuras de Actopan, de la Región Hidrológica número 28 Papaloapan, se encontró un déficit en la cantidad y calidad de la pesca, presencia de abundante lirio acuático, pérdida de vegetación rarápá (a las orillas de los mantos acuíferos) como consecuencia de la presencia de diversos contaminantes. Existe un problema de contaminación generalizado en todas las aguas: presencia de agroquímicos, metales pesados y coliformes. Esto ocasiona pobreza de peces, explicada en parte por la sobrepesca, pero también por la falta de hábitats y buenas condiciones de calidad del agua en donde se producirían poblaciones sanas y alta diversidad (Ramírez, 2018).

Como se ha demostrado en los párrafos anteriores, varios autores citan la contaminación por metales pesados como una de las causas de la pérdida de agua potable, flora y fauna acuáticas.

3.1.- CONTAMINACIÓN DEL RIO PAPALOAPAN

El Atlas del Agua (2016) elaborado por CONAGUA indicó que de los 51 ríos principales que hay en México 35 de ellos (60 %), los cuales abarcan nueve regiones hidrológicas, se encuentran “fuertemente contaminados”. Entre ellos destacan los ríos Balsas, Santiago, Pánuco, Grijalva-Usumacinta, Turbio, Papaloapan, Coatzacoalcos y Tonalá, los cuales en su conjunto reúnen 87 % del agua superficial del país. El informe de la CONAGUA expuso que dichos afluentes están contaminados con materiales como mercurio, plomo, cadmio, níquel, cromo, arsénico, cianuro, tolueno, benceno, cloroformo e incluso compuestos como cloruro de vinilo y disruptores hormonales. Dicho diagnóstico agregó que las principales fuentes de contaminación de los ríos son las aguas residuales municipales y las provenientes de las actividades productivas, principalmente de la industria y la minería, así como los lixiviados provenientes de basureros a cielo abierto.

El municipio de Tierra Blanca localizado en el estado de Veracruz presenta, desde hace casi 10 años, un aumento en el número de casos de insuficiencia renal terminal (IRT). En un estudio realizado por la Facultad de Medicina de la UNAM, se reportó que la zona afectada está fundamentalmente circunscrita a los municipios de Tierra Blanca y Tres Valles ambos en el estado de Veracruz y algunas comunidades del Estado de Oaxaca como Temascal, Papaloapan, Pueblo Nuevo y el municipio de San Juan Bautista Tuxtepec. La figura 4 muestra un mapa de los ríos mencionados anteriormente.



Figura 4.- Ríos que colindan con la región de Tuxtepec, Oaxaca provenientes de localidades de Veracruz como Tierra Blanca y Tres Valles (Modificada de CONAGUA, 2014).

Los datos iniciales del caso de Tierra Blanca apuntaron a una de las enfermedades más graves del estado de Veracruz y por las características geográficas, todo pareció indicar que el problema es de naturaleza ambiental debido a la multitud de tóxicos provenientes de las zonas industriales de varias ciudades contiguas, por lo que resulta casi imposible, señalar una sola causa del problema. Se reportó también el uso de agua y la automedicación como posibles causas de contaminación. A este respecto, se mencionó que han encontrado extensas áreas geográficas con suelos azufrosos, lo cual pudiera liberar zinc y posteriormente precipitar la formación de cadmio en el ambiente. Otra teoría indicó que el uso de lodos de aguas negras y los superfosfatos, utilizados en la agricultura, contaminan el suelo y los mantos acuíferos subterráneos con cadmio y otros metales. (Mendoza, 2006).

El Río Blanco (el cual es considerado de uno de los ríos más contaminados del país) termina su trayecto uniéndose al Río Papaloapan formando la Laguna de Alvarado. En esta región se han detectado gran cantidad de casos de Insuficiencia renal terminal (IRT). Los pobladores vecinos a los afluentes del río Blanco, han llamado “revoltura” a la contaminación industrial del río por los cambios en el color, la presencia de espuma y los peces “atontados” y muertos que produce la contaminación (Mendoza, 2006).



Figura 5.- Unión de los ríos Papaloapan y Río Blanco en la Laguna de Alvarado (Modificado de CONAGUA, 2016).

Bajo un protocolo experimental, recolectaron muestras de agua del Río Blanco (en dos diferentes lugares de este). El agua se dio a beber a grupos de seis ratas de la cepa Wistar durante tres meses y se realizaron las observaciones correspondientes. Después de transcurrido el tiempo de observación se determinó que los animales no presentaron ninguna alteración notable. Sin embargo, estos resultados no pueden descartar el problema de contaminación del río Blanco debido a la existencia de varias posibilidades de

interpretación. Entre ellas se encuentra el hecho de que los contaminantes podrían descender a las profundidades del río y que la toma del agua fuera en la superficie, por lo cual los resultados dieron negativos. Otra alternativa es que, posiblemente, en las poblaciones estudiadas existan algunos casos de IRT en infantes pero que, sin embargo, el agua que recibe la población provenga sólo de pozos, por lo que la hipótesis de ser sólo los ríos la única no es del todo concluyente (Mendoza, 2006).

La región del Papaloapan ha comenzado a presentar problemas de contaminación del río que lleva el mismo nombre y de cuerpos de agua aledaños. Todo lo anterior ha llevado al humano a estudiar posibles vías de tratamiento de los ecosistemas contaminados, entre los que se encuentra la biorremediación, sin embargo, para poder emplear a los microorganismos en los métodos de biorremediación es necesario inicialmente su identificación, selección y estudios que permitan seleccionar a los microorganismos que sean capaces de sobrevivir y proliferarse en medios contaminados, estos microorganismos pueden ser obtenidos de sitios contaminados, los cuales presenten resistencia a la exposición a metales pesados.

3.2.- ESTRATEGIAS DE BIORREMEDIACIÓN EN ECOSISTEMAS CONTAMINADOS

El suelo acumula y concentra los metales pesados, debido a su capacidad de retención, sobre todo en las capas superficiales de la corteza terrestre. Los metales incorporados en la corteza pueden seguir diversas vías (Nriagu, 1990): 1) Pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa del mismo, ocupando sitios de intercambio o específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo, asociados con la materia orgánica y/o precipitados como sólidos puros o mixtos (Pagnanelli *et al.*, 2004).

2) Pueden ser absorbidos por las plantas, y pasar a la atmósfera por volatilización, movilizarse de manera natural a las aguas superficiales o subterráneas. La circulación de los metales puede tener lugar por la acción del agua al ser influenciada por el balance hídrico en el suelo, donde interviene la cantidad de precipitación, evaporación, escorrentía e infiltración del agua, en función de las propiedades fisicoquímicas del suelo como los cambios en el pH, oxidación y de su composición química (Banat *et al.*, 2005). La figura 6 muestra un esquema de lo explicado anteriormente.

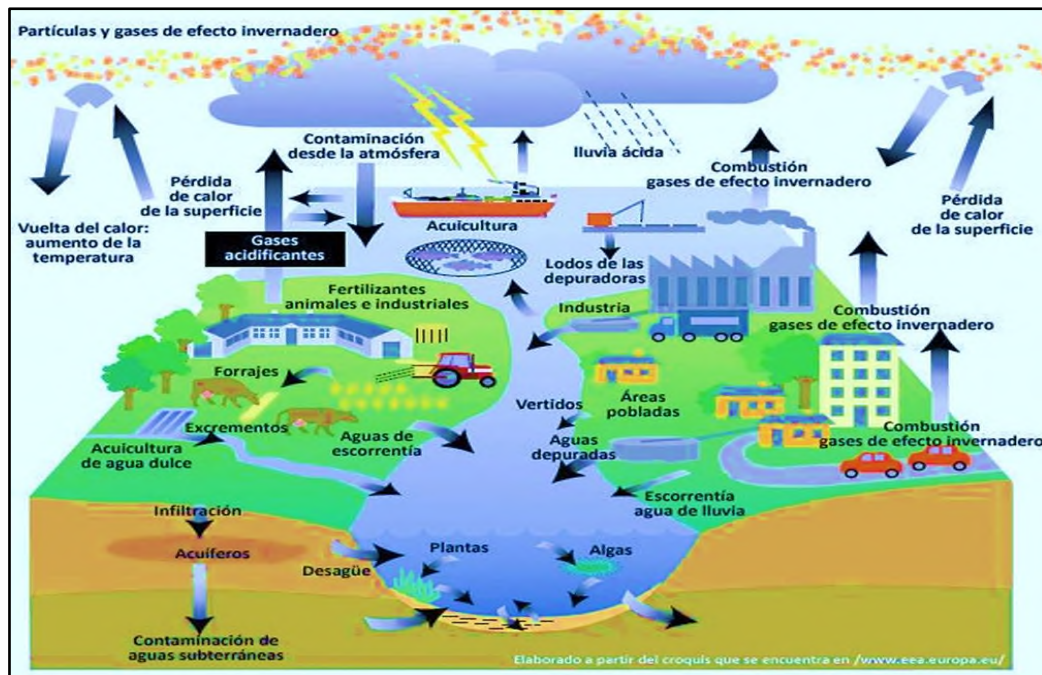


Figura 6.- Movilización natural de metales pesados por acción del agua y el viento (Modificado de Banat et al., 2005).

Cuando la contaminación ya se ha producido, se precisa restaurar el ecosistema contaminado, para lo cual se pueden utilizar diversas estrategias. Una de ellas es la biorremediación, la cual se define como una técnica que utiliza organismos vivos (microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos) para regresar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural, transformando las sustancias tóxicas en inocuas tanto para el ambiente como para la salud humana. La biorremediación puede llevarse a cabo de dos maneras: 1) en el lugar contaminado, proceso conocido como biorremediación *in situ* y 2) en un lugar especialmente preparado, conocido como biorremediación *ex situ* (Cota-Ruiz, 2019).

En el caso de la biorremediación utilizando microorganismos (que pueden provenir del sitio de contaminación o de la previa exposición de microorganismos autóctonos a medios artificiales contaminados con metales y con desechos domésticos), esta ha permitido la aparición y la selección de bacterias resistentes a varios contaminantes como los antibióticos, los insecticidas, los plaguicidas y los metales pesados. Esta respuesta microbiana constituye un fenómeno ambiental de selección natural para la sobrevivencia de los agentes biológicos como las bacterias (Pathak, 2005). Estas pueden degradar prácticamente cualquier sustancia orgánica. Cuando lo anterior no sucede, los microorganismos pueden ser, algunas veces, modificados experimentalmente para adquirir la capacidad de modificar sustancias

químicas peligrosas o reducir la biodisponibilidad de algunos metales pesados como el mercurio, el arsénico, el cromo, el cadmio, el zinc o el cobre (Castillo, 2005).

4. - BACTERIAS COMO ALTERNATIVA DE BIORREMEDIACIÓN

Para iniciar con el estudio de las bacterias como posibles organismos aplicados a la biorremediación es importante mencionar algunas de sus características las cuales, si no son comprendidas será muy difícil establecer un proceso biotecnológico de remediación de aguas contaminadas con metales pesados o con otros compuestos químicos. Entre sus características se pueden mencionar las siguientes.

1.- Las bacterias son organismos procariontes, lo cual implica que, en general, todos sus procesos microbianos ocurren en el citoplasma y en su membrana citoplasmática.

2.- Las bacterias integran una gran familia de tipos bacterianos. Existen clasificaciones basadas en su metabolismo; su contenido de G +C; sus propiedades de tinción; sus efectos en la salud de humanos animales y plantas o de otras bacterias y microorganismos; sus propiedades de resistencia medioambiental, etc. Por ello la gran variedad de organismos procariontes implica un amplio metabolismo, con variables entre especies, mismas que les confieren propiedades de tolerancia, adaptación y por lo tanto de evolución.

3.- Las rutas metabólicas que llevan a cabo dependen del tipo de microorganismo y sus características nutricionales, de transporte de electrones y de consumo o no de oxígeno. Por ello pueden ser aerobias, mostrando un metabolismo oxidativo muy parecido al de muchos organismos eucariontes; anaerobias en donde el proceso fundamental es la fermentación, y/o facultativas, las cuales pueden o no vivir bajo la ausencia o presencia de oxígeno.

4.- Lo anterior implica que los organismos procariontes pueden utilizar diferentes fuentes de carbono, de nitrógeno, de electrones y protones; generando una amplia gama de metabolitos secundarios o sistemas de resistencia. Entre estos últimos se encuentran los plásmidos que son genes pequeños extra-cromosomales que les ayudan a sobrevivir utilizando diferentes estrategias, en su medioambiente.

Antes de comenzar a describir el metabolismo que les confiere sus características, se realizará la descripción de las bacterias como organismos procariontes.

4.1- GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares de organización sencilla que contienen las siguientes estructuras: citoplasma con ADN organizado en forma de nucleoide; ribosomas, membrana citoplasmática; algunas especies contienen pared celular y/o cápsulas externas, extensiones extracelulares de movimiento y sensibilidad (flagelos y pili respectivamente), membranas intracitoplasmáticas e inclusiones celulares (Prescott 2002). La figura 7 ilustra algunas de las estructuras que conforman las células bacterianas.

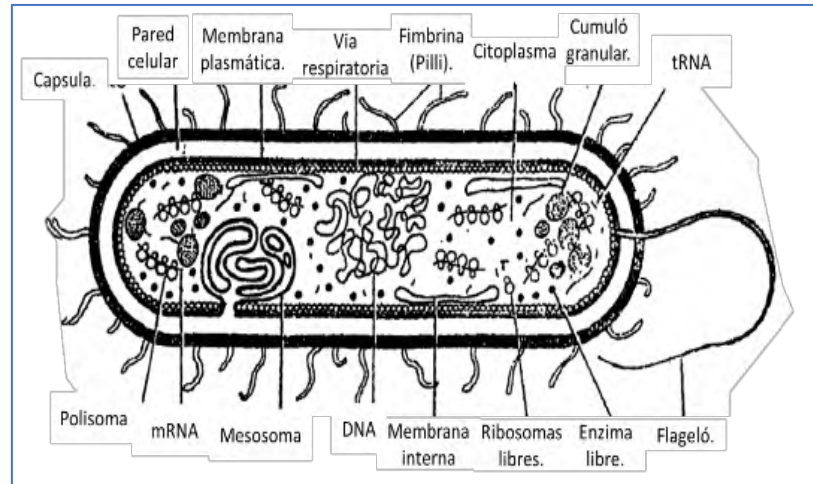


Figura 7.- Morfología de una bacteria Gram positiva. La mayoría de las estructuras que se muestran en esta figura se encuentran en todas las bacterias Gram positivas (modificado de Trividi, 2010).

Las bacterias se pueden clasificar según su capacidad de retención de la tinción en microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Aunque las bacterias Gram (+) y Gram (-) poseen unas estructuras internas semejantes, no ocurre lo mismo con sus estructuras externas como se observa en la figura 8. Esta muestra que las dos características clave que conducen a las diferentes propiedades de visualización de las especies son el grosor de la capa de peptidoglicano y la presencia o ausencia de la membrana lipídica externa (Marler M, *et.al.* 2004).

El cromosoma bacteriano se compone de una única molécula circular de doble cadena que no está contenida en un núcleo, la célula puede también contener plásmidos que son moléculas extracromosómicas circulares más cortas de ADN. Estas le proporcionan una ventaja selectiva al conferir resistencia frente a uno o más antibióticos (Murray, 2007).

La mayoría de las bacterias se encuentran clasificadas en tres formas: cocos, bacilos y espirilos. Los cocos son células casi esféricas que pueden existir como células individuales, pero que también se pueden asociar formando diferentes agrupaciones. Los bacilos su forma del extremo del bacilo varía a menudo

entre especies; puede ser plana, redondeada, en forma de puro o bifurcada. Muchas bacterias poseen una forma semejante a bacilos largos retorcidos como espirales o hélices; se denominan espirilos si son rígidos, y espiroquetas cuando son flexibles, aunque hay bacterias con formas menos convencionales y con formas de deslizamiento diferentes a los flagelos (Prescott 2002, Trivide 2010).

4.2.- METABOLISMO BACTERIANO

El crecimiento bacteriano requiere una fuente de energía y la materia prima necesaria para fabricar las proteínas, las estructuras y las membranas que conforman la maquinaria estructural y bioquímica de la célula. El proceso por el cual la célula bacteriana sintetiza sus propios componentes se conoce como anabolismo (o biosíntesis) y resulta en la producción de nuevo material celular. Constituye un proceso que requiere energía, por lo tanto, las bacterias deben ser capaces de obtenerla de su entorno para crecer y, eventualmente, multiplicarse. El catabolismo, por el contrario, es la serie de rutas metabólicas mediante las cuales se degradan materiales complejos para generar energía y cofactores necesarios para ser usados en el proceso del anabolismo (Murray 2007). Existen vías metabólicas muy parecidas a los de los eucariontes y también vías propias de ciertos grupos bacterianos que pueden contener rutas alternas que les proporcionan ciertas ventajas evolutivas a los organismos que las contienen. A nivel evolutivo, lo anterior está involucrado en la aparición de las diferentes bacterias a lo largo del tiempo. La figura 8 muestra la evolución de las bacterias desde el ancestro fotótrofo común.

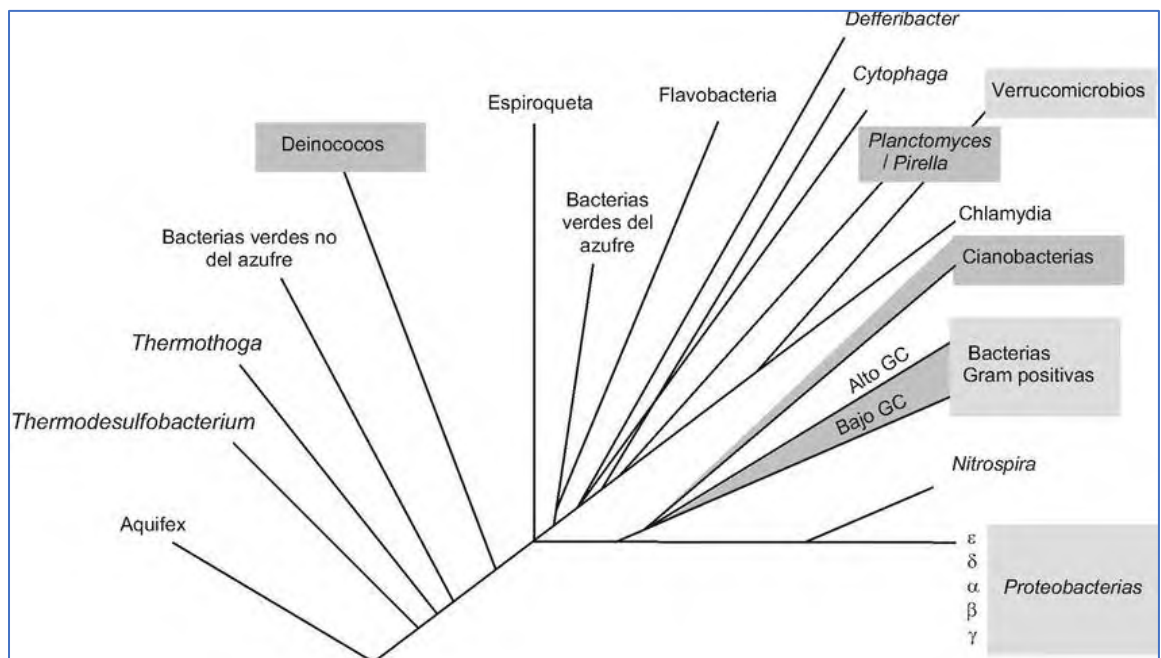


Figura 8. Árbol filogenético del origen y evolución de las bacterias basado en la secuencia de RNA (Tomado de Madigan et al., 2004).

Las bacterias pueden realizar metabolismo oxidativo, fermentación y fotosíntesis, por lo que hablar de cada proceso implicaría muchas páginas. Por ello solo se detallarán los mecanismos catabólicos principales ya que son ellos los que se relacionan directamente con el estudio de las características que les permitirán o no ser usadas en modelos de biorremediación.

4.2.1.- Metabolismo fotosintético. Este metabolismo se encuentra en bacterias que realizan fotosíntesis y que tienen fotosistemas parecidos o no a los fotosistemas de las plantas. Este grupo está integrado por fotótrofos oxigénicos (que generan oxígeno y que incluyen a los géneros (*Prochloron*, *Prochlorothrix* y *prochlorococcus*), fotótrofos anoxigénicos (que producen compuestos diferentes al oxígeno por tener diferentes donadores de electrones; estos incluyen a las bacterias púrpuras fotosintéticas, las bacterias fotosintéticas verdes del azufre, bacterias fotosintéticas verdes no del azufre y las heliobacterias, cada una con diferentes especies). Estas bacterias utilizan diferentes tipos de clorofilas como la a, b, las ficobilinas y las bacterioclorofilas a, b, c, d, e y g. sus donadores de electrones pueden ser agua, azufre, sulfitos, sulfuro de hidrógeno o hidrógeno. Su fuente de carbono es generalmente es el bióxido de carbono y compuestos orgánicos. Cada una de ellas realiza su transporte de electrones de forma diferente utilizando un fotosistema o dos en el caso de las heliobacterias, en las cuales el flujo de electrones y los dos fotosistemas son idénticos a los de los cloroplastos. Estas bacterias sintetizan sus carbohidratos y el ATP (mediante una ATPasa igual a la de los eucariontes) como consecuencia del transporte de electrones membranal.

4.2.2.- Metabolismo oxidativo y fermentativo. Ambos metabolismos pueden llevarse a cabo dependiendo de la fuente de electrones y la de carbono. En general todo parte del metabolismo de los carbohidratos. Las bacterias presentan la vía Embden-Meyerhof-Parnas y la de Entner-Doudoroff. Como producto de cualquiera de ellas, se produce piruvato y este se convierte en acetil-Coenzima A, iniciando así el ciclo de Krebs. Este ciclo produce intermediarios reducidos como NADH, NADPH, FADH₂, así como CO₂. Los tres primeros sirven para general el potencial requerido para que la ATPasa pueda sintetizar el ATP usando un flujo de protones y un gradiente de electrones. De la misma forma usando estos cofactores reducidos las bacterias pueden realizar el proceso respiratorio (produciendo Agua y ATP) o el fermentativo. Los distintos tipos de fermentaciones son: 1) la homoláctica que tiene como producto principal el ácido láctico; b) la ácido -mixta que produce ácidos succínico, ascórbico, fórmico y etanol entre otros; y 3) butírica que genera ácidos butírico y acético. Muchas bacterias se identifican según estos productos metabólicos. Las bacterias entéricas como E. coli y salmonella pueden generar metabolitos como hidrogeno, CO₂, ácido fórmico, ácido acético, etanol, ácido láctico, ácido succínico al fermentar el piruvato (White, 2012., Zalduegui, 2001., Madigan, 2004., Murray, 2007). La figura 9 muestra lo anterior.

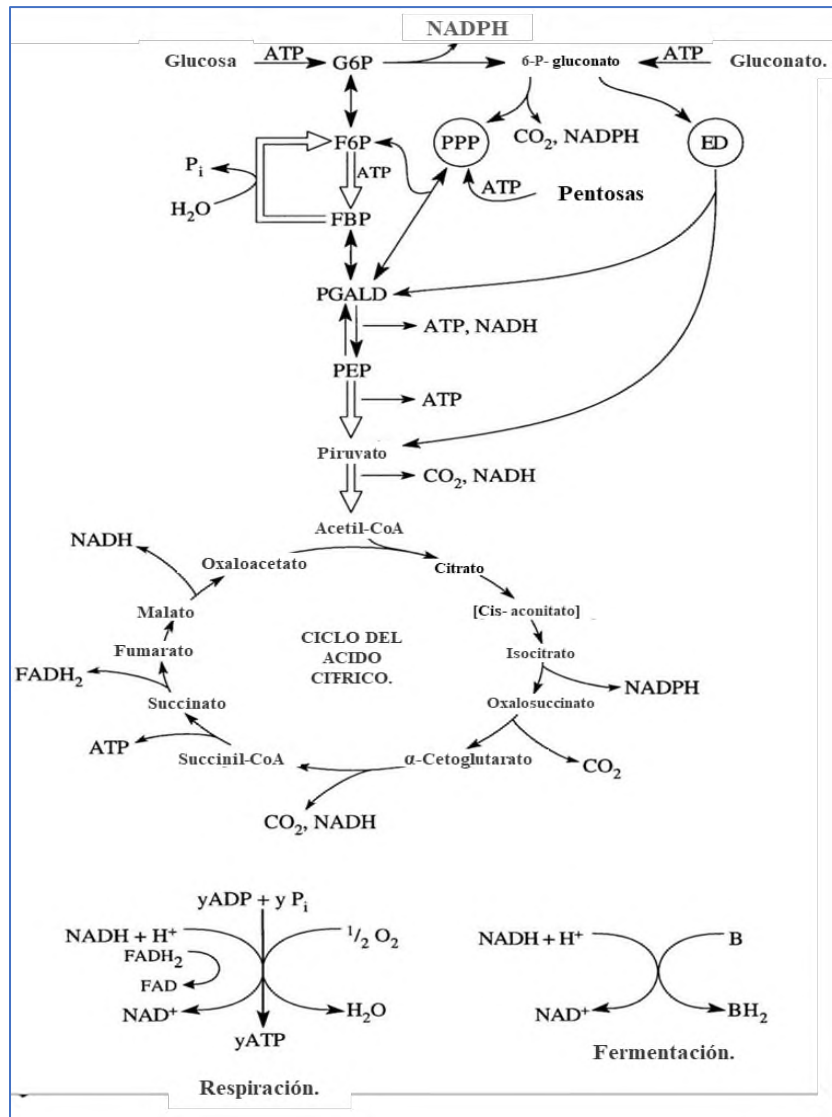


Figura 9.- Metabolismo oxidativo y fermentativo en bacterias. Se presentan las rutas del metabolismo de los carbohidratos utilizando las vías Embden-Meyerhof-Parnas y Entner-Doudoroff (Tomado de White, 2012).

Las vías Embden-Meyerhof-Parnas y Entner-Doudoroff implican dos procesos diferentes. La primera es la degradación de la glucosa hasta el ácido pirúvico y la segunda se relaciona con la ruta de las pentosas fosfato, en donde como producto de una de las reacciones se libera piruvato.

Muchas bacterias como E.coli, realizan glucólisis anabólica. En este caso y como se muestra en la figura 10, los productos intermedios de la glucólisis sirven para formar macromoléculas necesarias para el metabolismo, entre las que se encuentran polisacáridos, aminoácidos, amino azúcares, fosfolípidos, ácidos carboxílicos y ácido murámico

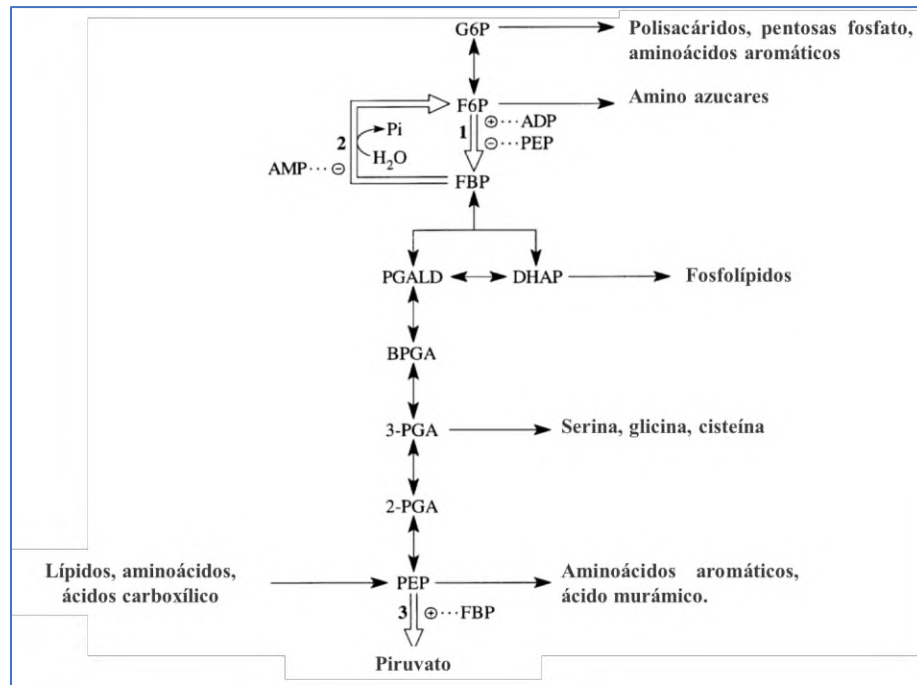


Figura 10.- Glucólisis anabólica en bacterias, en este ejemplo se muestra la estudiada en *Escherichia coli*. La finalidad de la misma es el inicio de la síntesis de macromoléculas a partir de los intermediarios de la ruta glucolítica (White, 2012).

Existen bacterias que pueden llevar a cabo la fermentación de sustratos como la maltosa y generar, dentro de la vía, la fuerza protón motriz necesario para la síntesis de hidrógeno mediante la enzima hidrogenasa. Por ejemplo, la bacteria *Pyrococcus furiosus*. Este parte de la glucosa derivada de la maltosa, llevándola hasta la formación de gliceraldehído 3 fosfato y dihidroxicetona fosfato. El primero es metabolizado por la enzima gliceraldehído 3-fosfato ferredoxín oxidoreductasa a 3-fosfoglicerato. En este paso se generan electrones que originan el hidrógeno usando enzimas como la Ferredoxin-NADP oxidoreductasa. Al continuar la ruta glucolítica y llegar hasta el piruvato, se genera la segunda ruta para la producción de hidrógeno. En esta la coenzima A y el piruvato reaccionan formando Acetil-CoA y dos electrones los cuales son captados por la Ferredoxina la cual los transfiere a la enzima Ferredoxin-NADP oxidoreductasa iniciando el proceso de producción de hidrógeno. Finalmente, la Acetil-CoA en presencia de ADP y la

enzima Acetil.CoA sintetasa genera ATP y acetato, que es el producto de la fermentación. Esto se muestra en la figura 11.

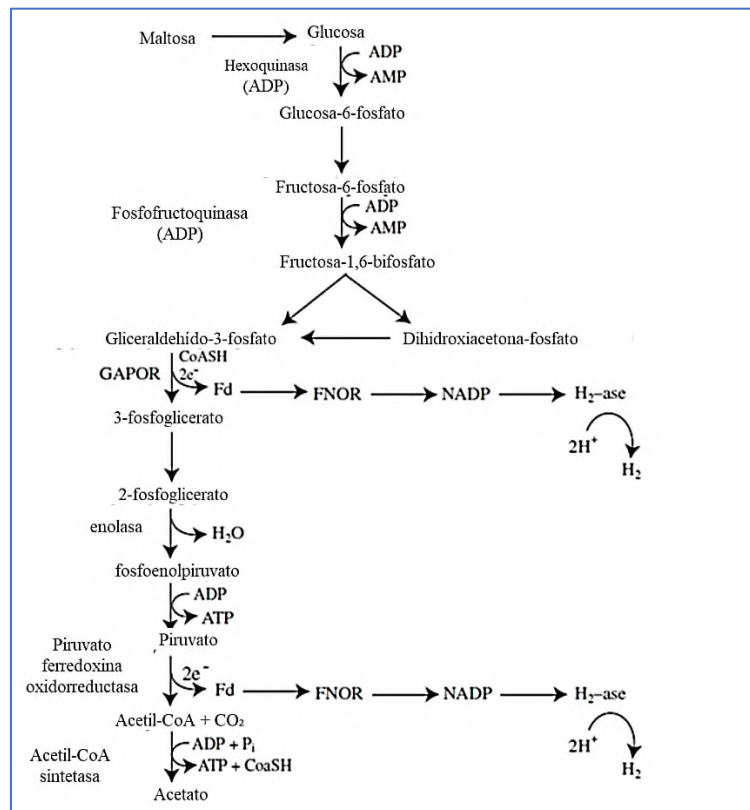


Figura 11.- Proceso de fermentación en la bacteria *Pyrococcus furiosus*, generando acetato como producto de fermentación y la generación de potencial electroquímico para la síntesis de hidrógeno desde los intermediarios de la ruta glucolítica (White, 2012).

Las bacterias poseen sistemas formados por cadenas de transporte de electrones, las cuales presentan ventajas evolutivas sobre las cadenas de transporte de electrones de muchos organismos eucariontes. La figura 12 muestra las cadenas alternas en bacterias aerobias y anaerobias y su comparación con la que sucede en las mitocondrias. Esto ayuda a los microorganismos a seguir formando oxígeno u otro aceptor final de electrones respectivamente, aun cuando algunos de los sistemas de transporte fueran dañados.

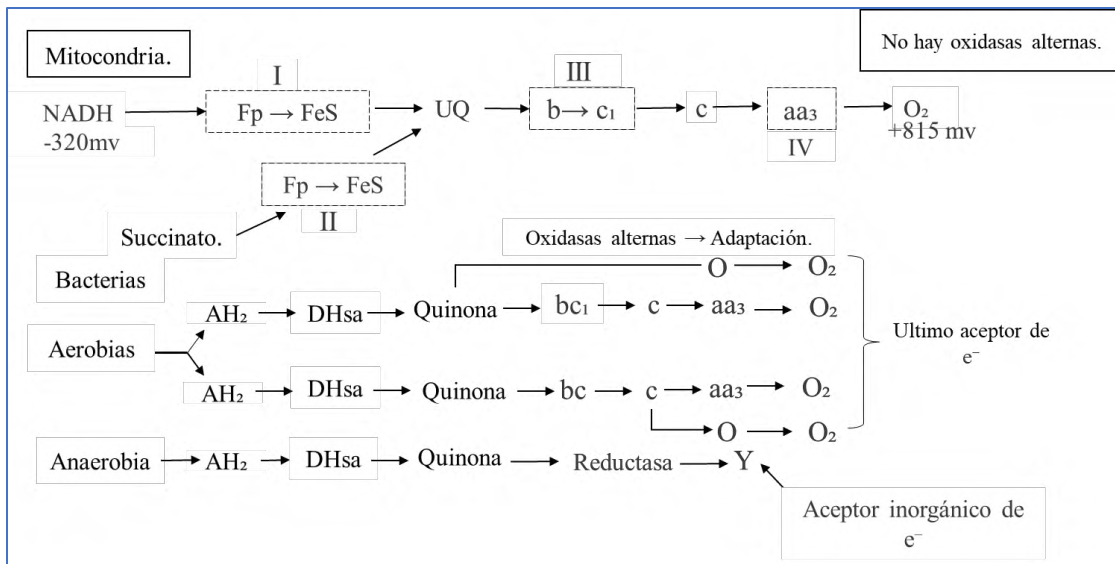


Figura 12.- Cadena de transporte de electrones en bacterias aerobias y anaerobias y su comparación con el transporte de electrones en mitocondrias (White, 2012).

Muchos géneros bacterianos pueden llevar a cabo la respiración aerobia y la anaerobia. Por ejemplo E.coli puede hacer los dos procesos y cada uno de ellos le proporcionará una ventaja en relación con el último aceptor de electrones, produciendo compuestos como oxígeno en el caso de la respiración aerobia y fumarato, dimetilsulfóxido (DMSO), trimetilamina N-óxido (TMANO) o nitritos en la anaerobia. Esto se muestra en la figura 13.

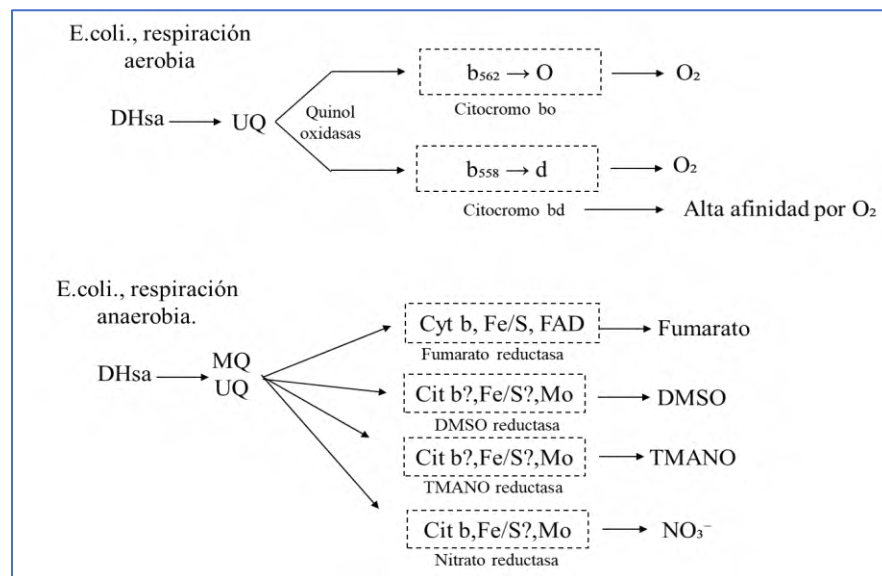


Figura 13.- Productos finales de la respiración aerobia y anaerobia en bacterias (White, 2012).

En relación con el ciclo de Krebs, las bacterias pueden realizarlo de la misma forma que los organismos eucariontes o presentar modificaciones como el ciclo del ácido cítrico reductivo. En este caso, se forman dos ramas en el ciclo. La primera el fosfoenol piruvato y el piruvato son metabolizados a piruvato por las enzimas fosfoenol piruvato carboxilasa y piruvato carboxilasa. Como producto final de esta rama se obtiene succinil-CoA. Por la otra rama de la vía el oxaloacetato o la Acetil-CoA son metabolizados a citrato, terminando la vía en el α -cetoglutarato. La figura 14 muestra las dos derivaciones mencionadas.

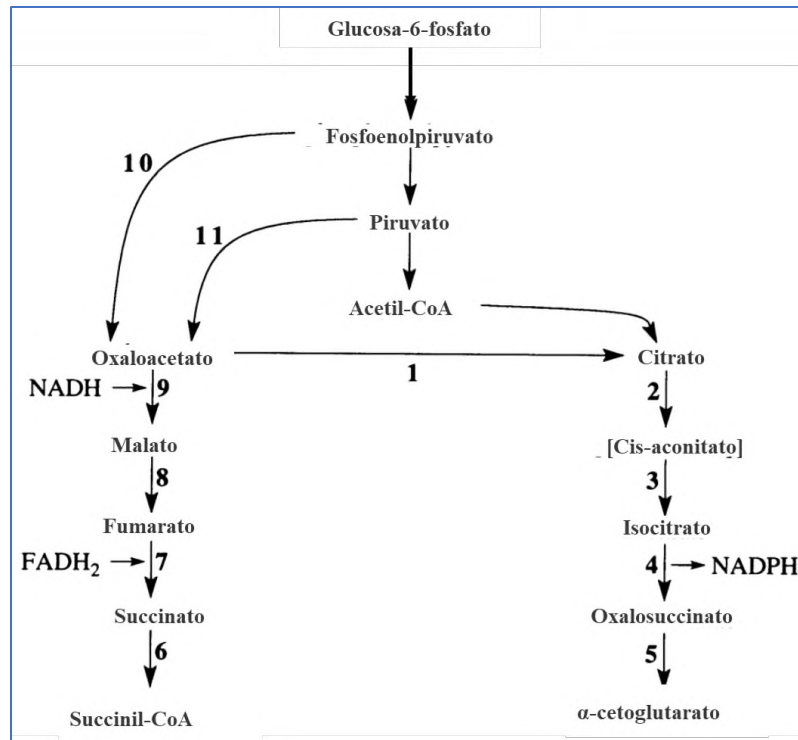


Figura 14.- Ciclo de Krebs en bacterias aerobias, en donde se observa que esta ruta puede tener dos derivaciones dando como productos succinilCoA, α -cetoglutarato y el cofactor reducido NADPH (White, 2012).

La acetil-CoA participa en un ciclo conocido como el del glioxalato. Este ciclo es requerido por bacterias anaerobias que crecen en presencia de ácidos grasos o acetato. Es diferente al ciclo de Krebs pero se conservan algunas de sus reacciones. La ruta inicia con el malato, el cual es metabolizado a oxaloacetato, el cual se une con la Acetil-CoA para formar citrato y después isocitrato. Esta molécula es metabolizada por la isocitrato liasa formando succinato y glioxalato. Este último se convierte, por acción de la malato sintetasa en malato reiniciando el ciclo. Por otro lado, el isocitrato puede seguir con algunas de las reacciones del ciclo de Krebs y transformarse en oxaloacetato, α -cetoglutarato, succinil-CoA y succinato.

En este caso se obtiene los productos NADPH, CO₂, NADH, Coenzima A y ATP, obtenido por el proceso de fosforilación a nivel sustrato. La figura 15 muestra este ciclo y su importancia metabólica.

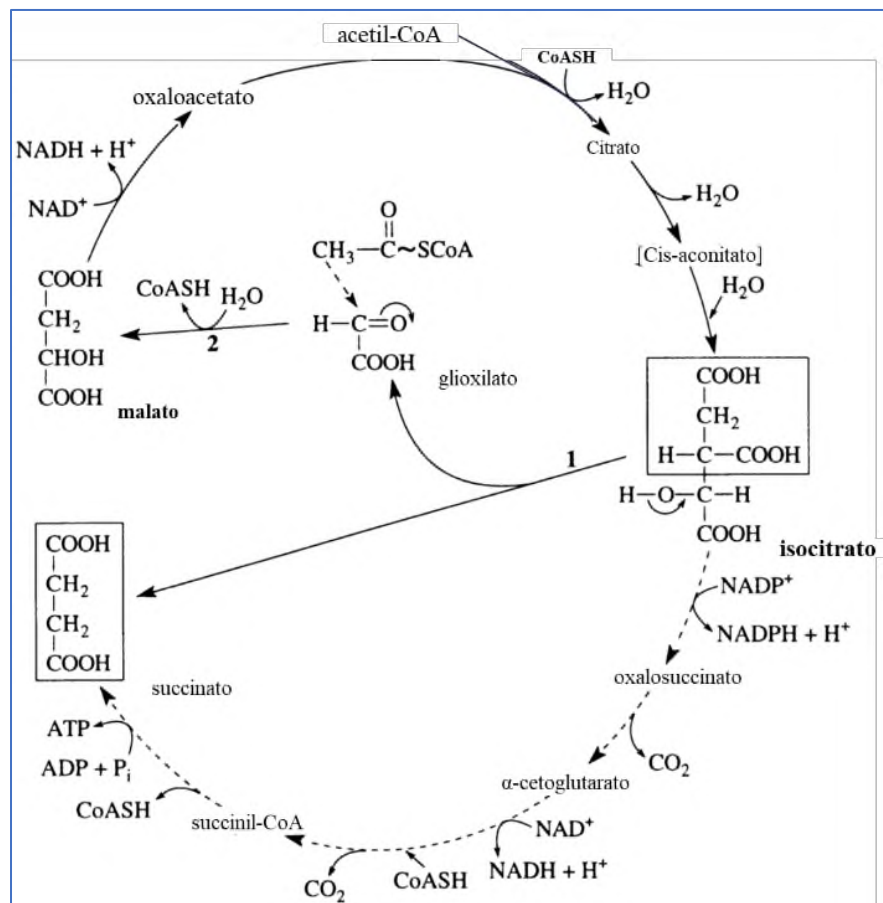


Figura 15.- Ciclo del glioxalato derivado de la Acetil-CoA en bacterias (White, 2012).

