



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Departamento de Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud

“Identificación de bacterias halófilas tolerantes a metales pesados”

TESIS

Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

IBI. Jonathan Ricardo Rosas Ramírez

Comité de Tutores

Tutor Académico: Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor interno: Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Tutor externo: Dr. Horacio Sandoval Trujillo

Toluca, Estado de México,

2017

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
1. ANTECEDENTES	10
1.1. Metales pesados.....	10
1.2. Principales fuentes de metales pesados	10
1.2.1. Fuentes naturales	10
1.2.2. Fuentes de origen antropogénico.....	11
1.2.2.1. Residuos sólidos municipales.....	13
1.2.2.2. Residuos sólidos industriales	14
1.3. Clasificación de los metales pesados	15
1.3.1. Metales vestigio	15
1.3.2. Metales esenciales.....	15
1.3.3. Metales pesados	15
1.3.4. Elementos metálicos potencialmente tóxicos	16
1.4. Metales pesados tóxicos y su efecto en la salud	16
1.4.1. Arsénico (As).....	17
1.4.2. Cromo (Cr)	17
1.4.3. Mercurio (Hg)	17
1.4.4. Plomo (Pb)	18
1.5. Efectos de la exposición a metales pesados en México.....	19
1.6. Alternativas de remediación en zonas contaminadas con metales pesados.....	20
1.6.1. Métodos fisicoquímicos	20
1.6.2. Métodos biológicos.....	21
1.7. Ambientes extremos	23
1.7.1. Microorganismos extremófilos.....	25
1.7.2. Ambientes salinos	26
1.7.3. Microorganismos halófilos.....	27
1.7.4. Clasificación de los microorganismos halófilos según sus requerimientos salinos	27

1.8. Actinobacterias	28
1.9. Bacterias tolerantes a metales pesados y/o capaces de bioacumularlos.....	29
1.10. Actinobacterias tolerantes a metales pesados y/o capaces de bioacumularlos.....	32
1.11. Bacterias halófilas tolerantes a metales pesados y/o capaces de bioacumularlos.....	32
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
2.1. Pregunta de investigación	34
3. HIPÓTESIS.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1. Objetivo general.....	35
4.2. Objetivos particulares	35
5. JUSTIFICACIÓN.....	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
6.1. Diseño de estudio.....	36
6.2. Método de muestreo.....	36
6.3. Muestra.....	36
6.4. Criterios de Inclusión	36
6.5. Criterios de exclusión	36
6.6. Criterios de eliminación	36
6.7. Procedimientos.....	37
6.7.1. Caracterización fisicoquímica de las muestras	37
6.7.2. Preparación del medio de cultivo para bacterias halófilas.....	37
6.7.3. Aislamiento y purificación de bacterias halófilas	37
6.7.4. Caracterización morfológica de las cepas.....	38
6.7.5. Caracterización fisiológica de bacterias halófilas	38
6.7.6. Tolerancia de las cepas a los a metales pesados.....	38
6.7.7. Identificación genética de las cepas tolerantes a metal pesado.....	39
6.7.8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	40

6.7.9. Cambios morfológicos de las cepas en presencia del metal pesado.	41
7. VARIABLES DE ESTUDIO	42
7.1. Variable independiente	42
7.2. Variables dependientes	42
7.3. Operacionalización de variables	42
8. RESULTADOS.....	43
8.1. Título corto del artículo enviado.....	43
8.2. Página frontal del artículo enviado	43
8.3. Carta de envío	44
8.4. Abstract	45
8.5. Keywords.....	45
8.6. Introduction.....	46
8.7. Materials and methods	49
8.8. Results.....	55
8.9. Discussion	59
8.10. Acknowledgements.....	61
8.11. Conflict of interest.....	61
8.12. References	61
8.13. List of tables	67
9. RESULTADOS ADICIONALES.....	71
9.1. Cepas aisladas	71
9.2. Principales características macroscópicas y microscópicas encontradas en las bacterias aisladas.....	73
9.3. Tolerancia de las cepas a metal pesado.	74
9.3.1. Tolerancia a Arsénico (As ³⁺).....	74
9.3.2. Tolerancia a Cromo (Cr ⁶⁺)	74
9.3.3. Tolerancia a mercurio (Hg ²⁺).....	75
9.3.4. Tolerancia a plomo (Pb ²⁺).....	75

9.4. Identificación genética de cepas bacterianas con mayor capacidad de tolerancia a metal pesado.....	77
10. DISCUSIÓN.....	78
11. CONCLUSIONES.....	80
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

RESUMEN

Los metales pesados son materiales empleados en procesos tecnológicos y actividades antropogénicas, algunas veces son liberados al medio ambiente provocando deterioro de flora, fauna y salud humana por lo que se han implementado diferentes estrategias para eliminarlos o reducirlos del medio ambiente como los tratamientos químicos, los cuales utilizan las propiedades físicas y químicas de los contaminantes o del medio contaminado para transformar, separar o inmovilizarlos pero muchas veces estos tratamientos presentan como desventaja el requerir un tratamiento secundario o disposición final del contaminante, lo que genera un costo económico y ambiental. También existen los métodos biológicos (biorremediación) que utilizan principalmente plantas, hongos y bacterias principalmente. Existen ambientes que presentan parámetros fisicoquímicos extremos ya sea de temperatura, pH, presión, salinidad etc., en estos ambientes se desarrollan microorganismos extremófilos los cuales requieren de condiciones extremas para desarrollarse, tal es el caso de las bacterias halófilas, las cuales requieren cierta concentración de salinidad para desarrollarse. El objetivo de esta investigación fue determinar la tolerancia a los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} por bacterias halófilas aisladas de suelo salino del ex Lago de Texcoco. Se aislaron bacterias halófilas en medio de cultivo MH con 10% NaCl, pH 8 y 37°C. Se determinó la tolerancia de las cepas aisladas a los metales pesados: As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} , inoculándolas en medio MH complementado con diferentes concentraciones de metal. Las cepas que presentaron mayor tolerancia, se identificaron genéticamente por análisis de secuenciación del gen 16S rRNA y se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del metal pesado que toleró. Setenta y cinco cepas halófilas fueron aisladas de suelo salino del ex Lago de Texcoco, se identificaron las especies: *Salinicoccus roseus* con CMI de 0.10 mM de Hg^{2+} ; *Halomonas pantelleriensis* mostrando una CMI de 7.0 mM de Pb^{2+} ; *Nocardiopsis xinjiangensis* con CMI de 9.75 mM de As^{3+} y *Nocardiopsis salina*, esta última tuvo la capacidad

de tolerar la mayor concentración de tres metales con CMI de 27.25 mMAs³⁺; 1250 mM Cr⁶⁺ y 7.75 mMPb²⁺. Este estudio demuestra que las bacterias halófilas aisladas de suelo salino del ex Lago de Texcoco toleran metales pesados. Se observaron cambios morfológicos en algunas cepas tolerantes debido a la presencia de metal pesado, principalmente el cambio de color o matiz, cambio en tamaño de las colonias y cambio de forma de las colonias con respecto a las cepas control, es decir, desarrolladas sin presencia de metal pesado. Actualmente no existen reportes sobre la tolerancia a metales pesados de las especies de actinobacterias *Nocardiopsis xinjiangensis* y *Nocardiopsis salina*, por lo que esta investigación será la primera en reportar la tolerancia de estas especies a los metales pesados Ar³⁺, Cr⁶⁺, Hg²⁺ y Pb²⁺ mismas que podrían ser candidatas potenciales en procesos de biorremediación de ambientes salinos contaminados con metales.

ABSTRACT

Heavy metals are materials used in technological processes and anthropogenic activities, sometimes they are released into the environment causing deterioration of flora, fauna and human health so that different strategies have been implemented to eliminate or reduce them from the environment such as chemical treatments, which use the physical and chemical properties of pollutants or contaminated media to transform, separate or immobilize them but often these treatments have the disadvantage of requiring a secondary treatment or final disposition of the pollutant, which generates an economic and environmental cost. There are also biological methods (bioremediation) that mainly use plants, fungi and bacteria mainly. There are environments that have extreme physicochemical parameters of temperature, pH, pressure, salinity, etc., in these environments, extremophile microorganisms develop which require extreme conditions to develop, such is the case of halophilic bacteria, which require a concentration of salinity to develop. The aim of this investigation was to determine the tolerance to heavy metals As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} by halophilic bacteria isolated from saline soil of the former lake of Texcoco. Halophilic bacteria were isolated in MH culture medium with 10% NaCl, pH 8 and 37 ° C. The tolerance of the isolated strains to the heavy metals was determined: As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} , inoculating them in MH medium supplemented with different concentrations of metal. The strains that showed the greatest tolerance were genetically identified by sequencing analysis of the 16S rRNA gene and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the heavy metal tolerated was determined. Seventy-five halophilic strains were isolated from saline soil of the former lake of Texcoco, the species identified were: *Salinicoccus roseus* with MIC of 0.10 mM Hg^{2+} ; *Halomonas pantelleriensis* showed MIC of 7.0 mM Pb^{2+} ; *Nocardiopsis xinjiangensis* with MIC of 9.75 mM of As^{3+} and *Nocardiopsis salina*, this last strain had the capacity to tolerate the highest concentration of three metals with MIC of 27.25 mM As^{3+} ; 1 250 mM Cr^{6+} and 7.75 mM Pb^{2+} . This study demonstrates that halophilic bacteria isolated from saline soil of the former Lake of Texcoco tolerate heavy metals. Morphological changes were

observed in some tolerant strains due to the presence of heavy metal, mainly the change of color or shade, change in size of the colonies and change of shape of the colonies with respect to the control strains, that is, developed without presence of heavy metal. There are currently no reports on the tolerance to heavy metals of the actinobacteria species *Nocardiopsis xinjiangensis* and *Nocardiopsis salina*, so this research will be the first to report the tolerance of these species to the heavy metals Ar^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} themselves that could to be potential candidates in processes of bioremediation of saline environments contaminated with metals.