Finalmente, la figura 16 muestra la integración de las rutas metabólicas mencionadas. Estas son importantes porque generan intermediarios metabólicos y moléculas de ATP necesarios para los procesos anabólicos que requieren estos organismos.

4.2.3.- Genoma bacteriano. Es el conjunto total de genes que porta una bacteria. Las bacterias suelen tener solo una copia de sus cromosomas (es decir, son haploides) pero, de igual manera, pueden también contener elementos genéticos extracromosómicos los cuales son independientes del cromosoma bacteriano y, en la mayor parte de los casos, se pueden transmitir de una célula a otra. Estos elementos son los plásmidos y los bacteriófagos (virus bacterianos). De la misma forma, cada genoma contiene muchos operones, que están constituidos por genes. Los genes pueden ser agrupados también en islotes, como los islotes de patogenicidad, que comparten funciones o que coordinan su control (Trivide, 2010).

4.2.4.- Plásmidos. Son moléculas de ADN extracromosómico. La mayor parte de los plásmidos son moléculas circulares bicatenarias de ADN con un número variable de pares de bases (de 1500 a 400.000) que juegan un papel importante en la adaptación bacteriana a diferentes ambientes, ya que promueven la transferencia de genes entre estos microorganismos. En muchos casos, los plásmidos contienen genes que codifican para enzimas capaces de degradar algunos antibióticos y metales pesados, permitiendo que la bacteria sobreviva a la acción de estos (Murray 2007, Loeza *et.al*, 2004). Los plásmidos pueden clasificarse según los distintos criterios que le confieren a la célula bacteriana.

1. Tamaño en pb (pares de bases)
2. Número de copias en la bacteria
3. Tipo de genes que porta
4. Propiedades metabólicas: Producción de bacteriocinas, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de compuestos carbonados, fijación de nitrógeno.
5. Factores que intervienen en la interacción con hospedero: Enterotoxina y hemolisinas (*Escherichia coli*), δ - endotoxina (*Bacillus thuringiensis*), Neurotoxina (*Clostridium tetani*), Infección y nodulación de leguminosas (*Bradyrhizobium sp*).
6. Plásmidos de resistencia. En general estos plásmidos contienen genes que codifican proteínas que inactivan al compuesto tóxico para la bacteria o afectan su transporte hacia el interior de la bacteria.

La figura 17 muestra la constitución de un plásmido de resistencia. Estos le permiten a la bacteria resistir a antibióticos (aminoglicósidos, cloramfenicol, β -lactamas), aniones tóxicos (arsenato, arsenito, boratos, cromatos) o metales pesados (Hg, Ni, Co, Pb, Cd, Bi) (Murray 2007).

Si bien el ADN plasmídico no porta información genética esencial para la vida de la bacteria, sí contiene genes que le confieren nuevas propiedades fenotípicas y que en algunos casos le son muy útiles para su adaptación al crecimiento en ciertos ambientes como los contaminados por metales pesados.

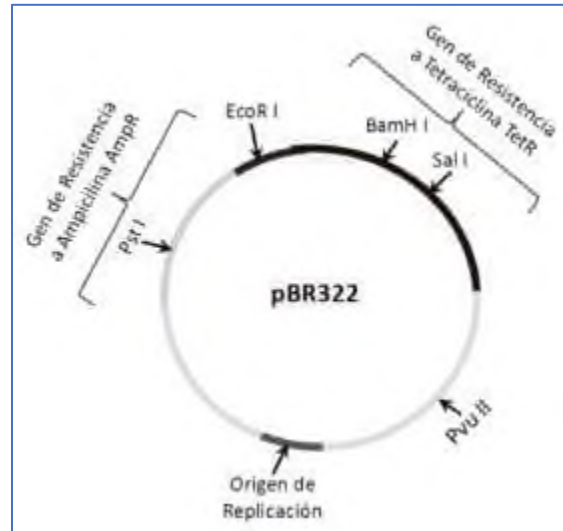


Figura 17.- Plásmidos. El plásmido pBR322 es uno de los plásmidos que se utilizan en la clonación del ADN. Este plásmido codifica la resistencia a ampicilina (Amp) y a tetraciclina (Tet), así como a un origen de replicación (ori). (Murray, 2007, <https://encolombia.com/medicina/revistas-medicas/menopausia/vm-183/clonacion-molecular/>).

Todo lo mencionado anteriormente debe tomarse en cuenta cuando se quiere utilizar un procarionte dentro de los procesos de biorremediación. Es por ello que el inicio se debe contar con un sustento experimental inicial el cual se base en el estudio, por un lado, de los efectos de los agentes tóxicos sobre los microorganismos y por otro los mecanismos por los cuales las especies tolerantes pueden seguir creciendo en su presencia. En este trabajo se enfoca en el primer punto, para ello se aislaron bacterias provenientes de medios acuosos contaminados. Se eligieron estos medios debido a que se sabe que un ambiente en donde existe un estrés, en este caso por contaminantes, los organismos que logran vivir en estos lugares han desarrollado mecanismos de resistencia que les permiten adaptarse al medio. En este trabajo se eligieron cepas bacterianas resistentes a concentraciones de metales pesados elevadas y con ellas se realizaron los experimentos que se detallan en la sección de metodología.

5.3.- RESISTENCIA BACTERIANA A METALES PESADOS.

Los metales pesados representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables en especies como los mamíferos. Las bacterias que portan sistemas genéticos que les ayudan a contrarrestar los efectos tóxicos de los metales, serán capaces de sobrevivir a ambientes con elevadas concentraciones de esos elementos. A continuación, se explica la resistencia a algunos metales por bacterias.

5.3.1.- Resistencia a mercurio.

Summer, *et.al.* 1978 mencionan que la resistencia bacteriana al metal se debe a la reducción del mercurio inorgánico a la forma metálica, menos tóxica y volátil constituyendo, esta transformación, un eficiente proceso mediante el cual los microorganismos se deshacen del ion tóxico.

Silver y Walderhaug (1992), reportaron que algunos sistemas bacterianos emplean un mecanismo de resistencia en común contra la intoxicación por mercurio: la reducción enzimática del Hg^{2+} a Hg^0 por la reductasa mercúrica codificada por el gen *merA*. Todos los sistemas de resistencia también codifican proteínas que transportan específicamente al mercurio hacia el citoplasma bacteriano donde se encuentran las reductasas. Como un ejemplo de lo anterior Madigan (2009), reportó que en la bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*, los genes de resistencia al mercurio residen en un plásmido. Estos genes, denominados genes *mer*, están organizados en un operón bajo el control de la proteína reguladora MerR. MerR funciona como represor y como activador de la transcripción. En ausencia del Hg^{2+} , MerR trabaja como un represor y se une a la región operadora del operón *mer*, lo que impide la transcripción de *merTPCAD*. Sin embargo, cuando hay Hg^{2+} , éste forma un complejo con MerR que activa la transcripción del operón *mer*. La proteína MerP es una proteína de unión a Hg^{2+} periplásmica. MerP se une al Hg^{2+} y lo transfiere a la proteína de membrana MerT, que transporta el Hg^{2+} al interior de la célula para que lo reduzca la mercúrico-reductasa. El resultado final es la reducción del Hg^{2+} a Hg^0 (volátil pero no tóxico) y su liberación del Hg^0 desde la célula. Lo anterior se muestra en la figura 18.

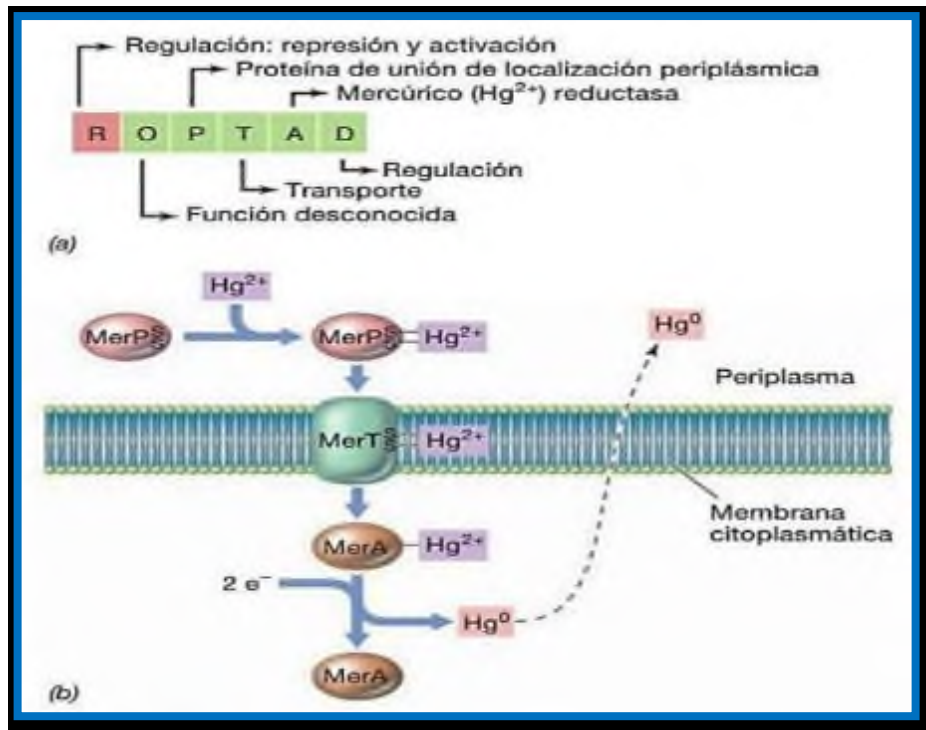


Figura 18.- Mecanismo de reducción del Hg^{2+} a Hg^0 en *Pseudomonas aeruginosa*. (a) El operón *mer*. *MerR* actúan como represor (en ausencia de Hg^{2+}) o como activador de la transcripción (en presencia de Hg^{2+}). (b) Transporte y reducción del Hg^{2+} . El Hg^{2+} se une a los restos de cisteína tanto en *MerR* como en *MerT* (Modificado de Madigan, 2009).

5.3.2.- Resistencia a plomo.

Las bacterias han desarrollado diferentes estrategias para tolerar al plomo en su medio ambiente. Un ejemplo de lo anterior lo constituyen varios géneros de bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Pseudomonas marginalis*, quién ha adquirido la capacidad de excretar el metal al exterior, mientras que *Bacillus megaterium* lo acumula en el citoplasma. *Staphylococcus aureus* y *Citrobacter freundii* también lo acumulan en su interior inmovilizándolo en forma de fosfato de plomo, aunque se desconoce el mecanismo de detoxificación. En otros microorganismos el Pb^{2+} puede ser excretado utilizando sistemas de translocación de metales pesados que implican la intervención de una ATPasa de tipo P (Castillo, 2005; Sharma, 2020). En 2010, Marreco aisló microorganismos resistentes al plomo y clasificó su potencial de bioacumulación, recogieron muestras de suelo de tres sitios contaminados ubicados en Rohtak e India. Se aislaron un total de 28 colonias en función de su capacidad para crecer en un medio que contenía plomo, pero solo 6 colonias, denominadas como BPS-1, BPS-5, BPS-7, BPS-9, BPS-26 y BPS-27 fueron seleccionados en función de su concentración mínima inhibitoria (MIC): 2500, 2000, 1800, 2400, 2000 y 2000 respectivamente, La cepa BPS-9 mostró un valor MIC más significativo (2400 ppm) que las otras cepas. Los resultados de bioacumulación demostraron que BPS-9 (identificado como *B. cereus*) podía acumular hasta

79.26% del plomo presente en el medio de crecimiento. De igual manera se realizó un análisis *in silico* del genoma completo de *B. cereus* por el software RAST que determinó su capacidad para la biorremediación de metales pesados al contener los genes para el flujo de salida de metales pesados como plomo, cobre, cadmio y zinc, níquel y cromo. Se encontraron en el genoma de *B. cereus* genes que codifican una variedad de transportadores, como la ATPasa de tipo P y el transporte de cationes metálicos a través de la membrana citoplasmática (figura 19).

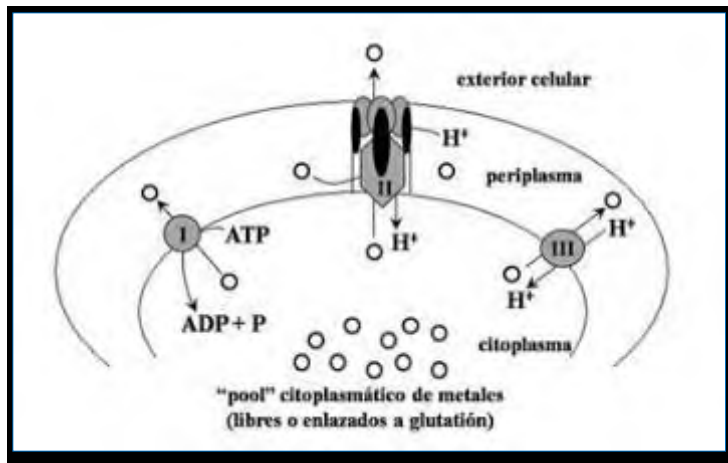


Figura 19. Prototipo de los principales sistemas de eflujo de iones metálicos, I) ATPasa tipo P, II) Sistema RND y III) facilitadores de difusión (CDF) (Tomado de Marreco, 2010).

5.3.3.- Resistencia a cromo.

Varios investigadores han reportado que la presencia de altas concentraciones de cromato en el ambiente puede ejercer, por un lado, un efecto inhibitorio sobre los microorganismos, pero por otro, seleccionar variantes resistentes al ion, como consecuencia de mutaciones cromosómicas (que afectan el transporte de sulfato) o a la presencia de plásmidos (Ohtake, 1987; Cervantes, 1988). En numerosas especies bacterianas se ha identificado la capacidad de reducir Cr (VI) a Cr (III). Las expresiones de los determinantes de resistencia han permitido identificar una proteína de membrana, denominada ChrA, la cual origina la translocación de los iones cromato (Cervantes, 1992).

En 2017 se identificaron bacterias pertenecientes a los géneros: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Oceanospirillum*, *Gemmobacter*, *Nesterenkonia*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Leuconostoc* y *Lysinibacillus* resistentes a cromo y cadmio de la zona de Papallacta cantón Quijos provincia de Napo. Los consorcios bacterianos mostraron mayor sensibilidad a cadmio aún a concentraciones tan bajas como las de 2ppm, en contraste con la resistencia que presentaron a concentraciones de hasta 500 ppm de Cr.

En el caso de *Pseudomona serias* se han encontrado los genes de resistencia chrA1 y chrA2. La figura 20 muestra un ejemplo de los genes de resistencia chrA1 y chrA2 que codifican bombas de eflujo de cromato que confieren resistencia en algunas bacterias (Bustos, 2017).

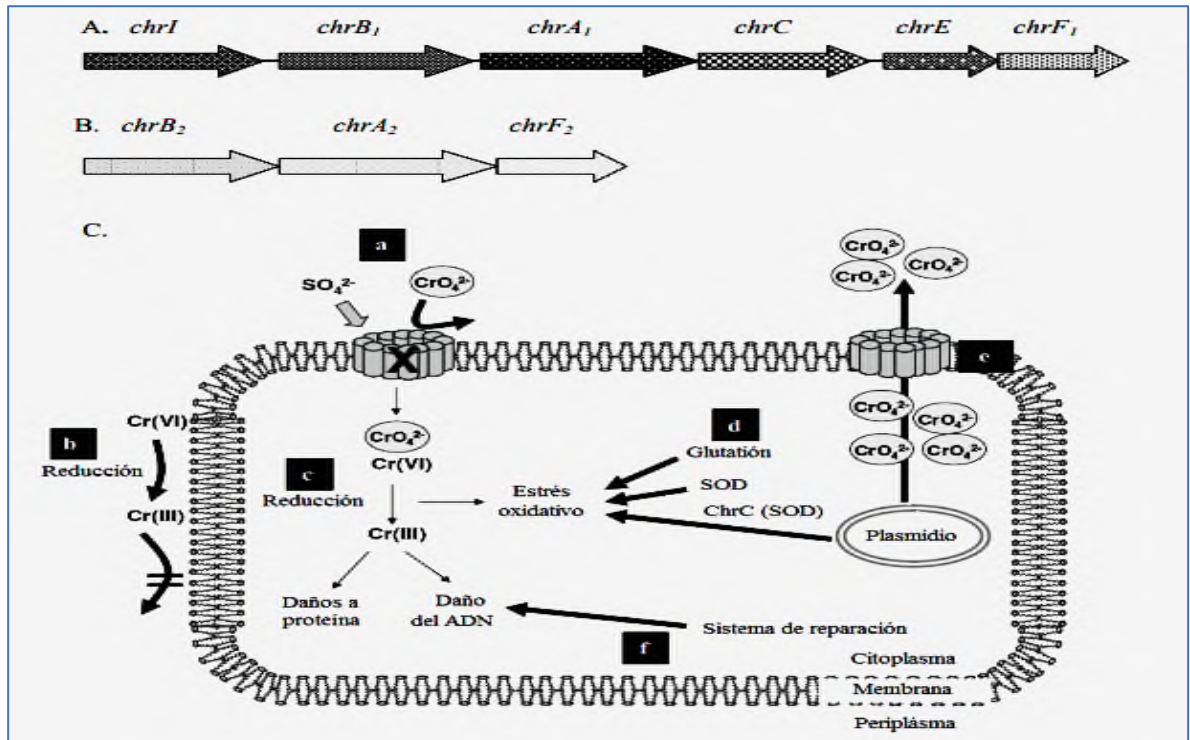


Figura 20.-Sistemas de resistencia a cromato en bacterias. A). Organización de los genes de resistencia a cromato en el plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* CH34. B). Organización de los genes de resistencia a cromato en el cromosoma de *C. metallidurans* CH34 (Juhnke et al., 2002). C). Mecanismos de regulación de las concentraciones de CrO_4^{2-} en bacterias; a, Transportador de sulfato utilizado por el CrO_4^{2-} para entrar a la célula; B) reducción del Cr^{6+} a Cr^{3+} , el cual no cruza la membrana; C), reducción del Cr^{6+} a Cr^{3+} que puede generar estrés oxidativo, oxidación de proteínas y ADN; D), enzimas disminuyen el estrés oxidativo; e, transportadores de CrO_4^{2-} codificados por plásmidos; F), sistemas de reparación del ADN por daños provocados por el CrO_4^{2-} (Ramírez-Díaz, 2008).

5.3.4.- Resistencia a cadmio.

Ji y Silver (1994) reportaron que el cadmio entra a *Staphylococcus aureus* por la vía de transporte de manganeso, mientras que en *Escherichia coli* lo hace por el sistema de transporte del zinc.

El operón *Czc* es codificado por dos plásmidos: pMOL28 y pMOL30 en *A. eutrophus* los cuales contienen los genes *czcA*, *czcB*, *czcC*, *czcD*, *czcI*, y *czcN*, que le puede conferir resistencia a cadmio (Banjerdikij, 2005, Nies DH 1995 y Nies DH 2003). Cheng en 2015 mencionó un posible mecanismo de resistencia a cadmio realizando experimentos con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Utilizando análisis de homología de secuencia

para identificar 10 genes que posiblemente participen en la homeostasis de varios metales pesados en células cultivadas, realizaron determinaciones en presencia de un aumento de concentraciones de cadmio, encontrando que el gen *cmtR_{Af}* codificaba un supuesto regulador transcripcional sensible a Cd^{2+} y Pb^{2+} ; para Cd^{2+} producía cuatro genes, para proteínas de salida de metales pesados dos genes, para proteínas de canales de cationes putativos relacionadas con el transporte de Cd^{2+} . Con sus descubrimientos desarrollaron un modelo para el mecanismo de resistencia mostrando que, para lograr la homeostasis intracelular, la salida de Cd^{2+} debe ocurrir a través de la envoltura celular completa de *A. ferrooxidans* (compuesto por el exterior membranal, periplasma y membrana citoplásmica). Los operones *czc* son impulsados por un gradiente de protones que permite a *CzcA* (ubicado en la membrana interna) bombear a Cd^{2+} fuera del citoplasma. *CzcB* lanza el metal de la membrana interna a la externa, evitando contacto con el periplasma. La figura 21 muestra los mecanismos de resistencia en *A. ferrooxidans*.

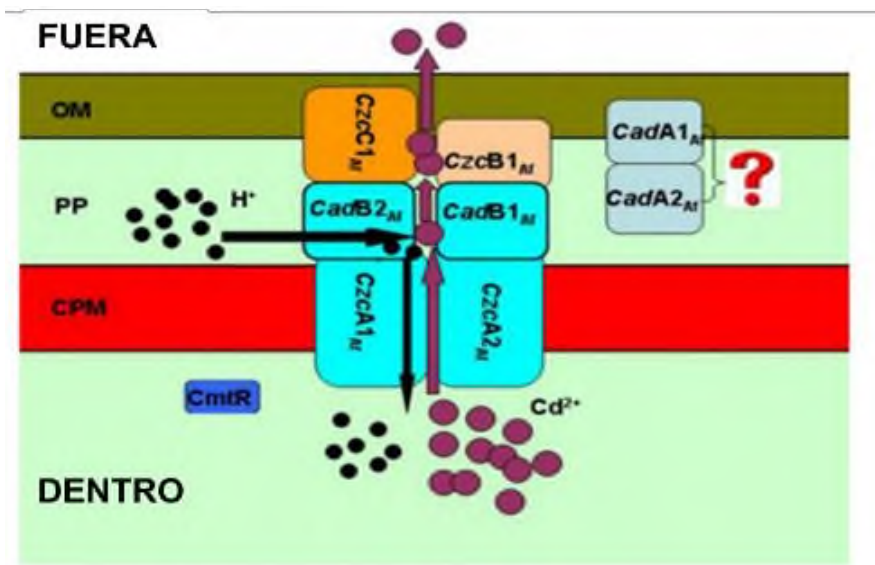


Figura 21.-Esquema que resume el posible papel de la resistencia a Cd^{2+} *A. ferrooxidans*. Esta propuesta se basa en los resultados de expresión. OM es la Membrana exterior, PP corresponde al Periplasma y CPM A la membrana citoplásmica (Cheng, 2015).

Roane en 1999, investigó los mecanismos generales de *Pseudomonas marginalis* y *Bacillus megaterium* resistentes a plomo aislados de dos suelos contaminados. El primero con plomo soluble indetectable y el segundo de un suelo con altos niveles de plomo soluble detectable. Dicha investigación se realizó por medio de observaciones en microscopía de transmisión encontrando que *Pseudomona marginalis* mostró exclusión de plomo de manera extracelular, mientras que *Bacillus megaterium* presentó una acumulación citoplásmica intracelular del metal. Otro estudio, realizado por microscopía de polarización, indicó que

Pseudomona marginalis produjo una gran cantidad de un polímero extracelular implicado en el mecanismo de resistencia a plomo y que *Bacillus megaterium* no produjo sustancias poliméricas extracelulares discernibles. El estudio de estos dos organismos sirvió de ejemplo para entender como los microorganismos del suelo responden a la exposición ambiental al metal.

5.4.- IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TOLERANTES DE AMBIENTES CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.

En el año 2000 se realizó un estudio relacionado con los mecanismos que podrían conferir tolerancia a los metales pesados en bacterias provenientes de ambientes contaminados. Ellos encontraron que algunos plásmidos específicos como el pDU1358 confieren resistencia a mercurio a *S. marcescens*. En algunas especies de *Staphylococcus aureus*, los plásmidos de penicilinasa pueden mediar la resistencia a Cd (II) así como a otros metales cambiando la permeabilidad de la membrana celular confiriéndole tal resistencia. De la misma manera se han reportado plásmidos y algunos transposones [segmentos discretos de DNA con capacidad para moverse entre una localización genética (sitio donador) y otra (sitio receptor)]. Un transposón puede presentar genes extras que codifican al menos una función que cambia el fenotipo de la célula receptora de manera predecible (por ejemplo, la resistencia). Se han encontrado genes de resistencia al cadmio ubicados en transposones de *Listeria monocytogenes*. La resistencia al cadmio la confieren los genes *cad A* y *cad B* ubicados en un transposón de 6.4 kb denominado Tn5422. Esta resistencia puede transmitirse a la población de *Listeria*, en general, para conferir ventajas para la supervivencia, el transposón Tn501 de *P. aureginosa* le confiere la resistencia a mercurio. Varios trabajos demostraron la presencia de dos patrones de resistencia a Cd (II) mediada por plásmidos. El primero tiene un único loci *cad (cad A)* responsable de la resistencia y el segundo tiene dos loci; *cad A* y *cad B*). También indicaron que el uso de la manipulación genética para inducir la resistencia ha sido ampliamente usado en casos como el de cromo (VI) (Bruins, 2000).

Martínez (2010) se reportó una investigación en la cual se aislaron cepas provenientes del río Almendares en la Habana Cuba con la finalidad de investigar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos y a iones metálicos a partir de muestras de agua y sedimento de este ecosistema acuático. El aislamiento se realizó a partir de la siembra por dispersión en agar nutritivo de diluciones seriadas. Después de ello se identificaron, por pruebas bioquímicas y morfología colonial, 23 cepas bacterianas entre las cuales se encontraron *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*. A todos los aislados bacterianos se les evaluó la resistencia a antibióticos por el método de Kirby-Bauer, así como la

resistencia a plomo, cromo y cadmio por cultivo en placa de agar con el respectivo metal, encontrando que el 96% de las cepas mostraron multi-resistencia a los antibióticos, pero solo 4 cepas (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Pseudomona*) presentaron multi-resistencia a todos los antibióticos y a los tres metales pesados.

Banda (2017) se reportó una investigación en la cual se aislaron cepas bacterianas provenientes de la presa del Bote en Zacatecas con la finalidad de aislar y caracterizar bacterias que fueran capaces de resistir diversos metales pesados. Principalmente al ser un sitio de actividad minera, y en el cual se han cuantificado altas concentraciones de Pb, Ni y Cd. Se tomaron muestras de suelo de distintos puntos de la presa, de donde lograron seleccionar 22 aislados bacterianos diferentes con base en su morfología. Los aislados se expusieron con cromo, arsénico, cobalto, cobre y zinc de los cuales solo cuatro aislados presentaron tolerancia a altas concentraciones de los metales pesados, posteriormente estas cepas fueron identificadas como *Pseudomonas*.

Marzan *et.al.*, 2017 aislaron e identificaron bacterias capaces de reducir y desintoxicar metales pesados (cromo, cadmio y plomo) del efluente de la curtiduría en la ciudad de Chittagong, Bangladesh. Identificaron tres colonias en función de sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, estas fueron *Gemella sp*, *Micrococcus sp* y *Hafnia sp*. Estas bacterias fueron expuestas con los metales Pb, Cd y Cr, siendo *Gemella sp* y *Micrococcus sp* quienes mostraron resistencia a plomo, cromo y cadmio, mientras que *Hafnia sp.*, mostró sensibilidad al cadmio (cd). Al determinar el potencial de degradación de los metales, se observó que *Gemella sp* y *Micrococcus sp* mostraron porcentajes de reducción de plomo de 55.16 ± 0.06 y 36.55 ± 0.01 respectivamente. Por otro lado, *Gemella sp*, mostró una degradación moderada de cadmio (50.99 ± 0.01 %) mientras que esta fue baja en *Micrococcus sp* (38.64 ± 0.06 %). Con los resultados anteriores, los autores determinaron que la capacidad de degradación de metales pesados de *Gemella sp* y *Micrococcus sp* podría ser mediada por plásmidos.

Bowman *et.al.*, 2018 aislaron cepas bacterianas resistentes a plomo de los sedimentos del río Saint Clair. Ellos prepararon dos medios de enriquecimiento con concentraciones crecientes de Pb (NO₃)₂ a partir de los cuales se seleccionaron 97 cepas resistentes al metal para determinar su capacidad de producir biofloculante (agregación y separación de la nueva biomasa formada a partir del tratamiento de efluentes). Las cepas bacterianas crecieron desde 1.25 a 1.5 g L⁻¹ de Pb (NO₃)₂. Estas fueron purificadas y seleccionadas para su posterior estudio. La mayoría de las cepas resistentes a Pb mostraron actividad de floculación moderada a alta. Los ensayos de eliminación de metal demostraron que cuanto mayor es la actividad de floculación, mayor es la eficiencia de la eliminación de metal. De igual manera, al realizar su siembra en soluciones multimetálicas, la cepa bacteriana con la mayor actividad de floculación (R19, que

correspondía a *Pseudomona spp*) mostró la mayor capacidad de eliminación de metales (seis de ocho metales Zn, Cd, Pb, Cu, Ni, Cr, Co, Fe) y la mayor eficiencia de eliminación de estos (Bowman, 2018). Se ha detectado la presencia de bacterias tolerantes a los metales pesados en el Río Papaloapan en Tuxtepec, Oaxaca y/o los efluentes que desembocan en él. Lo anterior se ha demostrado en la Universidad del Papaloapan por Galicia quién reportó, en 2013, la presencia de plomo (1.2 y 0.85 ppm), cromo (2.3 y 2.1 ppm) y cadmio (0.75 ppm) en muestras de agua del río Papaloapan (Galicia, 2013). De la misma manera es muy probable que existan microorganismos que se han podido adaptar a las condiciones en las que se encuentran las aguas del río Papaloapan y sus alrededores. Actualmente se tiene conocimiento de que las cepas bacterianas *Hafnia alvei* y *Bacillus pumilus*, aisladas del río Papaloapan son microorganismos que muestran resistencia a concentraciones crecientes de plomo. La primera tolera la concentración de 6.59 μM del metal en el medio de cultivo y la segunda 5.66 μM que son concentraciones muy elevadas a comparación con otras reportadas por diferentes autores (Galicia, 2013).

5.5.- GLUTATIÓN S-TRANSFERAS (GST) EN BACTERIAS COMO BIOINDICADOR DE DAÑO

Cuando los microorganismos u otros organismos son expuestos a agentes contaminantes, dentro de sus células ocurren fenómenos bioquímicos que las condicionan y por los cuales pueden o no tolerar la presencia de xenobióticos. Para verificar el estado de daño o de efecto, en muchos organismos, se han utilizado algunas moléculas indicadoras como las enzimas. La Glutación S-transferasa constituye una familia de enzimas ampliamente distribuida dentro de los diferentes reinos y posee varias actividades celulares en el metabolismo de los xenobióticos y el metabolismo oxidativo (Allocati 2012). Es por ello que en este trabajo se utilizó como un bioindicador de efecto por exposición a metales pesados en bacterias.

La Glutación S Transferasa se dividen en al menos en cuatro familias:

- 1.- Citosólicas (cGST), que en bacterias se distribuyen en siete clases: Beta, Chi, Zeta, Theta, Rho, Eta y Nu
- 2.- Mitocondriales, conocidas como GST de clase kappa, ST, se distribuye en dos isoformas la DsbA (Dos isoformas del enlace disulfuro de la oxidoreductasa A) y HCCA (Ácido alfa ciano-4-hidroxicinámico)
- 3.- Microsomal (MAPEG), subdividida en dos isoformas la MGST (Glutación S-transferasa microsomal) y SynMG (Glutación S-transferasa proveniente de *Synechocystis sp*)
- 4.- GST exclusiva de bacterias resistentes a la fosfomicina, cuenta con tres clases FOS A (Fosfomicina A), FOS B (fosfomicina B) y FOX (Fosfomicina X) (Allocati, 2012; Shehu, 2018).

Existen dos clases que no han podido ser asignadas a las cuatro familias: la clase Xi y proteína Ure2p (El dominio C- terminal de Ure2p muestra un pliegue similar al de las GST, parecido al de los GST de clase Beta). La figura 22 presenta un esquema con las familias de GST en bacterias y las isoformas que las conforman (Nerino, 2008; Allocati, 2012; Shehu, 2018).



Figura 22.- Familia GST presente en bacterias y sus diferentes miembros. GST citosólicas presentan, como se muestra en la figura, una mayor localización en las bacterias (Allocati, 2012).

La GST participa en varios procesos de desintoxicación, tales como protección contra estrés químico y oxidativo, así como la resistencia a fármacos antimicrobianos. Entre las diversas clases de GST citosólicas, Theta, Beta, Rho y Zeta tienen una función de deshalogenación (proceso para retirar los halógenos presentes en diversos contaminantes químicos, volviéndolos menos peligrosos) de varios sustratos. Lo anterior podría significar que el papel de las GST bacterianas no solo es la defensa al estrés oxidativo y la resistencia, sino también la desintoxicación de una diversa gama de contaminantes ayudando, de esta forma, a limpiar el ambiente (Shehu, 2018).

En 2008 algunos investigadores realizaron un estudio detallado sobre las funciones de la enzima GST en bacterias, describiendo que las enzimas están implicadas en una colección variada de procesos bien definidos, entre los que se encuentran la biodegradación de xenobióticos, la protección contra daños oxidativos y la farmacorresistencia antimicrobiana. De la misma manera realizaron un estudio sobre las posibles aplicaciones de la enzima, entre ellas las relacionadas a sus usos y su acción dentro de la detección de contaminantes en diferentes ambientes acuáticos (Nerino, *et. al*, 2008).

6.- JUSTIFICACIÓN

En la ciudad de Tuxtepec, Oaxaca, se han realizado diversos estudios por parte de CONAGUA en los que se ha encontrado que el río Papaloapan presenta índices de contaminación considerables principalmente ocasionados por la presencia de metales pesados, agroquímicos y organismos coliformes. Aunado a lo anterior, se ha observado que la contaminación del río, debida a las actividades humanas en la ciudad es generada al no existir un tratamiento de agua adecuado en las industrias, así como al mal manejo de los desechos domésticos y los lixiviados provenientes de basureros. Todo lo anterior constituye una de las principales causas de contaminación por metales en las aguas de uso vital para animales, plantas y humanos que, a largo plazo, generará diversas enfermedades.

Los microorganismos que se encuentran en contacto con los metales pueden presentar procesos de sensibilidad y resistencia. En el caso de las bacterias la exposición a metales puede llevar a la selección de variantes resistentes, mismas que posteriormente podrían ser usadas como microorganismos con alto potencial biodegradante.

Al constatar que el río Papaloapan y los pequeños ríos vecinos presentan problemas considerables de contaminación, se ha iniciado el estudio de algunas cepas de bacterias provenientes de dichos ambientes. A partir de un análisis inicial de las cepas seleccionadas se procederá a evaluar su capacidad para adaptarse a la presencia de concentraciones elevadas de metales pesados para poder seleccionar las cepas resistentes y, posteriormente, evaluar su potencial acción como microorganismos removedores de metales pesados. La figura 23 muestra el diseño de este trabajo de investigación.

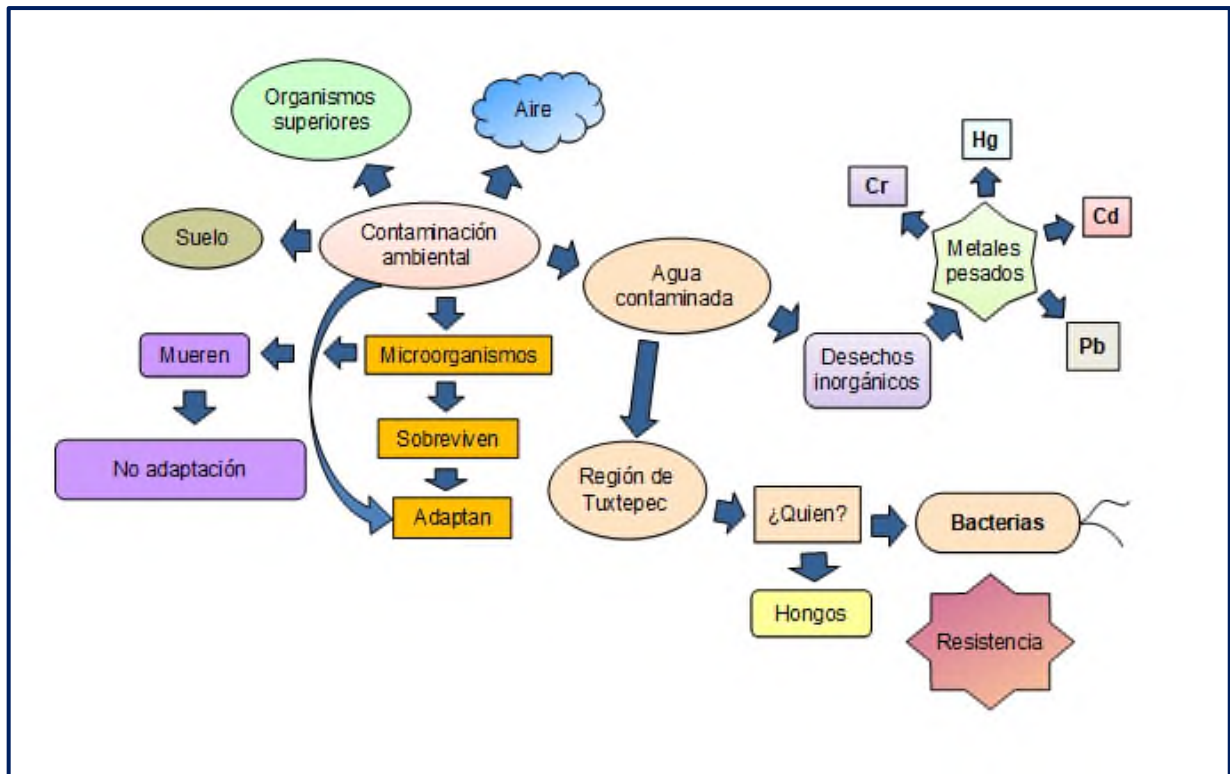


Figura 23. Protocolo de estudio de los procesos de resistencia y susceptibilidad a metales pesados en bacterias (Elaboración de la autora).

7.- HIPÓTESIS

La contaminación con metales pesados en ambientes acuáticos podría generar la adaptación de microorganismos que, al encontrarse en contacto con ellos, presenten procesos de resistencia a algunos contaminantes existentes en aguas, de tal manera que al ser expuestos a concentraciones elevadas de estos u otros elementos tendrán la capacidad de resistirlos y continuar con sus procesos celulares.

8.- OBJETIVOS

8.1.- General

Aislar y caracterizar cepas de bacterias resistentes a metales pesados a partir de muestras de agua de ríos localizados en la región de Tuxtepec, Oaxaca.

8.2.- Específicos.

1. Recolectar muestras de agua de tres acuíferos contaminados de la región de Tuxtepec, Oaxaca.
2. Aislar cepas bacterianas de las muestras recolectadas, mediante criterios y técnicas microbiológicas.
3. Seleccionar cepas resistentes a los metales plomo, cromo, cadmio y mercurio.
4. Identificar el género y la especie de las bacterias resistentes a metales pesados.
5. Evaluar el efecto de cuatro metales pesados, a diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de las bacterias aisladas.
6. Determinar la actividad de la enzima Glutación S-transferasa de las cepas bacterianas expuestas a los cuatro metales pesados a diferentes concentraciones.

9.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

9.1.- Toma de muestra.

Se seleccionaron tres efluentes pertenecientes a la ciudad de Tuxtepec. Los criterios de selección tomados en cuenta fueron la ubicación, las condiciones ambientales y la profundidad. Los mantos de agua seleccionados fueron el Río Papaloapan, el Río San Jacinto y la Laguna Linda Vista. La tabla 5 muestra la localización y coordenadas geográficas.

Tabla 5. Localización geográfica de los efluentes.

Efluentes.	Localización.	Coordenadas geográficas.
Río Papaloapan	San Juan Bautista Tuxtepec	18.082088, - 96.111701
Río San Jacinto	Colonia Moderna	18.061902, - 96.144747
Laguna Linda Vista.	Colonia Moderna	18.061902 - 96.144747

La toma de muestra se realizó en las riberas y el centro de cada efluente, se tomó una cantidad de 75 mL, considerando los frascos estériles mismos que fueron colocados en las zonas no profundas para evitar obtener una gran cantidad de sedimentos. Las muestras fueron colocadas a -4°C hasta su uso (Galicia, 2013).

9.2.- Procesamiento de la muestra.

Para mejores resultados en la obtención de los microorganismos, las muestras fueron filtradas con gasa estéril para eliminar la materia orgánica. Se conservó una muestra de agua sin filtrar para realizar la comparación de colonias encontradas provenientes de un mismo punto y la obtención de diversos microorganismos. Luego del procesamiento las muestras fueron sembradas en medio Agar nutritivo para realizar la selección de diferentes cepas de microorganismos.

9.3.- Siembra en agar nutritivo.

Las muestras fueron sembradas por separado por primera vez en placas de Agar nutritivo. Para ello se tomó una muestra de cada frasco con un asa bacteriológica y se sembraron utilizando la técnica de estría cruzada con la finalidad de separar lo más posible las diferentes colonias microbianas presentes en las muestras, se incubaron a una temperatura de 37°C y se realizaron observaciones y anotaciones de las muestras cada 24 horas hasta su crecimiento. Se eliminaron las colonias que presentaban contaminación por hongos o levaduras. Se tomaron muestras de las colonias de bacterias y estas fueron teñidas mediante la Tinción de Gram y se observaron al microscopio. Para realizar todo lo anterior se siguieron los siguientes criterios.

1. Distribución: Se buscaron las colonias que se encontraban aisladas.
2. Tamaño: Las colonias no debían ser menores a 2 milímetros, estas se midieron con la ayuda de una regla marcando la posición de cada colonia.
3. Color: El color de las colonias ayudó a identificar posibles cepas.
4. Características morfológicas: Después de la selección por tamaño y color, se llevó a cabo una Tinción de Gram (Anexo 1) que permitió elegir las colonias puras y ayudar en la clasificación de estas.
5. Selección de cepas con posible resistencia a los metales plomo, cadmio, cromo y mercurio, bajo una exposición a plomo a una concentración de 0.12 μM . se prepararon cajas de Agar nutritivo que contenían el metal, la siembra se realizó por medio de una picadura en el medio de cultivo y se midió el crecimiento radial de las bacterias determinándolo como la longitud del diámetro de estas.

Al término de la selección se realizaron dos siembras consecutivas de cada microorganismo con el fin de evitar contaminación y para la obtención de colonias puras.

9.4.- Tolerancia a metales pesados en las cepas seleccionadas.

Realizada la selección y purificación de las colonias se realizaron dos ensayos con concentraciones diferentes las cuales se administraron por difusión de discos de los metales Mercurio, Cadmio, Cromo y Plomo, cada concentración se realizó por triplicado.

El primer ensayo se administraron las concentraciones 0.12, 0.24, 0.33, 0.60, 0.67 y 0.75 mM de los metales pesados Mercurio, Cadmio, Cromo y Plomo, las concentraciones mencionadas se tomaron en base al trabajo anterior realizado con las cepas de *Hafnia alvei* y *Bacillus pumillus* (Galicia 2013). la técnica consistió en preparar cajas Petri con medio agar nutritivo, se subministraron 100µl de caldo nutritivo con el inóculo previamente sembrado y con ayuda de un aza triangular se dispersó homogéneamente hasta secar, esperar mínimo 5 minutos con la caja Petri cerrada, posteriormente se marcaron las posiciones de los discos para proceder a su colocación con pinzas estériles dejando un margen entre discos de mínimo 2cm, los discos fueron sumergidos de forma vertical dejando que la solución suba por capilaridad para evitar que el disco quede empapado posteriormente se colocaron en el medio haciendo una ligera presión para una mejor fijación al medio, se incubaron a 37°C. El metal se difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas las 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición de ± 0.8 cm de diámetro se considera que la cepa presenta sensibilidad (Picazo, 2000)

Al observar el comportamiento bacteriano se procedió a una segunda determinación en la cual se aumentaron y disminuyeron las concentraciones para cada uno de los metales en base a los resultados mostrados por cada colonia seleccionada. Las concentraciones menores utilizadas para Plomo y Cadmio fueron 0.1, 0.5 y 1 µM y 0.005, 0.1 y 0.5 mM respectivamente; para Cromo fueron 0.005, 0.01 y 0.05 mM y para Mercurio 0.01, 0.05 ,0.1 ,0.5, 1 y 3 µM, así como 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1 mM. Las concentraciones mayores utilizadas fueron las siguientes: para Plomo 1, 1.5, 1.95, 5.66 y 6.59 mM mientras que para los metales Cadmio, Cromo y Mercurio fueron 1.95, 5.66 y 6.59 mM. Se observó el crecimiento de las colonias microbianas y se eligieron aquellas que crecieron a las dos concentraciones mayores de los metales pesados y con ellas se procedió a hacer las siguientes determinaciones.

9.5.- Pruebas de viabilidad.

Con el uso de una tinción adecuada y una cámara de recuento es posible contar el número de células vivas en un volumen adecuado. En este trabajo se utilizó el colorante vital azul de algodón para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que este colorante no puede penetrar y teñir a las células vivas debido a que sus membranas se encuentran íntegras. La finalidad del uso de la técnica es evaluar la habilidad de una población microbiana para multiplicarse y producir una colonia macroscópica en medio de cultivo sólido o producir turbidez en un medio líquido apropiado. Por lo cual se realiza una colección de cultivos microbianos, para determinar la viabilidad, pureza y preservar el depósito en el tiempo, se utiliza la capacidad de los microorganismos para multiplicarse y crecer en medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio (Aquiahuatl, 2004).

Para llevar a cabo esta técnica, se midió la viabilidad de las cepas sin metal y las cepas con las concentraciones de metales a las cuales presentaron tolerancia y sensibilidad, se tomaron 100µl de la alícuota y se sembraron en tubos con 1.5 ml de caldo nutritivo sin y con la concentración de metal, los tubos que contenían el metal; cuando se obtuvo el tiempo indicado de crecimiento (fase log) se agregó a un tubo de CN una alícuota de 100 µL de las cepas sin y con los metales Mercurio, Cadmio, Cromo y Plomo, más una alícuota de 10 µL de colorante vital (azul de algodón) se mezclaron por inversión y se colocaron 10 µL de la mezcla en la cámara de conteo. Esta se colocó en el microscopio y se procedió al conteo, para la diferenciación de las bacterias en el conteo se tomó en cuenta que las bacterias vivas no presentan tinción, mientras las bacterias muertas tomaran un color azul.

9.6.- Curva de crecimiento.

Esta técnica se basa en la representación gráfica del número de células microbianas (crecimiento) respecto al tiempo y permite identificar las distintas fases de esta mediante el uso de un procedimiento estadístico elaborando una curva de crecimiento. Esta puede realizarse mediante el conteo en placa o determinando la concentración de proteína total en función del tiempo. En la fase exponencial, la velocidad de crecimiento del cultivo es proporcional a la concentración de células o de la biomasa (Calderón, 2017).

La técnica nos permitió determinar el tiempo óptimo de crecimiento de las tres cepas bacterianas para analizar el efecto de los metales Mercurio, Cadmio, Cromo y Plomo.

Cada técnica se realizó por triplicado, empleando matraces Erlenmeyer de 50 ml con caldo nutritivo, en donde se inocularon 100µl de la cepa, se realizó una cinética por 24 horas en donde las muestras iniciales se tomaron cada hora hasta completar 12 horas, posteriormente se tomaron cada 2 horas, tomando 1 ml

y colocándola en tubos Eppendorff con 10 μ l de HCl en una relación 1:1 y llevándolas a un espectrofotómetro UV/VIS a 560 nm para medir sus absorbancias.

Esta cinética fue acompañada por la técnica de conteo en cámara de Neubauer. Para ello se tomaron 10 μ l de la muestra y se realizó una dilución 1:1000, utilizando azul de algodón como medio de tinción.

Las curvas se realizaron con la finalidad de conocer el tiempo de crecimiento de las cepas bacterianas, así como el número de bacterias por mililitro, para poder realizar diversos ensayos bajo condiciones equivalentes.

9.7.- Cuantificación de proteína.

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas, se basa en añadir a las muestras un reactivo que forma un complejo con las proteínas en el cual la intensidad de color es proporcional a la concentración de proteínas, basados en la Ley de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, (Lowry, 1951).

Se realizó la cuantificación de proteína por el método de Lowry (Lowry, 1951), usando una curva patrón de albúmina sérica bovina. Como punto inicial se prepararon los reactivos correspondientes (Anexo 1) y se siguió el siguiente procedimiento.

En un tubo se colocaron 790 μ L de agua destilada, 10 μ L de muestra, 100 μ L de desoxicolato de sodio ($C_{24}H_{39}NaO$), 2 mL de una solución compuesta por sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) al 0.5%, 2 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) y 0.134 gramos de tartrato de sodio potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) y 100 μ L de Folín-Ciocalteu ($C_{10}H_5NaO_5S$, usando una dilución 1:3). Se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se realizó una curva de calibración con seroalbúmina bovina. La metodología detallada de la construcción de la curva se presenta en el Anexo 1. Una vez preparados los tubos se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer Lambda 25) a una longitud de onda de 750 nm.

9.8.- Medición de la actividad de la Glutación S-transferasa.

La familia de las enzimas glutación-S-transferasa (GST) es uno de los mayores grupos de enzimas detoxificantes altamente conservadas e implicadas en el metabolismo de muchos xenobióticos. El amplio rango de sustratos de la enzima GST permite proteger a la célula mediante la conjugación del glutati6n (GSH) a sustratos electrofílicos, generando compuestos menos reactivos y más solubles, fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores de membrana específicos (Castillo,2007).

En una celda de vidrio se agregó el volumen correspondiente de un amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH 6.5, el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) a una concentración final de 1 mM y el ligante glutati6n

reducido (GSH) también a una concentración final de 1 mM. Esta mezcla se homogenizó por inversión y finalmente se adicionó el volumen correspondiente a 1 mg/ml de proteína total. Se midió la absorbancia a 350 nm por un tiempo de cinco minutos con intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 25). La actividad de la GST se determinó por la ecuación de Lambert-Beer de la siguiente manera (Jacoby. 1985).

$$A = \epsilon cl$$

Dónde:

A es la absorbancia

ϵ es el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 9.6 \text{ mg/mL min}$)

c es la concentración de la enzima GST

l es el diámetro de la celda.

9.9.- Identificación de cepas microbianas por pruebas bioquímicas.

Esta parte del trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental bajo la asesoría de la Dra. Jeiry Toribio Jiménez. Las colonias que presentaron tolerancia a concentraciones altas de metales pesados fueron sometidas, por separado, a identificación tomando como base los resultados obtenidos en la Tinción de Gram (Anexo 2) y las pruebas bioquímicas que permitieron identificar el género y la especie de las bacterias. Los fundamentos y técnicas de las pruebas bioquímicas se muestran en el Anexo 3.

9.10.- Identificación de las cepas mediante pruebas de biología molecular

Realizadas las pruebas bioquímicas e identificadas al tipo de familia que pertenecían se procedió a la identificación de las colonias bacterianas mediante las técnicas de ARNs 16S, realizadas por la empresa Geno+, con la ayuda del M.M.M Luis Uribe Espejo_Galicia. Se entregaron cultivos puros de las tres cepas bacterianas, para confirmar los datos de las secuenciaciones utilizaron la cepa bacteriana *Massilia* como cepa control para la secuenciación al ser una muestra diferente y permitir confirmar los resultados.

La secuenciación por ARNr 16S permite conocer la relación filogenética que existen entre los microorganismos procariontes, el ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica, como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla, la identificación molecular basada en el ADNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo




de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S incluye tres etapas, amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva, para esta última sección se utilizan base de datos, algunas de acceso libre como GenBank NCBI, EMBL Y RDP, entre otras las cuales permiten la comparación de las secuencias y la construcción de árboles filogenéticos que reflejen de manera esquemática el grado de parentesco entre las bacterias analizadas (Del Rosario, 2004).

10.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1.- SITIOS DE RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUA.

Se escogieron tres lugares con características de contaminación. Los mantos de agua seleccionados fueron: Río Papaloapan localizado a la altura de la ciudad de Tuxtepec; Río San Jacinto y Laguna Linda Vista en la colonia Moderna. La tabla 6 presenta las principales características de contaminación presentes en los efluentes.

Tabla 6. Sitios de recolección de agua ubicados en la zona de Tuxtepec, Oaxaca
(Fotografías archivo personal de la autora).

Efluente.	Nombre	Características
	<p>Río Papaloapan.</p> <p>Colinda con la ciudad de Tuxtepec.</p> <p>Localización: 18.082088, - 96.111701</p>	<p>El río presentaba un alto índice de contaminantes de origen doméstico y de uso diario, basureros clandestinos y la siembra de diversos cultivos en sus riveras.</p>
	<p>Laguna Linda Vista.</p> <p>Colonia Moderna, Tuxtepec.</p> <p>Localización: 18.061902- 96.144747</p>	<p>La laguna presentaba desechos domésticos y cloacales, animales y flora muertos, el agua era muy turbia haciendo imposible observar el fondo.</p>
	<p>Río San Jacinto.</p> <p>Colonia Moderna, Tuxtepec.</p> <p>Localización: 18.061902- 96.144747.</p>	<p>Presentaba altos índices de contaminación por desechos domésticos, hojarascas muertas, cultivos en sus litorales, poca visibilidad en el agua.</p>

10.2.- SIEMBRA Y SELECCIÓN DE LAS COLONIAS.

Siembra.

Mediante la técnica de sembrado en placa y realizando observaciones y anotaciones cada 24 horas por 7 días, se obtuvieron 16 cajas Petri con diferentes colonias cada una. La figura 24 muestra las colonias obtenidas. Con base en las observaciones y los criterios de selección mencionados en la metodología se procedió a aislar las colonias que serían utilizadas.

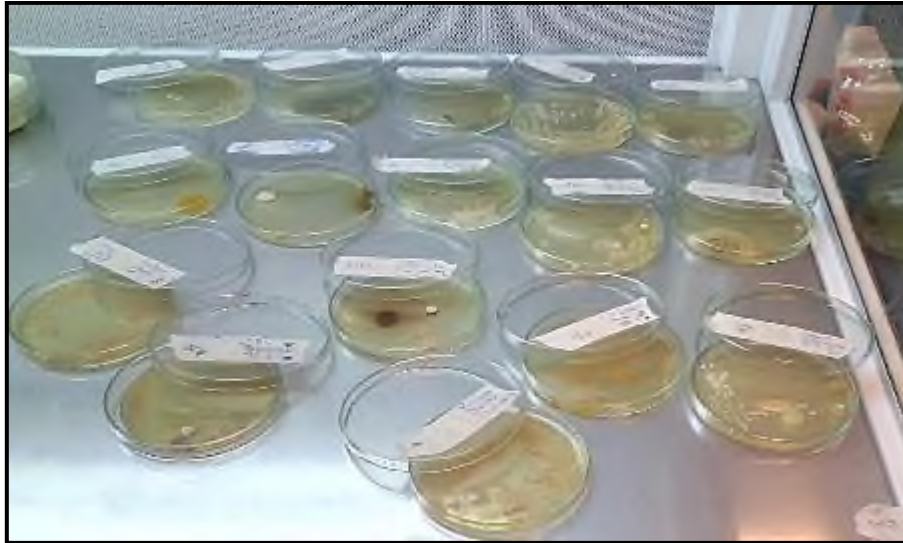


Figura 24. Colonias obtenidas tras la etapa de siembra y de selección de las muestras filtradas y sin filtrar, de acuerdo con las características morfológicas presentes en cada una de ellas

(Fotografías: archivo personal de la autora).

Selección.

Se seleccionaron las colonias que estuvieron alejadas entre sí, que presentaron un diámetro promedio mayor a 0.2 mm y el color característico de las cepas bacterianas. Se descartaron las posibles colonias de hongos o levaduras. Las colonias seleccionadas fueron resebradas nuevamente en placas de Petri con agar nutritivo e incubadas a una temperatura de 35 a 37 grados centígrados. La figura 25 muestra un ejemplo de los cultivos obtenidos después de la resiembra, la fotografía izquierda se observa una caja con colonias color amarillo paja sin contaminación de un diámetro mayor a 0.2 mm y la fotografía derecha muestra colonias blancas y levaduras dispersas.

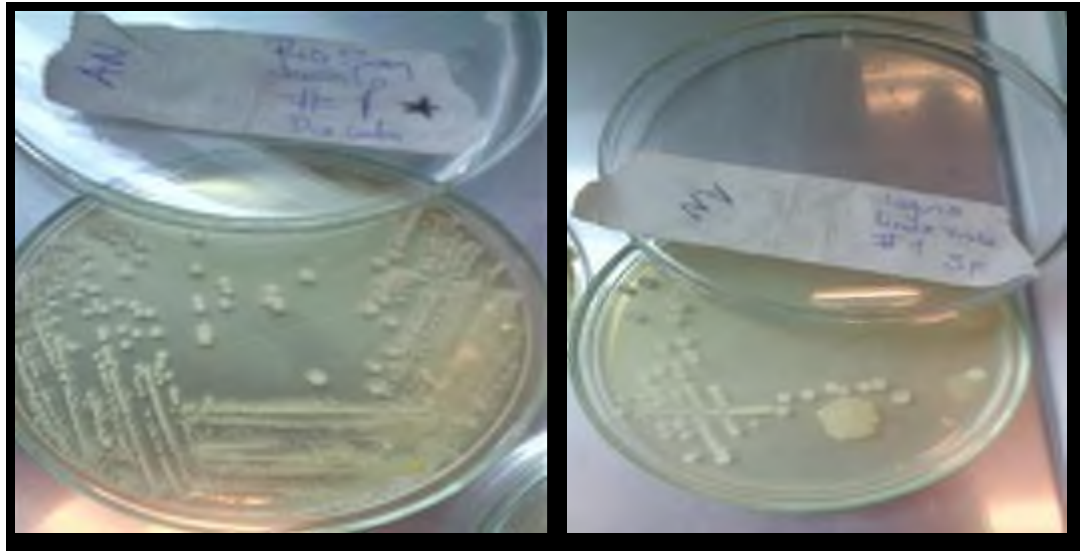


Figura 25 .-Segunda resiembra de cepas de bacterias con un diámetro mayor a 0.2mm.
(Fotografías: archivo personal de la autora).

Después de realizar la selección de las colonias por su tamaño, color y pureza, se procedió a observar sus características morfológicas y tinción de Gram. Mediante estos procedimientos se pudo realizar una tercera selección de colonias al eliminar todas aquellas que presentaran contaminación por hongos y levaduras.

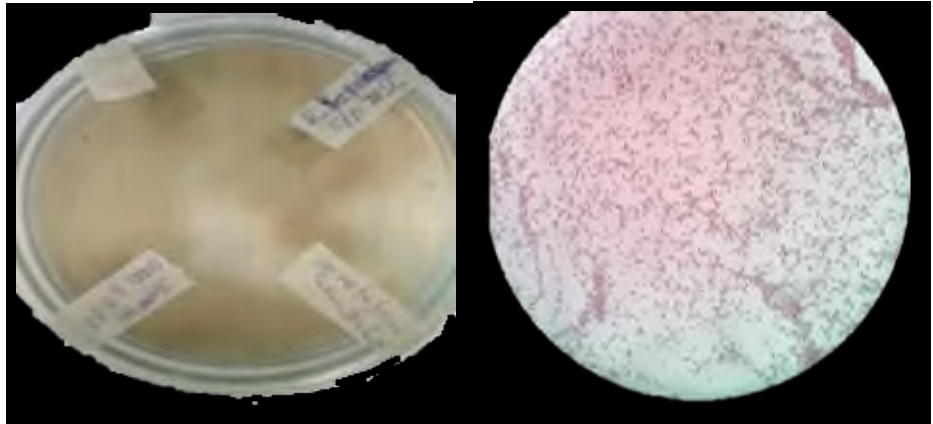
Como resultado, se seleccionaron tres colonias con base en el cumplimiento de los criterios anteriores. Estas fueron denominadas Cepa 1, Cepa 2 y Cepa 3, a continuación, se describen sus características macro y microscópicas (figura 26).

Cepa 1. Bacteria Gram negativa. Esta cepa provino del Río Papaloapan. Presentó colonias semiesféricas con pigmentación color café-verde, no cóncavo ni brillante. Microscópicamente se observaron bacilos rectos.

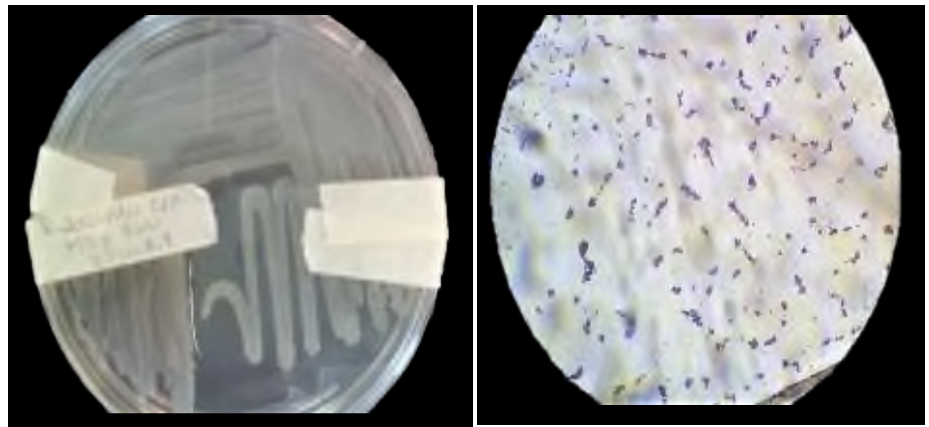
Cepa 2. Bacteria Gram positiva. Esta cepa fue aislada del Río San Jacinto. Se observaron colonias de color blanco, semiesféricas con bordes irregulares. Microscópicamente se observó la presencia de cocos.

Cepa 3. Bacteria Gram positiva. Esta cepa fue obtenida de la muestra de la Laguna Linda Vista. Presentó colonias de color blanco, esféricas y con diámetro mayor a 0.2 cm. Microscópicamente se observaron cocos agrupados.

Cepa 1. Bacilos Gram (-)



Cepa 2. Cocos Gram (+)



Cepa 3. Cocos Gram (+)

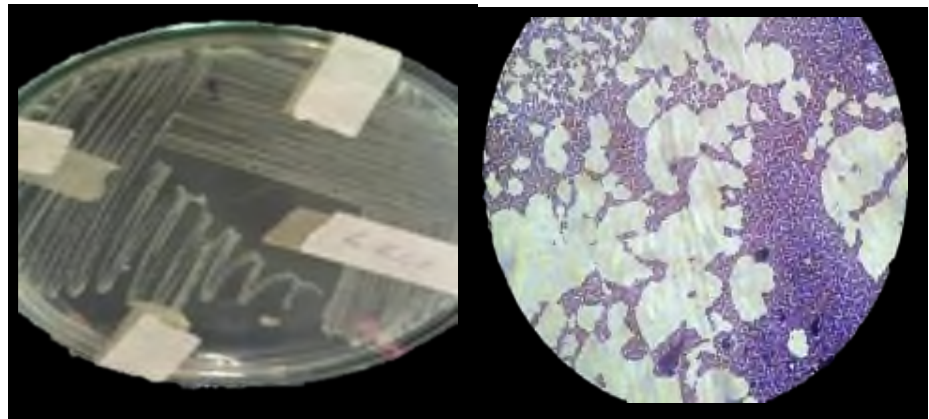


Figura 26. Características macro y microscópicas de las cepas seleccionadas por métodos microbiológicos (Fotografías: acervo personal de la autora).

En un trabajo anterior en el grupo de investigación del laboratorio de Bioquímica de la Universidad del Papaloapan se aislaron dos cepas bacterianas a partir de muestras de agua del río Moctezuma, que es un río de aguas negras que se localiza al lado del Hospital del IMSS de la ciudad de Tuxtepec, Oaxaca. En dicho trabajo, las cepas fueron expuestas a diferentes concentraciones de plomo (0.12, 0.24, 0.33, 0.60, 0.67 y 0.75 mM) en el medio de cultivo, y se observó con 1.95 mM de acetato de plomo las dos cepas podían crecer sin problemas en un tiempo de 24 horas. Posteriormente a concentraciones superiores el crecimiento se volvía más lento. Debido a ello se decidió exponer las tres cepas seleccionadas a una concentración menor de plomo en el medio de cultivo con la finalidad de observar si existía tolerancia a los metales desde su aislamiento. La concentración elegida fue para ello fue 1.2 mM las tres colonias presentaron crecimiento al metal plomo, siendo una pauta para continuar con el trabajo experimental, La tabla 7 presenta el diámetro colonial (cm) de las tres cepas sembradas en Plomo y su crecimiento se muestra en el recuadro presente en la figura 27, los estudios se realizaron por triplicado, en ambos datos se observa que las tres colonias presentan tolerancia a plomo en la concentración 1.2mM con resultados favorables de las tres cepas bacterianas se continuo con los estudios correspondientes.

Tabla 7. Diámetro colonial (cm) de las tres colonias seleccionadas expuestas a 1.2 mM de acetato de plomo.

Cepa bacteriana	Crecimiento ($X \pm SD$)
1	0.20 ± 0.09
2	0.15 ± 0.05
3	0.05 ± 0.01

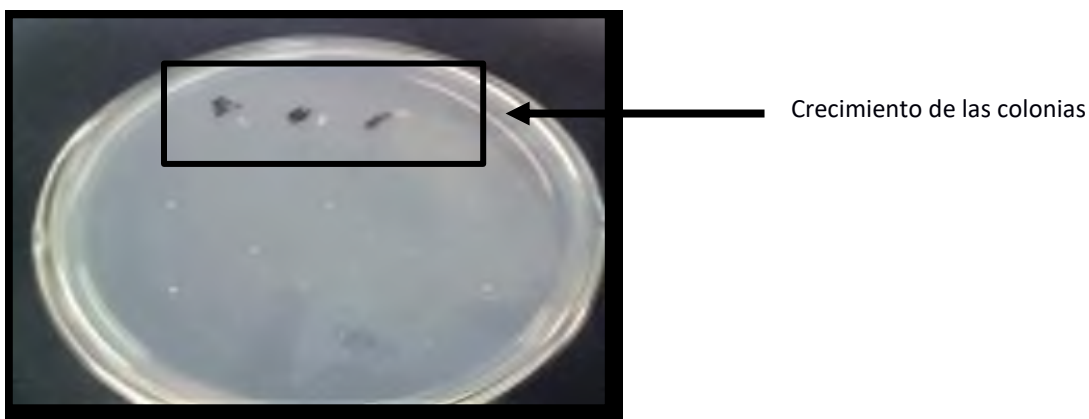


Figura 27. Crecimiento de las colonias en un medio de agar nutritivo con 1.2 mM de acetato de plomo (Fotografía: acervo personal de la autora).

10.3.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

10.3.1.-Pruebas bioquímicas.

La figura 28 presenta las imágenes correspondientes a las pruebas bioquímicas. En ella se presentan los cambios obtenidos en cada prueba. Con ayuda del crecimiento colonial, la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas se pudo determinar que la Cepa 1 corresponde a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.



Pruebas bioquímicas sin inocular

De izquierda a derecha:
Urea
MIO
LIA
Citrato de Simmons
Kiggler K/K

Prueba bioquímica.	Cepa 1.
UREA	+
MIO	+
LIA	+
CITRATO	+
KIGGLER K/K	+



Figura 28. Identificación por pruebas bioquímicas de la cepa 1, correspondiente a los medios de cultivo antes y posterior a la siembra, A) UREA, B) MIO, C) LIA, D) CITRATO y E) KIGGLER. (Fotografías pertenecientes al acervo personal de la autora).

La bacteria fue capaz de metabolizar la urea. La prueba MIO sirve para investigar si una bacteria posee movilidad, produce inositol y si descarboxila a la ornitina, en este caso la bacteria solo presentó descarboxilación de ornitina y movilidad. La prueba positiva de LIA indica la capacidad de las bacterias de descarboxilar a la lisina. El viraje en el medio citrato sugiere que el microorganismo presenta la enzima citrato permeasa. Finalmente, una prueba positiva de Kiggler indica que las bacterias producen alcalinización del medio y que la bacteria tiene la propiedad de oxidar glucosa y lactosa. Los resultados

anteriores corresponden a las características bioquímicas de la bacteria *Pseudomona aeruginosa*. (Macfaddin, 2003).

Identificación de la cepa 2.

Pruebas bioquímicas.

La figura 29 presenta el cambio obtenido por las pruebas bioquímicas de la Cepa 2. Los resultados obtenidos tanto en la morfología colonial como en las pruebas bioquímicas indicaron que la cepa 2 corresponde a un *estafilococo*. En este caso el *estafilococo* no presenta las mismas características bioquímicas que *Pseudomona aeruginosa*.

Prueba bioquímica	Cepa 2.
UREA	-
MIO	-
LIA	-
CITRATO	-
KIGGLER K/K	-



Figura 29. Identificación por pruebas bioquímicas de la cepa 2, correspondiente a los medios de cultivo antes y posterior a la siembra, A) UREA, B) MIO, C) LIA, D) CITRATO y E) KIGGLER. (Fotografías pertenecientes al acervo personal de la autora).

Identificación de la cepa 3.

Pruebas bioquímicas.

La figura 30 presenta el cambio obtenido por las pruebas bioquímicas de la Cepa 3 a las pruebas bioquímicas, en ella se presentan el cambio obtenido en los medios de cultivo, con los resultados obtenidos de la morfología colonial y las pruebas bioquímicas se pudo determinar que la cepa 3 corresponde a otra cepa de *estafilococo*.

Prueba bioquímica	Cepa 3
UREA	-
MIO	-
LIA	-
CITRATO	-
KIGGLER K/K	-



Figura 30. Identificación por pruebas bioquímicas de la cepa 3, correspondiente a los medios de cultivo antes y posterior a la siembra A) UREA, B) MIO, C) LIA, D) CITRATO y E) KIGGLER. (Fotografías pertenecientes al acervo personal de la autora).

Con base en los resultados de las pruebas bioquímicas de las Cepas 2 y Cepa 3 corresponden al género estafilococos se realizó la prueba de coagulasa para diferenciar si ambos pertenecían al tipo coagulasa positivo o negativo.

Prueba de la coagulasa para las cepas 2 y 3.

Las Cepas 2 y Cepa 3 no presentaron coágulo por lo cual ambas pertenecen al género de coagulasa negativo (figura 31)

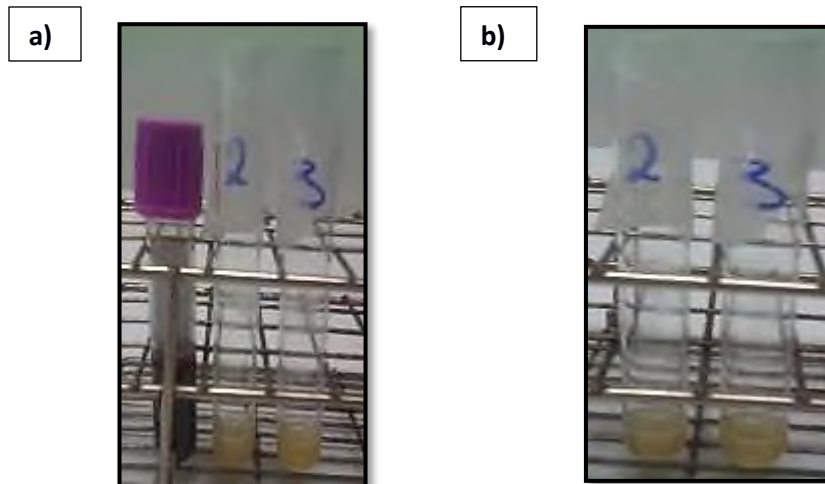


Figura 31. Prueba de coagulasa de las Cepas 2 y Cepa 3, a) siembra de las cepas en plasma, b) Cepas 2 y Cepa 3 transcurridas las dos horas y media sin presencia de coágulos. (Fotografías pertenecientes al acervo personal de la autora).

10.3.2 Identificación por secuenciación 16s

Obtenidos los resultados de las pruebas bioquímicas, las tres cepas se mandaron a analizar en el laboratorio Geno+ para realizar la secuenciación 16S, la cual permitió conocer con exactitud la identidad de las colonias bacterianas que fueron seleccionadas.

Para ello se realizaron de nueva cuenta cultivos y tinciones de Gram. La Cepa 2 cocos Gram positivos, sin embargo, en todas las pruebas bioquímicas se mostraron resultados negativos por lo cual solo se pudo determinar por la morfología que se trataba de un *Estafilococos*. Para poder conocer la especie fue necesario identificarla por medio de métodos moleculares. De igual manera la cepa 3 presento cocos Gram positivos, mientras que sus pruebas bioquímicas mostraron resultados negativos mostrando que posiblemente se tratada de otro estafilococo. Resulta importante mencionar que las Cepas 2 y Cepa 3 presentaron el mismo Gram y las pruebas bioquímicas similares siendo la identificación por medio Kiggler la única diferente al mostrar un viraje amarillo en la Cepa 3, Sin embargo, la morfología colonial de la Cepa 2 presentó colonias con bordes irregulares, mientras que la Cepa 3 formó colonias esféricas. Otro dato que indicaba que eran microorganismos diferentes fue la prueba de tolerancia a plomo, la cual fue diferente para cada una. Por ello era evidente la necesidad de conocer si se trataba o no de la misma especie de *estafilococo*.

Para realizar la identificación mediante esta técnica, se entregaron cultivos puros de las tres cepas bacterianas. Para confirmar los datos de las secuenciones se utilizó la cepa bacteriana *Massilia* como cepa control de la secuenciación al ser una muestra diferente y por ello permitir la confirmación de los resultados.

Identificación de la cepa 1.

Una vez extraído el ADN genómico de la muestra y amplificado por PCR el gen 16S ARNr y hechos los procesos necesarios, se realizó un BLAST en la base de datos GenBank, la cual permitió clasificar el 79% de la muestra. Los resultados mostraron que la cepa bacteriana que presentó la mayor similitud correspondió a *Pseudomonas aeruginosa*. Tomando en cuenta los resultados obtenidos de la identificación por pruebas bioquímicas y la secuenciación 16S se pudo afirmar que la cepa 1 corresponde a *Pseudomonas aeruginosa*. En la figura 32 la imagen A) muestra las bacterias identificadas en el análisis por BLAST y un árbol filogenético donde se observan las similitudes entre taxones de las cepas identificadas, la imagen B) muestra la comparación de los taxones obtenidos mediante el programa Krona en el cual se determinó que la cepa predominante pertenece al grupo de las *Pseudomonas aeruginosa*

Taxon	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
<i>Bacillus isabelliae</i>	4
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	2
<i>Pseudomonas knackmussii</i>	2
<i>Pseudomonas otitidis</i>	2
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	2
<i>Azotobacter chroococcum</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Bacillus circulans</i>	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	1

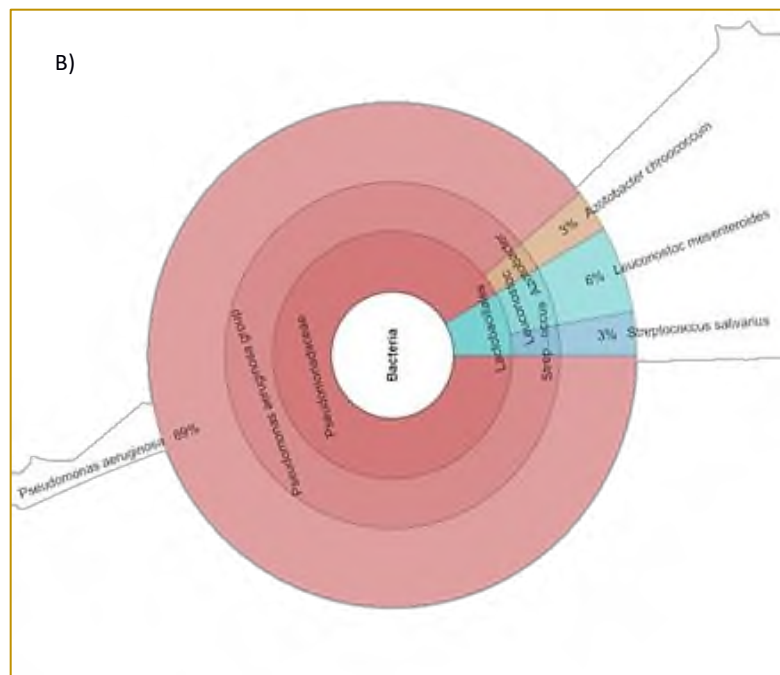


Figura 32.- Resultados de la secuenciación 16S de la cepa 1. La imagen A) muestra el número de bacterias que comparten una sección de su material genético con la cepa 1, B) muestra una comparación entre los fastas de las cepas bacterianas obtenidas y determinando que la cepa predominante corresponde a *Pseudomona aeruginosa*

A continuación, se muestra la secuencia correspondiente la cepa 1 identificada como *Pseudomona aeruginosa*.

Ref. sec. NR_117678.1, *Pseudomonas aeruginosa cepa DSM 50071* ARN ribosomal 16S, secuencia parcial.

```
AGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAG
CTTGCTCCTGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGT
CCGGAACCGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGGGAGAAATGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATC
AGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTC
TGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCA
CTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCG
GCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGTGGTTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTA
CTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTG
GCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGAC
ATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGATGGCTGTGCT
CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACC
TCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGA
GCTAATCCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCT
AGTAATCGTGAATCAGAATGTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
GGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTTCATGACT
GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
```

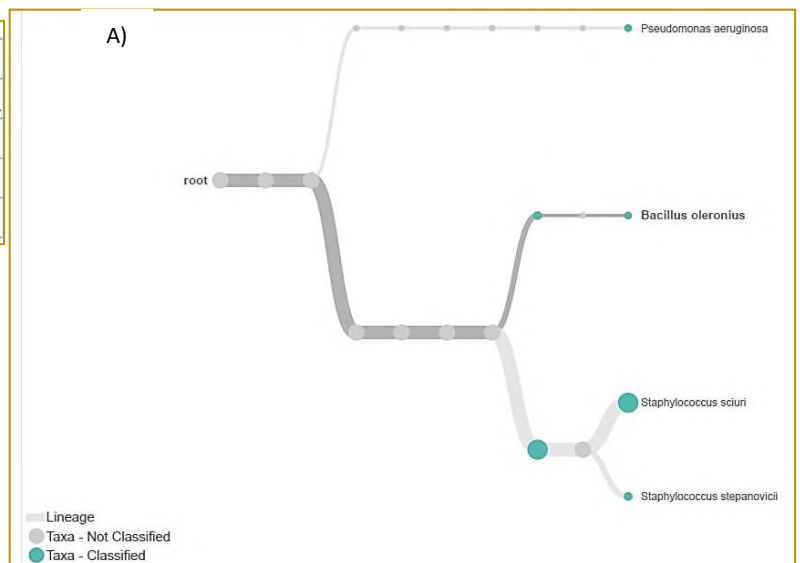
La bacteria del género *Pseudomonas* se caracterizan por su movilidad y la presencia de flagelos; cuentan con un metabolismo aerobio, siendo catalasa y oxidasa positivo (BDataBio, 2016). Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* son un habitante común de suelo, plantas y agua; y es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí (Lújan, 2014). Un estudio similar al de este trabajo fue realizado por Gutiérrez *et. al* 2017. Ellos recolectaron muestras de canales de riego en la Ciénega de Chapala Michoacán, tomando muestras de los bordes a profundidades de 1m con 30 cm de profundidad. Las muestras fueron analizadas realizando diluciones 1:100 y 1:1000 y sembrándolas en agar nutritivo. Se seleccionaron colonias pigmentadas y fluorescentes bajo luz UV, Los resultados de la tinción y las pruebas bioquímicas demostraron que sus bacterias no fermentaron lactosa ni glucosa, no produjeron gas ni H₂S, dieron positivo para catalasa y oxidasa, crecieron usando centrimida y piocianina. De la misma manera realizaron una prueba de confirmación usando el gen ribosomal 16S, Este estudio se realizó amplificando los genes *oprI/oprL* y fragmentos específicos del gen ribosomal 16S a nivel de género y especie. De las 100 bacterias obtenidas solo 46 se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* al ser todas las muestras positivas (Gutiérrez, 2017).

Identificación de la cepa 2.

Realizado el mismo procedimiento que con la Cepa 1, se logró clasificar el 93% de la muestra que la Cepa 2 presentó mayor similitud con *Staphylococcus sciuri*. En la figura 33 la imagen A) muestra las bacterias que comparten una sección de su material genético analizadas por medio de BLAST y un árbol filogenético donde se muestran las similitudes entre los taxones identificados, la imagen B) presenta la comparación de los taxones mediante el programa Krona en el cual se determinó que la cepa 2 pertenece al grupo de *Staphylococcus sciuri*.

Staphylococcus sciuri es un habitante común de suelo y agua, encontrándose principalmente en animales de granja, aunque no es de mucha importancia clínica este microorganismo presenta la capacidad de generar resistencia a antibióticos utilizando un gen propio de la bacteria: *mecA* (Orozco, *et.al.* 2018). *Staphylococcus sciuri* es considera una de las especies más primitivas del género estafilococos con un compendio de 50 especies y subespecies, los miembros de su familia son oxidasa positivos y su pared celular está caracterizada por peptidoglicanos de tipo Lys-Ala-Glys₄ (De Vos *et al.*, 2009). Esta bacteria es un habitante común de hábitats como suelos y agua, se encuentra principalmente en animales de granja, aunque no es de mucha importancia clínica este microorganismo presenta la capacidad de generar resistencia a antibióticos un gen propio de la bacteria el gen *meco* (Orozco. *et.al* 2018). La presencia de esta bacteria esta correlacionada con dermatitis en perros, enfermedades nosocomiales en humanos, inflamaciones pélvicas y heridas infectadas, de igual manera se ha especulado que el grupo de especies de *Staphylococcus sciuri* es un potencial reservorio de genes de resistencia antimicrobiana para otros estafilococos. (Nemeghaires.*et al.*2014).

Taxon	
<i>Staphylococcus sciuri</i>	21
<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	2
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1
<i>Bacillus oleronius</i>	1



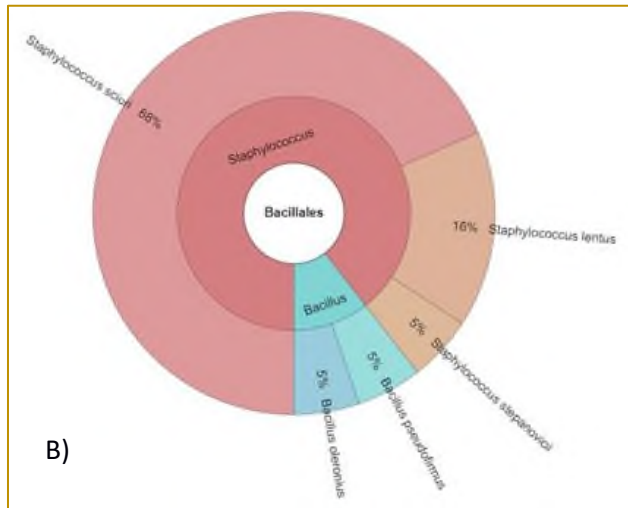


Figura 33.- Resultados de la secuenciación 16S de la Cepa 2. A) Número de bacterias que comparten una sección de su material genético con la Cepa 2, B) Comparación entre los fastas de las cepas bacterianas obtenidas y determinando que la cepa predominante corresponde a *Staphylococcus sciuri*.

A continuación, se muestra la secuencia correspondiente la cepa 1 identificada como *Staphylococcus sciuri*.