1. ANTECEDENTES

1.1. Metales pesados

Los metales pesados son aquellos elementos que tienen un peso específico mayor de 5 g/cm³ o tienen un número atómico superior a 20 (Barceló y Poschenrieder, 1992). Desde el punto de vista de la salud humana, los metales pesados son considerados como elementos potencialmente tóxicos (Alloway, 2013; Volke *et al.*, 2005; Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004; Gadd, 1993).

1.2. Principales fuentes de metales pesados

Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados fácilmente de forma natural o biológica ya que algunos no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Barceló y Poschenrieder, 1992).

Estos elementos se introducen a los ecosistemas por fuentes antropogénicas que utilizan materiales o materias primas que los contienen. Estos pueden llegar a depositarse en el agua, lo cual provoca su movilidad a través de ambientes naturales ocasionando la contaminación de suelo, agua superficial y subterránea, así como diferentes ambientes acuáticos (SEMARNAT, 2009).

El desarrollo de la industrialización y diferentes actividades antropogénicas adicionan metales pesados al aire agua y suelo siendo estos materiales los que perjudican principalmente al medio ambiente y organismos vivos: microorganismos, plantas y animales (Gall *et al.*, 2015; Ullah *et al.*, 2015).

1.2.1. Fuentes naturales

Los metales pesados pueden encontrarse en los minerales primarios y coprecipitados con los minerales secundarios. Los minerales primarios son los

constituyentes de las rocas, y los llamados minerales secundarios se deben a la cristalización de los productos del meteorismo (Fergusson, 1990) (Figura 1).

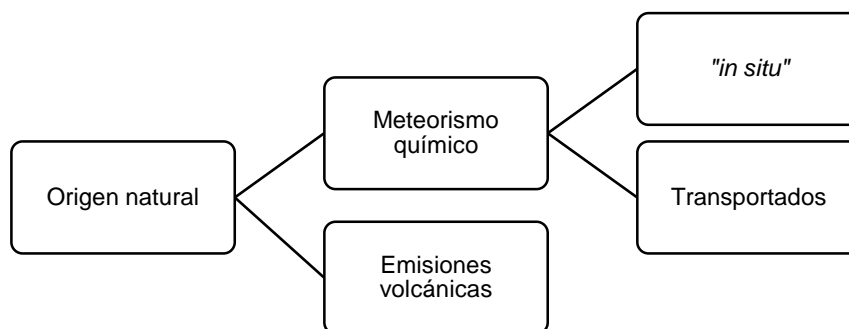


Figura 1. Clasificación de las fuentes naturales de contaminación por elementos potencialmente tóxicos (Modificado de Zúñiga, 1999).

Conociendo el tipo de roca y los minerales que la conforman pueden deducirse los metales pesados que en ellas se encuentran, por ejemplo, en rocas sedimentarias hay mayores posibilidades de encontrar arsénico (As), mercurio (Hg) y selenio (Se) que en las ígneas; en el granito es más probable encontrar plomo (Pb) (Fergusson, 1990) (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles medios de elementos potencialmente tóxicos en rocas y en suelos (mg/kg)

Elemento	Rocas ígneas		Rocas sedimentarias
	basalto	granito	
As	1.5	1.5	7.7
Bi	0.031	0.065	0.4
Cd	0.13	0.09	0.17
Hg	0.012	0.08	0.19
Pb	3.0	24.0	19.0
Se	0.05	0.05	0.42
Ti	0.08	1.1	0.95

As= arsénico, Bi= bismuto, Cd= cadmio, Hg= mercurio, Pb= plomo, Se= selenio y Ti= titanio.

Tomado de Fergusson, 1990.

1.2.2. Fuentes de origen antropogénico

Las fuentes antropogénicas se clasifican en puntuales (fijas) y no puntuales (móviles) dependiendo de su procedencia, dentro de las primeras se tienen las

fuentes industriales, las carreteras (aun cuando no son la fuente de metales pesados es ahí donde se depositan de manera fija y continua). Dentro de las no puntuales se encuentran los lodos residuales, los fertilizantes, las cenizas y humos (transportados por los vientos de manera esporádica), los pesticidas, el riego, entre otras (Zúñiga, 1999) (Tabla 2).

Tabla 2. Fuentes antropogénicas de metales pesados

Fuentes	Metal pesado
Lodos residuales	Cd, Pb, As, Cr, Zn, Co, B, Ba, Be, Br, Ce, Cu, Mn, Co, Ge, Hg, Mo, Ni, Rb, Sn, Sr, V y ZN
Riego	Cd, Pb, Se
Fundidoras	Pb, Cd, Sb, As, Se, In y Hg
Plaguicidas	Pb, As, Hg, Br, Cu, V y Zr
Minas	Pb, Cd, As, Hg
Abonos	As, Se, Ba, Br, Co, Cr, Cu, F, Ge, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn y Zr
Automóviles	Pb
Pinturas	Pb, Cd, Cr
Combustión de carbón	As, Se, Sb, Pb

Cd= cadmio, Pb= plomo, As= arsénico, Cr= cromo, Zn= zinc, Co= cobalto, B=boro, Ba= bario, Be= berilio, Br= bromo, Ce= Cerio, Cu= cobre, Mn= manganeso, Co= cobalto, Ge= germanio, Hg= mercurio, Mo= molibdeno, Ni= níquel, Rb=rubidio, Sn= estaño, Sr= estroncio, V= vanadio, Zn= zinc, Sb= antimonio, Se= selenio, In= indio, V= vanadio, Zr= circonio, F= flúor.
Tomado de Fergusson, 1990

El uso de los metales pesados ha ido aumentando paralelamente al desarrollo industrial y tecnológico. Actualmente es difícil encontrar una actividad industrial o un producto manufacturado en los que no intervenga algún metal pesado, si bien, la tendencia aunque lenta, es sustituir progresivamente en la industria, algunos metales pesados potencialmente tóxicos por otros materiales más inocuos (Förstner y Wittmann, 2012).

Diversas actividades antropogénicas se llevan a cabo en nuestro país generando grandes cantidades de contaminantes al ambiente como producto de los diferentes procesos antropogénicos. Algunas de las principales emisiones se llevan a cabo por procesos en los cuales no existe alguna regulación normativa para la disposición final de éstos, vertiéndolos directamente en descargas que

provocan el movimiento de estos a través de ríos y lagos principalmente (Rosas, 2001).

En México la generación de desechos sólidos se encuentra relacionada con el uso de suelo, regularmente se consideran ocho categorías o fuentes de emisión que son: residencial, comercial, institucional, construcción y demolición, servicios municipales, plantas de tratamiento, industrial y agropecuarios (Tchobanoglous *et al.*, 1993). Las seis primeras pueden agruparse en residuos sólidos municipales, por lo que finalmente quedan dos principales grupos; municipales e industriales (Peavy y Tchobanoglous, 1985).

1.2.2.1. Residuos sólidos municipales

Las aguas residuales de las ciudades son las portadoras de los metales pesados de origen doméstico. Los vertidos domésticos transportan una amplia gama de metales contenidos en las excreciones humanas, en los restos de los alimentos, en las aguas de lavado, etc. (Förstner y Wittmann, 2012, Van *et al.*, 2002; Al-Saleh y Al-Doush, 1998; Fuge y Perkins, 1991; Adriano, 1986).

Los residuos sólidos municipales generalmente incluyen desechos de los hogares y los generados en pequeños comercios e industrias, así como los residuos de mercados y jardines. De los aproximadamente 27 tipos de residuos sólidos más comunes, 15 corresponden a residuos de origen orgánico que pueden ser biodegradados, algunos ejemplos son: residuos alimenticios, de jardinería, algodón, cartón, papel, hueso, fibra vegetal y otros. Los compuestos sintéticos y de materiales no biodegradables son: vidrio, fibra sintética, plástico, lata, loza y cerámica, material de construcción, material ferroso, pañales desechables, poliuretano, poliestireno y demás. Algunos de ellos, como los metales y el vidrio son separados y posteriormente reciclados (Zúñiga, 1999).