Ref.Sec.NR_117252.1 *Staphylococcus stepanovicii* cepa 196 16S ARN ribosomal, secuencia parcial

```

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGATGA
GAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAGTACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTTCGATAGTGAAAGACGGT
TTCGGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGA
CGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGTTAGTAACTGAACAAGTCTTGACGGTACC
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
GGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTTAGCGTGAAATGC
GCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGTGCGAAAG
CGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGG
GTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGATCGCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
AAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAATACAAAGGGCA
GCGAACCCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAATTATTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTA
CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACAC
ACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTC
GAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACC
TCCTT

```

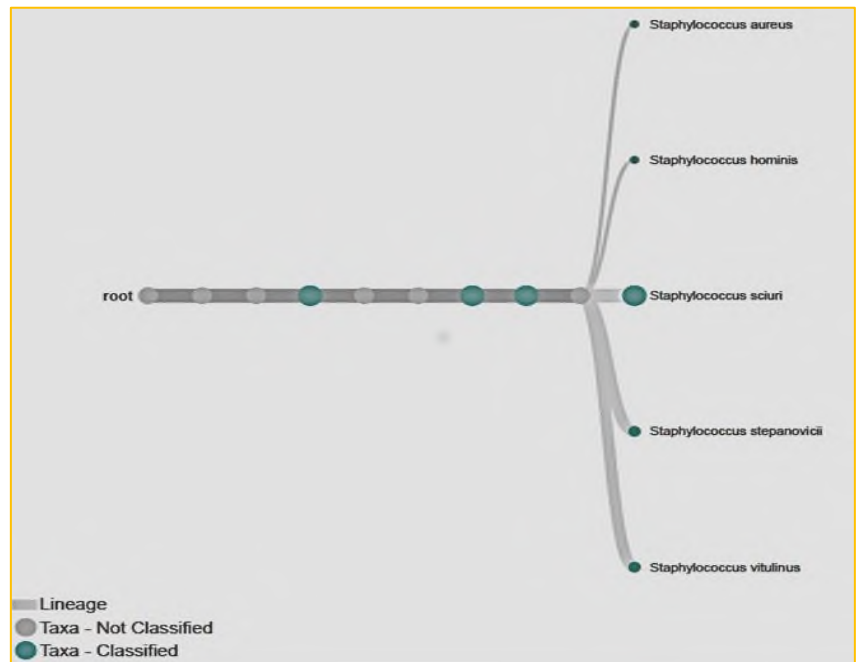
Identificación de la cepa 3.

Los resultados mostraron que la cepa bacteriana que presentó la mayor similitud (91%) correspondió a *Staphylococcus sciuri*. En la figura 34 la imagen A) muestra las bacterias que comparten una sección de su material genético analizadas por medio de BLAST y un árbol filogenético donde se muestran las similitudes entre los taxones identificados, la imagen B) presenta la comparación de los taxones mediante el programa Krona en el cual se determinó que la cepa 3 pertenece al grupo del *Staphylococcus sciuri*, posteriormente se realizó un alineamiento por BLAST entre la secuenciación del *Staphylococcus sciuri* (Ref.sec.NR_025520.1) y el *Staphylococcus stepanovicii* (Ref.sec. NR_117252.1) obteniendo un 99.1% de similitud para *Staphylococcus stepanovicii*.

Sin embargo, tomando en cuenta los resultados obtenidos de la identificación por pruebas bioquímicas y la morfología colonial y con base en la teoría se sabe que *Staphylococcus sciuri* incluye cinco especies de bacterias que son coagulasas negativas y que son resistentes a la novobiocina. Estas bacterias incluyen: *Staphylococcus fleuretti*, *Staphylococcus vitulinus*, *Staphylococcus lentus* y *Staphylococcus stepanovicii* (De Vos *et al.*, 2009; Hauschild *et al.*, 2010). Por lo cual, en base al BLAST y las diferencias morfológicas se manejó a la cepa 3 como *Staphylococcus stepanovicii*, al pertenecer a la familia del *Staphylococcus sciuri*.

Taxón	
<i>Staphylococcus sciuri</i>	15
<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	4
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	1

A)



B)

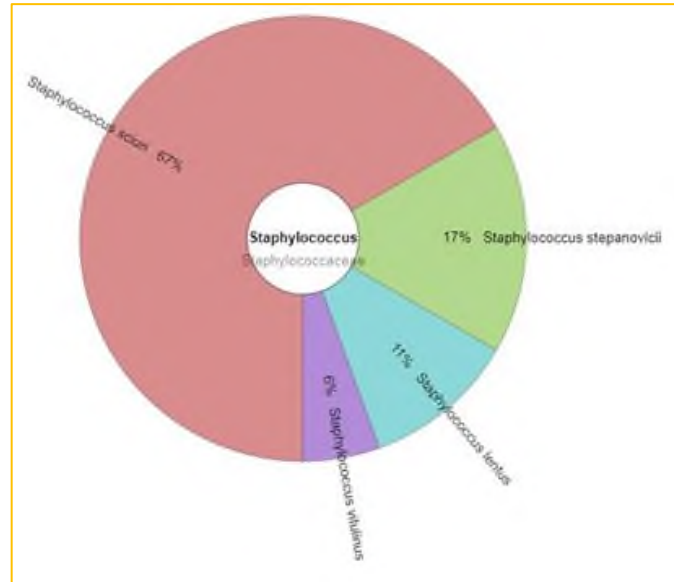


Figura 34.- Resultados de la secuenciación 16S de la cepa 3. La imagen A) Número de bacterias que comparten una sección de su material genético con la cepa 3, B) Comparación entre los fastas de las cepas bacterianas obtenidas y determinando que la cepa predominante corresponde a *Staphylococcus stepanovicii*.

A continuación, se muestra la secuencia correspondiente la cepa 3 identificada como *Staphylococcus stepanovicii*.

>NR_117252.1 *Staphylococcus stepanovicii* cepa 196 16S ARN ribosomal, secuencia parcial

```

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGATGA
GAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAGTACCGGATAATATTTGAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGACGGT
TTCGGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGCGGA
CGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACCGCGGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGTTAGTAACTGAACAAGTCTTGACGGTACC
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
GGGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTTAGCGTGAAATGC
GCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTGCGAAAG
CGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGG
GTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACCGGAAGAA
CCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGATCGCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTT
AAGCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAATACAAAGGGCA
GCGAACCCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAATTATTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTA
CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACAC
ACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTC
GAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACC
TCCTT

```

10.4. CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

Con la finalidad de conocer los tiempos óptimos de crecimiento y medir los efectos de los metales pesados en la cepa, así como la actividad de la enzima GST, se realizó el procedimiento de las curvas de crecimiento en las cepas *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii*. Estas se detallan a continuación.

10.4.1.- *Pseudomona aeruginosa*: La figura 35 muestra los valores de absorbancia y conteo bacteriano obtenidos para esta cepa. La determinación de la curva se realizó por medición de absorbancia a 500 nm y por conteo en Cámara de Neubauer, realizándolo por triplicado para esta cepa bacteriana.

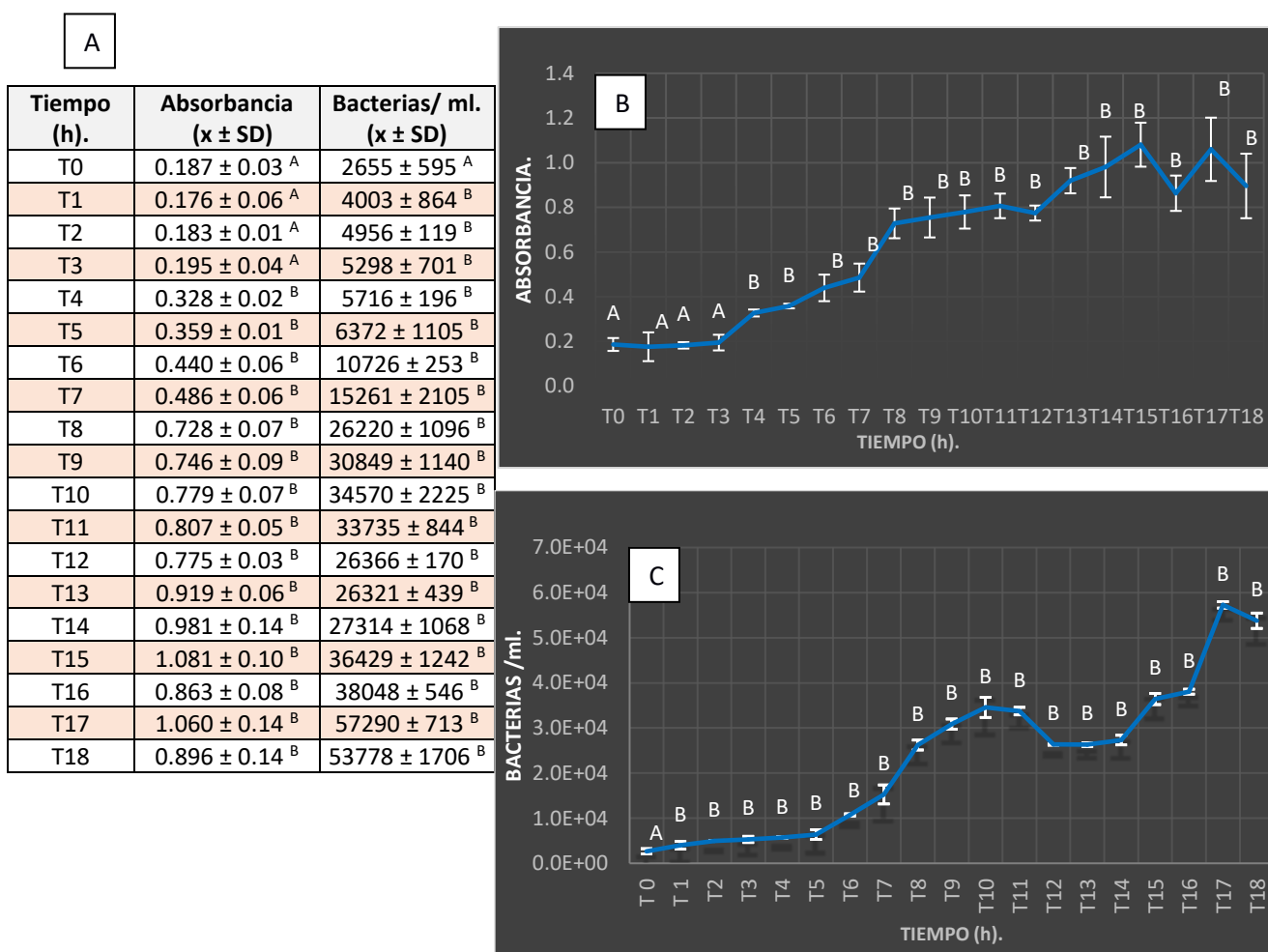


Figura 35. Cinética de crecimientos de *Pseudomona aeruginosa*. (A) Tabla de absorbancia y concentración de bacterias y las gráficas correspondientes a la medición por absorbancia a 500 nm (B) y por conteo directo del número de células en cámara (C). Los datos muestran el promedio y la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de los tiempos iniciales de las concentraciones y absorbancias, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.5$) ($n=3$).

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos por las cinéticas de crecimiento tomando como control el tiempo cero (T0) se evaluaron los puntos donde la curva cambió de pendiente (a los que se llamarán puntos de inflexión) comparándolos con respecto al control (T0) para cada gráfica. La estadística de la gráfica B) permitió determinar que no existieron diferencias significativas entre los primeros tres tiempos con respecto al control (A) ($p > 0.05$) sin embargo, en los tiempos T4 (B) a T18 (B), con respecto al control T (0), se determinó que si existieron diferencias significativas ($p < 0.05$). Para T3 (A) y T4 (B) los resultados fueron significativamente diferentes; los tiempos T8 (B), T9 (B), T10 (B) y T11 (B) no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$). A pesar del decaimiento de la curva en los tiempos T11 (B) y T12 (B), estos no presentan diferencias significativas entre ellos mientras que los tiempos finales de la curva si presentan diferencias significativas lo que explicaría el comportamiento observado a partir del Tiempo 15.

La grafica C) muestra la medición del crecimiento bacteriano por conteo. Al igual que la gráfica B se tomó el T0 como control y se observó que existieron diferencias significativas con respecto a los tiempos T1 al T18. De igual manera, se realizó un análisis estadístico de los puntos de inflexión que muestra la gráfica y se encontró que los tiempos T5 (A) y T6 (B) presentaron diferencias significativas. Al igual que la gráfica A, se compararon los tiempos T8 (B), T9 (C), T10 (A) y T11 (A) en los cuales se observó que solo los tiempos T10 y T11 no presentaron diferencias significativas lo que permitió determinar que el tiempo 10 era un punto óptimo del crecimiento bacteriano. Posteriormente se analizaron los puntos T11 (A) y T12 (B) los que presentaron diferencias significativas. Datos iguales se obtuvieron con los puntos de inflexión de los tiempos T14(B) y T15(A) así como T16 (B) y T17(A) los cuales también presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Después de analizar ambas gráficas se determinó el tiempo 10 como el punto de análisis del efecto de los metales en esta cepa.

10.4.2.- *Staphylococcus sciuri*.

La figura 36 muestra los valores de absorbancia y conteo bacteriano obtenidos de la cepa, en forma de tabla y gráficas.

Se realizó el mismo análisis que en el caso de la cepa anterior, tanto para las mediciones por conteo como por las de absorbancia. La gráfica B) muestra que no existieron diferencias significativas en los tiempos T0 (A) a T2 (A). Al realizar el análisis de los puntos donde la curva cambió de pendiente (a los que se llamarán puntos de inflexión) se observó que los tiempos T4 (B), T5 (A), T6 (B) y T7 (A) mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Sin embargo, al analizar los tiempos T7 (A), T8 (A) y T9(A) no se observaron

diferencias significativas. Se eligió el tiempo óptimo de crecimiento siendo el tiempo 8 (T8). Al analizar el punto de inflexión entre T11 (A) y T12(A) y se llegó a la conclusión de que no existieron diferencias significativas entre ellos. Entre los tres últimos puntos y los puntos 7,8 y 9 si existió diferencia significativa.

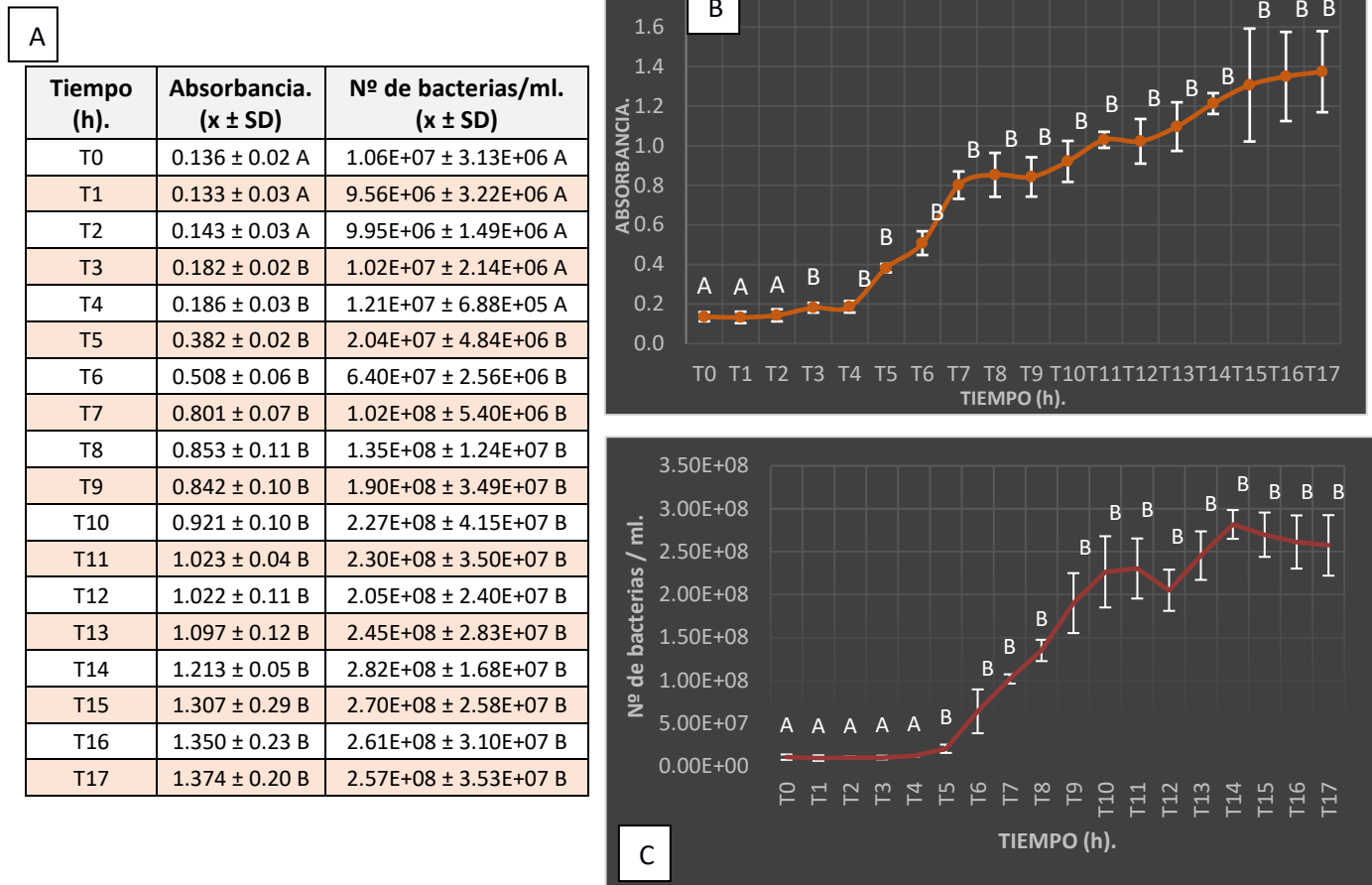


Figura 36.- Cinéticas de crecimientos de la cepa bacteriana *Staphylococcus sciuri*, (A) Tabla de absorbancia y concentración de bacterias y las gráficas correspondientes a la medición por absorbancia a 500 nm la gráfica (B) corresponde a la medición de las absorbancias con respecto al tiempo y la gráfica (C) a la medición por conteo directo del número de células en cámara. Los datos muestran el promedio y la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de los tiempos iniciales de las concentraciones y absorbancias, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.5$) ($n=3$).

El análisis estadístico correspondiente a la gráfica C) muestra que los tiempos T1 (A), T2 (A), T3 (A) y T4(A) no tienen diferencias significativas con respecto al tiempo control (T0) (A), caso contrario a los tiempos T5(B) al T17 (B) donde se observan diferencias significativas con respecto al control. Se analizaron los puntos de inflexión y se observó que los tiempos T4 (B) y T5 (B) presentaron diferencias significativas, al

igual que en la gráfica A se evaluaron los tiempos T7 (B), T8 (A) y T9(A) observándose diferencias significativas entre los puntos T7 y T8, sin embargo, no presenta diferencias con respecto al T9. Se determinó, de nueva cuenta el tiempo 8 (T8) como el tiempo óptimo de crecimiento. Los puntos T11 y T12 no presentaron diferencias significativas.

10.4.3.- *Staphylococcus stepanovicii*.

La figura 37 muestra los valores de absorbancia y conteo bacteriano obtenidos de la cepa, en tabla y gráfica.

Tiempo (h).	Absorbancia. (x ± SD)	Nº de bacterias/ml. (x ± SD)
T0	0.182 ± 0.016 ^A	4.65E+07 ± 1.34E+07 ^A
T1	0.166 ± 0.021 ^A	4.43E+07 ± 3.19E+06 ^A
T2	0.177 ± 0.020 ^A	5.13E+07 ± 1.38E+07 ^A
T3	0.192 ± 0.024 ^A	6.03E+07 ± 1.39E+07 ^A
T4	0.230 ± 0.015 ^B	9.23E+07 ± 3.91E+06 ^B
T5	0.350 ± 0.025 ^B	1.00E+08 ± 6.30E+06 ^B
T6	0.512 ± 0.048 ^B	1.02E+08 ± 1.06E+06 ^B
T7	0.663 ± 0.063 ^B	1.00E+08 ± 5.23E+06 ^B
T8	0.724 ± 0.108 ^B	1.02E+08 ± 4.16E+06 ^B
T9	0.653 ± 0.179 ^B	1.07E+08 ± 1.12E+07 ^B
T10	0.871 ± 0.120 ^B	1.20E+08 ± 1.77E+07 ^B
T11	0.887 ± 0.125 ^B	9.15E+07 ± 7.20E+06 ^B
T12	0.934 ± 0.092 ^B	1.04E+08 ± 1.30E+07 ^B
T13	0.984 ± 0.070 ^B	1.16E+08 ± 1.06E+07 ^B
T14	1.118 ± 0.118 ^B	1.51E+08 ± 2.03E+07 ^B
T15	1.446 ± 0.178 ^B	1.85E+08 ± 1.23E+07 ^B
T16	1.546 ± 0.261 ^B	1.87E+08 ± 1.23E+07 ^B
T17	1.554 ± 0.227 ^B	1.91E+08 ± 8.00E+06 ^B

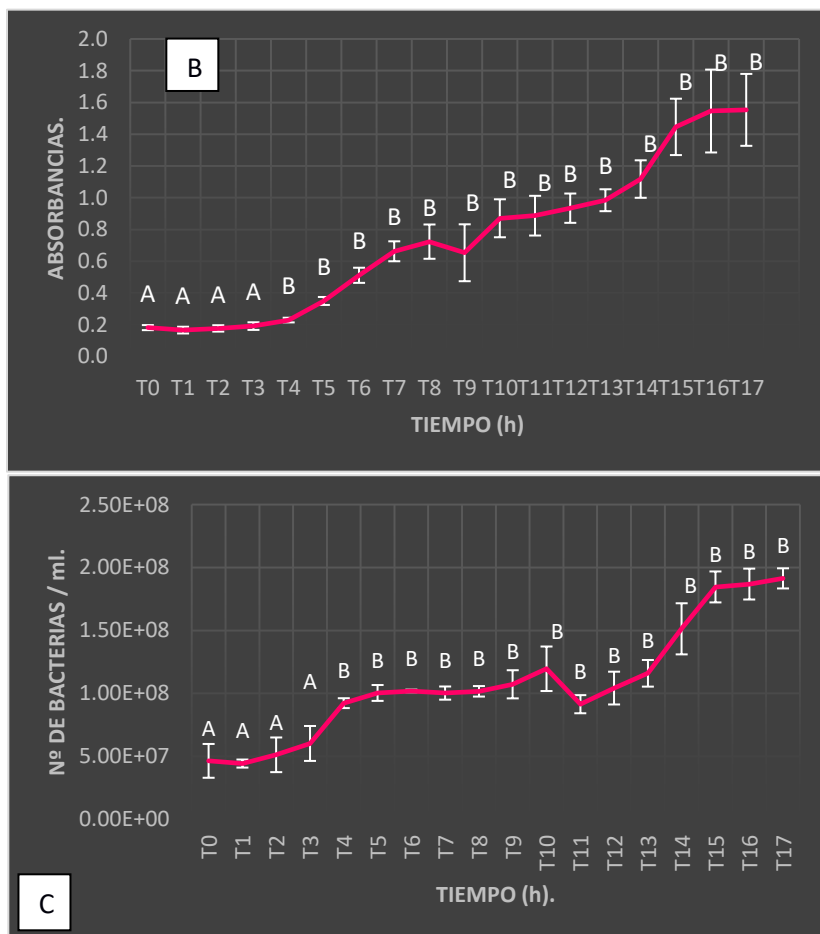


Figura 37. Cinéticas de crecimientos de la cepa bacteriana *Staphylococcus stepanovicii*, (A) Tabla de absorbancia y concentración de bacterias y las gráficas correspondientes a la medición por absorbancia a 500 nm, la gráfica (B) corresponde a la medición de las absorbancias con respecto al tiempo y la gráfica (C) a la medición por conteo directo del número de células en cámara. Los datos muestran el promedio y la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de los tiempos iniciales de las concentraciones y absorbancias, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.5$) ($n = 3$)

La gráfica B) muestra que los tres primeros tiempos T1 (A), T2(A) y T3 (A) de la cinética no presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo control (T0) (A). Se analizaron los puntos de inflexión para observar el comportamiento de la gráfica y poder definir el tiempo óptimo de crecimiento. Los tiempos T4 (B) y T5 (A) mostraron diferencias significativas, posteriormente se analizaron los puntos T8 (A) y T9 (A) los cuales no mostraron diferencias significativas, sin embargo, al analizar el punto T9 (B) y T10(A) se muestran diferencias significativas entre ambos. T10 (A) y el T11(A) no se presentaron diferencias significativas. De acuerdo con los datos, se eligió el tiempo 10 como el punto elegido para llevar a cabo los experimentos correspondientes.

La grafica C) presenta un comportamiento similar a la gráfica (A) en relación con el control (T0), se analizaron los puntos de inflexión y se observó que el tiempo T3 (B) y T4 (A) mostraron diferencias significativas, los puntos T8(A) y T9(A) así como T9 (A) y T (10) (A) no fueron diferentes. Posteriormente se analizaron los puntos T10 (B) y T11(A) así como T14 (B) y T15 (A) los cuales resultaron diferentes significativamente. El T10 resultó ser el punto óptimo de crecimiento. Se constató que a pesar del decaimiento en el punto T11 el crecimiento desde el T5 fue constante hasta el T10.

Para comparar el crecimiento de las tres cepas, se graficaron juntas y se obtuvo la figura 38. Se puede ver que los tiempos seleccionados corresponden a la fase de crecimiento de las tres cepas

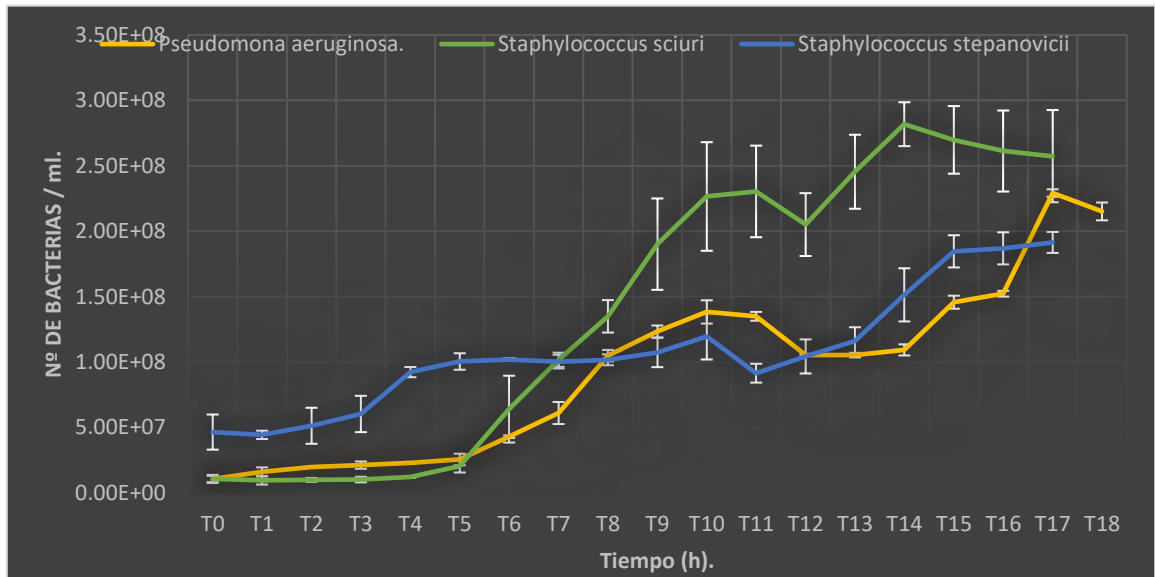
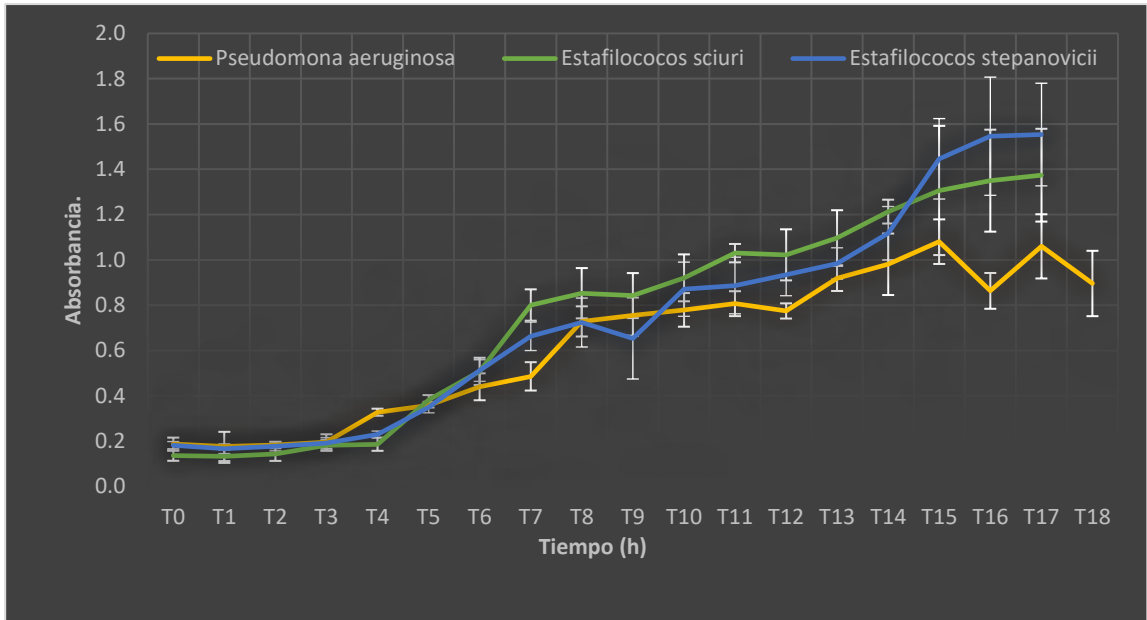


Figura 38. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* en función del tiempo por los métodos de absorbancia y conteo. (n=3)

10.5.- EFECTO DE MERCURIO, CADMIO, CROMO Y PLOMO EN EL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS.

Las tres cepas fueron sembradas en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de cadmio, dicromato de potasio, acetato de plomo y cloruro de mercurio utilizando la técnica de difusión en disco donde se midieron los halos de inhibición en los tiempos de crecimiento mencionados en la sección anterior. Los tiempos de medición de los efectos corresponden a los seleccionados anteriormente. Los valores de 0.0 significan que las bacterias mostraron un crecimiento óptimo al no mostrar halos de inhibición y sensibilidad si los halos mostraban 0.2 mm y los halos de inhibición representan el efecto tóxico del metal sobre el crecimiento de las bacterias.

10.5.1 Mercurio.

La figura 39 muestra el efecto correspondiente sobre el crecimiento de las tres cepas bacterianas en presencia de las concentraciones (0.01 μ M a 6.59 mM) de cloruro de mercurio, en ella es posible observar los halos de inhibición y el crecimiento en función de las concentraciones administradas.

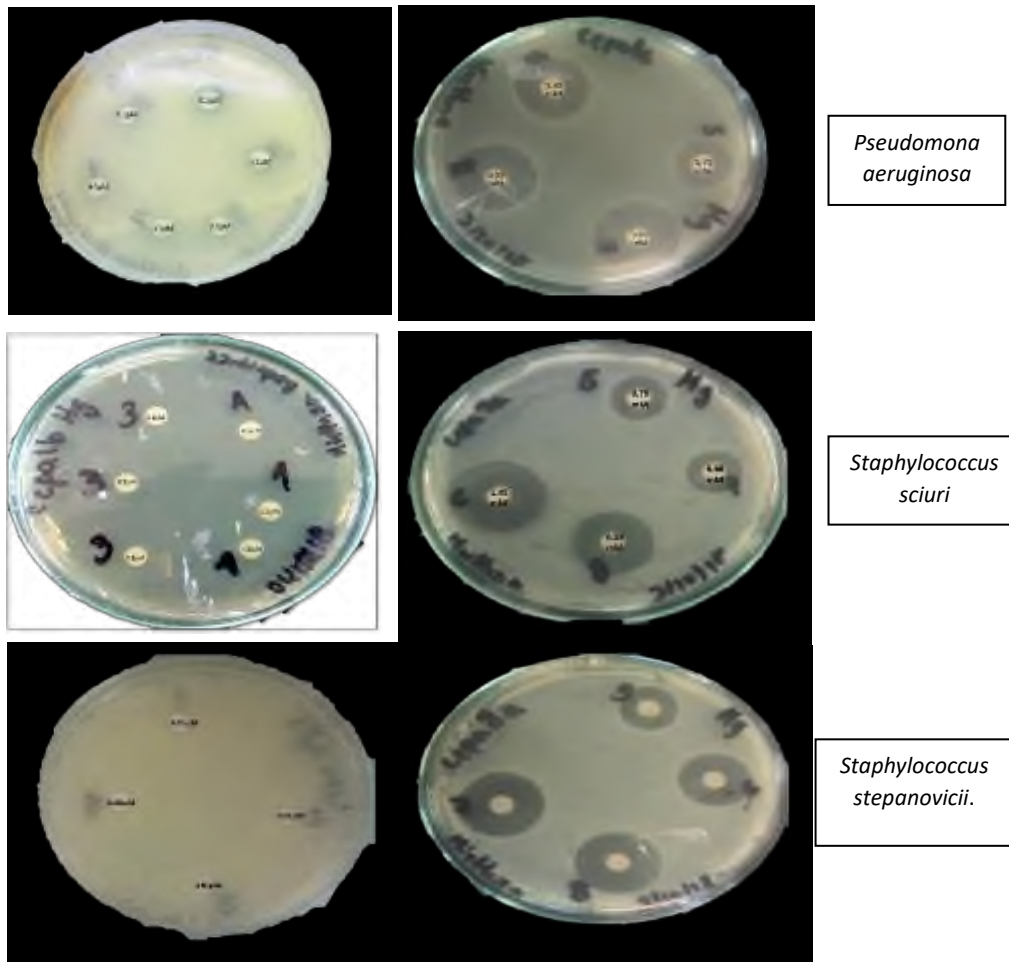
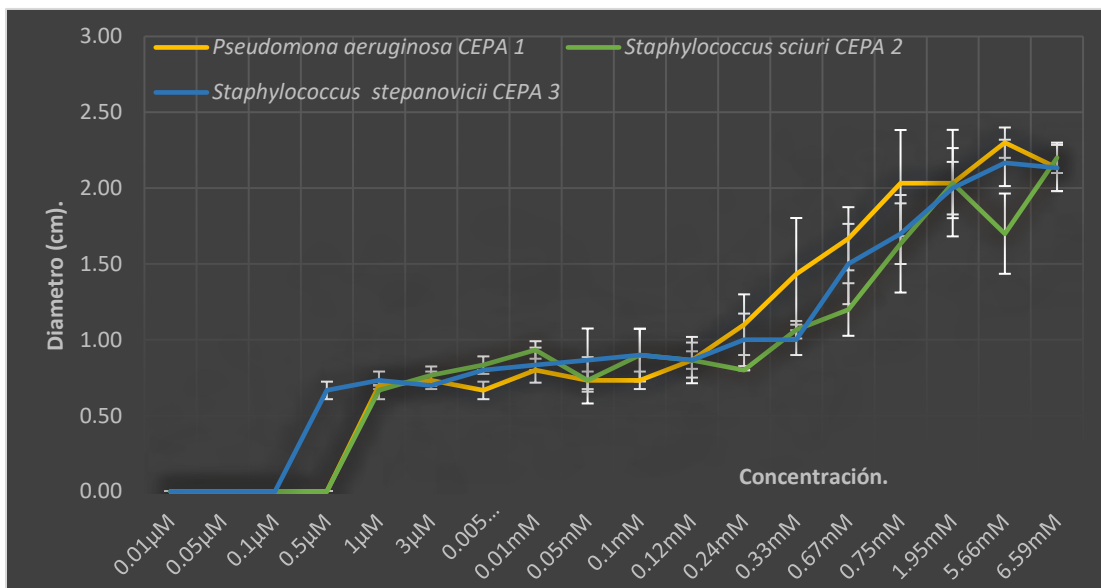


Figura 39. Estudio de la exposición a el metal cloruro de mercurio de las tres cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii*, se midieron los halos de inhibición y se determinó si presentaban sensibilidad o tolerancia. (Fotografías: acervo personal de la autora).

La figura 40 presenta el efecto del cloruro de mercurio en *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* en ella es posible observar que el mercurio surte un efecto diferente en cada una de las cepas conforme se aumentaba la dosis hasta llegar a la concentración final 6.59mM.



Concentración	<i>Pseudomona aeruginosa</i> . Diámetro del halo (cm)	<i>Staphylococcus Sciuri</i> Diámetro del halo (cm).	<i>Staphylococcus stepanovicii</i> . Diámetro del halo (cm)
0.01µM	0	0	0
0.05µM	0	0	0
0.1µM	0	0	0
0.5µM	0	0	0.67 ± 0.06 ^A
1µM	0.7 ± 0.0 ^A	0.67 ± 0.06 ^A	0.73 ± 0.06 ^A
3µM	0.73 ± 0.06 ^A	0.77 ± 0.06 ^A	0.7 ± 0.0 ^A
0.005mM	0.67 ± 0.06 ^A	0.83 ± 0.06 ^A	0.8 ± 0.0 ^A
0.01mM	0.8 ± 0.0 ^A	0.93 ± 0.06 ^A	0.83 ± 0.12 ^A
0.05mM	0.73 ± 0.06 ^A	0.73 ± 0.15 ^A	0.87 ± 0.21 ^A
0.1mM	0.73 ± 0.06 ^A	0.9 ± 0.17 ^A	0.9 ± 0.17 ^A
0.12mM	0.87 ± 0.12 ^A	0.87 ± 0.06 ^A	0.87 ± 0.15 ^A
0.24mM	1.1 ± 0.20 ^E	0.8 ± 0.0 ^C	1 ± 0.17 ^A
0.33mM	1.43 ± 0.40 ^D	1.07 ± 0.06 ^B	1 ± 0.10 ^A
0.67mM	1.67 ± 0.21 ^A	1.2 ± 0.17 ^A	1.5 ± 0.26 ^A
0.75mM	2.03 ± 0.67 ^A	1.63 ± 0.32 ^A	1.7 ± 0.20 ^A
1.95mM	2.03 ± 0.23 ^A	2.03 ± 0.35 ^A	2 ± 0.17 ^A
5.66mM	2.3 ± 0.10 ^A	1.7 ± 0.26 ^A	2.17 ± 0.15 ^A
6.59mM	2.13 ± 0.15 ^A	2.20 ± 0.10 ^A	2.13 ± 0.15 ^A

Figura 40. Tabla y gráfica del efecto de la exposición a mercurio en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* (n=3).

Los resultados indicaron que la cepa más sensible a mercurio fue *Staphylococcus stepanovicii*, la cual mostró crecimiento hasta la concentración de 0.1 μM . Las dos cepas restantes *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri* presentaron tolerancia hasta la concentración 0.5 μM . El comportamiento de las cepas expuestas a mercurio fue muy similar entre ellas. Se pudo observar que a partir de la concentración de 0.24 mM las tres cepas presentan diferencias significativas en el halo de inhibición debido a que comenzó a incrementar más rápidamente hasta llegar a la concentración de 6.59 mM. Estos resultados mostraron que los tres microorganismos solo pueden tolerar concentraciones micromolares de mercurio de 0.1 a 0.5.

En relación con los resultados obtenidos en este trabajo, en la literatura se ha reportado que la cepa *Pseudomona aeruginosa* presenta altos niveles de resistencia, tanto intrínseca como adquirida, a diversos antibióticos (Strateva y Yordanov, 2009). De igual en esta bacteria se ha observado una resistencia a diferentes metales pesados lo que implica una co-selección en los mecanismos de resistencia (Pitondo-Silva *et al*, 2016). Se ha reportado que la resistencia a metales pesados en *Pseudomona aeruginosa* podría deberse a la generación de mecanismos de detoxificación y/o tolerancia, tales como reducción de metales; precipitación en forma de sales metálicas; secuestro, unión a metalotioneínas y remoción del exceso de iones metálicos fuera de la célula por diferentes mecanismos de transporte como las bombas de salida (Mihdir, 2016).

En el caso de *Staphylococcus sciuri* se ha demostrado que varios de los miembros de este género poseen múltiples genes de resistencia, en especial el gen *mec A* (Orozco, *et.al.*, 2017). Este dato podría ayudar a entender la tolerancia presentada por *Estafilococos sciuri* a la concentración de 0.5 μM demostrada en este trabajo de investigación. En estudios realizados por Altalhi (2009); Martínez (2010) y Heck (2015) se ha mencionado que los géneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Methylococcus*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Planococcus*, ***Staphylococcus***, *Streptomyces* y *Pseudomonas* son tolerantes a los iones metálicos Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} .

Un estudio realizado por Altalhi, 2009 demostró la bioadsorción de hasta un 90.4% de mercurio en cultivos conjuntos de *Bacillus subtilis* y *Pseudomona aeruginosa*, en un lapso de 40 y 60 minutos. Un estudio de sensibilidad a mercurio en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* demostró que de 237 muestras analizadas solo el 32% presentó o desarrolló resistencia a concentraciones de 380 μg de mercurio/mL. De la misma forma estas cepas presentaron la mayor resistencia a diversos antibióticos, al telurito y el arseniato (Cervantes, 1987; Tarangini, 2009). No se cuenta con datos bibliográficos que permitan conocer

la tolerancia de *Staphylococcus sciuri* y *S. stepanovicii* a mercurio. Sin embargo, algunos estudios han demostrados su resistencia a diversos antibióticos. Un estudio afirmó que la producción de *B-lactamasas* le confiere resistencia a la penicilina, las β -lactamasas son codificadas por los genes *blaZ* los cuales son regulados por un inductor *blaI* y un receptor *blaR*, este *operón bla* es localizado en plásmidos y una localización cromosomal en el transposón Tn552 (Jensen *et.al.*, 2009). Otro mecanismo reportado se relaciona con el gen *mecA* que codifica a la proteína *PBP2a*, quienes confieren la resistencia a algunos antibióticos *B-lactamicos* incluyendo metacilinas, oxicilina y cefalosporinas (Cuoto *et al.*, 1996).

10.5.2 Cadmio

Las concentraciones utilizadas fueron de 0.01 μ M a 6.59 mM. La figura 41 muestra las observaciones en las cajas Petri para cada cepa microbiana. Se puede ver que los halos de inhibición presentaron diferente tamaño de halo para cada cepa, a pesar de que en algunas cepas los halos de inhibición eran mayores a 0.5mm con el mercurio.

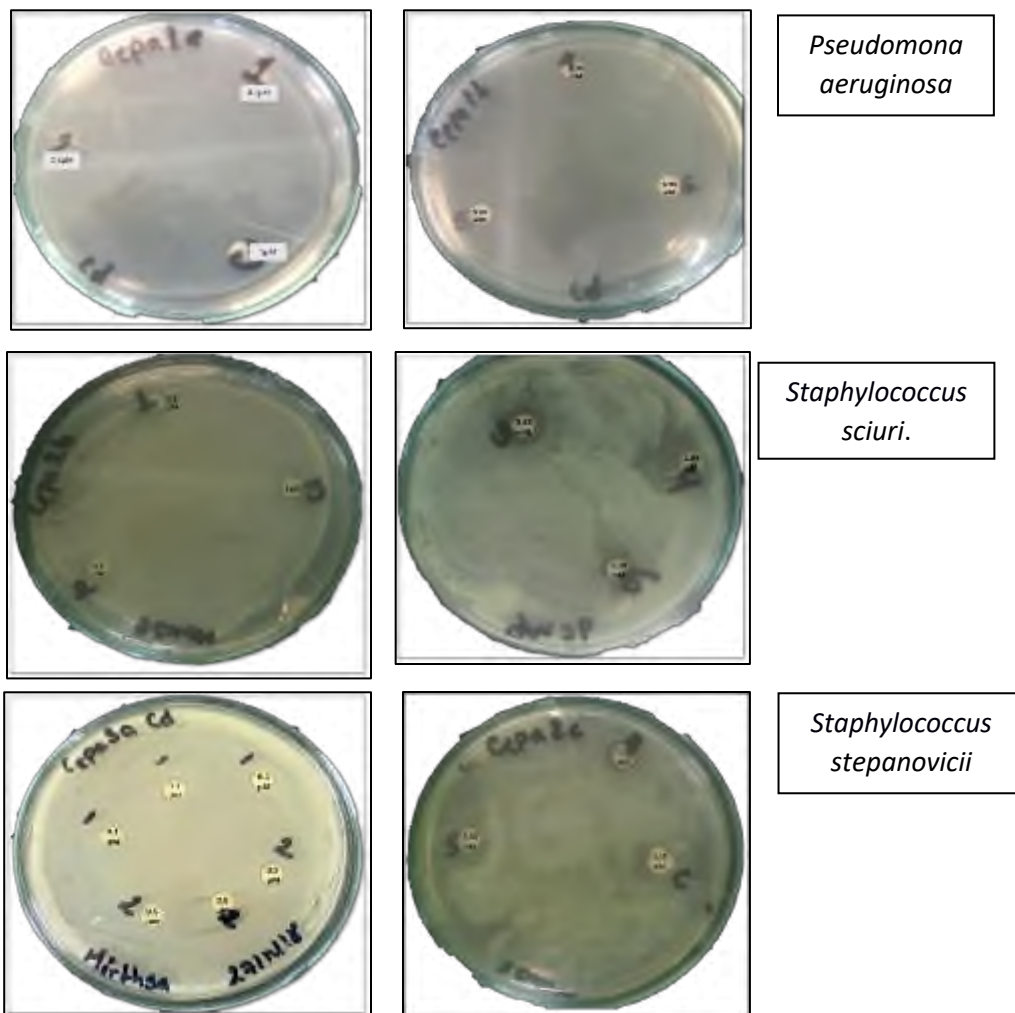


Figura 41. Estudio de la exposición a Cadmio. Muestran las tres cepas sembradas en placa en presencia de los discos que contenían las diferentes concentraciones de cadmio. Se observan los halos de inhibición (Fotografías: acervo personal de la autora)

A partir de las observaciones de las cajas Petri se procedió a realizar la cuantificación de los halos de inhibición, para evaluar el efecto del metal. La figura 42 muestra la tabla y la gráfica con el promedio y la desviación estándar de los halos de inhibición obtenidos para cada cepa bacteriana.

Concentración.	<i>Pseudomona aeruginosa</i> Diámetro del halo (cm)	<i>Staphylococcus sciuri</i> . Diámetro del halo (cm)	<i>Staphylococcus stepanovicii</i> Diámetro del halo (cm)
0.1µM	0	0	0.87 ± 0.12 ^A
0.5µM	0	0	0.73 ± 0.06 ^A
1µM	0	0	0.77 ± 0.06 ^A
0.005mM	0	0	0.73 ± 0.06 ^A
0.01mM	0	0	0.77 ± 0.06 ^A
0.05mM	0	0	0.73 ± 0.06 ^A
0.12mM	0	0	1.23 ± 0.15 ^A
0.24mM	0	0	1 ± 0.10 ^A
0.33mM	0	0	1.13 ± 0.15 ^A
0.67mM	0.7 ± 0.10 ^A	0.93 ± 0.06 ^A	1.2 ± 0.10 ^A
0.75mM	0.77 ± 0.12 ^E	1.07 ± 0.15 ^B	1.17 ± 0.06 ^A
1.95mM	0.9 ± 0.35 ^D	1 ± 0.10 ^C	1.17 ± 0.12 ^A
5.66mM	0.87 ± 0.12 ^E	1.5 ± 0.26 ^D	1.73 ± 0.32 ^B
6.59mM	1 ± 0.26 ^E	1.9 ± 0.17 ^C	1.83 ± 0.23 ^A

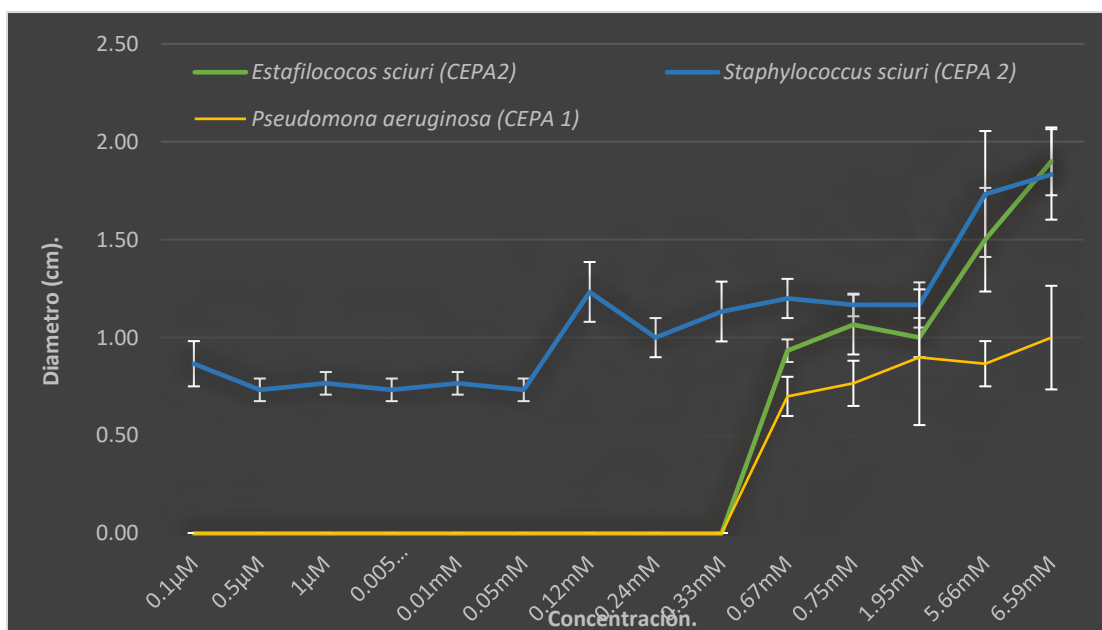


Figura 42. Tabla y gráfica del efecto de la exposición a diferentes concentraciones de cadmio sobre el crecimiento de las bacterias *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii*.

Las tres cepas presentaron una sensibilidad diferencial debido a que los halos de inhibición fueron diferentes entre las concentraciones administradas de cada cepa bacteriana. *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri* presentaron crecimiento en presencia de cadmio en el intervalo de concentraciones de 0.1 μM a 0.33 mM. Se pudo ver que, entre estas dos cepas, *Pseudomona aeruginosa* toleró más las diferentes concentraciones de metal ya que a partir de la concentración 0.67 mM la inhibición del crecimiento fue menor que en *Staphylococcus sciuri*. *Staphylococcus stepanovicii* presentó la mayor sensibilidad a la exposición con el metal inhibirse el crecimiento en todas las concentraciones administradas. De igual manera se puede observar que a partir de la concentración 0.75mM las tres cepas presentan diferencias significativas de los halos de inhibición al aumentar considerablemente hasta la concentración 6.59mM.

Estos resultados mostraron que el efecto del cadmio es diferente al observado con el mercurio, ya que, en el segundo, las tres cepas toleraron concentraciones micromolares y después se inhibió su crecimiento. El cadmio permitió ver que *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri* presentaron tolerancia hasta concentraciones del orden mM.

Toribio-Jiménez *et.al*, (2014) aislaron cepas del jale minero El Fraile el cual cuenta con un contenido de metales solubles muy heterogéneos: Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} . Su acumulación en el suelo ha generado riesgo para los individuos que viven en las cercanías ya que se han aislaron cepas tolerantes a Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , y As^{3+} las cuales fueron identificadas como *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, y *Bacillus sp*

En 2020, Cabudivo y Tapayuri aislaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de zonas intrahospitalarias y ambientales. Estas se colocaron en placas con agar Tripticosa soya (TSA) más Pb, Cd y Cr a las concentraciones 0.5, 1 y 1.5 mM para realizar una primera selección. Posteriormente las cepas seleccionadas fueron sometidas a diferentes ensayos para determinar el nivel de asimilación de los metales Pb, Cd y Cr, a las concentraciones de 50, 100 y 150 ppm de cada uno. Se observó que ambas cepas asimilaron en su totalidad las concentraciones administradas de los metales utilizados, sin embargo 3 cepas ambientales y 1 cepa intrahospitalaria no fueron capaces de consumir la totalidad de las 150 ppm de Cadmio (Cabudivo, *et., al.*, 2020).

Abubark (2003) realizó un estudio en el cual aisló 126 cepas de *Staphylococcus sciuri* de Grey Treefrogs con la finalidad de observar si las cepas presentaban genes de resistencia presentes en *Staphylococcus aureus* los cuales le conferirían resistencia a cadmio. Los genes que investigo fueron CadA (mayor resistencia a cadmio) y CadB/D (menor resistencia a cadmio). En su estudio realizó ensayos de tolerancia a concentraciones de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 300 $\mu\text{g/ml}$, posteriormente seleccionó 6 cepas resistentes, 6 cepas

intermedias y 6 cepas sensibles las cuales analizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para CadA Y cadB/D analizo el ADN cromosomal de *Staphylococcus sciuri* obteniendo como resultado la amplificación de las cepas F5C20 (resistente a cadmio) y F1C20. De igual manera amplificaron 540pb observadas en la cepa F1C20 intermedia, así como F2C4 y F2C5 sensibles. Posteriormente clonaron y secuenciaron el DNA de los genes CadA y CadB utilizando primers específicos y un análisis por medio del sistema BLAST, encontrando que *Staphylococcus sciuri* F5C20 resistente presentó homólogos de CadA y *Staphylococcus sciuri* F1C20 intermedio presentó homólogos de CadB/D provenientes de *Staphylococcus aureus* (Abubark, 2003).

10.5.3 Cromo.

La figura 43 muestra las imágenes de los halos de inhibición de las tres cepas bacterianas. En este caso, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri* resultaron muy resistentes a cromo, siendo la *Staphylococcus sciuri* el único que resistió todas las concentraciones del metal

En la figura 44, se puede observar que *Staphylococcus sciuri* mostró mayor tolerancia a cromo al no presentar inhibición del crecimiento a todas las concentraciones; *Pseudomona aeruginosa* también presentó tolerancia significativa hasta la concentración de 5.66mM. *Staphylococcus stepanovicci* resultó ser la más sensible en los ensayos con cromo. Se observó una inhibición del crecimiento a partir de la concentración 0.12Mm.

Los ensayos realizados con cromo mostraron que *Staphylococcus sciuri* fue la cepa que presentó la mayor tolerancia al no verse inhibido su crecimiento en todas las concentraciones utilizadas a diferencia del *Staphylococcus stepanovicii* el cual presento tolerancia hasta la concentración 0.05 mM, la *Pseudomona aeruginosa* mostro tolerancia hasta la concentración 1.95Mm, estudios realizados han demostrado que *Staphylococcus sciuri* ha mostrado alta resistencia a múltiples metales pesados siendo capaz de remover el 93% de Cr⁶⁺ de suelos contaminados (Elahi, 2019). Castro en el 2017 estudio la ecotoxicidad de algunos microorganismos que habitan en el lago de Maracaibo (Venezuela) observando que todas las cepas bacterianas estuvieron conformadas por Bacilos Gram (-) a excepción de los géneros *Bacillus*, *Bordetella* y *Acinetobacter*. Una vez identificadas las cepas bacterianas seleccionadas se procedió a la realizar pruebas de resistencia a metales pesados encontrando que las bacterias fueron más sensibles a la presencia de Cr⁶⁺, así como a Cd²⁺, sin embargo, casi todas las cepas presentaron tolerancia a Pb²⁺, posiblemente estos resultados fueron obtenidos por la existencia de estos contaminantes dentro del ecosistema de procedencia (Castro, 2017).

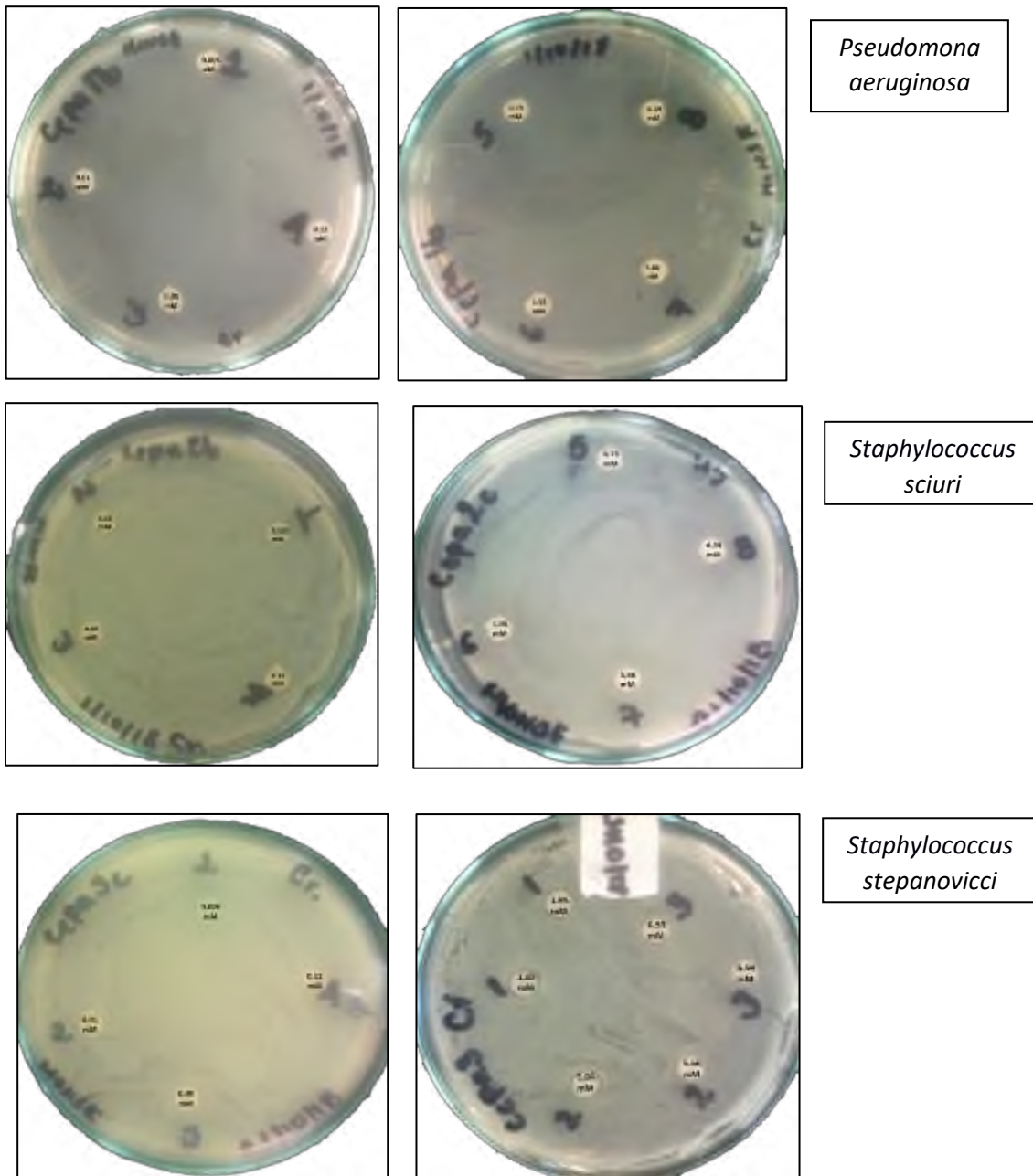


Figura 43 .-Estudio de la exposición a Cromo. Muestran las tres cepas sembradas en placa en presencia de los discos que contenían las diferentes concentraciones de cromo. (Fotografías: acervo personal de la autora).

Concentración.	<i>Pseudomona aeruginosa</i> Diámetro del halo (cm)	<i>Staphylococcus sciuri</i> Diámetro del halo (cm)	<i>Staphylococcus stepanovicii</i> Diámetro del halo (cm)
0.005mM	0	0	0
0.01mM	0	0	0
0.05mM	0	0	0
0.12mM	0	0	0.87 ± 0.15 ^A
0.24mM	0	0	1.0 ± 0.17 ^A
0.33mM	0	0	1.0 ± 0.10 ^A
0.67mM	0	0	1.5 ± 0.26 ^A
0.75mM	0	0	1.7 ± 0.2 ^A
1.95mM	0	0	2.0 ± 0.17 ^A
5.66mM	1.7 ± 0.36 ^A	0	2.17 ± 0.15 ^A
6.59mM	1.3 ± 0.29 ^B	0	2.13 ± 0.15 ^B

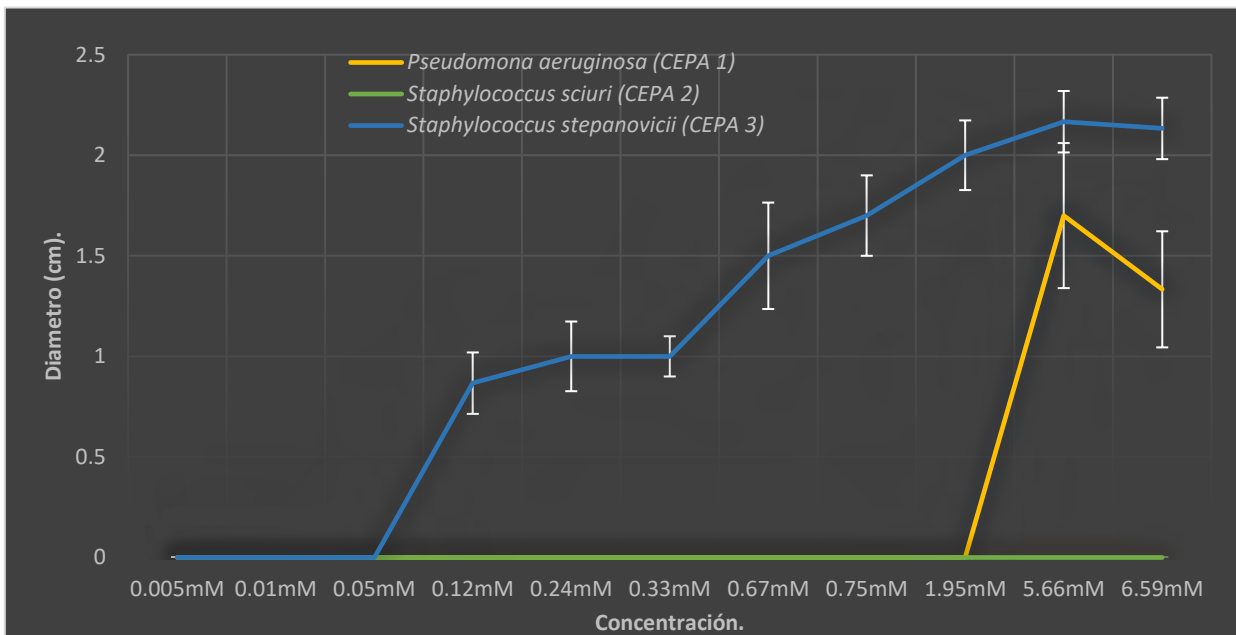


Figura 44. Tabla y grafica del efecto de la exposición a diferentes concentraciones de cromo sobre el crecimiento de las bacterias *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii*. (n=3).

Los resultados mostraron que *Staphylococcus sciuri* es un microorganismo tolerante a cromo, mientras *Staphylococcus stepanovicii* y *Pseudomona aeruginosa* presentaron tolerancia hasta las concentraciones 0.05 y 1.95 mM respectivamente, lo que las convierte en cepas menos tolerantes. A partir de la concentración 5.66mM existen diferencias significativas entre los halos de inhibición de las dos cepas bacterianas al verse afectados por el metal los halos fueron mayores. En el caso del *Staphylococcus*

stepanovicii se puede considerar que posiblemente utilice mecanismos muy parecidos a los que presenta el *Staphylococcus sciuri* al pertenecer a la misma familia, de igual manera es bien sabido que las bacterias son capaces de adaptarse a diversos medios utilizando los mecanismos necesarios de adaptación, así como la captación de diversos plásmidos conferidos de otras cepas bacterianas (De Vos *et al.*, 2009; Hauschild *et al.*, 2010).

10.5.4 Plomo.

La figura 45 muestra los halos de inhibición en las cajas Petri de las tres cepas bacterianas. En ella se puede observar que *Pseudomonas aeruginosa* presentó menos halos de inhibición en un número mayor de concentraciones que las bacterias *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii*.

Estos resultados indican que las bacterias de estudio presentan, de igual forma que con los metales anteriores, diferente tolerancia a estas y que *Pseudomonas aeruginosa* fue resistente a concentraciones del orden mM, mientras que los dos estreptococos fueron sensibles a todas las concentraciones de plomo utilizadas.

A partir de las observaciones en las cajas Petri se procedió a realizar la tabla y la gráfica de resultados que se presenta en la figura 46. Hasta aquí se ha observado como las cepas microbianas presentan diferente sensibilidad a los metales pesados plomo, cromo, cadmio y mercurio. Estas diferencias posiblemente se deban a mecanismos de resistencia que pueden expresarse en las diferentes bacterias. Entre estos mecanismos se encuentran las proteínas. Se ha reportado que las metalotioneínas constituyen un tipo de proteínas que poseen una significativa cantidad de residuos de cisteína (Cys), lo cual les confiere cargas negativas que les proporcionan la capacidad para unirse a iones metálicos. La biosíntesis de estas proteínas puede ser inducida en respuesta a la presencia de metales como Cd, Pb, Zn, y Cu. Se ha comprobado la existencia de genes específicos que codifican estas proteínas en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. En ambas se ha encontrado el gen *bmtA* (Naik *et al.*, 2013). *Pseudomonas spp.* Puede utilizar mecanismos de biosorción y bioacumulación (usando las metalotioneínas), como estrategia para tolerar altas concentraciones de plomo. Como resultado de sus experimentos encontraron que, algunos de sus aislados bacterianos (etiquetados como P01, P02, P05 y P06) tuvieron la capacidad de crecer en un medio que contenía hasta 2500 mg/L de plomo (Bedoya, *et al.* 2019).

Naik y Dubey (2013) reportaron que la producción de pigmentos también puede jugar un papel importante para la tolerancia al plomo bajo condiciones de estrés en *Pseudomonas spp.* Esto se debe a que los sideróforos presentes en los pigmentos pueden formar complejos estables con los metales como Cd^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} y Cu^{+2} , lo cual influye en la movilidad del metal en el medio y por lo tanto se considera una

estrategia importante de la célula para secuestrar el metal tóxico y sobrevivir sin que su presencia afecte su crecimiento (Naik.et.al, 2013).

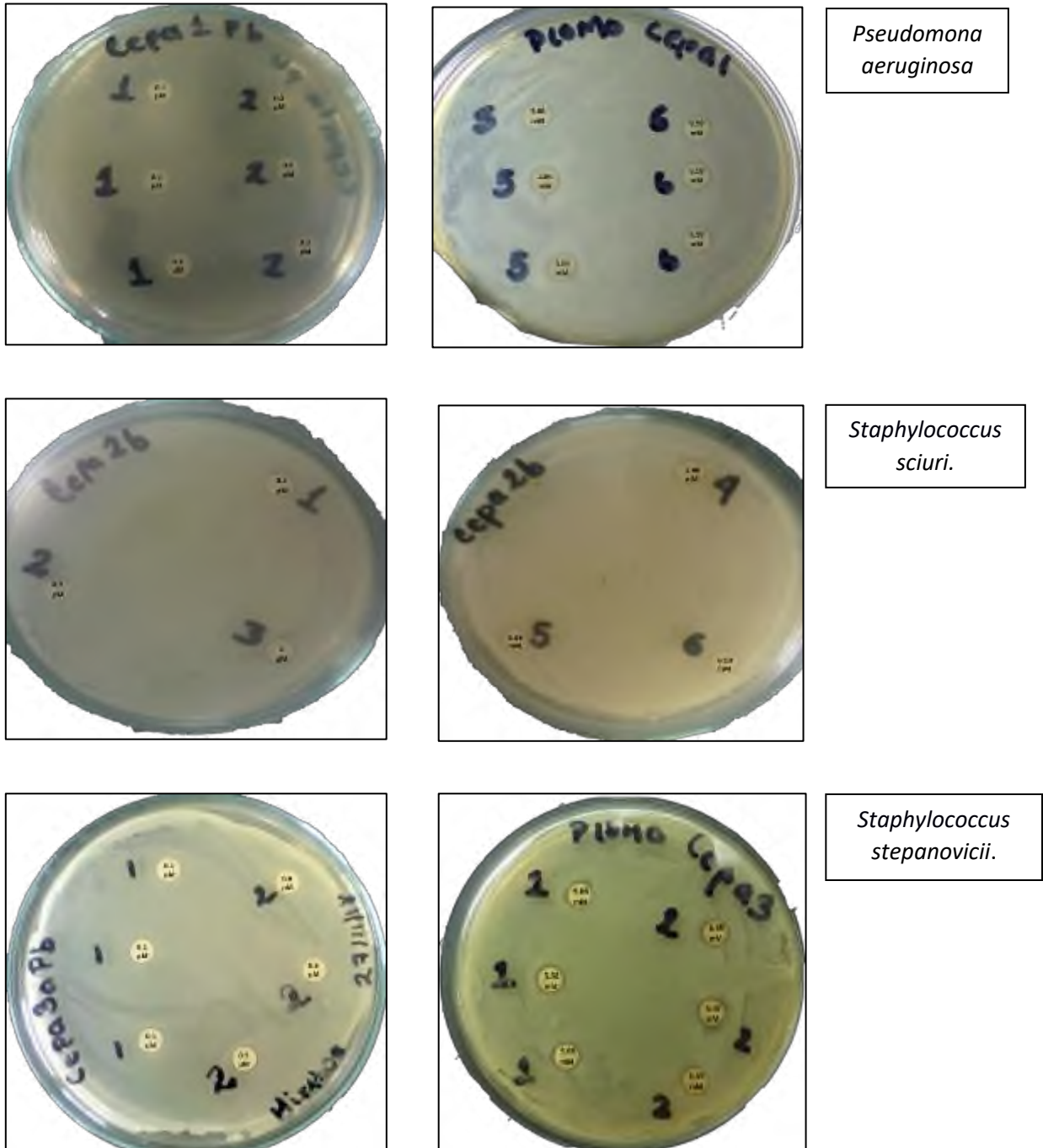


Figura 45. Placas de Petri de la exposición a plomo. Muestran las tres cepas sembradas en placa en presencia de los discos que contenían las diferentes concentraciones de Plomo. Se observan los halos de inhibición (Fotografías: acervo personal de la autora).

Concentración.	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Estafilococos sciuri</i>	<i>Estafilococos stepanovicii</i>
0.1µM	0	0.73 ± 0.06 ^A	0.77 ± 0.06 ^A
0.5µM	0	0.77 ± 0.06 ^A	0.73 ± 0.06 ^A
1µM	0	0.80 ± 0.10 ^C	0.73 ± 0.06 ^A
0.005mM	0	0.77 ± 0.06 ^B	0.70 ± 0.10 ^B
0.01mM	0	0.77 ± 0.06 ^C	0.70 ± 0.0 ^A
0.05mM	0	0.80 ± 0.0 ^B	0.70 ± 0.10 ^A
0.12mM	0	0.77 ± 0.06 ^A	0.77 ± 0.06 ^A
0.24mM	0	0.77 ± 0.06 ^A	0.67 ± 0.06 ^A
0.33mM	0	0.80 ± 0.10 ^A	0.77 ± 0.06 ^A
0.67mM	0	0.77 ± 0.06 ^A	0.80 ± 0.10 ^A
0.75mM	0	0.73 ± 0.06 ^A	0.80 ± 0.17 ^A
1mM	0.63 ± 0.06 ^A	0.63 ± 0.06 ^A	0.83 ± 0.06 ^A
1.5mM	0.63 ± 0.06 ^A	0.63 ± 0.06 ^A	0.80 ± 0.0 ^A
1.95mM	0.83 ± 0.23 ^A	0.67 ± 0.06 ^A	0.70 ± 0.0 ^A
5.66mM	0.80 ± 0.10 ^A	0.70 ± 0.00 ^A	0.77 ± 0.06 ^A
6.59mM	0.77 ± 0.06 ^A	0.73 ± 0.06 ^A	0.77 ± 0.06 ^A

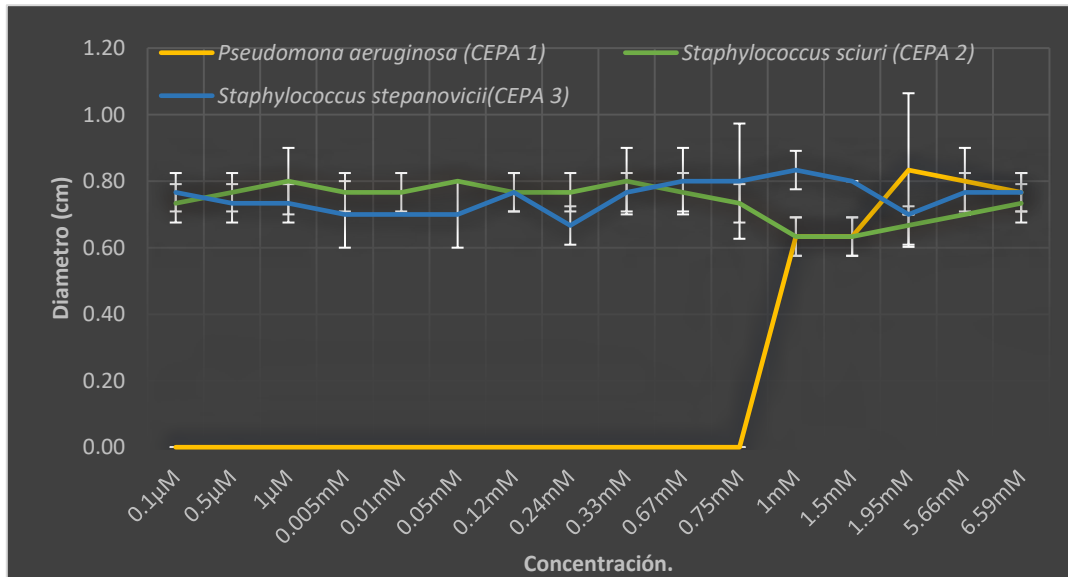


Figura 46. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de plomo sobre el crecimiento de las bacterias *Pseudomona aeruginosa* *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii*.

Como resultado de los experimentos realizados se observó que el efecto de la exposición a los metales mercurio, cadmio, cromo y plomo en las cepas *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* dependió del tipo de metal y de la concentración utilizada. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Efecto de los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo en el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii*. (n=3).

Metal	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Staphylococcus stepanovicii</i>
Mercurio	Hasta 0.5 μ M	Hasta 0.5 μ M	Hasta 0.1 μ M
Cadmio	Hasta 0.33 mM	Hasta 0.33 mM	Inhibido por todas las concentraciones
Cromo	Hasta 1.9 mM	Crece en todas las concentraciones	Hasta 0.05 mM
Plomo	Hasta 0.75 mM	Inhibido por todas las concentraciones	Inhibido por todas las concentraciones

La tabla 8 indica que el mercurio fue tolerado solo a concentraciones micromolar por las tres cepas, siendo *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri* las más tolerantes a este metal. *Staphylococcus sciuri* fue sensible a todas las concentraciones de plomo, pero tolerante a cromo creciendo en todo el intervalo de concentraciones; de la misma forma creció hasta las concentraciones de 0.5 μ M de mercurio y 0.33 mM de cadmio. *Staphylococcus stepanovicii* fue sensible a cadmio y a plomo. Si se observa esta bacteria se podrá constatar que fue la más sensible a los cuatro metales ya que solo toleró concentraciones de 0.1 μ M de mercurio y 0.05 mM de cromo. *Pseudomona aeruginosa* creció en los cuatro metales, pero ese crecimiento dependió de la concentración del metal y fue la única que creció en presencia de plomo. Todos estos resultados demuestran que los metales estudiados ejercen diferentes efectos en cada una de las cepas estudiadas y qué estas son o no capaces de expresar diferentes mecanismos de resistencia para poder crecer en presencia de los metales. De esta forma, los resultados obtenidos sirven como antecedentes de futuros estudios dedicados a la exploración de los diferentes mecanismos de daño de los metales y de los mecanismos de resistencia expresados en estas bacterias.

La tabla 8 se realizó para comparar los resultados en las tres cepas y su respuesta ante cada metal, a continuación, se muestran las gráficas juntas conformando la figura 47 en donde se puede observar la sensibilidad de las bacterias (por separado) frente a los cuatro metales pesados.

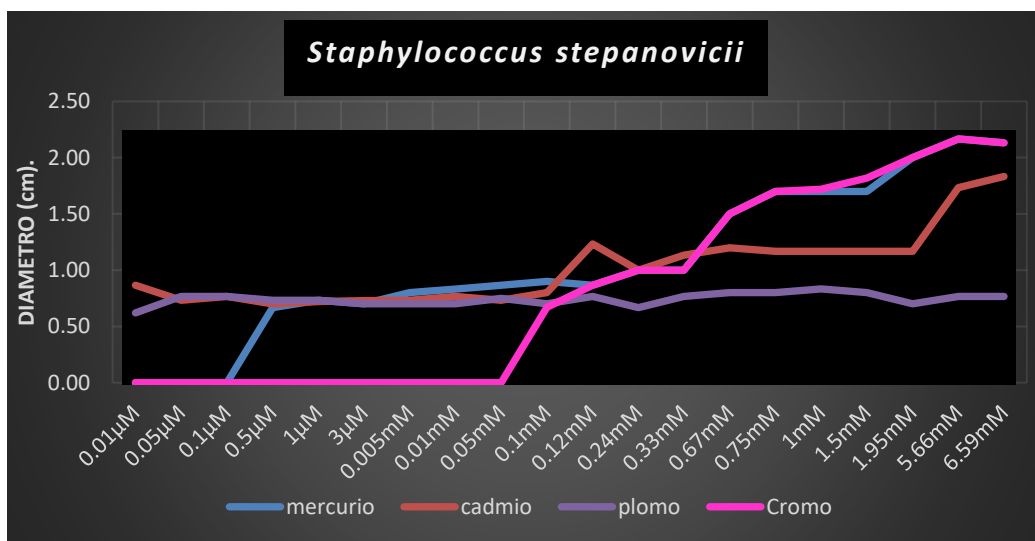
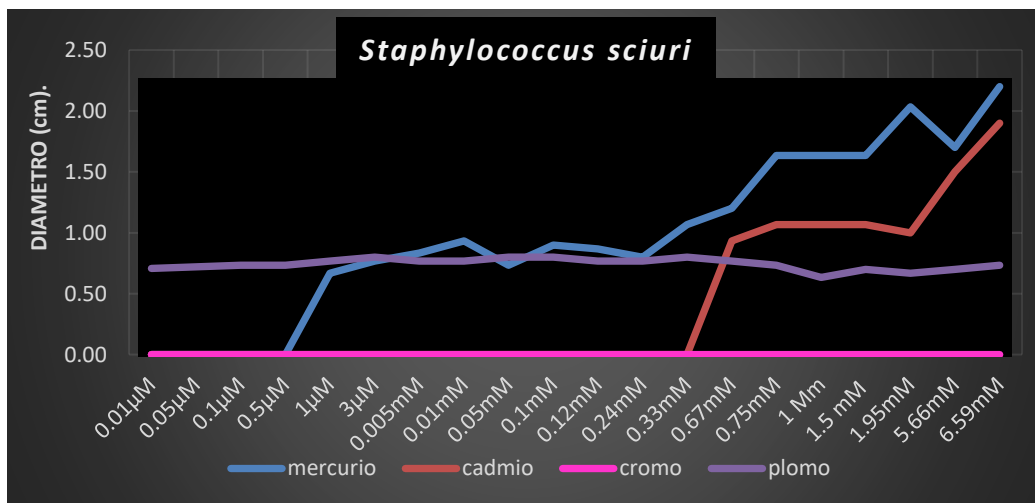
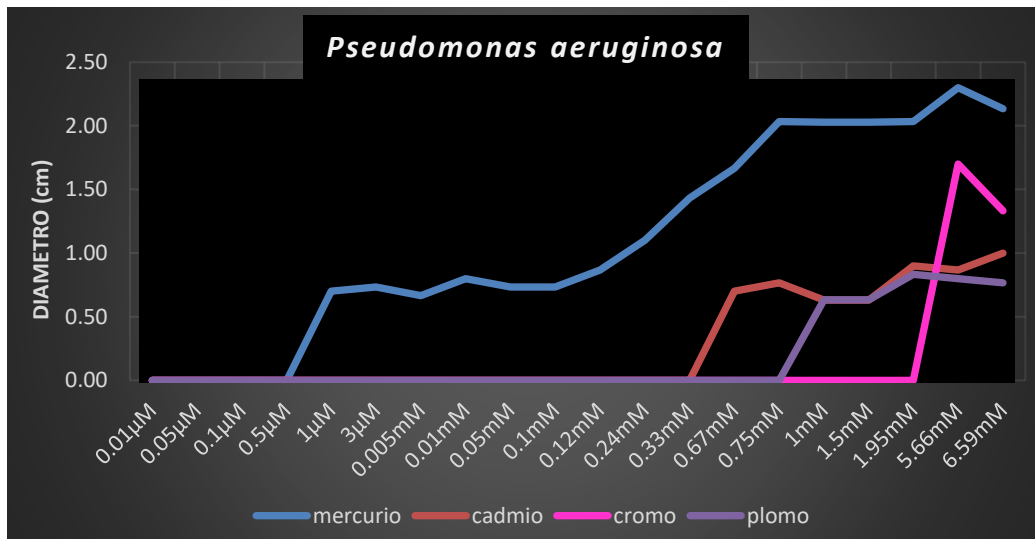


Figura 47. Efecto de los metales mercurio, cadmio, cromo y plomo en el crecimiento de cada cepa bacteriana

Es común que los microorganismos nativos de sitios contaminados con metales muestren resistencia a los determinados iones metálicos, debido a que poseen mecanismos activos o pasivos que les permiten removerlos o detoxificarlos. Se ha reportado que *Pseudomonas aeruginosa* y *Cupriavidus metallidurans* cuentan con una proteína ChrA que funciona como una bomba expulsora de cromato permitiéndoles la resistencia al ion (Ramírez, *et. al.*, 2008). Por lo tanto, pueden existir mecanismos específicos que le permiten a los microorganismos generar resistencia a metales pesados, estos mecanismos podrían ser propios del metabolismo de la bacteria o bien desarrollados por influencia del entorno original. Se sabe que bacterias del género *Pseudomonas* spp., están presentes en la mayoría de los ecosistemas de suelo y del agua, siendo capaces de metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, además son conocidas por su capacidad de tolerar y resistir moléculas tóxicas, incluidos antibióticos, metales pesados, detergentes y disolventes orgánicos (Chien *et. al.*, 2013). Estudios realizados por Gutiérrez y su grupo de investigación revelaron que *Pseudomonas aeruginosa* presento resistencia a metales como Cu, Zn, Pb, Ba y Se, y susceptibilidad a metales como Hg⁺², Ag⁺², y Te⁺⁴ (Gutiérrez, 2017). Lo anterior podría ayudar a comprender porque la cepa, aislada en este trabajo de Tesis, presentó esa susceptibilidad a mercurio con respecto a los otros metales. Sin embargo, aunque muestra inhibición en el crecimiento a ciertas concentraciones la cepa *Pseudomonas aeruginosa* fue capaz de resistir a los cuatro metales pesados, Varios estudios han demostrado que esta bacteria presenta resistencia natural a una gran variedad de antibióticos, además de la capacidad que tiene para adquirir mecanismos adicionales de resistencia a través de elementos genéticos móviles, por lo cual se ha considerado un fenómeno de resistencia a antibióticos y metales pesados (Strateva *et. al.*, 2009). Por otro lado, la producción de pigmentos también puede jugar un papel importante en la tolerancia a los metales pesados, se ha informado que, bajo condiciones de estrés por la presencia de altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, se puede inducir la producción de pigmentos al medio en respuesta a estos elementos tóxico (Naik *et. al.*, 2013). Esto se debe a que los sideróforos presentes en los pigmentos pueden formar complejos estables con los metales como el Cd⁺², Zn⁺², Pb⁺² y Cu⁺², lo cual influye en la movilidad del metal en el medio y por lo tanto se considera una estrategia importante de la célula para secuestrar el metal tóxico y sobrevivir sin que su presencia afecte su crecimiento (Naik y Dubey, 2012, 2013). Otros mecanismos de resistencia reportados para *Pseudomonas aeruginosa* comprenden la presencia de β-lactamasas; la alteración de la permeabilidad de la membrana producidas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales (Gómez *et al*, 2005). *Staphylococcus sciuri* puede presentar mecanismos que le permitieron resistir a tres de los cuatro metales pesados utilizados, estos mecanismos pudieron ser obtenidos en el entorno original, *S. sciuri* es

considerada una de las especies más primitivas del género *Staphylococcus*, estos son oxidasa positivos, cuentan con el gen *mecA* el cual le confiere resistencia a la novobiocina y la metícilina así como plásmidos que le confieren resistencia a ciertos antibióticos, estos mecanismos de resistencia también pueden contribuir a la capacidad de la bacteria para tolerar los metales pesados. Estudios previos han demostrado que *Staphylococcus sciuri* es capaz de reducir el Cr^{6+} a Cr^{3+} utilizando mecanismos como la absorción del metal y su reducción por reacciones enzimáticas y no enzimáticas que van desde condiciones aerobias y anaerobias, de las cuales usan las vías del sistema de transporte de electrones o la producción de pequeños intermediarios como el Cr^{5+} y el Cr^{4+} (Elahi, *et.al.*, 2019). Sin embargo, aunque se conocen estos mecanismos, aún no se cuenta con la información necesaria para conocer mejor los efectos de otros metales con respecto a esta bacteria.