Al ser tratados estos residuos, se genera composta que no llega a contener grandes cantidades de metales pesados por lo que difícilmente llegarían a constituir un peligro de contaminación, por el contrario, las grandes cantidades de materia orgánica, así como la calidad de la misma, en la composta, pueden ser utilizadas en el mejoramiento de los suelos agrícolas. La excepción a la regla son los lodos residuales producidos en el tratamiento de las aguas residuales que llegan a contener cantidades importantes de metales pesados y requieren un trato diferente (Zúñiga, 1999).

1.2.2.2. Residuos sólidos industriales

Los tipos y características de los residuos sólidos industriales dependen de la fuente o tipo de industria. Las principales fuentes de metales pesados en los sistemas acuáticos son las aguas residuales procedentes de las industrias que utilizan los cauces fluviales como vertederos. A menudo estos vertidos no se someten a procesos de depuración o su tratamiento es inadecuado. Un alto grado de industrialización y urbanización es un fuerte riesgo de contaminación por metales pesados, especialmente en sedimentos anaerobios ricos en sulfuros que favorecen la retención y acumulación de metales (Tam y Yao, 1998; Tam y Wonk, 1995; Thompson y Tirmizi, 1995; Lacerda y Solomons, 1991), en la Tabla 3 se muestran algunos de los procesos industriales por los que se introducen metales pesados en el medio ambiente.

Tabla 3. Principales orígenes industriales de los metales pesados

Origen	Sb	As	Cd	Cu	Cr	Hg	Ni	Pb	Zn
Baterías eléctricas			*	*			*	*	
Curtidos de pieles				*	*				
Eléctrica y electrónica			*	*	*		*	*	*
Farmacéuticas		*		*	*				*
Fertilizantes		*	*	*	*	*	*	*	*
Fotografía			*	*	*			*	
Fundiciones		*	*	*	*		*	*	*
Galvanizados, electrochapados			*	*	*		*	*	*
Minería	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Motores de vehículos, chapados de aviones			*	*	*				*
Papeleras y similares				*	*		*	*	*
Pesticidas		*		*	*	*		*	*
Pigmentos, tintes, tintas, pinturas	*		*	*	*		*	*	*
Plásticos	*		*		*				*
Químicas, petroquímica	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Textiles	*			*	*				*

Sb= antimonio, As= arsénico, Cd= cadmio, Cu= cobre, Cr= cromo, Hg= mercurio, Ni= níquel, Pb= plomo, Zn= Zinc.

Modificado de Förstner y Wittmann, 2012.

1.3. Clasificación de los metales pesados

Cuando se menciona el término “metal pesado”, muchas veces se interpreta como algo tóxico, lo cual es incorrecto ya que no todos los metales pesados son tóxicos ni todos los elementos tóxicos son metales pesados (Zúñiga, 1999). De manera general, entre los metales se pueden encontrar metales vestigio, metales esenciales, metales pesados y elementos metálicos potencialmente tóxicos. Cabe mencionar que muy pocos de ellos, se llegan a encontrar en concentraciones menores al 0.01% de la masa total de un organismo y son considerados como elementos metálicos esenciales para la vida (Anderson, 1989; Brown *et al.*, 1987; Carson *et al.*, 1986; Förstner y Wittmann, 2012).

1.3.1. Metales vestigio

Se refiere a los elementos metálicos que se encuentran en la solución del suelo en concentraciones menores de 1 mol/m³, o a los elementos que tienen concentraciones menores a los 100 mg/kg de la fase sólida del suelo. Los metales vestigio no son necesariamente peligrosos, algunos de ellos son esenciales para vegetales y animales (Zúñiga, 1999).

1.3.2. Metales esenciales

Son aquellos que se requieren para la vida principalmente de plantas, ya que sin ellos no se completa el ciclo vital de estas. No todos los metales esenciales lo son para las plantas sino que también son utilizados por otros organismos, por ejemplo el bromo (Br) es considerado esencial en algunas algas; el cobalto (Co) es esencial en animales y no en plantas; el cromo (Cr) es esencial en animales pero no en plantas; el flúor (F) es esencial en animales y no en plantas; etc. (Market, 1994).

1.3.3. Metales pesados

Es un término utilizado para los metales que contienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm³ (Barceló y Poschenrieder, 1992), son tóxicos para los seres vivos,

son ampliamente utilizados en la industria, son relativamente muy abundantes y ocasionan graves daños a los ciclos biogeoquímicos (Tabla 4).

Tabla 4. Metales pesados importantes, su densidad y categoría como esenciales y/o contaminantes.

Elemento	Densidad (g/cm ³)	Esencial	Contaminante vegetal/animal
Ag	10.5		*
Cd	8.7		*
Co	8.9	*	*
Cu	8.9	*	*
Fe	7.9	*	*
Cr	7.2	*	*
Hg	13.6		*
Mo	10.2		*
Ni	8.9	*	*
Pb	11.3		*

Ag= plata, Cd= cadmio, Co= cobalto, Cu= cobre, Fe= hierro, Cr= cromo, Hg= mercurio, Mo= molibdeno, Ni= níquel, Pb= plomo. Modificado de Davis, 1980.

1.3.4. Elementos metálicos potencialmente tóxicos

Se refiere a todos aquellos elementos metálicos (metales vestigio, metales pesados y metales esenciales) que debido a sus características y cantidades pudieran ser tóxicos para la biota y al organismo humano (Zúñiga, 1999). La toxicidad de los elementos metálicos depende en gran medida de la dosis o cantidades de las que se traten, ya que existen elementos esenciales que en grandes dosis son tóxicos.

1.4. Metales pesados tóxicos y su efecto en la salud

Debido a que los metales pesados son elementos no degradables, inmutables y persistentes en el ambiente (Lebeau *et al.*, 2008; Adriano *et al.*, 2004), pueden movilizarse en el suelo, aire y agua mediante cambios en su estado de óxido-reducción (Young, 2012) o incorporarse a los seres vivos a través de las cadenas tróficas.

Por su abundancia y toxicidad para el ser humano, los metales pesados más estudiados son:

1.4.1. Arsénico (As)

El arsénico generalmente se encuentra en sus estados As^{+5} y As^{+3} en ambientes con condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente: su toxicidad en humanos está relacionada con irritación estomacal, daño en la piel y disminución de glóbulos rojos, además de ser considerado como un agente cancerígeno (Covarrubias *et al.*, 2015).

La exposición prolongada al elemento arsénico, principalmente en agua potable, tiene relación con aumento de los riesgos de cáncer de piel, pulmón, vejiga y riñón, así como alteraciones en la piel, por ejemplo hiperqueratosis y cambios de pigmentación en relación con la ingestión de agua potable en concentraciones $>50\mu g$ de arsénico/litro (Aitio y Becking, 2001).

1.4.2. Cromo (Cr)

Este metal puede estar presente en cuerpos de agua en su forma química Cr^{+3} , el cual es poco soluble y muy estable (elemento esencial) y en su forma Cr^{+6} siendo este menos estable pero más soluble y con una alta movilidad. La Toxicidad de este metal está relacionada con su capacidad mutagénica y carcinogénica en humanos y puede alterar seriamente el equilibrio biológico causando efectos tóxicos, ya que es rápidamente absorbido por las membranas biológicas (Téllez *et al.*, 2004). Los principales riesgos a la salud humana son debidos al estado más tóxico del cromo (Cr^{+6}) y se le relaciona con reacciones alérgicas en la piel, en las vías respiratorias e irritación gastrointestinal, así como lesiones renales y hepáticas (Cuberos y Prieto-Suárez, 2009).

1.4.3. Mercurio (Hg)

El metal mercurio se puede encontrar en diferentes especies iónicas tales como Hg^0 , Hg^{2+} , Hg_2^{2+} y son consideradas muy tóxicas para el cuerpo humano aun en concentraciones extremadamente bajas (Esbri *et al.*, 2009).

Los principales riesgos a la salud por exposición de este elemento metálico se relacionan con dificultad respiratoria, caries dental, neumonía y fallas renales principalmente (Covarrubias *et al.*, 2015).

1.4.4. Plomo (Pb)

La forma iónica en la que se encuentra principalmente al plomo es Pb^{2+} la cual está estrechamente relacionada con efectos tóxicos en el cuerpo humano tales como anemia, falta renal, abortos, disminución de fertilidad y daño neuronal. (Covarrubias *et al.*, 2015).

El plomo tiene la capacidad de acumularse en diferentes partes de cuerpo humano como los huesos, dientes, hígado, pulmón, riñón y cerebro; asimismo es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y placenta (Gwaltney-Brant, 2002). El plomo que se puede encontrar en la sangre puede permanecer ahí hasta 35 días, mientras que la permanencia en tejidos blandos puede ser de 40 días y se ha demostrado que el plomo contenido en huesos puede permanecer ahí de 20 a 30 años (Papanikolaou *et al.*, 2005).

En la Tabla 5 se muestran los efectos crónicos sobre la salud humana debido a la exposición a metales pesados como Ar, Cr y Pb contenidos en agua potable.

Tabla 5. Efectos crónicos en la salud por exposición de As, Cr y Pb en agua potable.

Elemento	MNMC ¹ (mg/L)	NMC ² o TT ³ (mg/L)	Posibles efectos sobre la salud	Fuentes contaminantes comunes en agua potable
Arsénico	Ninguno	0.05	Lesiones en la piel, trastornos circulatorios, alto riesgo de cáncer	Erosión de depósitos naturales, aguas de escorrentías de huertos, aguas con residuos de la fabricación de vidrios y electrónicos.
Cromo	0.10	0.10	Dermatitis alérgica	Efluentes de fábricas de aceros y papel, erosión de depósitos naturales.
Plomo	0.00	Nivel de acción = 0.015	En bebés y niños, retardo en desarrollo físico o mental; podrían sufrir leve déficit de atención y de capacidad de aprendizaje. En adultos trastornos renales e hipertensión	Corrosión de cañerías en el hogar, erosión de depósitos naturales.

¹ MNMC (Meta de Nivel Máximo Contaminante): Es el nivel de un contaminante en el agua potable por debajo del cual no se conocen o no se esperan riesgos para la salud. Permiten contar con un margen de seguridad y no son objetivos obligatorios de la Salud Pública.

²NMC (Nivel Máximo del Contaminante): Es el máximo nivel permitido de un contaminante en el agua potable. Los NMC se establecen tan próximos a los MNMC como sea posible, usando la mejor tecnología de tratamiento posible. Los NMC son normas de obligatorio cumplimiento.

³TT (Técnica de Tratamiento): Proceso obligatorio cuya finalidad es reducir el nivel de contaminante dado en el agua potable.

Agencia de Protección Ambiental (EPA), 2007.

1.5. Efectos de la exposición a metales pesados en México

Los metales pesados poseen significantes efectos en ecosistemas y llegan a ser un riesgo para la salud humana, ya que cuentan con diferentes maneras de entrar en contacto con el cuerpo humano como lo es a través de la comida, agua o en el aire que respiramos (Dixit *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2015).

En México, la contaminación por metales pesados se ha incrementado principalmente por la actividad industrial como la metalúrgica y la minera (Santos-Santos *et al.*, 2006), la agricultura (Green-Ruiz y Páez-Osuna, 2001) y las emisiones vehiculares (Morton-Bermea *et al.*, 2009).

A nivel nacional, se generan más de 21 mil toneladas anuales de residuos sólidos municipales, de las cuales el 43.6% se genera en la zona centro; en la zona norte el 17.2%; en la zona sur 15.7%; en la Ciudad de México 13.7% y la zona fronteriza 9.8% (INEGI, 1994).

México es un país altamente minero por sus características geológicas (Sierra Madre Oriental y Sierra Madre Occidental). Alrededor de dos terceras partes del territorio mexicano, se encuentran formadas por rocas ígneas y metamórficas con las características geológicas adecuadas para la existencia de minerales de importancia económica. En el país se extraen 47 minerales además del oro y plata, 14 no ferrosos, 4 siderúrgicos y 27 no metálicos. A nivel mundial México es el principal productor de plata y celestita; segundo en bismuto, tercero en cadmio, fluorita, antimonio y grafito; quinto en arsénico; sexto en zinc; séptimo en plomo, barita, azufre y molibdeno (SEMIP, 1992).

La producción minera comprende actividades de extracción de minerales, purificación de minerales y disposición de residuos. Las actividades mineras relacionadas con metales pesados ocasionan un gran número de afectaciones al ambiente como lo son: la oxidación ambiental provocada por la disolución de algunos metales pesados, la acidificación del suelo que inhibe el crecimiento

vegetal y el movimiento de metales pesados que contaminan cauces de ríos (Gutiérrez-Ruiz y Bautista-Zúñiga, 1992). En México, los residuos sólidos provenientes de minas y fundiciones son los más abundantes ya que se generan alrededor de 337,500 t/día, sin embargo, dichos residuos no reciben tratamiento alguno (Bustani, 1994).

El agua está destinada a varios usos y actividades humanas tales como la agricultura, energía hidroeléctrica o abastecimiento, entre otras. En México se genera una gran cantidad de aguas residuales que no tienen algún tratamiento químico, físico o biológico por lo que más del 70% de los cuerpos de agua presentan algún grado de contaminación (CONAGUA, 2014).

Tan solo en México se generaban en el año 2000 un volumen de aguas residuales de 207 m³/s, de las cuales 115 m³/s eran de origen doméstico y el resto de origen industrial (Trejo, 2002).

1.6. Alternativas de remediación en zonas contaminadas con metales pesados

Las rigurosas leyes con las que se cuenta a nivel mundial sobre la contaminación de metales pesados solicitan un tratamiento para estos por lo que se han establecido diferentes alternativas como procesos fisicoquímicos para su biorremediación (Mishra y Malik, 2013).

A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden descomponerse por vía biológica, física o química (Volke *et al.*, 2005). Dependiendo de su naturaleza, los métodos de remediación se pueden clasificar en: fisicoquímicos o biológicos (Covarrubias *et al.*, 2015).

1.6.1. Métodos fisicoquímicos

Son aquellos que utilizan las propiedades físicas y químicas de los contaminantes o del medio contaminado para transformar, separar o inmovilizar el o los contaminantes (Covarrubias *et al.*, 2015; Volke *et al.*, 2005).

Los tratamientos fisicoquímicos más empleados consisten en procesos como la transformación (oxidación/reducción) de los metales, el lavado (separación de metales) y la solidificación/extracción (inmovilización de metales) (Covarrubias *et al.*, 2015; Dermont *et al.*, 2008; Van *et al.*, 2002).

Una desventaja de los métodos fisicoquímicos radica en que la mayoría requiere de un tratamiento secundario o disposición final del contaminante, lo que genera un costo económico y ambiental (Covarrubias *et al.*, 2015).

1.6.2. Métodos biológicos

Los métodos biológicos son aquellos que aprovechan el potencial metabólico de organismos vivos (bacterias, hongos y plantas) para limpiar ambientes contaminados (Covarrubias *et al.*, 2015; Gadd, 2010; Kazuya, 2001) y son también nombrados como métodos de *biorremediación*.

Los procesos de biorremediación para el tratamiento de la contaminación por metales ofrecen una alta especificidad mediante mecanismos de bioabsorción, bioprecipitación, biolixiviación y biovolatilización, muchas veces transformando los metales a formas no tóxicas, suelen ser más económicos y seguros que las tecnologías convencionales (Okeke, 2008). Los microorganismos más utilizados en los procesos de biorremediación de metales pesados son las bacterias (Schippers y Sand, 1999; Valls y De Lorenzo, 2002) y los hongos (Gadd, 2010; Gonzalez-Chavez, 2004) (Tabla 6).

Tabla 6. Métodos de biorremediación de metales pesados

Método	Fundamento	Descripción	Microorganismo
Bioabsorción	Los metales pesados son absorbidos pasivamente a los componentes celulares de los microorganismos debido a atracciones electrostáticas.	Al tener los metales carga positiva son atraídos por las cargas negativas de los grupos carboxilos, fosforilos y aminos presentes en las paredes celulares, membranas y materiales extracelulares de bacterias y hongos (Gadd, 2004; Kirchman, 2012).	Algunos géneros microbianos utilizados con éxito para remover cadmio, plomo y cobre son <i>Rhizopus</i> , <i>Penicilium</i> y <i>Phanerochaete</i> (Say <i>et al.</i> , 2001).
Bioprecipitación	Ciertos metales pesados pueden ser inmovilizados debido a la acción bacteriana con la capacidad de reducirlos a un estado redox menor reduciendo su biodisponibilidad (Valls y De Lorenzo, 2002).	Ocasiona que formas oxidadas de metales pasen rápidamente a formas reducidas que se precipitan fácilmente en una solución acuosa.	Un grupo muy importante en este sentido son las bacterias sulfato reductoras (White <i>et al.</i> , 1998) constituido por los géneros <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfomonas</i> , <i>Desulfobacter</i> , entre otros, (Monroy, 2014).
Biolixiviación	Consiste en la acidificación del medio por la movilización de protones a través de la membrana plasmática ocasionando una liberación de metales (Gadd, 2004)	Bacterias que fijan bióxido de carbono y obtienen energía de la oxidación de compuestos (Rawlings y Silver, 1995; Schippers y Sand, 1999).	Bacterias que oxidan azufre y fierro como <i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>T. ferrooxidans</i> y <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> (Donati y Sand, 2007).
Biovolatilización	Algunas bacterias y hongos pueden llevar a cabo la metilación de metales pesados y metaloides como el Hg, As y Se.	Los metales metilados pueden ser reducidos a otras formas por medio de reacciones enzimáticas bacterianas (Valls y De Lorenzo, 2002).	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Deinococcus radiodurans</i> (Brim <i>et al.</i> , 2000; Cursino <i>et al.</i> , 2000; Okino <i>et al.</i> , 2000).