Staphylococcus stepanovicii presentó un comportamiento diferencial sobre los cuatro metales pesados. Hasta el momento, no se cuenta con suficiente bibliografía que permita conocer mejor su comportamiento al ser expuesto a los metales pesados, los resultados obtenidos solo nos permitieron conocer que la bacteria es capaz de tolerar al metal Cr hasta la concentración 0.05mM y el Hg hasta la concentración 0.1 μ M, pero presenta inhibición en todas las concentraciones utilizadas de los metales cadmio y plomo. Esta bacteria pertenece al mismo grupo del *Staphylococcus sciuri* por lo que podrían estar compartiendo ciertos mecanismos que les confieren una tolerancia muy parecida a los metales Hg y Cr. Un ejemplo de esto es que ambos comparten los genes *mec A* los cuales son originarios del grupo *S. sciuri* el cual incluye a *S. sciuri*, *S. fleuretti*, *S. vitulinus*, *S. Lentus* y el *Staphylococcus stepanovicii* (Tsubakishita, *et al*, 2010) De igual manera, se conoce que la cepa presenta resistencia a la novobiocina y bacitracina, pero es muy susceptible a diversos antibióticos como el cloranfenicol, la clindamicina, eritromicina, gentamicina, neomicina, tetraciclina, vancomicina, etc. (Hauschild, Stepanovici, 2010).

A partir de las tablas y las gráficas mostradas anteriormente, se elaboró la tabla 9, en donde se muestran las concentraciones máximas toleradas e inhibitorias de cada metal para cada una de las cepas bacterianas estudiadas.

Tabla 9. Concentraciones máximas toleradas e inhibitoria de cada metal para cada cepa bacteriana.

CEPA	Mercurio		Cadmio.		Cromo.		Plomo.	
	Máxima tolerada	Inhibitoria.	Máxima tolerada	Inhibitoria.	Máxima tolerada	Inhibitoria.	Máxima tolerada	Inhibitoria.
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0.5µM	1µM	0.33mM	0.67mM	1.95mM	5.66mM	0.75mM	1mM
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.5µM	1µM	0.33mM	0.67mM	6.59 mM	-	-	-
<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	0.1µM	0.5µM	-	-	0.05mM	0.12mM	-	-

Con base a los datos generados en la tabla 9, se procedió a determinar la viabilidad de las cepas crecidas en presencia de los metales tomando en cuenta las concentraciones máximas toleradas por cada una de ellas.

10.6. VIABILIDAD

10.6.1 EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS METALES MERCURIO, CADMIO, CROMO Y PLOMO

10.6.1.1 Mercurio.

Se determinó la viabilidad, para las tres cepas, en función de las concentraciones inhibitorias y no inhibitorias. En el caso de las concentraciones no inhibitorias en *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri* fue de 0.5 µM; mientras que para *Staphylococcus stepanovicii* fue de 0.1 µM. Para las tres cepas la concentración inhibitoria más alta seleccionada fue 6.59mM. La figura 48 muestra la tabla y la gráfica obtenidas. En ella se observan los datos de viabilidad expresados como promedio ± desviación estándar de tres mediciones en cada caso. Las diferencias encontradas entre el grupo control y las concentraciones son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La viabilidad observada entre los grupos control fue la misma en los tres casos. En el caso de las concentraciones no inhibitorias se pudo ver que la presencia de mercurio disminuyó 14.6, 12.1 y 8.7 % la viabilidad para las cepas *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* respectivamente. La concentración inhibitoria ocasionó el 100 % de mortandad.

	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Staphylococcus stepanovicii</i>
Control	91.5 ± 3 ^A	91 ± 1.5 ^A	92 ± 3 ^A
Concentración no inhibitoria	78 ± 1 ^B	80 ± 3 ^B	84 ± 4 ^B
Concentración inhibitoria	0	0	0

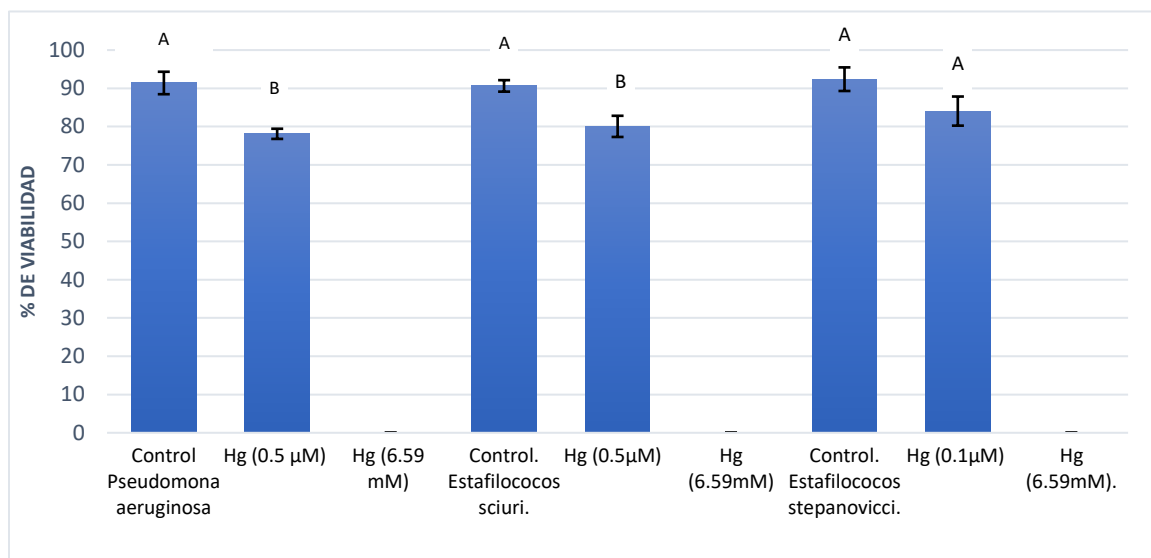


Figura 48. Porcentaje de viabilidad de las cepas *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* expuesta a las concentraciones tolerantes e inhibitorias para cada una de mercurio. (n=3).

10.6.1.2 Cadmio.

Para *Pseudomona aeruginosa* y *Estafilococos sciuri* la concentración tolerante elegida fue 0.33mM, mientras que la inhibitoria fue de 6.59 mM. La figura 49 muestra los resultados obtenidos. Cuando cada cepa fue expuesta a la primera concentración, su viabilidad no fue alterada, ya que los resultados estadísticos indicaron que no existió diferencia significativa ($p>0.05$). Cuando fueron expuestas a la concentración de 6.59 mM se observó una disminución significativa de la viabilidad de 45 y 37 % respectivamente ($p<0.05$). La bacteria *Staphylococcus stepanovicii* resultó sensible a todas las concentraciones de este metal.

	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Estafilococos sciuri.</i>
Control	93.5 ± 2 ^A	98 ± 1 ^A
Concentración no inhibitoria	93 ± 5 ^A	95 ± 2 ^A
Concentración inhibitoria	42 ± 2 ^B	36 ± 7 ^B

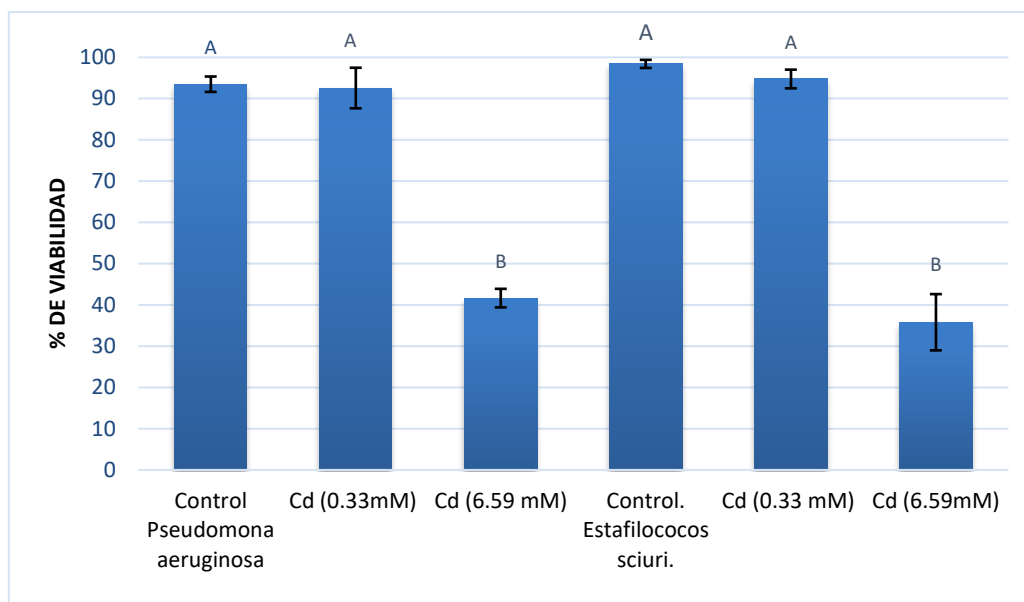


Figura 49. Porcentaje de viabilidad de las cepas *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri* expuestas a las concentraciones tolerantes e inhibitorias para cada una de cadmio. (n=3).

10.6.1.3 Cromo.

Se determinó la viabilidad solo para *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus stepanovicii* ya que *Staphylococcus sciuri* resultó sensible a cualquier concentración de este metal. Para las dos primeras cepas, la concentración tolerante (no inhibitoria) fue de 1.95 y 0.05mM respectivamente. En el caso de *Pseudomona aeruginosa* se utilizaron dos concentraciones inhibitorias con la finalidad de diferenciar lo observado en los halos de inhibición en esta concentración y en la de 5.66 mM. La concentración inhibitoria, para ambas cepas, fue de 6.59 mM. Los resultados obtenidos se muestran como X ± SD del porcentaje de viabilidad en la figura 50. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus stepanovicii</i>
Control	95 ± 1.3 ^A	97 ± 1 ^A
Concentración no inhibitoria	86 ± 7 ^A (1.95 mM)	91 ± 2 ^B (0.05 mM)
Concentración inhibitoria	33 ± 4 ^B	44 ± 1 ^B

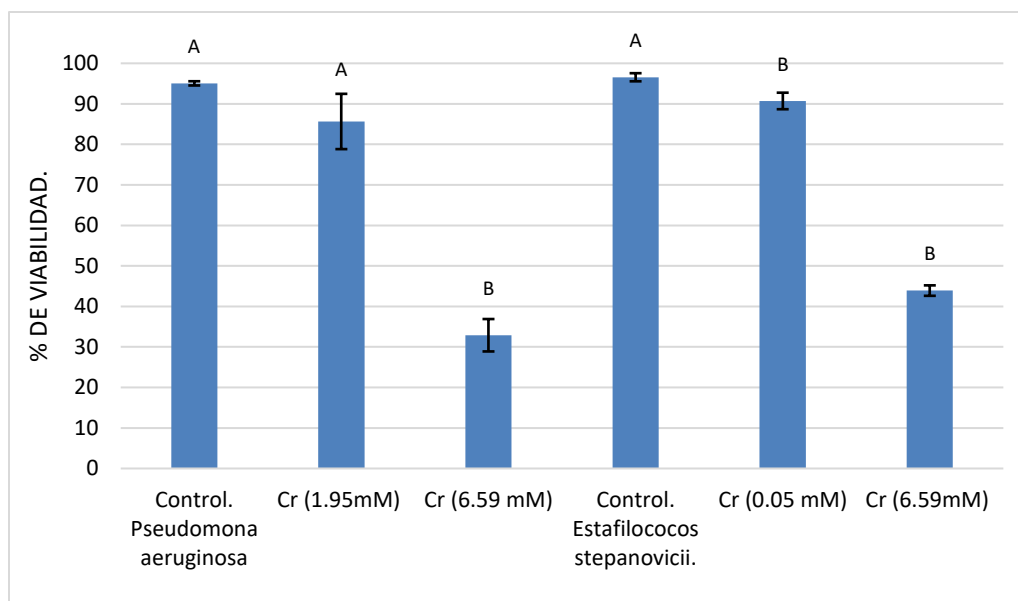


Figura 50. Porcentaje de viabilidad de las cepas *Pseudomona aeruginosa* y *Estafilococos stepanovicii* expuestas a las concentraciones tolerantes e inhibitorias para cada una de cromo. (n=3).

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* con base al estadístico no hubo diferencias significativas de viabilidad del control al ser medida en presencia de la concentración no inhibitoria de cromo, pero si se observó una disminución significativa de 65% en su viabilidad en la concentración 6.59mM ($p < 0.05$). Para el caso de *Staphylococcus stepanovicii*, la concentración de 0.05 mM de cromo ocasionó una disminución significativa ($p < 0.05$) del 6%. Al aumentar la concentración a 6.59 mM la viabilidad disminuyó, igual de forma significativa ($p < 0.05$) en un 55%. Entre las dos bacterias, se observó un comportamiento similar, en donde al aumentar la concentración hubo una disminución de la viabilidad, indicando que las bacterias fueron más sensibles en función de la concentración de cromo utilizada.

10.6.1.4. Plomo.

Pseudomona aeruginosa fue la única cepa bacteriana que creció en presencia de plomo. La concentración elegida como tolerante fue 0.75mM y las inhibitorias de 1.95 y 6.59mM. En este caso, se utilizaron dos concentraciones para los ensayos de viabilidad ya que, los resultados observados con los halos de

inhibición demostraron que, a la concentración 1.95Mm pareció inhibir más que la de 6.59. La figura 51 muestra la tabla y la gráfica correspondientes. Los resultados obtenidos se muestran como $X \pm SD$ del porcentaje de viabilidad. Las determinaciones se realizaron por triplicado para poder observar mejor este comportamiento.

<i>Pseudomona aeruginosa</i>	
Control	89.3 \pm 2.3 ^A
Concentración no inhibitoria	84 \pm 4 ^A (0.75 Mm)
Concentración inhibitoria	44 \pm 3 ^B (1.95 Mm)
	0.0 (6.59 Mm)

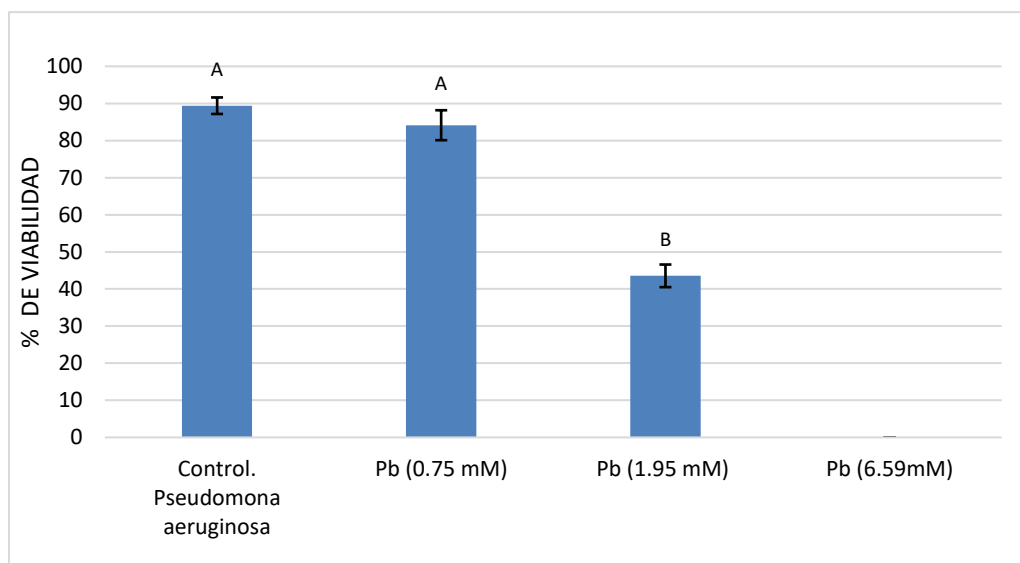


Figura 51. Porcentaje de viabilidad de *Pseudomona aeruginosa* expuesta a las concentraciones tolerantes e inhibitorias de plomo. (n=3).

El crecimiento de la bacteria a la concentración de 0.75 mM no ocasionó una diferencia significativa de la viabilidad de la bacteria. Al aumentar la concentración se observó que a 1.95 mM la viabilidad disminuyó de forma significativa ($p < 0.05$) hasta el 50 % en relación con el grupo control, mientras que cuando las bacterias fueron intoxicadas con 6.59 mM tuvieron una mortalidad del 100%.

10.6.2 EN FUNCIÓN DE LAS BACTERIAS *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y

Staphylococcus stepanovicii

10.6.2.1 *Pseudomona aeruginosa*

La figura 52 muestra los resultados obtenidos en forma de tabla y gráficas. La tabla presenta la viabilidad de *P.aeruginosa* expuesto a los cuatro metales pesados. La gráfica A muestra todas las concentraciones usadas y las gráficas B y C, las no inhibitorias y las inhibitorias respectivamente.

Concentración.	Control.	Hg 0.5µM	Hg 6.59mM	Cd 0.33mM	Cd 6.59mM	Cr 1.95mM	Cr 6.59mM	Pb 0.75mM	Pb 1.95 mM	Pb 6.59mM.
Viabilidad (x ± SD)	92 ± 2 ^A	78 ± 1 ^B	0 ± 0	93 ± 5 ^A	42 ± 2 ^B	86 ± 7 ^A	33 ± 4 ^B	44 ± 3 ^B	84 ± 4 ^B	0 ± 0

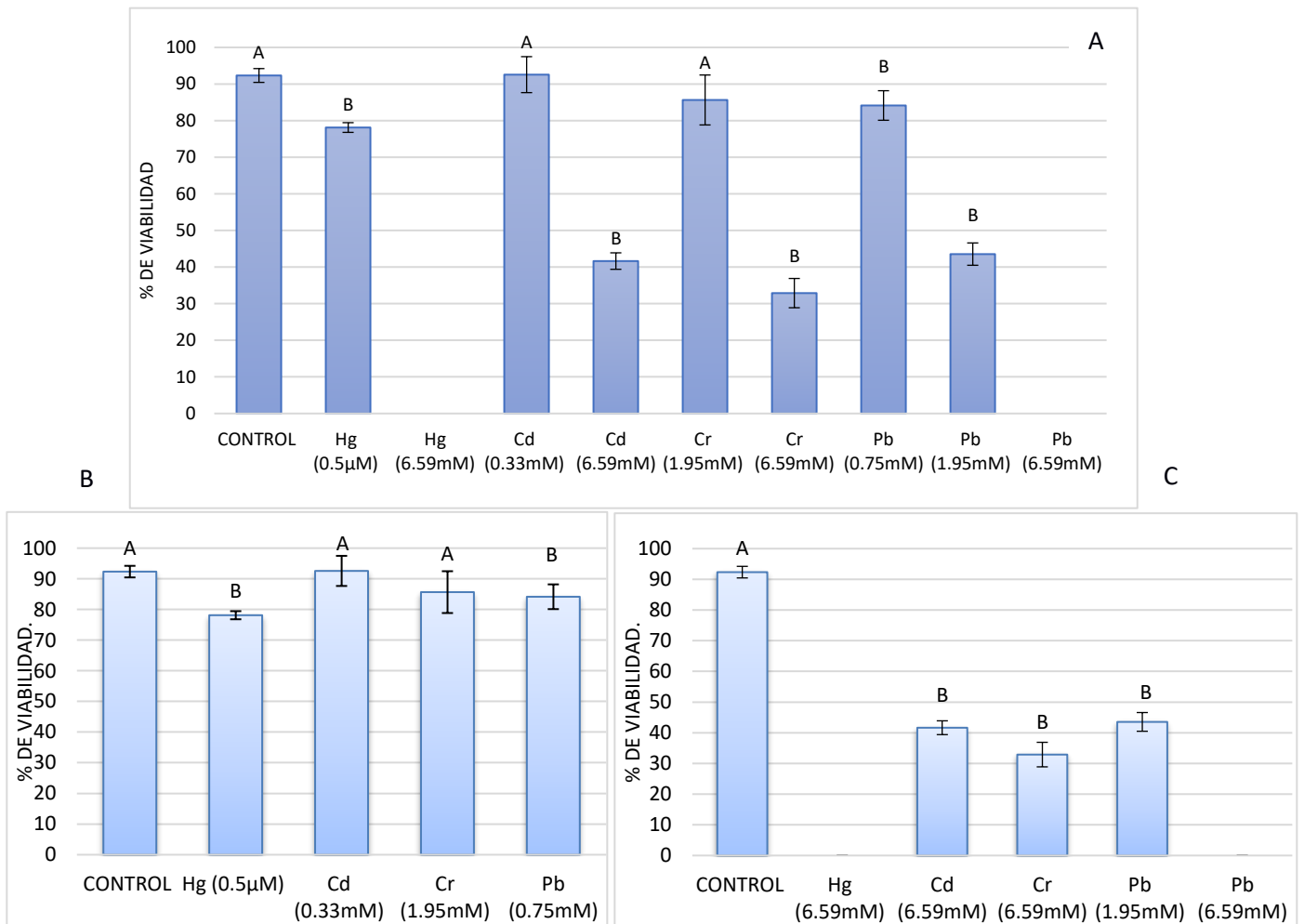


Figura 52. Porcentaje de viabilidad de *Pseudomona aeruginosa* expuesta a todas las concentraciones, (A) comparación de las concentraciones inhibitorias y no inhibitorias, (B) concentraciones no inhibitorias y (C) las inhibitorias (C) (n=3).

Los resultados obtenidos indican que *Pseudomonas aeruginosa* tolera diferentes concentraciones de los cuatro metales y que, a concentraciones no inhibitorias solo el mercurio y el plomo disminuyen la

viabilidad de forma significativa ($p < 0.05$), mientras que cadmio y cromo no lo hacen con respecto al grupo control. Cuando se aumentó la concentración de los metales (concentraciones inhibitorias), hasta niveles inhibitorios (6.59 mM) la viabilidad medida en cadmio y cromo disminuyó 54 y 64 % respectivamente mostrando diferencias significativas con respecto al control. En el caso del plomo las viabilidades encontradas fueron 0, 44 y 84 % para las concentraciones 0, 1.95 y 6.59 mM.

10.6.2.2. *Staphylococcus sciuri*

La figura 53 muestra los resultados obtenidos al realizar las comparaciones. La tabla presenta la viabilidad de *S. sciuri* expuesto a Mercurio y Cadmio. La gráfica A muestra todas las concentraciones usadas y las gráficas B y C, las no inhibitorias y las inhibitorias respectivamente.

Concentración.	Control.	Hg 0.5 μ M	Hg 6.59mM	Cd 0.33mM	Cd 6.59mM
Viabilidad ($x \pm SD$)	95 \pm 1 ^A	80 \pm 3 ^B	0 \pm 0	95 \pm 2 ^A	36 \pm 7 ^B

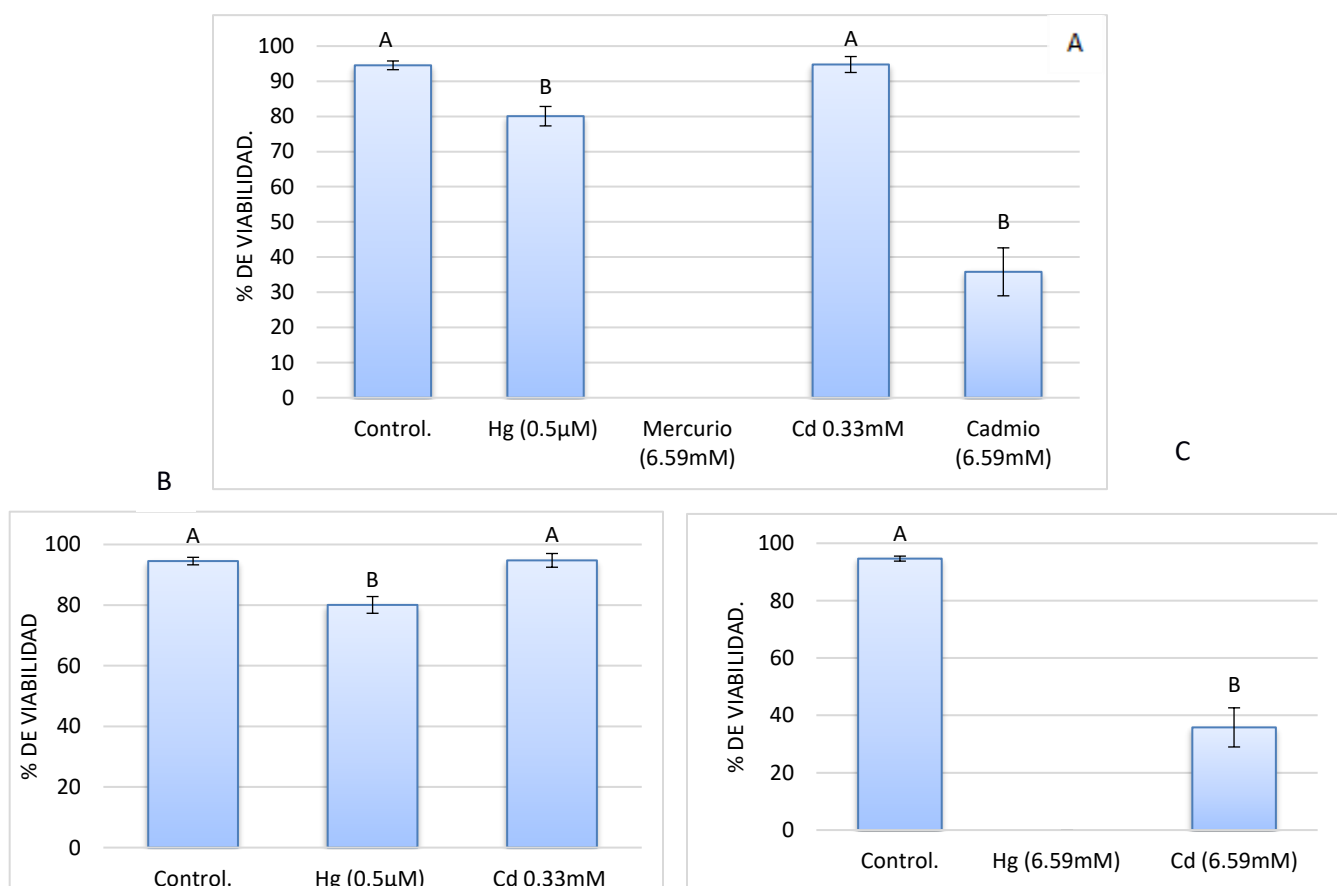


Figura 53. Porcentaje de viabilidad de *Estafilococos sciuri* expuesta a todas las concentraciones (A) comparación de las concentraciones inhibitorias y no inhibitorias, (B) las concentraciones no inhibitorias y (C) las inhibitorias (C) ($n=3$).

Los resultados muestran que el mercurio a la concentración de 0.5 mM disminuyó un 15 % la viabilidad de las células, pero al aumenta la concentración a 6.59 mM (que es la concentración considerada como inhibitoria) la viabilidad disminuyó hasta un 0 %. La viabilidad en presencia de la concentración no inhibitoria de cadmio (0.33 mM) no disminuyó la viabilidad de las bacterias, pero al aumentarla hasta 6.59, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) de viabilidad de 95 a 37 %. Las bacterias pudieron tolerar esta concentración, que fue la misma a la que el mercurio inhibió su crecimiento.

10.6.2.3 *Staphylococcus stepanovicii*.

La figura 54 muestra los resultados obtenidos al realizar las comparaciones. La tabla presenta la viabilidad de *S. stepanovicii* expuesto a Mercurio y Cromo. La gráfica A muestra todas las concentraciones usadas y las gráficas B y C, las no inhibitorias y las inhibitorias respectivamente.

Concentración.	control	Hg 0.1 μ M	Hg 6.59mM	Cr 0.05mM	Cr 6.59mM
Viabilidad ($x \pm SD$)	94 \pm 2 ^A	84 \pm 4 ^B	0 \pm 0	91 \pm 2 ^A	44 \pm 1 ^B

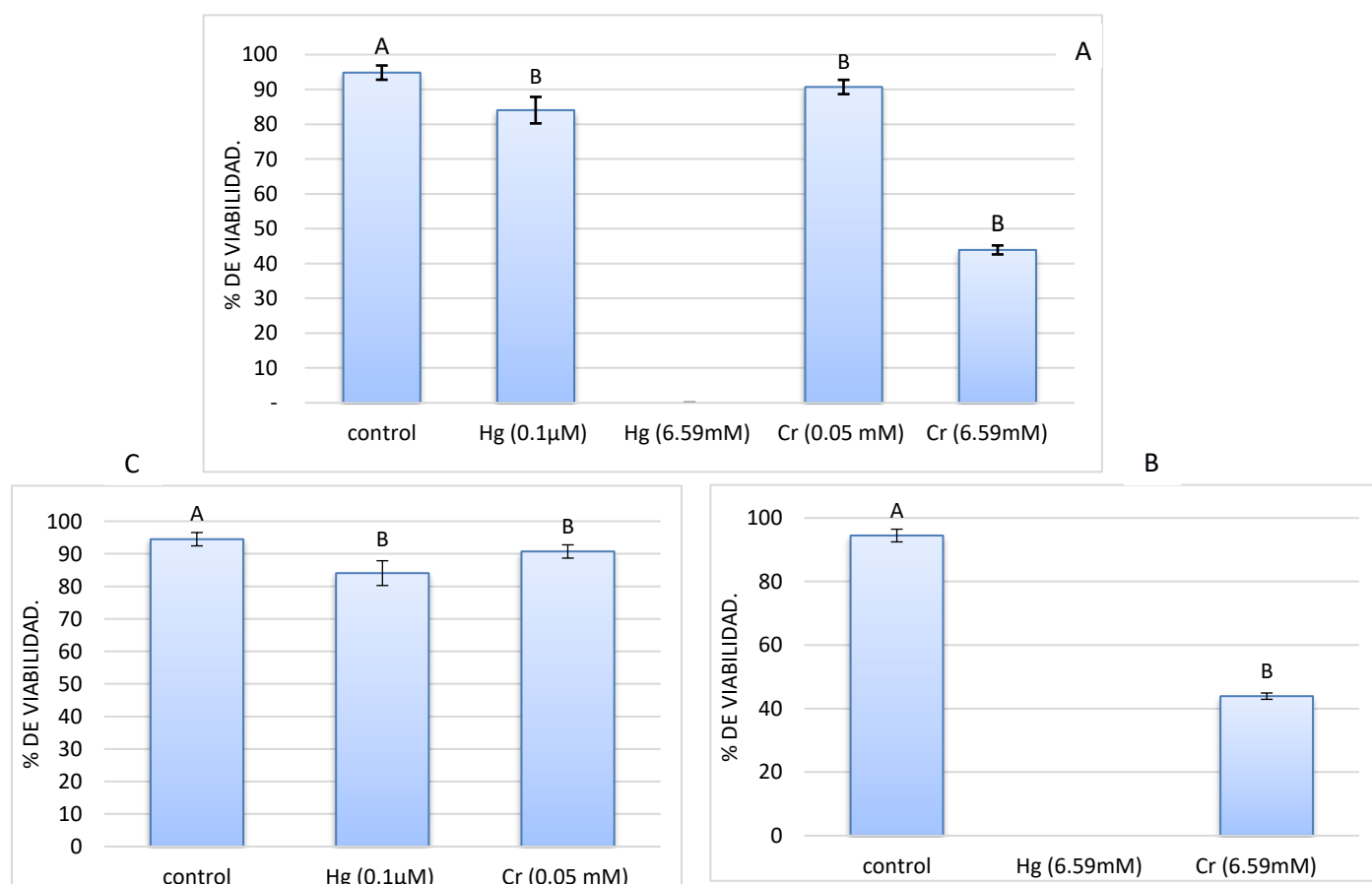


Figura 54. Porcentaje de viabilidad de *Staphylococcus stepanovicii* expuesta a todas las concentraciones (A) comparación de las concentraciones inhibitorias y no inhibitorias, (B) las concentraciones no inhibitorias y (C) las inhibitorias (C) ($n=3$).

Los metales mercurio y cromo afectaron la viabilidad de este estafilococo en relación con el grupo control cuando fueron expuestos a las concentraciones no inhibitorias. Esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$). El mercurio ocasionó un efecto mayor al del cromo disminuyendo la viabilidad 10%. Al crecer este microorganismo en presencia de 6.59 mM de ambos metales se observó que el mercurio originó un 0 % de viabilidad mientras que el cromo la disminuyó 50 veces.

10.7.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA

Para observar el daño ocasionado por los metales pesados en las tres cepas bacterianas se utilizó la medición de la actividad de la enzima Glutati3n S-transferasa, la cual presenta una gran variedad de actividades dentro del metabolismo de muchos organismos. De la misma manera se le ha relacionado con los procesos de estr3s ocasionados por diversos agentes xenobi3ticos como los metales pesados. Tambi3n se ha reportado como una enzima indicadora de da3o. Las bacterias se han caracterizado por tener m3ltiples genes de GST con una variedad de secuencias gen3ticas y funciones biol3gicas. Adem3s, se sabe que se conoce que cuentan con diferentes clases de GSTs como beta, chi, theta y zeta (Allocati N, *et.al*, 2008).

En las secciones anteriores de este trabajo se reportaron las concentraciones m3nimas inhibitorias, as3 como las concentraciones inhibitorias para cada cepa bacteriana por metal estudiado. Como siguiente paso se evalu3 la actividad de la enzima GST en las cepas de estudio. Para ello se procedi3 a elegir dos concentraciones, una no inhibitoria y otra inhibitoria de la poblaci3n y comparar la actividad de la enzima en cada concentraci3n. Lo anterior se realiz3 analizando las tablas de la secci3n anterior y verificando en cada caso que fuera la concentraci3n indicada. Esto se llev3 a cabo con la finalidad de observar la relaci3n entre la concentraci3n de t3xico y la actividad de la enzima. En relaci3n con los metales pesados se ha reportado que el GSH puede constituir la primera l3nea de defensa contra el cadmio en muchos tipos de c3lulas ya que este metal posee mayor afinidad para los compuestos de azufre, lo que indica que este metal se puede unir a grupos sulfuro y tiol como el GSH: Con base en este an3lisis diversos estudios han reportado que la GST, junto con sus isoformas, de *Exophiala pisciphila* est3n asociadas a la disminuci3n del estr3s por cadmio y se ha sugerido que algunos hongos han desarrollado resistencia a los metales pesados *E. pisciphila* ha mostrado una tolerancia alta a metales pesados, incluso mayor que el ma3z (*Zea mays* L). Sin embargo, los mecanismos de la tolerancia a metales pesados a3n no se han dilucidado completamente, pero se ha asociado a las GSTs clase Gtt2 como responsables de la resistencia a este metal (Zhang *et al*, 2008., Helbig *et al*, 2008 y Li *et, al*.2011).

La tabla 10 muestra los valores elegidos para realizar el estudio. Para llevarlo a cabo también se determinó el número de células y la concentración de proteínas en cada caso.

Tabla 10. Concentraciones de metales elegidas para medir la actividad de GST.

Cepa	Mercurio		Cadmio	
	[Mínima inhibitoria]	[Máxima tolerada]	[Mínima inhibitoria]	[Máxima tolerada]
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0.05µM	0.12mM	0.12mM	0.75mM
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.05µM	0.12mM	0.12mM	0.75mM
<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	0.05µM	0.12mM		

Cepa	Cromo		Plomo	
	[Mínima inhibitoria]	[Máxima tolerada]	[Mínima inhibitoria]	[Máxima tolerada]
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0.12mM	0.75mM	0.24mM	1.95mM
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.12mM	0.75mM		
<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	0.01mM	0.75mM		

Como indica la tabla, las concentraciones administradas fueron para Mercurio la concentración tolerante fue (0.05µM) y a concentración inhibitoria (0.12mM) en las tres cepas, para cadmio la concentración tolerante fue (0.12mM) y (0.75mM) para las cepas *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri*, para Cromo la concentración tolerante es (0.12mM) y (0.75mM) para *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus sciuri*, (0.01mM) y (0.75Mm) para *Staphylococcus stepanovicii*, para Plomo se utilizó la concentración tolerante (0.24mM) y (1.95mM) para la cepa *Pseudomona aeruginosa*. Los tiempos de exposición se tomaron de los reportados en las mediciones anteriores. Para *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus stepanovicii* fueron de 10 horas y para *Staphylococcus sciuri* de 8. El T0 corresponde a la determinación realizada 30 min después de la exposición de las bacterias a los metales por separado.

Como primer paso se procedió a verificar el crecimiento microbiano a las concentraciones establecidas, para después determinar el contenido de proteína total y medir la actividad de la enzima.

10.7.1.- Concentraciones mínimas inhibitorias para la cuantificación de proteína.

10.7.1.1. Crecimiento microbiano.

La figura 55 muestra el crecimiento de las bacterias por absorbancia a concentraciones mínimas inhibitorias para las tres cepas microbianas. T0 significa 30 minutos y T10, diez horas.

Concentración mínima tolerante.	<i>Pseudomona aeruginosa.</i>		<i>Staphylococcus sciuri.</i>		<i>Staphylococcus stepanovicii.</i>	
	T0	Tf (T10)	T0	Tf (T8)	T0	Tf (T10)
Control.	0.045 ± 0.019 ^A	0.657 ± 0.072 ^B	0.032 ± 0.0077 ^A	0.622 ± 0.033 ^B	0.073 ± 0.047 ^A	0.641 ± 0.060 ^B
Mercurio	0.146 ± 0.028 ^A	0.608 ± 0.053 ^B	0.078 ± 0.051 ^A	0.654 ± 0.024 ^B	0.116 ± 0.024 ^A	0.692 ± 0.071 ^B
Cadmio	0.218 ± 0.027 ^A	0.170 ± 0.008 ^B	0.102 ± 0.011 ^A	0.416 ± 0.090 ^B	0	0
Cromo	0.033 ± 0.006 ^A	0.027 ± 0.008 ^A	0.148 ± 0.071 ^A	0.192 ± 0.063 ^A	0.068 ± 0.034 ^A	0.567 ± 0.012 ^B
Plomo	0.155 ± 0.027 ^A	0.464 ± 0.065 ^B	0	0	0	0

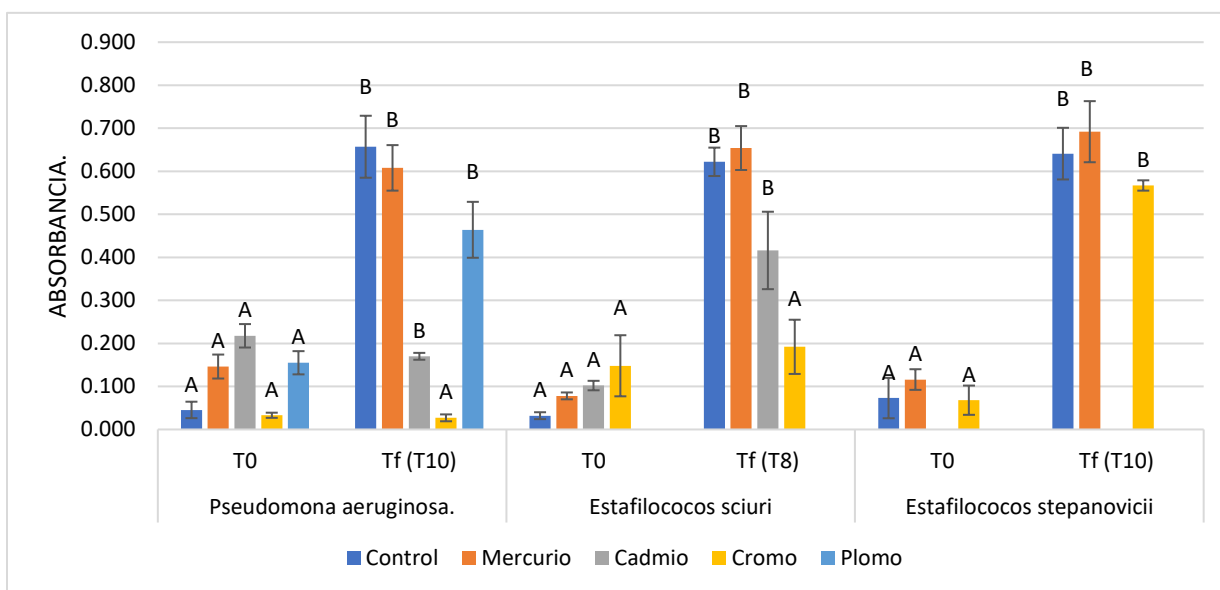


Figura 55. Crecimiento microbiano de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* expuestas a concentraciones mínimas inhibitorias (tolerantes) de los tres metales pesados. (n=3)

Como se puede observar en la figura, y después de realizar análisis estadístico, en general las tres cepas crecieron en los tiempos establecidos y en presencia de las concentraciones mínimas inhibitorias de los cuatro metales, con algunas excepciones. En el caso de *Pseudomona aeruginosa* hubo un incremento de 0.612 unidades para el control; 0.462 en el caso del crecimiento en presencia de mercurio; y 0.309 con plomo. El crecimiento en presencia de cadmio disminuyó 0.048 unidades de forma significativa. Finalmente, se pudo observar que en el caso del cromo no existió diferencia significativa entre el tiempo

cero (T0) y el tiempo final de crecimiento (T10). *Staphylococcus sciuri* por su parte mostró un crecimiento significativo de 0.590 unidades en el grupo control. La exposición a mercurio y cadmio originó aumentos de crecimiento de 0.576 y 0.314 unidades respectivamente. En el caso del cromo. No se registraron cambios significativos. *Staphylococcus stepanovicii*, presentó un crecimiento de 0.568 en el grupo control y crecimiento en presencia de mercurio y cadmio de 0.576 y 0.499 unidades respectivamente.

10.7.1.2 Concentración total de proteínas.

La figura 56 muestra la concentración de proteína para cada cepa microbiana bajo la exposición a las concentraciones mínimas inhibitorias.