Tomado de Covarrubias *et al.*, 2015

Las bacterias ocupan un papel muy importante en el medio ambiente ya que estas se desarrollan por procesos naturales para descontaminación de suelos y aguas que contienen metales que en ciertas concentraciones son nocivos para la salud humana. Los microorganismos necesitan varios metales para desarrollarse (Tabla 7), por ejemplo el hierro juega un papel fundamental en la respiración celular y representa un elemento clave de la respiración (Madigan *et al.*, 2004).

Algunos procariontes pueden crecer en ausencia total de hierro como *Lactobacillus plantarum* y *Borrelia burgdorferii* no contienen hierro. El Mn^{2+} sustituye en estas bacterias el hierro como componente metálico de las enzimas que normalmente contienen Fe^{2+} .

Tabla 7. Macronutrientes necesarios para los microorganismos

Elemento	Forma natural del nutriente en el ambiente
Azufre (S)	H ₂ S, SO ₄ ²⁻ , compuestos orgánicos con S, sulfuros metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc.)
Hierro (Fe)	Fe ²⁺ o Fe ³⁺ en solución, o como FeS, Fe(OH) ₃ y otras sales de Fe

Modificado de Madigan *et al.*, 2004

Se necesitan muchos otros metales en el metabolismo de los microorganismos y a estos micronutrientes se denominan elementos traza o micronutrientes los cuales desempeñan un papel estructural en varias enzimas, que son los catalizadores de las células. La Tabla 8 resumen los principales micronutrientes y contienen ejemplos de enzimas en las que intervienen (Madigan *et al.*, 2004).

Tabla 8. Micronutrientes (elementos traza) necesarios para los microorganismos^a

Cromo (Cr)	Requerido por los mamíferos para el metabolismo de la glucosa, posible requerimiento por microorganismos, pero no demostrado.
Cobalto (Co)	Vitaminas B ₁₂ ; transcarboxilasa (bacterias del ácido propiónico).
Cobre (Cu)	En la respiración, citocromo c oxidasa; en fotosíntesis, plastocianina; algunas superóxido dismutasas.
Hierro (Fe) ^b	Citocromos, catalasas, peroxidasas proteínas con Fe y S, oxigenasas, todas las nitrogenasas.
Manganeso (Mn)	Activador de muchas enzimas; presente en algunas peróxido dismutasas y en la enzima que rompe el agua en fotótrofos oxigénicos (Fotosistema II).
Molibdeno (Mo)	Algunas enzimas que contienen flavinas; algunas nitrogenasas, nitrato reductasa, sulfito oxidasa, algunas formato deshidrogenasas.
Níquel (Ni)	La mayoría de las deshidrogenasas; coenzima F ₄₃₀ de metanógenos; deshidrogenasa del monóxido de carbono; ureasa.
Selenio (Se)	Formato deshidrogenasa; algunas hidrogenasas; el aminoácido selenocisteína.
Tungsteno (W)	Algunas formato deshidrogenasas; oxotransferasas de los hipertermófilos.
Vanadio (V)	Vanadio nitrogenasa; bromoperoxidasa.
Zinc (Zn)	Anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa, RNA y DNA polimerasas, y muchas proteínas que se unen al DNA.

^aNo todos los micronutrientes indicados son requeridos por todas las células; algunos se necesitan sólo en microorganismos muy específicos.

^bNecesario en mayores cantidades que otros metales.

Modificado de Madigan *et al.*, 2004

1.7. Ambientes extremos

Ambiente extremo es aquel que presenta valores extremos de determinados parámetros físico-químicos tales como temperatura, pH, presión hidrostática, potencial redox, actividad del agua, salinidad, irradiación solar, concentración de nutrientes o metales tóxicos, condiciones inusuales poco favorables o letales para la mayoría de organismos. Los organismos que toleran e incluso requieren para su desarrollo estas condiciones se les denomina organismos extremófilos (MacElroy, 1974).

Se encuentran diferentes grupos de organismos extremófilos de acuerdo con las condiciones ambientales en las que se desarrollan. La mayor parte de estos pertenecen a bajos niveles de organización, siendo la gran mayoría de estructura celular procarionte, en la Figura 2 se indican las diferentes condiciones extremas ambientales y los organismos que viven en ellas.



Figura 2. Diferentes condiciones ambientales extremas y grupos de extremófilos adaptados a ellas. Modificado de Comerio *et al.*, 2007.

Las condiciones físico-químicas de estos ambientes difieren de los valores en los que la vida de muchos organismos es posible. El agua líquida, el suministro de energía y el control de la misma y las condiciones de óxido-reducción ambientales son indispensables para la vida, por lo que los microorganismos extremófilos deben vivir dentro de esos parámetros o bien ser capaces de mantenerlos regulados intracelularmente (Rothschild y Mancinelli, 2001). Por ejemplo, los psicrófilos sintetizan enzimas con modificaciones bioquímicas que les permiten funcionar a bajas temperaturas, así como moléculas que reducen el punto de congelación del agua dentro de la célula; los acidófilos y alcalófilos poseen mecanismos de regulación del pH intracelular para mantenerlo en valores cercanos a la neutralidad a través de diversas adaptaciones en las membranas

celulares y en los transportadores de iones transmembranales (Reed *et al.*, 2013); la membrana celular de los termófilos contiene ácidos grasos saturados, mantiene a la célula lo suficientemente rígida para sobrevivir a elevadas temperaturas.

Las proteínas de los termófilos son especialmente estables, ya que poseen un mayor número de puentes de hidrógeno entre sus aminoácidos, poseen menor flexibilidad, un menor número de giros en su estructura, tienen una carga superficial mayor y pocos aminoácidos termolábiles hacia el exterior, en comparación con sus contrapartes mesófilas (Gomes y Steiner, 2004; Rothschild y Mancinelli, 2001).

1.7.1. Microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos tienen como hábitat natural ambientes que antiguamente se consideraban demasiado hostiles para permitir la supervivencia de organismos vivos. Se clasifican en base a la condición física o química extrema del ambiente donde se desarrollan: termófilos, temperatura óptima de crecimiento superior a 45°C; acidófilos, pH óptimo de crecimiento por abajo de 5; alcalófilos, pH óptimo de crecimiento por arriba de 8 y los halófilos; habitan en medios hipersalinos (5-30% de sal); metalófilos, toleran altas concentraciones de metales pesados (Reed C. *et al.*, 2013).

Los hábitats donde viven los microorganismos extremófilos dependen de las condiciones que en estos se encuentran, por ejemplo manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales, tierras y mares polares fríos y glaciares alpinos; lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos, sea ácido (zonas de solfataras, minas) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos); y con relativa frecuencia, en zonas que combinan dos o más factores extremos, como alta temperatura y condiciones ácidas, en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o

baja temperatura y alta presión, en los fondos marinos (Rothschild y Mancinelli, 2001).

En México, se han aislado bacterias y extremófilas de pozos petroleros (Miranda-Tello *et al.*, 2004), aguas termales (Pinzón-Martínez *et al.*, 2010), zonas desérticas (Souza *et al.*, 2006), suelos alcalinos (Valenzuela-Encinas *et al.*, 2008; Ruiz-Romero *et al.*, 2009), zonas volcánicas (Cavicchioli *et al.*, 2011), entre otros, revelando la gran biodiversidad y el gran potencial biotecnológico de estos microorganismos.

1.7.2. Ambientes salinos

Los ambientes salinos e hipersalinos son ambientes extremos que se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de sal. Estos ambientes contienen una cantidad muy alta de iones (factor que le atribuye la característica de ser un ambiente inhóspito para la mayoría de los microorganismos), elevadas o muy bajas temperaturas, elevados valores de pH o bajas concentraciones de oxígeno (Rodríguez-Valera, 1993).

Los ambientes hipersalinos acuáticos en los que la concentración de sal supera la del agua de mar (3.5% de sales totales) pueden ser de origen natural, como el Gran Lago Salado en Estados Unidos o el Mar Muerto en Israel, pero también pueden ser de origen artificial como las salinas construidas por el hombre para la obtención de sal (Soria, 2004).

Los suelos salinos se encuentran extendidos por todo el mundo y son aquellos que presentan una concentración superior al 0.2% de sales solubles. Los ambientes salinos acuáticos se caracterizan por tener una concentración de sales inorgánicas más elevada que la del agua de mar, que corresponde aproximadamente a un 3.5% de sales. Diversos estudios realizados en suelos

salinos revelan la presencia de microorganismos habitantes de estos ambientes (Rodríguez-Valera, 1993).

1.7.3. Microorganismos halófilos

Los microorganismos halófilos son organismos que requieren para vivir ambientes con altas concentraciones de sal (Reed *et al.*, 2013; Oren, 2005; Kushner, 1978), sin embargo, no todos los microorganismos halófilos tienen los mismos requerimientos de sal, por lo que se pueden agrupar en función del rango de sal que necesitan para tener un crecimiento óptimo (Soria, 2004).

1.7.4. Clasificación de los microorganismos halófilos según sus requerimientos salinos

Kushner y Kamekura en 1988 propusieron categorías de microorganismos por la concentración de sal que requieren para su crecimiento óptimo:

- No halófilos: aquellos que crecen óptimamente con una concentración de NaCl inferior a 0.2 M (aproximadamente 1% p/v).
- Halófilos débiles: aquellos que crecen óptimamente con una concentración de NaCl de 1-10% p/v (0.2-0.5 M)
- Halófilos moderados: microorganismos que tienen crecimiento óptimo en medios con concentraciones de NaCl de 10-20% p/v (0.5 – 2.5 M) y
- Halófilos extremos: microorganismos que presentan un crecimiento óptimo en medios que contienen más del 20% p/v de NaCl (2.5 – 5.2 M) (Margesin y Schinner, 2001).

Los microorganismos halófilos moderados y extremos son comunes en ambientes salinos e hipersalinos, especialmente en los ambientes que presentan una concentración superior a 1.5 M de NaCl, siendo predominantes las bacterias halófilas moderadas en concentraciones salinas intermedias (1.5-3 M de NaCl).

Las altas concentraciones salinas afectan a la estabilidad de las proteínas, así las enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas poseen unos

mecanismos específicos que las hacen permanecer estables a elevadas salinidades. Las enzimas producidas por bacterias halófilas suelen tener carácter marcadamente ácido en su superficie si se compara con las enzimas no halófilas, estos residuos ácidos contribuyen a la estabilidad de las mismas (Madigan y Oren, 1999).

1.8. Actinobacterias

Dentro de la gran variedad de microorganismos habitantes del suelo se encuentran las actinobacterias, que son bacterias filamentosas ampliamente distribuidas en el medio ambiente, son microorganismos heterótrofos, aerobios, poco tolerantes a la acidez, por lo que crecen de forma óptima en pH cercano a la neutralidad (El-Tarabily *et al.*, 2008; Julca-Otiniano *et al.*, 2006).

Las actinobacterias son una clase de bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina y citosina (G+C), su morfología es altamente pleomórfica; crecen como filamentos que se ramifican en forma de estrella o radian, o forman varillas o cocos de forma irregular. Son principalmente saprófitos y se sabe que contribuyen en el recambio de nutrientes, utilizan muchas fuentes de nutrientes disponibles para su desarrollo (Solano *et al.*, 2009; Romero, 2007).

La morfología de las actinobacterias se basa principalmente en las características macroscópicas y microscópicas como estructura del micelio, fragmentación en formas cocoides, bacilares, artroconidiales, presencia de espirales y bucles a través de coloraciones como Gram y Zielh-Nielsen, formación del micelio aéreo, forma y tamaño del mismo, la ramificación, fragmentación y disposición de las pseudohifas, formación de estructuras de reproducción, presencia y contenido de esporas, al igual que su estructura, formación de cadenas terminales en pares y superficie de las mismas, tamaño, forma del microorganismo y demás estructuras, además del crecimiento en diferentes medios de cultivo, micelios presentes en el sustrato, formación de pigmentos solubles, forma de la colonia, criterios

bioquímicos como el uso de fuentes de carbono, propiedades proteolíticas, uso de compuestos nitrogenados, presencia de oxidasas, reductasas, sensibilidad a determinados antibióticos, movilidad y reacciones serológicas entre otras (Duraipandiyar *et al.*, 2010; Cardona *et al.*, 2009; Taddei *et al.*, 2006).

Este grupo de bacterias se pueden encontrar en superficies rocosas y en el suelo rizosférico, ricos en humus, hojarasca y estiércol, sedimentos marinos (El-Tarabily *et al.*, 2008). La mayoría de las especies son heterótrofas, aerobios, mesófilas, crecen en un rango de temperatura entre 25 – 30°C, al ser poco tolerantes a la acidez requieren para su óptimo crecimiento un pH neutro, aunque pueden crecer en un rango de pH entre 5.0 – 9.0 (El-Tarabily *et al.*, 2008; Franco-Correa *et al.*, 2008; Jayasinghe y Parkinson, 2008). Las actinobacterias se adaptan a diferentes condiciones, según estudios se afirma que estos microorganismos han sido aislados de diferentes ambientes como praderas, arenas de playas, cuevas subterráneas arrozales y subhielo glacial de la Antártida, además se ha reportado el crecimiento de dichos microorganismos a temperaturas entre 2.5 – 10.2°C (Jayasinghe y Parkinson, 2008; Ibrahim *et al.*, 2006; Terkina *et al.*, 2006).

En 1975 se dio a conocer por primera vez el reporte de una actinobacteria capaz de crecer en altas concentraciones de salinidad, *Actinopolyspora halophila* (Gochnauer *et al.*, 1975). Después, en el año 1991, se reporta la segunda actinobacteria halófila *A. mortivallis* (Yosida *et al.*, 1991), a partir de este año ha sido reportada la identificación de una gran cantidad de estos microorganismos.

1.9. Bacterias tolerantes a metales pesados y/o capaces de bioacumularlos.

Las bacterias juegan un rol importante en la biorremediación de metales pesados en suelos y aguas residuales. En años recientes, se han realizado amplias investigaciones sobre métodos biológicos para la eliminación de estos contaminantes, los cuales se han considerado como alternativas amigables ya que

se ha demostrado que algunas bacterias son capaces de tolerar, bioacumular o eliminar metales pesados sin dañar al medio ambiente (Muñoz *et al.*, 2006) suponiendo que la contaminación del medio ambiente por estos metales conduce a la creación de una población microbiana que logra ser tolerante (Aleem *et al.*, 2003).

También se han reportado un gran número de estudios en los que bacterias nativas de sitios contaminados con metales muestran tolerancia, debido a que poseen mecanismos que les permiten removerlo, detoxificarlo o bioacumularlo (Cheung y Gu, 2007).

El potencial aplicativo de los microorganismos como agentes biolixiviadores (removedores de metales), puede usarse para promover la reducción de Cr⁺⁶ y la biolixiviación de Cr⁺³ (Fang *et al.*, 2007) por la habilidad de los procesos enzimáticos directamente involucrados como por la producción de metabolitos altamente reductores, que contribuyen a inmovilizar el metal (Cheung y Gu, 2007).

Zahoor y Rehman (2009), reportaron que las bacterias *Bacillus* sp. y *Staphylococcus capitis* pudieron reducir cromo hexavalente a trivalente con una eficiencia del 86% y 89% respectivamente, después de 144 h de exposición a efluentes industriales.

Yang *et al.*, (2009), también reportaron la capacidad de *Intrasporangium* sp., de reducir Cr⁺⁶ en forma aerobia.

Camargo *et al.*, (2004), evaluaron otra especie de *Bacillus* sp. ES 29 (ATTC: BAA-696) al inmovilizar las células y los extractos enzimáticos libres de células, en un biorreactor; los resultados indicaron que tanto las células como el extracto enzimático presentaron capacidad reductora del Cr⁺⁶, con una eficiencia del 84 al 98%, considerando a *Bacillus* sp., con un alto potencial para ser utilizado en modelos a escala real.

Se han realizado diferentes investigaciones con bacterias para determinar la bioacumulación de diferentes metales, como la investigación de Lin y Lai (2006), donde colocaron a la especie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* PU21 inmovilizada en pellets como adsorbentes para Pb^{2+} en condiciones de pH de 5.0 y temperatura de 40°C teniendo como resultado la disminución de la concentración de este metal en el medio, concluyendo que esta bacteria bioacumuló 0.723 mg de este metal por g de células.

Uslu y Tanyol (2006), realizaron investigaciones con *Pseudomonas putida* donde demostraron la mayor absorción de cobre en condiciones de 30°C, pH 5.5 con una concentración inicial de 100 mg/dm³ de cobre resultando una capacidad absorbente de estas bacterias de 96.9 mg de cobre por cada gramo de biomasa generada.

Otra investigación la realizaron Beolchini *et al.*, 2006 con la especie *Sphaerotilus natans* en diferentes condiciones de pH mediante la realización de pruebas en reactores de membrana, evidenciaron el efecto negativo de la fuerza iónica y el efecto positivo de pH en condiciones iniciales de 30°C y una concentración de cobre de 100 mg/L demostrando una mayor absorción en pH 6.0 en comparación con pH 4.0 obteniéndose absorciones de cobre de 60 mg/g y 15 mg/g respectivamente. Así como las investigaciones de Lu *et al.*, 2006 que trabajaron con *Enterobacter* sp., aislada de una planta de tratamiento de aguas residuales donde se expuso esta bacteria a plomo, cobre y cadmio a una concentración inicial de 100 mg/L de cada uno, mostrando como resultado que *Enterobacter* sp. fue capaz de captar 50.9 mg de plomo por cada gramo de células, 32.5 y 46.2 mg/g para cobre y cadmio, respectivamente con pH de 3.0 para cadmio y un pH menor o igual a 2.0 para plomo y cobre todos a una temperatura de 25°C.