Concentración mínima tolerante.	<i>Pseudomona aeruginosa.</i>		<i>Staphylococcus sciuri.</i>		<i>Staphylococcus stepanovicii.</i>	
	Tiempo inicial	Tiempo final	Tiempo inicial	Tiempo final.	Tiempo inicial.	Tiempo final.
Control.	0.054 ± 0.006 ^A	0.079 ± 0.004 ^B	0.053 ± 0.003 ^A	0.068 ± 0.009 ^A	0.054 ± 0.002 ^A	0.079 ± 0.003 ^B
Mercurio.	0.078 ± 0.004 ^A	0.071 ± 0.012 ^A	0.081 ± 0.005 ^A	0.082 ± 0.006 ^A	0.072 ± 0.006 ^A	0.077 ± 0.008 ^A
Cadmio.	0.070 ± 0.009 ^A	0.071 ± 0.007 ^A	0.079 ± 0.007 ^A	0.085 ± 0.010 ^A	0	0
Cromo.	0.062 ± 0.006 ^A	0.070 ± 0.002 ^B	0.062 ± 0.011 ^A	0.072 ± 0.001 ^A	0.064 ± 0.008 ^A	0.077 ± 0.009 ^A
Plomo.	0.099 ± 0.008 ^A	0.106 ± 0.015 ^A	0	0	0	0

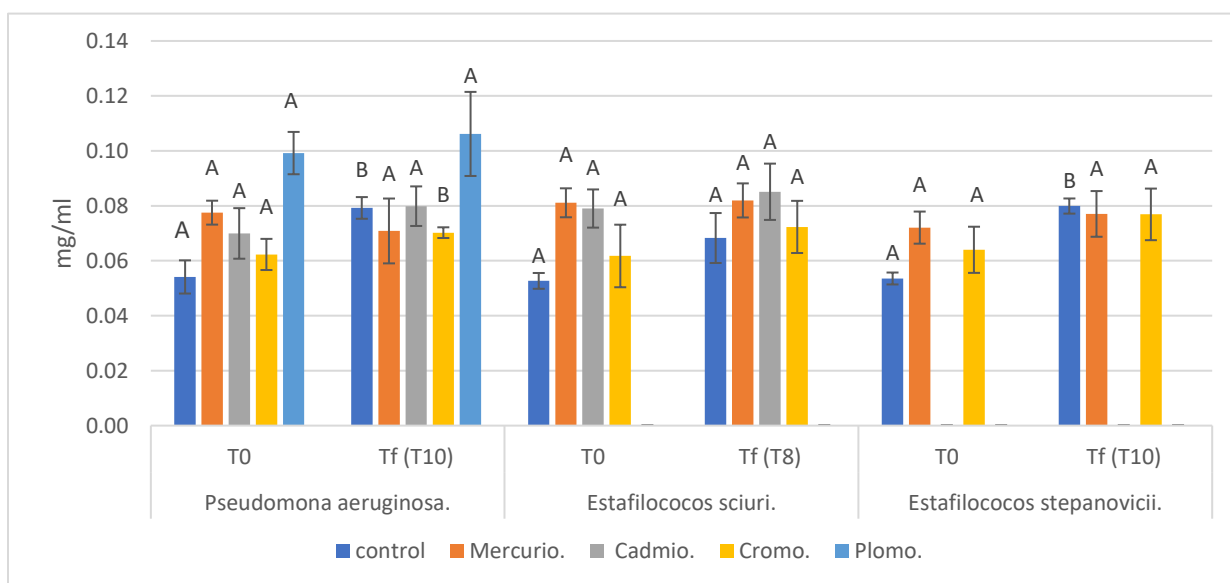


Figura 56. Concentración total de proteínas en cepas microbianas expuestas a las concentraciones mínimas inhibitorias de los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo. (n=3).

Los datos anteriores se utilizaron para llevar a cabo la determinación de la actividad de la enzima Glutación S-transferasa, la cual se muestra a continuación.

10.7.1.3 Actividad de la enzima Glutación S-transferasa.

La figura 57 muestra la actividad de la enzima en las tres cepas, medida a las concentraciones mínimas inhibitorias.

Actividad ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	<i>Pseudomona aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus sciuri</i>		<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	
	T0	T 10	T0	T 8	T0	T 10
Control	0.089 \pm 0.008 ^A	0.098 \pm 0.006 ^A	0.090 \pm 0.003 ^A	0.106 \pm 0.008 ^A	0.097 \pm 0.007 ^A	0.104 \pm 0.004 ^A
Mercurio	0.165 \pm 0.004 ^B	0.108 \pm 0.024 ^A	0.091 \pm 0.028 ^A	0.114 \pm 0.027 ^A	0.178 \pm 0.016 ^B	0.100 \pm 0.028 ^A
Cadmio	0.121 \pm 0.020 ^A	0.111 \pm 0.014 ^A	0.166 \pm 0.009 ^B	0.162 \pm 0.023 ^B		
Cromo	0.107 \pm 0.013 ^A	0.124 \pm 0.023 ^A	0.076 \pm 0.003 ^B	0.070 \pm 0.011 ^B	0.142 \pm 0.016 ^B	0.101 \pm 0.008 ^A
Plomo	0.096 \pm 0.004 ^A	0.101 \pm 0.003 ^A				

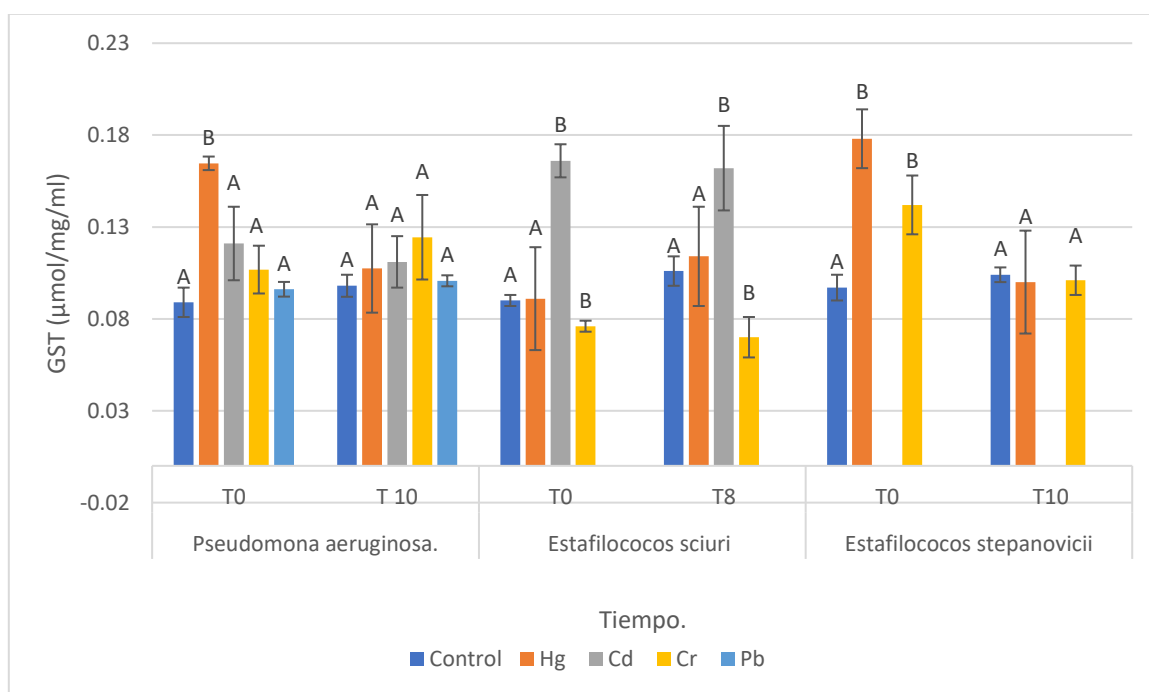


Figura 57. Actividad de GST en cepas microbianas expuestas a las concentraciones mínimas inhibitorias de los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo. (n=3).

La gráfica muestra un comportamiento muy diferente entre la actividad de las tres cepas a los tiempos inicial y final cuando fueron expuestas a las concentraciones mínimas inhibitorias. Para *Pseudomonas*

aeruginosa solo se observó un cambio significativo en la actividad de la enzima en presencia de mercurio. Al tiempo cero (30 minutos de exposición) la actividad aumentó aproximadamente el doble en relación con el grupo control (de 0.089 a 0.165 unidades), los metales restantes no ocasionaron un cambio significativo. Cuando la actividad se midió en el tiempo 10 (diez horas de crecimiento) se observó que la actividad de GST en presencia de mercurio disminuyó 0.057 unidades (de 0.165 ± 0.004 a 0.108 ± 0.024). Los metales plomo, cadmio y cromo no ocasionaron cambios en la actividad de GST en función del tiempo.

En relación con el género *Pseudomonas*, Satapute y sus colaboradores en 2019 publicaron un estudio en dos cepas de *Pseudomonas taiwanesis* (SJPS_KUD54 y KUD-MBBT4) aisladas de suelos contaminados las cuales demostraron tolerancia a los metales arsénico y cadmio a la concentración de 10 ppm. Observaron que la primera cepa mostró un aumento significativo en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión S-transferasa, mientras que la segunda cepa no. Ellos mencionaron que el aumento en la actividad de GST y las otras enzimas podría ser el resultado del estrés oxidativo generado por la toxicidad de ambos metales (Satapute, 2019). Se sabe que *Pseudomonas aeruginosa* cuenta con más de 10 genes de GST (Vuilleumier *et al*, 2002) los cuales podrían estar implicados en los mecanismos de tolerancia que presenta la cepa a los metales pesados. Estas GST bacterianas tienen la función de desintoxicación, esta función puede estar asociada a su capacidad de detoxificación de un gran número de moléculas usando la vía de conjugación GSH; su papel como la protección contra agentes productores de estrés oxidativo y a que muchas de sus actividades se encuentran implicadas en su metabolismo basal (Santos *et al* 2002). El que los demás metales no hayan alterado la actividad de GST puede deberse a que a esas dosis, no ocasionaron un estrés oxidativo capaz de inducir la actividad de GST como enzima antioxidante, como ya ha sido demostrado por Valko en 2011 quién demostró la actividad antioxidante de la GST cuando se forma 4-hidroxinonal como producto de la lipoperoxidación de los ácidos grasos de membrana; o a que las defensas antioxidantes primarias puedan equilibrar las especies reactivas de oxígeno formadas por los tres metales mencionados (Valko, 2007). Debe mencionarse también que cada metal posee sus propias características y reacciones dentro o en la membrana de las células, lo que influye en su toxicidad.

Cuando *Staphylococcus sciuri* fue expuesto a los metales mercurio, cadmio y cromo, mostró el mismo comportamiento tanto en el tiempo inicial como en el final. No obstante, se determinó un aumento y una disminución significativa de la actividad de GST en presencia de cadmio y cromo. En presencia del primer metal, al tiempo cero, la actividad aumento 0.056 unidades y para el segundo se cuantificó una disminución de 0.14 unidades. Para el tiempo final (T8), el aumento en presencia de cadmio fue de 0.056 unidades y la disminución ocasionada por cromo de 0.036 unidades. En este caso el mercurio no produjo cambio en la actividad de GST en función del tiempo.

Staphylococcus stepanovicii en presencia de mercurio y plomo presentó un comportamiento diferente en los dos tiempos de estudio. En el tiempo inicial (T0), se observó que los dos metales aumentaron la actividad de la enzima de forma significativa. Los aumentos fueron de 0.061 y 0.045 unidades para cada metal mencionado. En el tiempo final (T8), se observó una disminución de la actividad en presencia de los dos metales.

Las razones por las cuales se observó aumento o disminución en la actividad de la enzima en cada cepa dependen de factores biológicos y químicos relacionados con los microorganismos y su metabolismo, así como de los tóxicos utilizados. Se sabe que los metales pesados, igual que muchos otros agentes tóxicos, pueden generar especies reactivas de oxígeno, las cuales son responsables de una serie de eventos que involucran el aumento o la disminución de la funcionalidad de varias macromoléculas celulares. Se sabe que los metales cobre, cadmio, mercurio, níquel y arsénico inducen la generación de radicales libres vía reacciones tipo Fenton, de igual manera los iones superóxido y el peróxido de hidrogeno pueden interaccionar con los metales de transición como el hierro y el cobre generando a su vez que el metal catalice la reacción Haber–Weiss/Fenton formando radicales °OH (Stohs, *et.al.1995*). En los microorganismos los agentes tóxicos podrían generar procesos de adaptación por ejemplo los conferidos por plásmidos en bacterias; transformación de metales; bombas de eflujo, proteínas que les permiten la catálisis y remoción de los agentes como es el caso de la GST (Oyetibo, 2017; Sau *et.al.2010*). Otro factor que posiblemente este influenciando en las actividades determinadas es el relacionado con la entrada de los elementos a las bacterias, esta se encuentra condicionada a las proteínas receptoras de membrana y a los diferentes métodos de transporte a través de las membranas para cada uno de los xenobióticos estudiados. Es por ello por lo que el crecimiento y la actividad de la enzima también pudieron variar.

Como siguiente paso se realizaron las mismas mediciones en presencia de las concentraciones máximas tolerables para cada cepa microbiana.

10.7.2.- Concentraciones máximas tolerables para la cuantificación de proteína.

10.7.2.1 Crecimiento microbiano.

La figura 58 muestra el crecimiento de las bacterias a concentraciones máximas tolerables para las tres cepas microbianas. En este caso si se observaron diferencias en relación con el crecimiento microbiano de las cepas expuestas a metales al compararlas con el grupo control.

Concentración máxima tolerable	<i>Pseudomona aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus sciuri</i>		<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	
	T0	Tf (T10)	T0	Tf (T8)	T0	Tf (T10)
Control.	0.045 ± 0.019 ^A	0.657 ± 0.0724 ^B	0.032 ± 0.008 ^A	0.622 ± 0.033 ^B	0.073 ± 0.047 ^A	0.641 ± 0.060 ^B
Mercurio	0.155 ± 0.055 ^A	0.206 ± 0.081 ^A	0.039 ± 0.018 ^A	0.059 ± 0.020 ^A	0.113 ± 0.014 ^A	0.157 ± 0.017 ^A
Cadmio	0.210 ± 0.008 ^A	0.202 ± 0.064 ^A	0.191 ± 0.016 ^A	0.145 ± 0.034 ^A	0	0
Cromo	0.082 ± 0.029 ^A	0.041 ± 0.016 ^A	0.104 ± 0.031 ^A	0.196 ± 0.083 ^A	0.070 ± 0.015 ^A	0.088 ± 0.031 ^A
Plomo	0.367 ± 0.080 ^A	0.611 ± 0.068 ^B	0	0	0	0

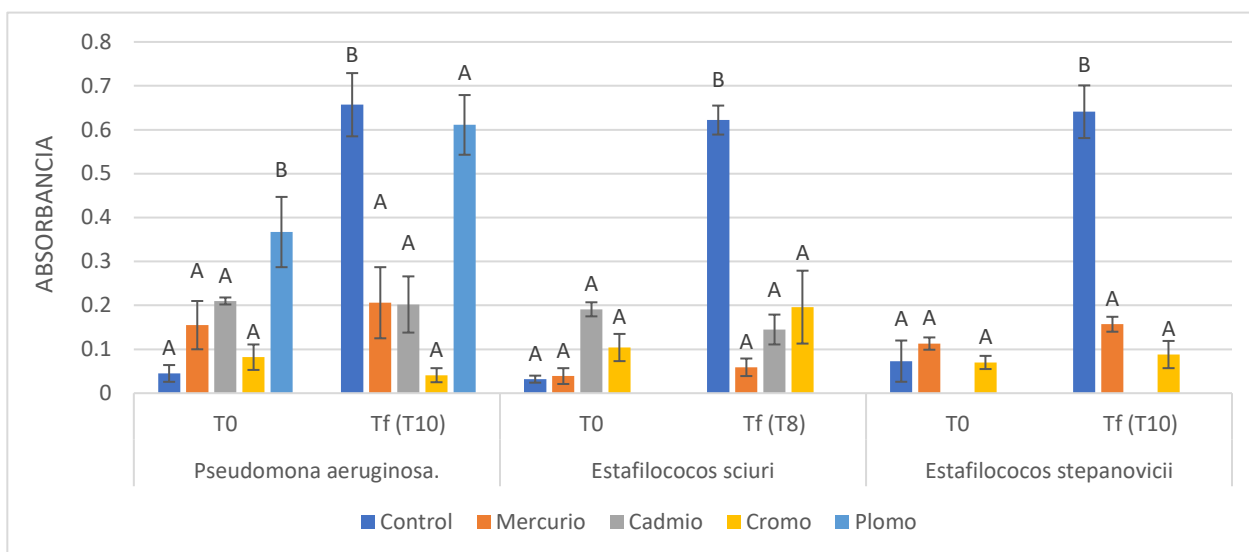


Figura 58. Crecimiento microbiano de *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* a las concentraciones máximas tolerables de los cuatro metales pesados.

Pseudomona aeruginosa resultó ser más tolerante a plomo que las dos cepas de estafilococos. Los demás metales no causaron un cambio en la actividad de GST al ser comparados el tiempo final con el inicial. A T0, *Pseudomonas*, presentó un incremento significativo en el crecimiento de 0.90, 0.165, y 0.322 unidades en presencia de mercurio, cadmio y plomo. Con cromo no hubo una variación en el crecimiento. Cuando terminó el tiempo de exposición a los metales se observó que el crecimiento en condiciones control y en presencia de plomo aumentó de forma significativa. Lo que indica que el aumento observado al inicio, en el caso de los metales mercurio, cromo y cadmio no varió, indicando que la bacteria fue tolerante a la concentración de plomo utilizada (1.95 mM). El aumento de crecimiento bajo condiciones control fue de 0.612 unidades y en presencia de plomo 0.244 en presencia de plomo. Esto podría indicar que el plomo pudo inducir el crecimiento de la bacteria o que la bacteria posee mecanismos de tolerancia muy efectivos

hacia este metal. En la bibliografía se ha reportado, para el caso del mercurio, que bacterias modificadas genéticamente pueden aumentar su resistencia a metales como el mercurio (Cursino *et. al.* 2000).

Staphylococcus sciuri solo mostro una diferencia en el crecimiento en el control con un aumento de 0.59 unidades a las ocho horas T8 con respecto al T0, mientras que *Staphylococcus stepanovicii*, en el caso del control, mostro diferencias significativas al aumentar 0.568 unidades en el T8 con respecto al T0.

10.7.2.2 Concentración de proteína.

Concentración máxima tolerable	<i>Pseudomona aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus sciuri</i>		<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	
	Tiempo inicial	Tiempo final	Tiempo inicial	Tiempo final	Tiempo inicial	Tiempo final
Control.	0.054 ± 0.006 ^A	0.079 ± 0.004 ^B	0.053 ± 0.003 ^A	0.068 ± 0.009 ^B	0.054 ± 0.002 ^A	0.079 ± 0.003 ^B
Mercurio.	0.075 ± 0.001 ^A	0.071 ± 0.009 ^A	0.079 ± 0.011 ^A	0.072 ± 0.006 ^A	0.074 ± 0.005 ^B	0.069 ± 0.006 ^A
Cadmio.	0.072 ± 0.029 ^A	0.065 ± 0.018 ^A	0.083 ± 0.009 ^A	0.071 ± .006 ^A	0	0
Cromo.	0.083 ± 0.006 ^A	0.064 ± 0.004 ^A	0.076 ± 0.005 ^A	0.077 ± 0.007 ^A	0.707 ± 0.011 ^A	0.069 ± 0.007 ^A
Plomo.	0.098 ± 0.016 ^A	0.082 ± 0.011 ^B	0	0	0	0

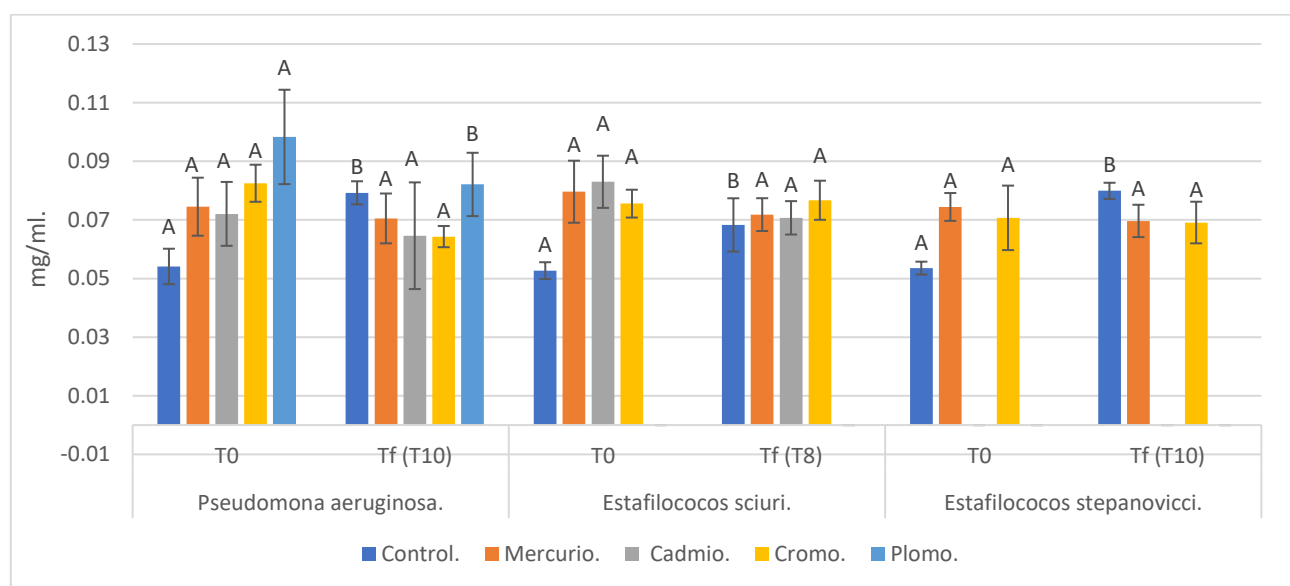


Figura 59. Concentración de proteína total en *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri* *Staphylococcus stepanovicii* a las concentraciones máximas tolerables de los cuatro metales pesados.

La figura 59 presenta la concentración de proteína total de las cepas control y expuestas a las concentraciones máximas toleradas por las cepas bacterianas. Estos datos se utilizaron para cuantificar la actividad de la proteína. Los datos indican el contenido de proteína total y describen un comportamiento similar al crecimiento. Los controles presentan mayor contenido de proteína que las cepas expuestas a los metales. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, en presencia de plomo se observó una disminución en su cantidad de proteína al finalizar el tiempo de exposición, de la misma forma a como sucedió con su

crecimiento. En el caso de los estafilococos solo los controles aumentaron su contenido de proteína en función del tiempo. *Pseudomona aeruginosa* presento un aumento de proteina de 0.025 unidades, *Staphylococcus sciuri* de 0.015 y *Staphylococcus stepanovicii* de 0.026 al terminar el periodo de experimentación.

10.7.2.3 Actividad de la enzima Glutación S-transferasa.

La figura 60 muestra los resultados obtenidos en presencia de las concentraciones máximas tolerables para cada cepa a los tiempos de exposición ya mencionados anteriormente.

Concentración máxima tolerable.	<i>Pseudomona aeruginosa.</i>		<i>Staphylococcus sciuri</i>		<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	
	T0	T 10	T0	T 8	T0	T 10
Control	0.089 ± 0.008 ^A	0.098 ± 0.006 ^A	0.090 ± 0.003 ^A	0.106 ± 0.008 ^A	0.097 ± 0.007 ^A	0.104 ± 0.004 ^A
Mercurio	0.158 ± 0.009 ^B	0.197 ± 0.023 ^B	0.071	0.062 ± 0.019 ^B	0.056 ± 0.035 ^A	0.036 ± 0.014 ^B
Cadmio	0.116 ± 0.014 ^A	0.139 ± 0.016 ^B	0.187 ± 0.013 ^B	0.168 ± 0.014 ^B		
Cromo	0.142 ± 0.011 ^B	0.139 ± 0.012 ^B	0.007	0.080 ± 0.014 ^B	0.109 ± 0.008 ^B	0.131 ± 0.015 ^B
Plomo	0.114 ± 0.006 ^B	0.134 ± 0.017 ^B				

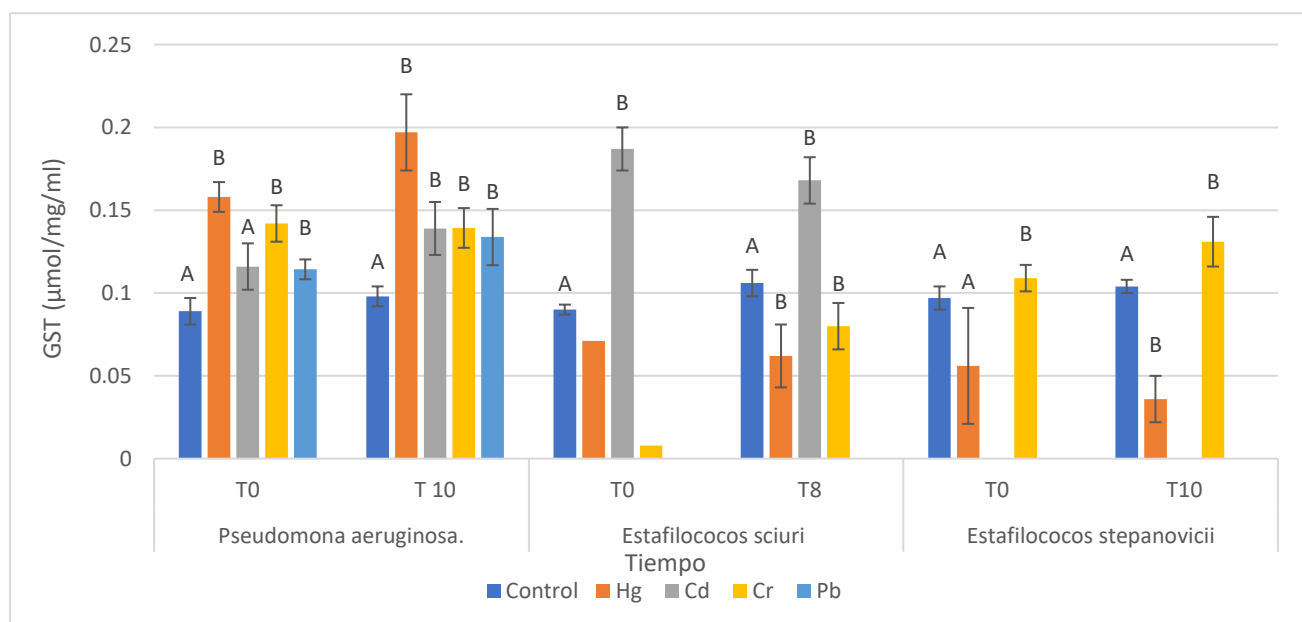


Figura 60. Actividad de GST en cepas microbianas expuestas a las concentraciones máximas tolerables de los metales pesados mercurio, cadmio, cromo y plomo. (n=3).

Pseudomonas aeruginosa al inicio del experimento, presentó un aumento significativo en la actividad de GST de 0.069, 0.053 y 0.025 unidades de actividad para mercurio, cromo y plomo respectivamente. Al

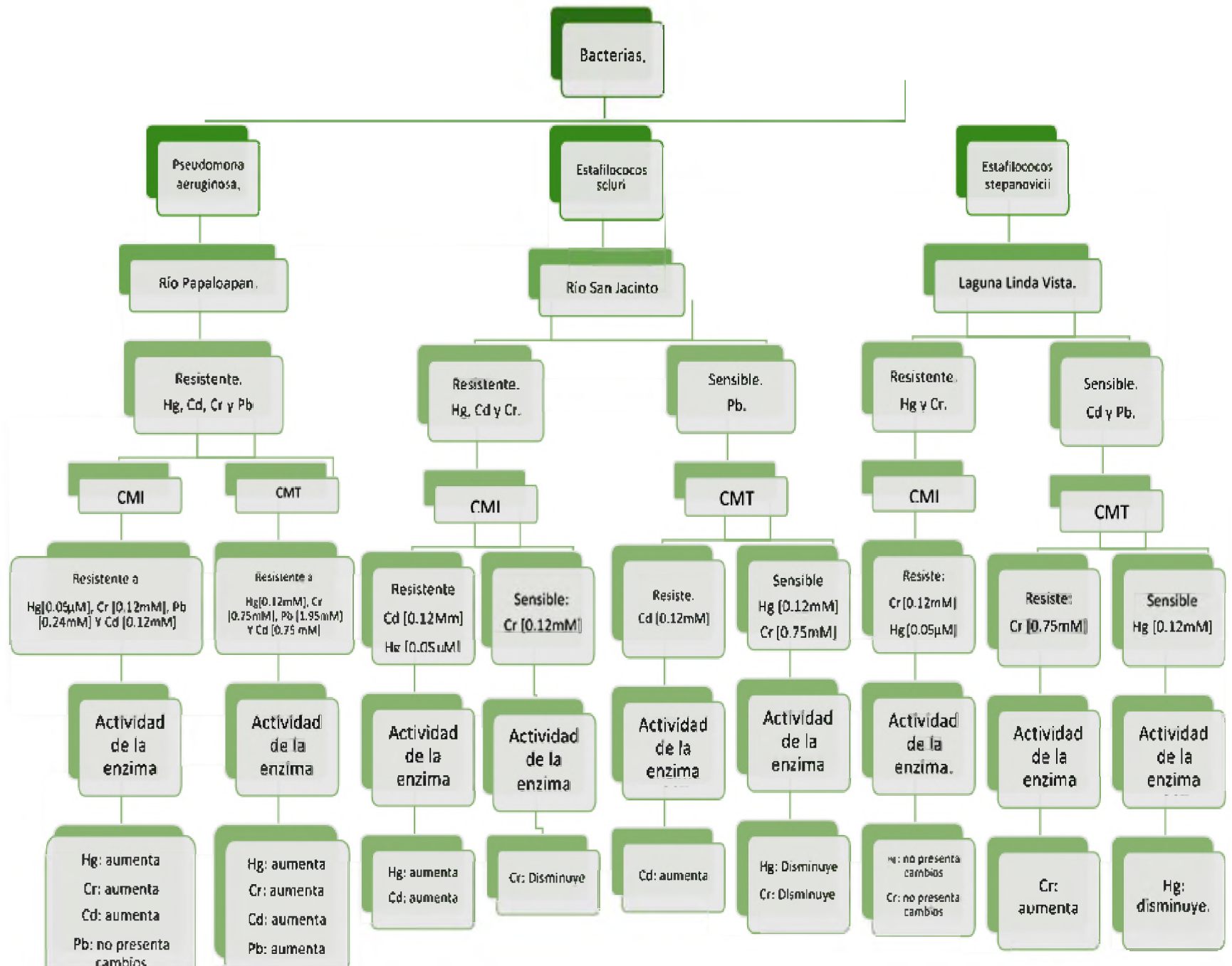
terminar el periodo de exposición se observó que la actividad de la enzima aumentó en presencia de los cuatro metales. Los aumentos de actividad registrados fueron 0.099 para mercurio, 0.041 para cadmio y cromo y 0.036 para plomo. La presencia de los metales ocasionó afectos dentro de la bacteria de tal forma que GST aumento su actividad, posiblemente debido a la generación de especies reactivas de oxígeno o de lipoperoxidación. Un estudio realizado por el grupo de Shamim demostró que *Pseudomonas putida* presentó una concentración mínima inhibitoria de 1.25 mM y que esta indujo la síntesis de glutatión, así como la actividad de la enzima glutatión reductasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa. De la misma forma, la bacteria pudo bioadsorber el metal a concentraciones considerables (Shamim, 2015). En relación con el cromo, un estudio proteómico reportó que *Pseudomonas aeruginosa* expuesta a 300 mg/L de Cr VI, se detectó la sobreexpresión de proteínas de estrés; proteínas involucradas en la biosíntesis de proteínas; proteínas responsables de la producción de energía y proteínas involucradas en la desintoxicación de radicales libres por el glutatión. Lo anterior sugirió que esta bacteria tiene acceso a diferentes mecanismos de resistencia frente a la exposición a metales tóxicos (Kiliç *et.al.*, 2010). Se ha reportado que *P. aeruginosa* cuenta con las enzimas de GST necesarias para tolerar a los cuatro metales pesados destacando principalmente su tolerancia a Plomo y que cuenta con más de 10 genes de GST (Vuilleumier *et.al.*, 2002).

En el caso de *Staphylococcus sciuri* al tiempo inicial (T0), la exposición a cadmio aumentó de forma significativa la actividad de GST 0.097 unidades. Cuando fue expuesta a mercurio y cromo, la actividad disminuyó 0.019 y 0.083 unidades respectivamente. Al terminar el tiempo de exposición la actividad en presencia de los metales conservó el mismo comportamiento que el mostrado en el tiempo inicial, con excepción de la exposición a cromo, verificándose un aumento de 0.073 unidades de actividad. La exposición a cadmio y cromo pudo haber ocasionado la generación de estrés oxidativo mientras que para el mercurio podría ser que la bacteria presente mecanismos de tolerancia hacia este metal. Aunque *Staphylococcus sciuri* es una bacteria Gram positiva es posible que esté sufriendo un mecanismo similar al mencionado por el grupo de Marrero-Coto. Encontró que en las bacterias Gram negativas cuando la concentración intracelular de los metales pesados se incrementa esos pueden enlazarse al Glutatión (GSH) y dar lugar a la formación de complejos que pueden reaccionar con el oxígeno molecular para generar bis-glutationato (GS-SG), el catión del metal y peróxido de hidrógeno. Debido a que la reducción del GS-SG requiere la participación del NADPH y los cationes metálicos se enlazan inmediatamente a otras moléculas de glutatión (GSH), los cationes de los metales provocan un considerable estrés oxidativo, que es en muchos casos la base de su toxicidad (Marrero-Coto, 2020). Por su parte Sochor utilizo *Staphylococcus aureus* para la determinación de marcadores que podrían usarse para detectar iones cadmio (II). Dentro

de sus experimentos, monitoreo los efectos de diferentes concentraciones de cadmio (II) sobre el crecimiento y metabolismo energético de la bacteria detectando cambios muy significativos en el metabolismo de los compuestos de tiol y aumentando específicamente la concentración de las proteínas Metalotioneína, la enzima Glutación S-transferasa y los grupos sulfhídrido como una respuesta contra el estrés oxidativo. La proporción de glutación reducido y oxidado indicó un marcado estrés oxidativo. Además, se determinaron cambios drásticos en la actividad de la ureasa, que está relacionada con la resistencia de las bacterias encontrando que estos podrían servir como marcadores para la detección de daño por cadmio (Sochor, 2011).

Staphylococcus stepanovicii presentó una actividad igual en ausencia y presencia de los metales mercurio y cromo. En el caso del cromo, al tiempo inicial hubo un aumento de actividad de 0.012 unidades, mientras que, al finalizar el tiempo de exposición, el aumento fue de 0.027 unidades, en el caso del mercurio, al inicio no existió diferencia en la actividad en relación con el grupo control, pero al final se cuantificó una disminución de 0.020 unidades de actividad. Se sabe que *Staphylococcus stepanovicii* pertenece a la familia de *Staphylococcus sciuri* (De vos *et.al.*, 2009; Hauschild *et.al.*, 2010). Elahi observo la tolerancia de una cepa de *Staphylococcus sciuri* A- HS1 al ion Cr^{6+} (25 mM) y otros iones metálicos como As^{2+} (19 mM), Pb^{2+} (18.5 mM), Zn^{2+} (17 mM), Cu^{2+} (2.5mM), Cd^{2+} (3 mM) y Ni^{2+} (1.5 mM). *Staphylococcus sciuri* mostro una absorción eficiente de Cr^{6+} en función del tiempo y la concentración de metal. De la misma forma observaron un incremento en la producción de compuestos como tioles y de glutación. Los resultados indicaron que esta bacteria puede ser capaz de remover el 93% de Cr^{6+} (Elahi *et.al.*, 2019). Se sabe que las bacterias poseen preferentemente la clase beta de GST (Allocati *et.al.*, 2009; Travensolo *et.al.*, 2008) siendo capaces de conjugar el sustrato modelo CDNB y de unirse a la matriz de afinidad a GSH. Todas las GST beta se caracterizan por la presencia de cisteína como residuo catalítico en el sitio G (Rossjohn *et.al.*, 1998). La estructura cristalina de varios representantes de la clase beta se han determinado y caracterizado como GST en *Proteus mirabilis* (*PmGST*) y *Ochrobactrum anthropi* (*OaGST*) (Skopelitou, 2015). Además de la anterior, se han reportado las clases Chi, Theta y Zeta, y todas son capaces de inactivar una gran cantidad de moléculas mediante la conjugación con GSH, tienen un papel activo en la protección contra el estrés oxidativo y están involucradas en la desintoxicación de agentes antimicrobianos.

La siguiente figura muestra un esquema con los principales resultados de este trabajo de Investigación, se puede observar el nombre de la bacteria, su lugar de aislamiento, así como su susceptibilidad a los diferentes metales y la actividad de la enzima GST evaluada a las concentraciones mínima inhibitoria y máxima tolerable en cada caso.



11.- CONCLUSIONES

1. El medio ambiente en el cual fueron aisladas las tres cepas bacterianas podría haber determinado su sensibilidad y tolerancia a la exposición a los metales Hg, Cd, Cr y Pb, debido a que los efluentes de donde fueron aisladas podrían contener metales pesados y al estar en contacto constante generar los mecanismos necesarios que aseguren su supervivencia.
2. Las tres cepas aisladas se identificaron como *Pseudomona aeruginosa* proveniente del Rio Papaloapan, *Staphylococcus sciuri* proveniente del Rio San Jacinto y *Staphylococcus stepanovicii* proveniente de la Laguna Linda Vista, aun no existen estudios suficientes que permitan conocer ampliamente a la bacteria, pero se conoce que es una subespecie perteneciente al grupo del *Staphylococcus sciuri*.
3. *Pseudomona aeruginosa* creció en Hg [0.5µM], Cd [0.33mM], Cr [1.95mM] y Pb [0.75mM], debido a que es una bacteria que cuenta con una variedad de mecanismos moleculares que le permiten su supervivencia en ambientes contaminados con antibióticos y/o metales pesados. *Staphylococcus sciuri* presentó crecimiento en Hg [0.5µM], Cd [0.33mM] y Cr [6.59mM] siendo sensible Pb. *Staphylococcus stepanovicii* mostró crecimiento en Hg [0.1µM] y Cr [0.05mM] presentando sensibilidad a Cd y Pb. Las dos cepas de *Estafilococos* presentaron una relación filogenética muy próxima, sin embargo, en los ensayos de selección y tolerancia los microorganismos mostraron un comportamiento diferencial.
4. La cinética de crecimiento mostró que *P. aeruginosa* presentó crecimiento óptimo en el tiempo 10 (T10), *Staphylococcus sciuri* a las 8 horas (T8) y *E. stepanovicii* a las 10 horas (T10).
5. *Pseudomona aeruginosa* mostró tolerancia a Hg [0.5µM] y [0.12Mm]. En ambas concentraciones presentó crecimiento microbiano y la actividad de la enzima a las 10 horas con respecto al control aumentó; en el caso de Pb²⁺ presentó tolerancia a [0.24mM] y [1.95mM] la actividad de la enzima GST tuvo un aumento no significativo con respecto al control en la concentración mínima inhibitoria siendo su actividad muy similar y en la concentración máxima tolerante su actividad incrementó con respecto al control, lo anterior podría significar que *Pseudomonas aeruginosa* presenta alguna enzima perteneciente al grupo de la GST la cual por diversos mecanismos le permite a la bacteria que los metales sean menos dañinos. Aunque la cepa presenta un crecimiento diferencial en Cd y Cr en las concentraciones [0.12Mm] y [0.75mM] ambas presentan un aumento de la actividad enzimática de la GST en respuesta al daño metabólico que se está generando, la actividad de GST indica que la bacteria tolera a los cuatro metales pesados a diferentes intervalos de concentración.

6. ***Staphylococcus sciuri*** presentó crecimiento diferencial, sin embargo, al medir la actividad de la enzima Glutación S-transferasa se determinó que tolera Cd^{2+} en las concentraciones [0.12mM] y [0.75mM] pues en ambas presenta un aumento en la actividad de la enzima con respecto al control. Lo anterior puede convertir a esta bacteria como una candidata para la remoción e identificación de este metal. En el caso de Hg^{2+} solo toleró la concentración [0.05 μM] y mostró un decremento en la actividad enzimática y en su crecimiento. En relación con el Cr^{2+} aunque en los ensayos de tolerancia mostraron crecimiento en todas las concentraciones, al medir la actividad de la enzima a [0.12mM] esta disminuyó con respecto al control y en [0.75mM] también se observó un crecimiento y la actividad de la enzima fue menor a la obtenida por el control.
7. ***Staphylococcus stepanovicii*** mostró tolerancia a Hg [0.05 μM] al presentar crecimiento. La actividad de la enzima a las diez horas fue similar al control. En el caso de Cr presentó tolerancia a [0.12mM] y [0.75mM] al presentar crecimiento microbiano y en la [0.12mM] el comportamiento de la actividad enzimática fue similar al obtenido por el control, en el caso de la concentración [0.75mM] la actividad de la enzima aumento con respecto al control, demostrando que *S. stepanovicii* podría ser utilizado como un microorganismo indicador de daño para mercurio y cromo utilizando a la enzima Glutación S-transferasa como indicador de daño, esta investigación aporta una pequeña brecha en el *S. stepanovicii* al no contar con la suficiente bibliografía que muestre su relación con los metales pesados.
8. El aumento de la actividad de la enzima y la respuesta a los factores de intoxicación de los metales pesados en diferentes organismos nos podrían ayudar a seleccionar a la enzima Glutación S-transferasa como un bioindicar de daño.

12.-PERSPECTIVAS

- 1- Realizar ensayos de tolerancia en bacterias pertenecientes al mismo género de las utilizadas en este trabajo con la finalidad de observar el efecto de los metales pesados sobre las cepas que no han sido expuestas.
- 2- Realizar pruebas antimicrobianas que permitan observar su efecto sobre las tres cepas bacterianas y si existe una relación entre la actividad de la enzima Glutación S-transferasa presentada por la exposición a metales pesados.
- 3- Estudiar las especies reactivas de oxígeno generadas por los metales pesados y si existe una relación con la actividad de la enzima Glutación S-transferasa.
- 4- Indagar en los mecanismos que le confieren la tolerancia y/o resistencia a los metales pesados en las bacterias *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus stepanovicii* al no presentar suficientes investigaciones sobre este tema.
- 5- Realizar estudios moleculares que nos permitan determinar la isoenzima de Glutación S-transferasa que está participando en los mecanismos de defensa de las cepas bacterianas.
- 6- Observar el tiempo y la capacidad de bioadsorción que están presentando las tres cepas bacterianas a los metales pesados que nos permitan determinar si las tres cepas bacterianas podrían ser utilizadas en un futuro como organismos biorremediadores a metales pesados.
- 7- Realizar determinaciones químicas que permitan conocer los niveles de Hg, Pb, Cd y Cr en el Rio Papaloapan, el Rio San Jacinto y la Laguna Linda Vista.