1.10. Actinobacterias tolerantes a metales pesados y/o capaces de bioacumularlos.

Recientemente se han realizado pruebas para evaluar la tolerancia a metales pesados con actinobacterias como lo demuestran El Baz *et al.*, (2014), donde aislaron e identificaron bacterias de zonas mineras abandonadas alrededor de la región de Marrakech, Centro Oeste de Marruecos y se demostró la tolerancia de algunas de las cepas aisladas (*Streptomyces* sp. BN2) a concentraciones relativamente altas de plomo (hasta 0.55 mg/mL) y se concluyó que los aislamientos de esas zonas también podían tolerar cobre con cepas de actinobacterias *Amycolatopsis tucumanensis* aisladas de sedimentos contaminados con cobre mostrando una tolerancia hasta 0.08 mg/mL de CuSO₄, también se demostró que *Amycolatopsis* sp. GT6, GT15 y GT39 pudieron tolerar cuatro metales Pb, Cu, Cr, y Zn en concentraciones de 0.25, 0.10, 0.15 y 0.10 mg/mL respectivamente.

Bueno *et al.*, (2008), realizaron pruebas con *Rhodococcus opacus* para demostrar la bioacumulación de Pb²⁺ y Cr³⁺ y Cu²⁺ donde se obtuvieron resultados de absorción de estos metales con las siguientes condiciones: concentraciones iniciales; Pb²⁺ y Cu²⁺ 200 mg/L y Cr³⁺ 160 mg/L, pH; 5 y temperatura; 25°C, concluyendo que *R. opaccus* llevó a cabo una absorción de 94.3, 72.9 y 32.2 mg/g de Pb²⁺ y Cr³⁺ y Cu²⁺, respectivamente.

1.11. Bacterias halófilas tolerantes a metales pesados y/o capaces de bioacumularlos.

Bacterias halófilas o moderadamente halófilas han demostrado ser útiles para la investigación de las bases moleculares de la resistencia a los metales pesados, por ejemplo *Halomonas zincidurans* B6, asilada de sedimentos marinos contaminados con metales, mostró una tolerancia extraordinaria a altas concentraciones de zinc (hasta 20 – 30 mM de Zn²⁺ en agar que contenía 5% de NaCl). En comparación, las cepas de referencia *Halomonas xingjiangensis*,

Chromobacter israelensis y *Salinicola socius* toleraron hasta 1 mM de Zn^{2+} (Xu *et al.*, 2013).

Halomonas zincidurans B6 y *Chromohalobacter israelensis* DSM 6768 demostraron su capacidad de crecer hasta 0.5 mM de Hg^{2+} en medio MH sólido (Zhou *et al.*, 2015). Las comparaciones genómicas han indicado la presencia de numerosos sistemas de transporte (por ejemplo, bombas de flujo específicas de metal), factores reguladores de la transcripción y enzimas (por ejemplo, reductasa mercúrica) que podrían mediar la resistencia a metales pesados en *H. zincidurans* y *C. israelensis* (Zhou *et al.*, 2015; Huo *et al.*, 2014). Los genes que codifican para multiresistencia de metales pesados (es decir, níquel, cobre, cromo, arsénico, zinc, cobalto y cadmio) se dedujeron en el genoma de los *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 ligeramente halófilos, aislados de sedimentos de agua profundas (Wang *et al.*, 2012).

Estudios recientes sobre aislados de haloarqueas pertenecientes a los géneros *Haloferax*, *Halococcus*, *Halorubrum* y *Haloarcula* revelaron un patrón de resistencia similar al descrito por Nieto (1991), con las cepas *Haloferax* BBK2 y *Halococcus* BK6 que mostraron la mayor tolerancia (CMI 0.5 mM) a Cd^{2+} y Zn^{2+} . Sin embargo, se observaron concentraciones máximas de Cd^{2+} y Zn^{2+} que favorecen el crecimiento (4 mM y 2mM, respectivamente) en medio complejo de agar NTYE (Salgaonkar *et al.*, 2016; Chaudhary *et al.*, 2014).

Los determinantes comunes de resistencia de metales bacterianos (arsénico, cadmio y mercurio) se han encontrado en varios géneros de arqueas (Baker-Austin *et al.*, 2007, Schelert *et al.*, 2006, Ettema *et al.*, 2006). Se detectaron elementos de resistencia a metales pesados similares en bacterias halófilas de *Archaea*, tales como operones de arsénico (arsADRC y arsR2M) en el plásmido pNRC100 y el gen cromosómico arsB asegurando resistencia a arsénico en *Halobacterium* sp. NRC-1 (Wang *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2000).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que existe una gran contaminación por metales pesados en los ecosistemas acuáticos hay un deterioro del medio ambiente, así mismo puede afectar a los organismos que se encuentran presentes en éste y para remediar este problema, se han implementado diferentes estrategias, dentro de las que destacan los tratamientos químicos pero estos a veces resultan con desventajas propias de los mismos como pueden ser altos requerimientos de reactivos, remoción impredecible de metales iónicos y generación de lodos residuales tóxicos. Así mismo, se han identificado métodos biológicos eficaces para la remoción de metales pesados empleando técnicas aerobias y anaerobias con diferentes bacterias que cuentan con la capacidad de resistir y acumular metales pesados, por lo que es necesario plantear nuevas técnicas para el tratamiento de estos metales que sean más amigables con el medio ambiente sin generar problemas de toxicidad. Numerosos estudios han demostrado que diversas bacterias tienen la capacidad de tolerar y acumular metales pesados de ambientes contaminados. Por lo que es de interés en esta investigación, comprobar si las bacterias son capaces de tolerar y acumular metales pesados y proponerlas como alternativa para el tratamiento de estos contaminantes.

2.1. Pregunta de investigación

¿Pueden las bacterias halófilas tolerar la presencia de los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} ?

3. HIPÓTESIS

Las bacterias halófilas toleran la presencia de los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} .

Las bacterias halófilas no toleran la presencia de los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} .

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar bacterias halófilas tolerantes a los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} .

4.2. Objetivos particulares

1. Aislar y caracterizar bacterias halófilas a partir de suelo salino.
2. Determinar la tolerancia a los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} por bacterias halófilas aisladas de suelo salino.
3. Identificar genéticamente bacterias halófilas tolerantes a los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} .
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria de metal pesado As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} para el desarrollo de bacterias halófilas.
5. Observar cambios morfológicos de bacterias halófilas tolerantes a los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} .

5. JUSTIFICACIÓN

Ya que existen diferentes ambientes contaminados con metales pesados derivados de fuentes antropogénicas y que estas causan un impacto sobre diferentes ecosistemas considerando una posible consecuencia en la salud humana, es necesario plantear alternativas de eliminación de estos contaminantes. Se sabe que existen diversos métodos químicos para dicho fin, sin embargo, estos presentan desventajas por lo que actualmente la comunidad científica está en la búsqueda de nuevas alternativas para la eliminación de estos metales. La presente investigación permitirá conocer si las bacterias halófilas tienen la capacidad de tolerar los metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} y así ampliar el campo de investigación en materia de biorremediación de dichos metales.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño de estudio

Estudio experimental

6.2. Método de muestreo

Por conveniencia

6.3. Muestra

Cepas bacterianas aisladas de suelo salino provenientes del ex Lago de Texcoco, Estado de México, México.

6.4. Criterios de Inclusión

Cepas bacterianas aisladas de suelo salino del ex Lago de Texcoco.

6.5. Criterios de exclusión

Bacterias no halófilas.

6.6. Criterios de eliminación

Bacterias halófilas que no toleran la presencia de metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+} .

6.7. Procedimientos

6.7.1. Caracterización fisicoquímica de las muestras

Se tomaron muestras de suelo salino del ex Lago de Texcoco, Estado de México, México. A cada muestra se le determinaron los parámetros fisicoquímicos: %NaCl y pH. Se colocó 1 g de muestra de suelo seco en un tubo de ensayo y se adicionaron 9 mL de agua destilada, la mezcla se agitó en un vortex durante 10 min y se dejó filtrar durante toda la noche a través de un papel filtro Whatmann 2. Se determinaron el % de NaCl y el pH de la solución filtrada utilizando un refractómetro (Hanna, HI931100) y un potenciómetro (Hanna, HI98128), respectivamente.

6.7.2. Preparación del medio de cultivo para bacterias halófilas

Se preparó medio de cultivo para bacterias halófilas (MH) (Ventosa *et al.*, 1982); extracto de levadura, 10 g/L; proteosa peptona, 5 g/L; glucosa, 1 g/L; agar bacteriológico, 18 g/L, solución de NaCl al 10%, cbp 1L, se ajustó el pH a 7.2 ± 0.2 . El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos, posteriormente fue enfriado a 50°C y vertido en cajas Petri. Se conservaron a 37°C durante 24 h para prueba de esterilidad.

6.7.3. Aislamiento y purificación de bacterias halófilas

De cada muestra se pesó 1 g de suelo y se colocó por separado en tubos de ensayo, posteriormente se le adicionaron 9 mL de solución de NaCl al 10% p/v y se agitó en vortex durante 30s. Una alícuota de 200µL de cada suspensión fue inoculada en el medio de cultivo MH y se mantuvieron en incubación durante 10 días a 37°C, después de este tiempo se llevó a cabo el aislamiento y purificación de cepas realizando resiembras en el mismo medio de cultivo hasta obtener una sola cepa por caja Petri confirmando la purificación por uniformidad de la morfología celular en el medio.