13.- APÉNDICE I

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY

1.- Reactivos.

Reactivo A: Solución 2 % de Na_2CO_3 en 0.10 N de NaOH.

Reactivo B: 0.5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ más 1% de sodio o tartrato de potasio y 20 gramos de NaOH.

Reactivo C: Mezcla de 50 ml del reactivo A con 1 ml de reactivo B (será descartado después de 1 día).

Reactivo D: Desoxicolato de sodio al 1%.

Reactivo E: reactivo de Folín diluido al 50%.

Estándar de proteína: Albumina sérica bovina a diferentes concentraciones.

2.- Curva de calibración de albúmina.

La curva de calibración se realiza para cuantificar la concentración de proteínas en una muestra. Se compara con la concentración de proteína de referencia estándar, en este caso, la referencia es albúmina sérica bovina. La curva de calibración de albúmina se lleva a cabo de la siguiente manera.

Tubo	Concentración de albúmina (mg/mL)	Agua (μL)	Albúmina (μL)	Desoxicolato de sodio (μL)	Solución C (μL)	Folín Cicalteu (μL)
Blanco	0	800	0	100	2000	100
1	0.0083	795	5	100	2000	100
2	0.0166	790	10	100	2000	100
3	0.0249	785	15	100	2000	100
4	0.0332	780	20	100	2000	100
5	0.0415	775	25	100	2000	100
6	0.0498	770	30	100	2000	100
7	0.0581	765	35	100	2000	100
8	0.0664	760	40	100	2000	100
9	0.0830	750	50	100	2000	100
10	0.1162	730	70	100	2000	100
11	0.1660	700	100	100	2000	100

14.- APENDICE 2

TINCION DE GRAM

Permite hacer diferenciaciones taxonómicas, separando dos grandes grupos de bacterias (Grampositivas, de color violeta azulado, y Gram-negativas, de color granate o rojo-rosado), según la composición de su pared celular (Bonilla, 2016). Los pasos se describen a continuación.

1.- PREPARACION DEL FROTIS

Se coloca una pequeña gota de agua pequeña sobre un portaobjetos limpio y seco, posteriormente se flamea el asa, se enfría en el agar y se toma una pequeña cantidad de una colonia de un cultivo sobre una gota de agua colocada en un portaobjetos, se extiende sobre la superficie del mismo y se evita que quede conglomerada. En caso de muestras líquidas, simplemente se coloca directamente la gota del cultivo en el portaobjetos y se procede a hacer el frotis en condiciones de esterilidad. Después de ello, usando unas pinzas, se procede a pasar dos o tres veces durante un segundo el portaobjetos con la cara del frotis hacia arriba por la parte baja de la flama del mechero dejando enfriar el portaobjetos entre los pases, para evitar que se queme la muestra. Se deja enfriar y se procede a realizar la tinción. La figura 1 indica el procedimiento para una muestra de cultivo sólido.

(https://www.geocities.ws/urtis_micro/sesiones/Gram.htm)

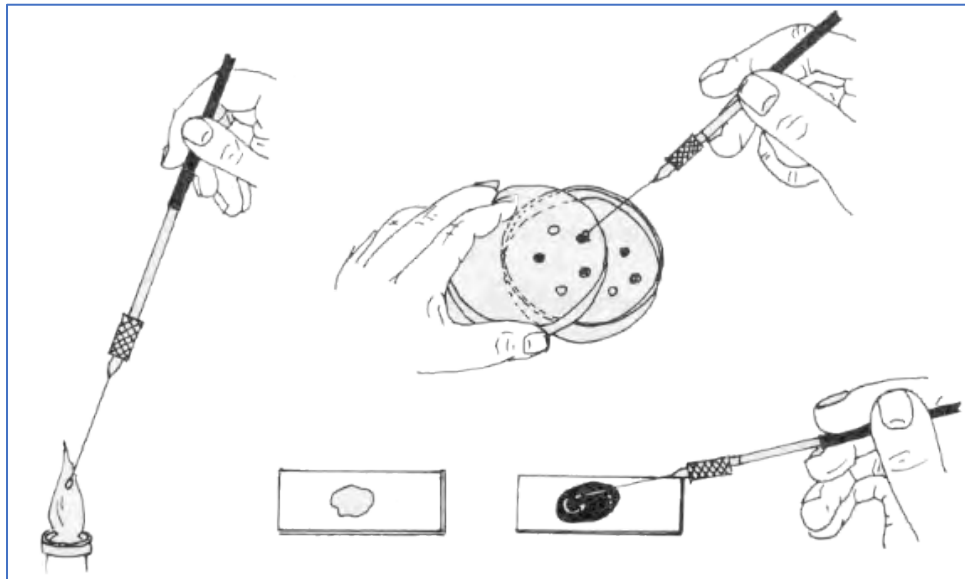


Figura 59. Preparación del frotis para realizar la Tinción de Gram (obtenido de https://www.geocities.ws/urtis_micro/sesiones/Gram.htm).

2.- TINCION.

El procedimiento que se lleva a cabo para realizar esta técnica debe seguir los siguientes pasos.

- 1.- Cubrir la preparación del frotis con unas gotas de cristal de violeta durante un minuto, enjuagar suavemente rociando un pequeño chorro de agua sobre la parte superior del portaobjetos, procurando no desprender la preparación, por presión del agua.
- 2.- Aplicar Lugol durante un minuto, después de transcurrido el tiempo lavar suavemente con agua. El yodo es corrosivo por lo cual se debe evitar el contacto con la piel.
- 3.- Decolorar por 10 segundos con una mezcla 1:1 de alcohol-acetona y enjuagar rápidamente con agua. Si no se retira rápidamente el decolorante desteñirá tanto a Gram positivas como Gram negativas.
- 4.- Contrastar con safranina durante 1 minuto, y finalmente enjuagar con agua.
- 5.- Observar al microscopio con el objetivo 10 a 100 X, agregando aceite de inmersión, solo en el último aumento, para lograr una buena resolución. La figura 2 muestra una ilustración de los pasos señalados anteriormente (<https://theory.labster.com/reagents-es/>).

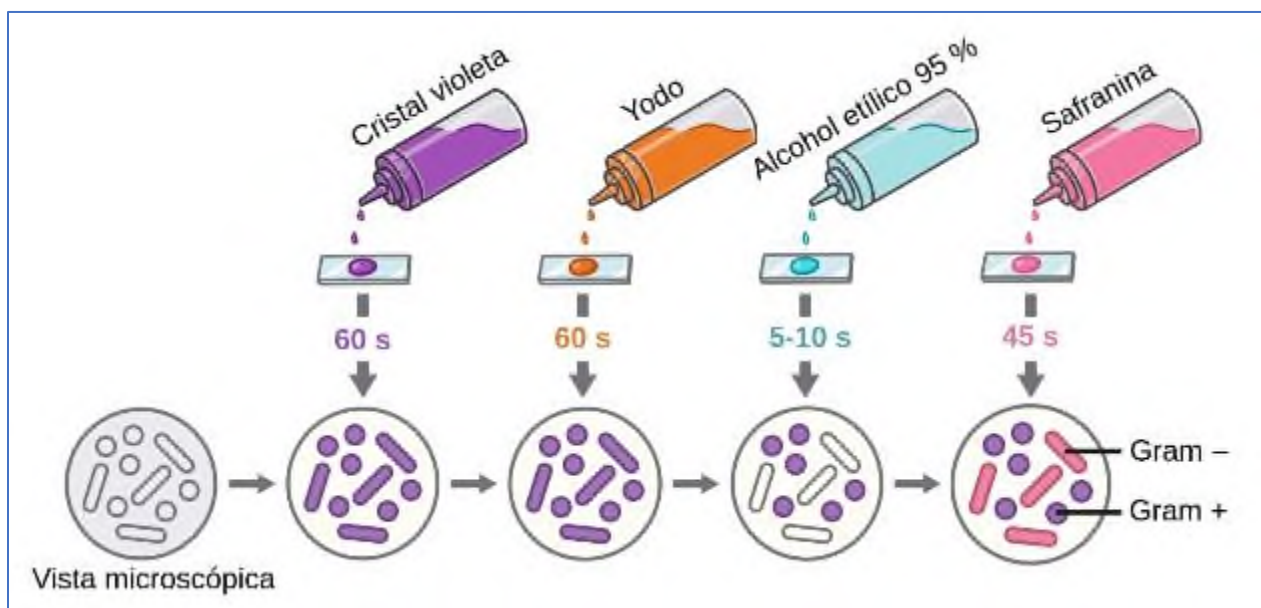


Figura 60. Pasos de la tinción de Gram y como se verá al microscopio en un aumento de 100X (tomado de <https://theory.labster.com/reagents-es/>).

15.- APÉNDICE 3

PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

1.- Fundamento y metodología.

MEDIO KIGLER: Medio diferencial que determina tanto la fermentación de los hidratos de carbono y la producción de ácido sulfhídrico. Las bacterias pueden ser utilizar cualquiera de los sustratos incorporados en el medio y ser metabolizados, características que son utilizadas para la diferenciación de estas, principalmente para las Enterobacterias.

Metodología: Suspender 54.8 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación constante, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar los tubos de ensayo con 15 ml. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo, la siembra en medio KIGLER a partir del cultivo puro se realiza una picadura en el medio sin tocar el fondo y se extiende sobre la superficie del medio.

MEDIO CITRATO: Determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento provocando alcalinidad, el medio incluye citrato de sodio, un anión como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

Metodología: Suspender 24,2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición pico de flauta profundo. La siembra en medio CITRATO a partir del cultivo puro se sembrará en la superficie un inoculó ligero realizando un arrastre de la muestra hasta el pico del medio.

MEDIO LIA: Determina la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido (Lisina y Arginina) para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad; la descarboxilación es el proceso mediante el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo.

Metodología: Suspender 35 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar reposar unos 15 minutos. Calentar cuidadosamente, agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en pico de flauta dejando un fondo vertical apto para la punción. Siembra con un aza recto se realiza una punción profunda.

MEDIO MIO: Medio para la identificación de enterobacterias sobre la base de movilidad (determina si un organismo es móvil o inmóvil por medio de sus flagelos) , la producción de ornitina descarboxilasa (mide la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido "ornitina" para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad) y de indol (la prueba se basa en la formación de un complejo de

color rojo cuando el indol reacciona con el grupo de aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído, la formación de indol se produce solamente en aquellos organismos capaces de fermentar los hidratos de carbono.).

Metodología: Suspender 31 g del polvo en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta completa disolución. Distribuir en tubos y esterilizar 15 minutos a 121°C, la siembra a partir de la cepa pura se realiza una punción en el centro hasta el fondo del medio con un aza recto.

MEDIO UREA: Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa produciendo un cambio de color rojo en el medio, la hidrólisis de la urea es catalizada por la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos.

Metodología: Suspender 24 g de polvo en 950 ml de agua destilada. Dejar reposar 2 minutos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 50 ml de una solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración o cloroformo. Fraccionar en tubos de hemólisis y solidificar en pico de flauta con fondo profundo. A partir de un cultivo puro de 18-24 horas, estriar la superficie del pico de flauta. Algunos microorganismos pueden requerir mayor tiempo de incubación Sin punzar la capa profunda para controlar el color.

AGAR Mac CONKEY: El medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva; por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia produciendo un viraje de color rojo, los microorganismos no fermentadores de lactosa serán incoloros.

Metodología: Suspender los ingredientes en el agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Se debe evitar el sobrecalentamiento. Enfriar entre 45°C y 50°C, colocar 20 mL de medio por cada placa y dejar solidificar.

MEDIO AGAR SANGRE: en el medio la tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. El agregado de sangre estéril promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemolisis.

Metodología: suspendiendo 40 g de polvo en 1000 ml de agua destilada a punto de ebullición, disolver hasta obtener una solución homogénea, aplicar calor lentamente en constante agitación, no permitir la ebullición, de esta forma aseguramos que los nutrientes no se desnaturalicen. La reconstitución del medio se alcanza cuando el medio se visualiza transparente a trasluz. Llevar a autoclave a esterilizar a 121°C a 1 atmósfera de presión por 15 minutos (mantener variable de temperatura constante). Enfriar hasta 50° temperatura que se registra en la práctica cuando el dorso de la mano resiste el contacto con el matraz. Es importante que el medio no registre mayor temperatura para lograr conseguir agar sangre (temperaturas elevadas generan agar chocolate). Agregar la sangre y homogeneizar.

AGAR DNAsa: permite diferenciar bacterias que poseen la enzima desoxirribonucleasa de aquellas que no la poseen, su presencia se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N, el ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia, mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado precipita y toma opacidad al medio de cultivos.

Metodología: Suspender 42 g. del polvo en 1 L de agua purificada, dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para disolución completa. Distribuir en placas de Petri estériles.

AGAR SAL Y MANITOL: Este agar permite el crecimiento de un determinado grupo de bacterias mientras que inhibe el crecimiento de otras. Este medio es importante en el laboratorio clínico debido a que es capaz de distinguir los microorganismos patogénicos en un corto periodo de tiempo. Contiene una alta concentración (~7.5%-10%) de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para *Staphylococcus* (y *Micrococcaceae*) debido a que el nivel de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias. Además, contiene manitol y un indicador de pH; rojo de fenol. Si un organismo es capaz de fermentar el manitol, un subproducto ácido es creado que hace que el rojo de fenol cambie a amarillo.

Metodología: Suspender 111 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta una temperatura entre 40-45°C y verter en placas estériles. Dejar solidificar a temperatura ambiente antes de su utilización

CATALASA: La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva.

OXIDASA: Se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa, que cuando se encuentra en presencia de oxígeno atmosférico, Citocromo c y el reactivo oxidasa, oxidan al reactivo para formar un compuesto colorado, indo fenol. Esta es una forma rápida de esta prueba y no se desperdicia reactivo, ya que este se oxida muy rápidamente y es difícil de conservar.

COAGULASA: Esta prueba detecta la presencia de la enzima coagulasa, producida por una cepa de *Staphylococcus* sobre el plasma sanguíneo. La coagulasa aumenta la velocidad de coagulación del plasma; el resultado final es la formación de un coágulo de fibrina. La concentración de la coagulasa influye sobre la velocidad de la coagulación del plasma, cuanto más alta la concentración más rápidamente se formará el coágulo.

2.- Resultado de las pruebas y tipo de microorganismo relacionado.

La siguiente tabla muestra las pruebas bioquímicas y la interpretación de los resultados, ya sea positivos o negativos, así como la información que muestran de los diferentes microorganismos (Macfaddin,2003).

Prueba bioquímica	Resultado positivo	Resultado negativo	Características del microorganismo
KLIGLER	Pico rojo/fondo rojo	Pico rosa/fondo naranja	No fermentador de azúcar, alcalino (oxida glucosa y lactosa)
CITRATO	Coloración azul	Coloración morada	Producción de citrato permeasa
LIA	Pico violeta/fondo violeta	Coloración azul y verde	Descarboxilación de lisina
MIO	Color púrpura	Color verde	Movilidad (bacterias suspendidas en la superficie). Ornitina descarboxilasa, comprobar si existe generación se realiza la prueba de Indol.
UREA	Rojo/rosa	Naranja	Bacterias que poseen la enzima ureasa
AGAR Mac CONKEY	Fermentadores de lactosa: colonias rojizas. Puede observarse halo de precipitación biliar	No fermentadores de lactosa: colonias del color del medio (incoloras)	Los fermentadores de lactosa producen colonias rojizas, los no fermentadores colonias incoloras.
AGAR SANGRE.	Existirá hemólisis existirá un cambio de color sobre el medio	No hemolítico, no existirá cambio de color sobre el medio	Hemólisis alfa: lisis parcial de glóbulos rojos, se observa halo de color verdoso alrededor de las colonias de estudio. Hemólisis beta: lisis total de los glóbulos rojos, halo blanco, brillante alrededor de la colonia de estudio. Hemólisis gamma: ausencia de lisis de los glóbulos rojos, el medio no

			presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia de estudio
AGAR DNAsa	Halo claro, transparente alrededor del crecimiento bacteriano	El medio se observa opaco	El microorganismo posee la enzima desoxirribonucleasa. La presencia de la enzima se detecta mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N.
AGAR SAL Y MANITOL	Produce colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo	producen colonias de Color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol	Enterobacterias. Capacidad de fermentar el manitol
Prueba bioquímica	Material y reactivos	Metodología.	Resultado
CATALASA	Portaobjetos. H ₂ O ₂ de 10 volúmenes Cultivos en fase exponencial de bacterias. Asas e hilos de siembra. Pipetas Pasteur	Colocar una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur. Suspender la bacteria	Resultado positivo se detecta la formación de burbujas.
OXIDASA	Papel de filtro cortado (trozos de 3x 1 cm) Placas de Petri; Reactivo de oxidasa: Solución al 1% de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina en agua destilada.	Poner un trozo de papel de filtro sobre una de las tapaderas de una placa de Petri. Añadir una gota del reactivo de oxidasa. Depositar sobre el reactivo masa bacteriana	La reacción positiva la indica un color purpura intenso antes de 10 segundos La reacción negativa la colonia no cambia de color o toma un color diferente al purpura
COAGULASA	Plasma sanguíneo, tubo o placas,	En placa.- Una colonia es emulsionada en una gota de plasma humano sobre un portaobjetos En tubo.- Consiste en colocar 0.1ml del plasma, 0.3ml de Solución Salina Fisiológica y la colonia, esta preparación se incuba a 37°C por 24 horas.	En placa.- La formación de pequeños coágulos o grumos en un tiempo de 2 minutos indica la presencia de coagulasa y constituye un resultado positivo. En tubo. - La prueba es positiva si existe formación de un coágulo en el fondo del tubo y negativa si no se forma coágulo. En esta prueba puede hacerse una primera lectura a las 4 horas de incubación, ya que algunas cepas de <i>Staphylococcus</i> son altamente positivas

16.- BIBLIOGRAFIA

Abubark Samer, 2003. Cadmium resistance in *Staphylococcus sciuri*, The Department of Biological Sciences EMPORIA STATE UNIVERSITY.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), (2007), U.S. Toxicological profile for cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta

Agency for toxic substances and disease control (ATSDR), 2011. División de Toxicología y Medicina Ambiental. Departamento de Salud y Servicios humanos de los EE. UU. Washington (USA): Servicio de Salud Pública, 2011, 269 pp.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2012. ToxFAQs for Chromium. Agency for toxic substances and disease registry, U.S. Toxicological profile for cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta.

Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., & Di Ilio, C. (2008). Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal*, 276(1), 58-75. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x>

Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., & Di Ilio, C. (2012). Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and Archaea. *Biochimie*, 94(3), 588-596.

Altalhi, A. D. 2009. Plasmids profiles, antibiotic and heavy metal resistance incidence of endophytic bacteria isolated from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 8: 5873-5882. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB09.1391>

Aquihuatl Ramos, M. de L. A., & Perez, C. M. L. (2004). Manual de prácticas de Microbiología general. <http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/5139>

Atlas del agua, 2016. Atlas del agua en México, Comisión Nacional del Agua, Subdirección General de Planeación, México, D.F., 140 pp.

Banat, K., Howari, F., & Al-Hamad, A. (2005). Heavy metals in urban soils of central Jordan: ¿Should we worry about their environmental risks, *Environmental Research*, 97(3), 258-273.

Banjerdkij, P., Vattanaviboon, P., & Mongkolsuk, S. (2005). Exposure to cadmium elevates expression of genes in the OxyR and OhrR regulons and induces cross-resistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1843–1849. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1843-1849.2005>

Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C. S., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Modolon, F., Chryssafidis, A. L., & Andrade, G. (2019). Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas Aeruginosa* LV strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.025>

Bowman, N., Patel, D., Sanchez, A., Xu, W., Alsaffar, A., & Tiquia-Arashiro, S. M. (2018). Lead-resistant bacteria from Saint Clair River sediments and Pb removal in aqueous solutions. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 2391-2398.

Bruins, Mark R, et.al, 2000, Microbial Resistance to Metals in the Environment, Department of Diagnostic Medicine/Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, Kansas 66506, doi:10.1006/eesa.1999.186041,2010, pp. 1-10

- Bustos, Viteri.K.T., Cacuango Gualacata.J.J. 2017. Identificación molecular de bacterias resistentes a cadmio y cromo aisladas de aguas contaminadas de la zona de Papallacta Cantón Quijos de la provincia de Napo, Universidad Politécnica salesiana sede Quito.
- Cabudivo Escobar, M. C, Tapayuri Rengifo, K. B., 2020., Perfiles de resistencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ambientales e intrahospitalarias frente a metales pesados, Iquitos-Perú.
- Castillo Rodríguez F. , Roldan Ruíz.M. D., Plá. Basco. R, Romero Huertas M.J, Caballero Dominguez, F.J., Vívian Moreno, C., Luque-Roque, M.M., (2005). libro de BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL, editorial Tébar: ISBN digital: 978-84-7360-395-9, 227-667pp.
- Castillo-Cadena, J., Contreras-Gómez, S., Poblano-Bata, R., Posadas-González, R., & Ramírez-García, J. J. (2007). Actividad de la enzima glutatión S-transferasa T1 en floricultores expuestos a plaguicidas. *Bioquímica*, 32(SuA), 138.
- Castro Echavez, F. L., & Marín Leal, J. C. (2018). Comparación de la ecotoxicidad por metales pesados sobre bacterias heterótrofas de dos sitios contrastados del Lago de Maracaibo (Venezuela). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 9–17. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2825>
- Ceballos, Miguel. Á. (2021). La contaminación por ozono en el Estado español durante 2021 (P. Segura, Ed.; 1.a ed.) [INFORME]. *Ecologistas en acción*. <https://www.ecologistasenaccion.org/183566>
- Cervantes C., Silver.S., 1992 “Plasmid chromate resistance and chromate reduction”, en *Plasmid*. 27 (1):65-71.
- Cervantes-Vega, C., Chávez, J., Córdova, N. A., de la Mora, P., & Amador Velasco, J. (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios*, 48(196-197), 159–163.
- Chen, S., Yang, Y., Liu, C., Dong, F., & Liu, B. (2015). Column bioleaching copper and its kinetics of waste printed circuit boards (WPCBs) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Chemosphere*, 141, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.082>
- Chien, C.-C., Lin, B.-C., & Wu, C.-H. (2013). Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.014>
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), (2014) Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación. Ciudad de México. SEMARNAT.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), (2016) Atlas del agua en México 2016. Proyectos estratégicos Agua potable, drenaje y saneamiento.
- Consejo D., J. J, (2014), Hacia una estrategia articuladora de esfuerzos en pro del agua en la cuenca del río Verde-Atoyac, Oaxaca, D.R. © Instituto de la Naturaleza y la Sociedad de Oaxaca, A. C. (INSO).
- Cota- Ruiz K., Gastelum Núñez J.A, Ríos-Delgado M, Martínez- Martínez A., (2019) Biorremediación: actualidad de conceptos y aplicaciones, *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud: Biotecnia*, vol. XXI (1): 37-44pp.

- Cuberos, E., Rodríguez, A. I., & Prieto, E. (2009). Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de salud pública (Bogotá, Colombia)*, 11(2), 278–289. <https://doi.org/10.1590/s0124-00642009000200012>
- Cursino, L. (2000). Capacity of mercury volatilization by mer (from *Escherichia coli*) and glutathione S-transferase (from *Schistosoma mansoni*) genes cloned in *Escherichia coli*. *The Science of the total environment*, 261(1–3), 109–113. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(00\)00629](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(00)00629)
- De la Rosa, D. A., Volke-Sepúlveda, T., Solórzano, G., Green, C., Tordon, R., & Beauchamp, S. (2004). Survey of atmospheric total gaseous mercury in Mexico. *Atmospheric Environment (Oxford, England: 1994)*, 38(29), 4839–4846. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.06.013>
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., & Schleifer, K.-H. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 3)*. Springer. -392-421pp
- Delgadillo-López, Angélica Evelin, González-Ramírez, César Abelardo, Prieto-García, Francisco, Villagómez-Ibarra, José Roberto, & Acevedo-Sandoval, Otilio. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(2), 597-612.
- Devlin, T. M., 2004, *BIOQUIMICA; Libro de texto con aplicaciones clínicas*, 4ª edición, editorial Reverte, Edición en español, Barcelona. 1248p. ISBN 84-291-7208-4.
- Elahi, A., Rehman, A., Zajif Hussain, S., Zulfiqar, S., & Shakoori, A. R. (2022). Isolation and characterization of a highly effective bacterium *Bacillus cereus* b-525k for hexavalent chromium detoxification. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2878-2885. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.027>
- Ellingsen, D. G., Thomassen, Y., Langård, S., & Kjuus, H. (1993). Urinary mercury excretion in chloralkali workers after the cessation of exposure. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 19(5), 334–341. <https://doi.org/10.5271/sjweh.1466>
- Encinas Malagón, M. D. (2011). *Medio ambiente y contaminación principios básicos (1.a ed.) [EL MEDIO AMBIENTE] (ESPAÑA)*. ISBN:978-84-615-1145-7, EAN: 9788461511457, 119pp.
- Estudio sobre la protección de ríos, lagos y acuíferos desde la perspectiva de los derechos humanos (De Comisión Nacional de los Derechos Humanos [CNDH] & Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]; 1.a ed.). (2018). Comisión Nacional de los Derechos Humanos. https://www.cndh.org.m/sites/all/doc/Informes/Especiales/estudio_rios_lagos_acuiferos.pdf.
- Estudio sobre la protección de ríos, lagos y acuíferos desde la perspectiva de los derechos humanos síntesis ejecutiva, (De Comisión Nacional de los Derechos Humanos [CNDH] & Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]; 1.a ed.). (2018). Comisión Nacional de los Derechos Humanos. https://www.cndh.org.m/sites/all/doc/Informes/Especiales/estudio_rios_lagos_acuiferos.pdf.
- Galicia, Apolinar. Jade Alejandrina, 2013. “Efecto de la exposición a plomo en bacterias aisladas de afluentes contaminados”, Universidad del Papaloapan, 2013, pp. 76, 86-88.
- Garrido López, P. A., Bautista Galicia, N. (2019), *Diagnostico de la contaminación del agua en el Estado de Oaxaca*, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional.

- Gil, Miriam Janet, Soto, Adriana María, Usma, Jorge Iván y Gutiérrez, Omar Darío. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7(2), 52-73. Retrieved March 29, 2023.
- Gómez Álvarez, C. A., Leal Castro, A. L., Pérez de González, M. J., Navarrete Jiménez, M. L. (2005). Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(1), 27-34.
- Gutiérrez Cárdenas, O. G., Navarro Ibarra, L. F., Loeza Lara, P. D., Río Rodríguez, O. G. D., & Jiménez Mejía, R. (2017). Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. *Nova scientia*, 9(19), 97-112.
- Hauschild, T., Stepanovic', S., Zakrzewska-Czerwin' ska, J., 2010. *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidasepositive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 183–187.
- Heck, K., De Marco, É. G., Duarte, M. W., Salamoni, S. P., & Van Der Sand, S. (2015). Pattern of multiresistant to antimicrobials and heavy metal tolerance in bacteria isolated from sewage sludge samples from a composting process at a recycling plant in southern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(6). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4575-6>
- Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G. J., & Nies, D. H. (2008). Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190, 5431–5438. <https://doi.org/10.1128/JB.00271-08>
- Jakoby W. B. (1985). Glutathione transferases: an overview. *Methods in enzymology*, 113, 495–499. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13064-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13064-8)
- Jensen, S. O., Lyon, B. R. (2009). Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*, 4, 565–582.
- Ji, G., Garber, E. A., Armes, L. G., Chen, C. M., Fuchs, J. A., y Silver, S. (1994). Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Biochemistry*, 33(23), 7294–7299. <https://doi.org/10.1021/bi00189a034>
- Jiménez Cisneros B., Torregrosa y Armentia M. L., Aboites A. L., (2010), *El agua en México: causas y encauses*, Primera edición, México, D.R. ©. Academia Mexicana de Ciencias, CONAGUA, ISBN 978-607-95166-1-1, 702pp.
- Juhnke S, Peitzsch N, Hübener N, Große C, Nies D. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch Microbiol.* 179(1):15-25
- Kiliç, N. K., Stensballe, A., Otzen, D. E., & Dönmez, G. (2010). Proteomic changes in response to chromium (VI) toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, 101(7), 2134–2140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.008>
- Klaassen C.D., Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 7ª edición. McGraw-Hill. 2008. Pg. 942-943

- Li, W. C., & Tse, H. F. (2015). Health risk and significance of mercury in the environment. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(1)192–201. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3544-x>
- Loeza Lara, P. D., & Valdez Alarcón, J. J. (2004). MECANISMOS DE REPLICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS BACTERIANOS. *REB:23 (2)*: 79-86,
- Lominchar, M.A ,2010.; Sierra, M.J.; Rodríguez, J.; Millán, R Estudio del Comportamiento y Distribución del Mercurio Presente en Muestras de Suelo Recogidas en la Ribera del Río Valdeazogues ,2010,36 pp.
- Lowry. H. Oliver Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, and Rose J. Randall,1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT, From the Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri
- Lújan Roca, Daniel Ángel. (2014). Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 465-474. Recuperado en 29 de marzo de 2023, de Macfaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (3a ed.)*. Editorial Medica Panamericana.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2004). *Brock, biología de Los microorganismos*. Pearson educación. 10ª edición.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2009). *Brock, biología de Los microorganismos*. Pearson Educación, 12ª edición.
- Malacalza, L. (Ed.). (2013a). *Ecología y ambiente Primera edición electrónica, AUGM-Comité de Medio Ambiente, Serie Monográfica Sociedad y Ambiente: Reflexiones para una nueva América Latina, Monografía N° 2, ISBN 978-29821-0-2*.
- Marrero-Coto, Jeannette, et al. "Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación." *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, vol. 41, no. 1, 2010, p. 67-78. Gale One File: Informe Académico, Accessed 5 Aug. 2020.
- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M. E., Salgado, I., Olivares, S., Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos ya metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1-10.
- Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., Chowdhury, A. M. A. (2017). Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 65-74.
- Mendoza-Patiño Nicandro, De León Rodríguez Jorge Arturo, Fernández Saavedra Gabriela, Figueroa José Luis, Páez de la Luz Hugo, Serrano Soval Cecilia, 2006. Tóxicos renales, *Revista de la Facultad de Medicina, Rev Fac Med UNAM Vol.49 No.1 Enero-Febrero*, 34-37pp
- Meza-Figueroa, D., Maier, R. M., de la O-Villanueva, M., Gómez-Álvarez, A., Moreno-Zazueta, A., Rivera, J., Campillo, A., Grandlic, C. J., Anaya, R., & Palafox-Reyes, J. (2009). The impact of unconfined mine tailings in residential areas from a mining town in a semi-arid environment: Nacozari, Sonora, Mexico. *Chemosphere*, 77(1), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.068>.

- Mihdir, A., Assaedi, A., Abulreesh, H., & Osman, G. (2016). Detection of heavy metal resistance genes in an environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *British microbiology research journal*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.9734/bmrj/2016/28655>
- Mireles, F., Davila, J. I., Pinedo, J. L., Reyes, E., Speakman, R. J., Glascock, M. D. (2012). Assessing urban soil pollution in the cities of Zacatecas and Guadalupe, Mexico by instrumental neutron activation analysis. *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 103, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.02.009>
- Moreno Sanchez R, Devars S (1999) Abundancia de los metales pesados en la biosfera. En: Cervantes C, Moreno-Sanchez R. Contaminación Ambiental por Metales Pesados. AGT Editor. Mexico. 1-10.
- Murray, P. R. (2007). *Microbiología Medica* (5a ed.). Elsevier España.
- Naik, M. M., & Dubey, S. K. (2013). Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.039>
- Navarro Aviñó, J., Aguilar Alonso, I., López-Moya, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas, revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 16 (2), 1-17.
- Nemeghaire, S., Argudín, M. A., Febler, A. T., Hauschild, T., Schwarz, S., Butaye, P. (2014). The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes. *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), 342–356.
- Nieboer, E., & Richardson, D. J. (1980). The replacement of the nondescript term ‘heavy metals’ by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 1(1), 3-26. [https://doi.org/10.1016/0143-148x\(80\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0143-148x(80)90017-8)
- Nies DH. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995 May;177(10): 2707-12. doi: 10.1128/jb.177.10.2707-2712.1995. PMID: 7751279; PMCID: PMC176940
- Nies, D. H. (2002). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 313–339. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(03)00048-2)
- Nriagu, J. O., & Pacyna, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature*, 333(6169), 134–139. <https://doi.org/10.1038/333134a0>
- Nriagu, J., O., Azcue J.M, (1990). Food contamination with arsenic in the environment. In: Simmons JON and MS, ed. *Food Contamination from environmental sources*. Inc.N.Y. John Wiley & Sons :121 -144.
- Ohtake, H., Cervantes.C. 1988 Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 173–176.
- Orozco Chinome, J. E., Picón Jaimes, Y. A., Garcés-Salamanca, C. T. (2018). *Staphylococcus sciuri*, una causa infrecuente de sepsis materna. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 83(3), 291–294.

- Oyetibo, G. O., Miyauchi, K., Huang, Y., Chien, M.-F., Ilori, M. O., Amund, O. O., Endo, G. (2017). Biotechnological remedies for the estuarine environment polluted with heavy metals and persistent organic pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 614–625.
- Pagnanelli, F., Moscardini, E., Giuliano, V. and Toro, L. 2004. Sequential Extraction of Heavy Metals in River Sediments of an Abandoned Pyrite Mining Area: Pollution Detection and Affinity Series. *Environmental Pollution*, 132:189-201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.002>
- Pathak, S. P., Gopal, K. 2005. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environmental Research*. 98 (1): 100-103.
- Pérez-Vázquez, F. J., Flores-Ramírez, R., Ochoa-Martinez, A. C., Orta-García, S. T., Hernández-Castro, B., Carrizalez-Yáñez, L., & Pérez-Maldonado, I. N. (2015). Concentrations of persistent organic pollutants (POPs) and heavy metals in soil from San Luis Potosí, México. *Environmental monitoring and assessment*, 187(1), 4119. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4119-5>
- Pitondo-Silva, A., Gonçalves, G. B., & Stehling, E. G. (2016). Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 124(8), 681–688.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiology: Food and Industrial Microbiology*. McGraw-Hill.
- Quispe, Machaca, E. D. (2017). RESISTENCIA IN VITRO AL PLOMO Y MERCURIO POR LA COMUNIDAD BACTERIANA DE LAS AGUAS DEL RÍO RAMIS – PUNO, PERÚ. *Revista De Investigaciones* , 6(3), 202-212. <https://doi.org/10.26788/riepg.v6i3.109>
- Ramírez P. R, (2018). Acuerdo por el que se dan a conocer los resultados del estudio técnico de las aguas nacionales superficiales en las cuencas hidrológicas Río Salado, Río Grande, Río Trinidad, Río Valle Nacional, Río Playa Vicente, Río Santo Domingo, Río Tonto, Río Blanco, Río San Juan, Río Tesechoacán, Río Papaloapan, Llanuras de Papaloapan, Río Jamapa, Río Cotaxtla, Jamapa-Cotaxtla y Llanuras de Actopan, de la Región Hidrológica número 28 Papaloapan, Dirección General de la Comisión Nacional del Agua, Órgano Administrativo. Desconcentrado de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2007). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*, 21(3), 321-332. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9121-8>.
- Rey-Crespo, F., Miranda, M., & López-Alonso, M. (2013). Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.040>
- Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. M., Gutiérrez-Builes, L. A. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 35(2), 236-247. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>.

- Roane, T. M. (1999). Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils. *Microbial Ecology*, 37(3), 218–224. <https://doi.org/10.1007/s002489900145>
- Rodicio, M. del R., y Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238–245. <https://doi.org/10.1157/13059055>
- Rodríguez, Eugenio N., McLaughlin, M. y Pennock, D. (2019). *La contaminación del suelo: una realidad oculta*. Roma, FAO. ISBN 978-92-5-131639-9.
- Rossjohn, J., & Polekhina, G. (1998). A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: Functional and evolutionary implications.” *Estructuré*.
- Santos, P. M., Mignogna, G., Hj Y Zennaro, E. (2002). Ocurrencia y propiedades de glutatión S-transferasas en cepas de *Pseudomonas* que degradan fenol. *Investigación en microbiología*, 153(2), 89–98.
- Satapute, P., Paidi, M. K., Kurjogi, M., Jogaiah, S. (2019). Physiological adaptation and spectral annotation of Arsenic and Cadmium heavy metal-resistant and susceptible strain *Pseudomonas taiwanensis*. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 251, 555–563.
- Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., & Caccuri, A. M. (2010). Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.012>
- SEMARNAT (2016). Decreto por el que se abrogan los acuerdos que se indican y se establece zona de reserva para uso ambiental o conservación ecológica en la cuenca hidrológica Río Fuerte 1, y zona de reserva para uso ambiental o conservación ecológica en la cuenca hidrológica Río Fuerte 2, así como zona reglamentada en las aguas superficiales no comprometidas en las reservas que se establecen en la Subregión Hidrológica Río Fuerte, Estudio sobre la protección de ríos, lagos y acuíferos desde la perspectiva de los derechos humanos, 2018 289 de la Región Hidrológica número 10 Sinaloa. DOF. Viernes 23 de septiembre del 2016.
- Shamim, S., Rehman, A. (2015). Antioxidative enzyme profiling and biosorption ability of *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2 under cadmium stress: Antioxidative enzyme profiling and biosorption ability. *Journal of Basic Microbiology*, 55(3), 374–381.
- Sharma Babita, Shukla Pratyosh, Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 401,2021, 123285, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123285>.
- Shehu, D., Alias, Z. (2018). Functional Role of Tyr12 in the Catalytic Activity of Novel Zeta-like Glutathione S-transferase from *Acidovorax* sp. KKS102. *The protein journal*, 37, 261-269.
- Silver y Walderhaug, 1992, Gene regulation and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev.* 56:195-228.

Skopelitou, Katholiki et al. 2015. "Catalytic features and crystal structure of a tau class glutathione transferase from *Glycine max* specifically upregulated in response to soybean mosaic virus infections." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*.

Sochor, J., Zitka, O., Hynek, D., Jilkova, E., Krejцова, L., Trnkova, L., Adam, V., Hubalek, J., Kynicky, J., Vrba, R., & Kizek, R. (2011). Bio-sensing of cadmium (II) ions using *Staphylococcus aureus*. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 11(11), 10638–10663. <https://doi.org/10.3390/s111110638>

Soo, Y. O.-Y., Chow, K.-M., Lam, C. W.-K., Lai, F. M.-M., Szeto, C.-C., Chan, M. H.-M., & Li, P. K.-T. (2003). A whitened face woman with nephrotic syndrome. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 41(1), 250–253.

Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(2), 321–336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-h](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-h)

Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>

Sunderland E.M et al. 2009. Mercury sources, distribution, and bioavailability in the North Pacific Ocean: insights from data and models. *Global Biogeochemical Cycles*, 23.

Tarangini, K. (2009). Biosorption of heavy metals using individual and mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Defence Life Science Journal*, 2(4), 442–447.

Toribio-Jiménez, J., M. A. Rodríguez-Barrera, A. M. Valdez-Lucena, A. Barrera-Flores, D. Segura, V. Wilson-Corral, E. Flores Alfaro, y Romero. 2014. Production of biosurfactants by bacteria isolated from a mine tailing zone in Southern Mexico and their resistance to heavy metals. *J. Bacteriol. Res.* 6: 23-31.

Travensolo, R. F., Garcia, W., Muniz, J. R. C., Caruso, C. S., Lemos, E. G. M., Carrilho, E., Araújo, A. P. U. (2008). Cloning, expression, purification and characterization of recombinant glutathione-S-transferase from *Xylella fastidiosa*. *Protein Expression and Purification*, 59(1), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.01.017>

Trivedi, P. C., Pandey, S., Bhadauria, S. (2010). *Text book of microbiology*.

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K. (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4352–4359. <https://doi.org/10.1128/AAC.00356-10>.

Valko, M., Jomova, K., (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Vázquez Banda, M. del R., Sánchez Calderón, L., & Díaz Pérez, C. (2017). Aislamiento y caracterización filogenética de bacterias resistentes a metales pesados del estado de Zacatecas. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 3(2), 12–16.

Vázquez, Y. C., Orozco, S. A. (2004). La destrucción de la naturaleza. Colección la Ciencia para Todos, número 83. SEP, FCE, CONACyT. 102pp.

Villasante Colina, J. (2000). Tipos de contaminación, sus fuentes y efectos en el estuario de Santoña. Dialnet, Nº 5, ISSN: 1138-9680. 211-224 pp.

Volke-Sepulveda, T., Velasco-Trejo, J. A., De La Rosa Pérez, D. A. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Vuilleumier, S., Pagni, M. (2002). The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: New lessons from genomes". *Applied Microbiology and Biotechnology*.

White, D., Drummond, J., Drummond, J. T., & Fuqua, C. (2012). *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford University Press, USA.

Yañez, L., García-Nieto, E., Rojas, E., Carrizales, L., Mejía, J., Calderón, J., Razo, I., Díaz-Barriga, F. (2003). DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area. *Environmental Research*, 93(3), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.07.005>.

Yaron, B., Dror, I., & Berkowitz, B. (2012). *Soil-subsurface change: Chemical pollutant impacts* (2012a ed.). Springer.

Zalduegui, P. C. (2001). *Bioquímica de las fermentaciones*. impreso en la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid. Ciudad Universitaria.- Madrid, I.S.B.N.- 84-600-6754-8.

Zetina Rodríguez, M. del C. (2012). La historia de un tesoro que se convirtió en un desastre ambiental, la Zacatecana, ejido de Guadalupe, Zacatecas. *Revista de el colegio de San Luis*, II(4), 160–194. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426239577007>.

Zhang, W., Yin, K., Li, B., & Chen, L. (2013). A glutathione S-transferase from *Proteus mirabilis* involved in heavy metal resistance and its potential application in removal of Hg²⁺. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.023>