6.7.4. Caracterización morfológica de las cepas

Se describió la morfología macroscópica de las cepas purificadas de acuerdo a las siguientes características: tamaño, color, forma, textura, presencia de micelio aéreo o vegetativo. La morfología microscópica de las cepas se determinó realizando tinción de Gram para observar su respuesta a dicha tinción, forma, agrupación presencia de células filamentosas y ramificaciones.

6.7.5. Caracterización fisiológica de bacterias halófilas

Concentración de NaCl para el crecimiento óptimo de las cepas halófilas aisladas:

Se determinó la concentración de NaCl óptima para el crecimiento de las cepas purificadas, sembrando cada cepa en medio de cultivo MH ajustado a diferentes concentración de NaCl a 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30% (p/v) a pH 7.2 ± 0.2 . La siembra se realizó por estría y se incubaron a 37°C observando el crecimiento durante 10 días. La concentración de NaCl óptima para el desarrollo de las cepas se estableció considerando aquella concentración en la cual el crecimiento fue más abundante.

Valor de pH para el crecimiento óptimo de las cepas halófilas aisladas:

Se determinó el valor de pH óptimo para el crecimiento de las cepas purificadas, utilizando medio de cultivo MH ajustado a la correspondiente concentración de crecimiento óptimo de NaCl previamente determinada. El valor de pH se ajustó a los valores 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Se inoculó por estría cada cepa en el medio de cultivo y se mantuvieron en incubación a 37°C observando el crecimiento durante 10 días. El valor de pH para el crecimiento óptimo de cada cepa se estableció considerando el valor de pH en el cual el desarrollo de las colonias fue más abundante.

6.7.6. Tolerancia de las cepas a los a metales pesados

Se determinó la tolerancia de las cepas a cada metal pesado. Las cepas fueron inoculadas en matraces con medio de cultivo MH al 10% NaCl, pH 8.2 ± 0.2

suplementado con el metal correspondiente en las siguientes especies químicas y respectivas concentraciones: As³⁺ (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 y 12.0) mM; Cr⁶⁺ (0.0, 100.0, 200.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 700.0, 800.0, 900.0, 1 000.0, 1 100.0 y 1 200.0) mM; Hg²⁺ (0.0, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.35, 0.04, 0.45, 0.05, 0.55, 0.06, 0.65, 0.07, 0.75, 0.08, 0.85, 0.09, 0.95 y 0.1) mM; Pb²⁺ (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) mM. Los matraces se mantuvieron en agitación orbital a 150 rpm y 37°C durante 15 días para determinar hasta qué concentración del metal pesado las cepas eran capaces de desarrollarse. Se define como tolerante al metal pesado a aquellas bacterias que fueron capaces de reproducirse al cabo de 15 días de incubación en presencia de las concentraciones de metal antes mencionadas.

6.7.7. Identificación genética de las cepas tolerantes a metal pesado

Las cepas que toleraron las concentraciones mayores de uno o más metales pesados fueron identificadas genéticamente por análisis de secuenciación del gen 16S rRNA

Obtención de biomasa y extracción de ADN

Las cepas fueron sembradas en medio de cultivo MH al 10% NaCl y pH 8.2±0.2, se incubaron a 37 °C a 150 rpm durante una semana. Se recuperó la biomasa por centrifugación a 10 000 rpm/10min.

La obtención de ADN de las bacterias se realizó de acuerdo al protocolo del Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega A1120).

Amplificación del gen 16S rRNA

La identificación genética de las bacterias se llevó a cabo por análisis de la secuenciación del gen 16S rRNA, empleando los siguientes *iniciadores* universales: 27F: 5' – AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG – 3'; 518F: 5' – CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG – 3'; 1492R: 5' – TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T – 3'; 800R: 5' – TAC CAG GGT ATC TAA TCC – 3'.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando Taq ADN Polimerase in Storage Buffer B (Storage Buffer B (Bioline® BIO21105). Las condiciones del ciclo térmico fueron: un ciclo de pre-desnaturalización 5 min (94°C); desnaturalización 30 s (94°C); acoplamiento 20 s (52°C); elongación 1:30 min (72°C); se repitieron 34 ciclos y al final un ciclo de post-elongación de 7 min (72°C). Los fragmentos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1%, utilizando el marcador de peso molecular de 300 – 10 000 pares de bases (Trading New Technologies) en cámara de electroforesis a 120 volts y 300 micro Amperes durante 60 minutos, se tiñó con bromuro de etidio (SIGMA 46065) durante 40 segundos y se observó en un fotodocumentador bajo luz ultravioleta. Los productos de esta amplificación fueron purificados utilizando el kit Amicon Ultra filter (Millipore® UFC901008) y fueron enviados al servicio de secuenciación de Macrogen, Maryland USA.

Identificación de especies tolerantes a los metales

Las secuencias obtenidas fueron corregidas y ensambladas usando los programas ChromasPro ver. 1.5 (Technelysium Pty. Ltd., 2006, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y BioEdit ver. 7.0.9 (Hall, 1999). Las secuencias consenso se compararon con las secuencias validadas y depositadas en la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information-NCBI) usando el programa Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide (BLASTN) que pertenece a NCBI (Altschul, 1990).

6.7.8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI de metal pesado a las cepas identificadas para conocer la concentración exacta que inhibió su crecimiento, cultivándolas en medio MH al 10% NaCl y pH 8.2±0.2 suplementado con el metal pesado respectivo en las siguientes concentraciones, As³⁺, 3.0-13.0 mM con amplitud de rango de 0.25; Cr⁶⁺, 300-1300 mM con amplitud de rango de 25, Hg²⁺, 0.0-0.1 mM con amplitud de rango de 0.0025 y Pb²⁺, 3.0-10.0 mM con amplitud de 0.5. Se mantuvieron en

incubación durante 15 días hasta verificar a qué concentración las cepas ya no fueron capaces de crecer (Shakoori *et al.*, 1998).

6.7.9. Cambios morfológicos de las cepas en presencia del metal pesado.

Se prepararon para cada cepa identificada dos matraces con medio de cultivo MH líquido al 10% de NaCl, pH 8.2 ± 0.2 . Uno de los matraces se suplementó con la concentración de máxima tolerancia del metal pesado. El inóculo de la cepa se ajustó al tubo 2 en la escala de McFarland (6.0×10^8 UFC/mL) en cada uno de los matraces y se mantuvieron en agitación orbital a 150 rpm a 37°C. Para cada matraz se construyó una curva de crecimiento microbiano para conocer el comportamiento del desarrollo de las cepas en condiciones normales (sin metal pesado) y el desarrollo de las cepas en presencia del metal de tolerancia. El crecimiento bacteriano se determinó por turbidimetría tomando alícuotas del matraz por fracciones de tiempo y midiendo la densidad óptica a 660 nm.

Como complemento de esta prueba se prepararon por duplicado dos cajas de medio de cultivo MH al 10% NaCl, pH 8.2 ± 0.2 , una de las cajas fue suplementada con la concentración de tolerancia máxima de metal pesado. Se sembraron las cepas correspondientes al metal y se mantuvieron en incubación a 37°C durante 15 días, al cabo de este tiempo se observaron macroscópicamente las características morfológicas de crecimiento de las colonias como tamaño, color, forma, textura y presencia de micelio aéreo o vegetativo.

Se hizo una comparación del crecimiento de las colonias en condiciones normales (sin metal pesado) y el crecimiento de las colonias en presencia del metal de tolerancia.

7. VARIABLES DE ESTUDIO

7.1. Variable independiente

Bacterias halófilas

7.2. Variables dependientes

- Tolerancia a alguna concentración de metal pesado (As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+}).
- Cambios morfológicos macroscópicos debido a la presencia de metal pesado (As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+}).

7.3. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis estadístico
Bacterias halófilas	Bacterias que para su crecimiento necesiten alguna concentración de NaCl.	Débiles: 1-10% p/v NaCl Moderadas: 10-20% p/v NaCl. Extremas: >20% p/v NaCl.	Independiente. Cuantitativa.	% p/v NaCl	No aplica
Tolerancia a los metales pesados	Capacidad de los microorganismos de crecer y desarrollarse en medio que contenga alguna concentración de metal pesado (As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+}).	Presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.	Dependiente. Cuantitativa.	[mM]	No aplica
Cambios morfológicos	Cambios morfológicos macroscópicos de las colonias como tamaño, color, forma y textura debido a la presencia de metal pesado (As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} o Pb^{2+}).	Concentración de tolerancia de metal pesado presente en el medio.	Dependiente Cualitativa dicotómica.	Presencia o ausencia de cambios morfológicos macroscópicos	No aplica

8. RESULTADOS

8.1. Título corto del artículo enviado

“Bacteria tolerant to heavy metals”

8.2. Página frontal del artículo enviado

IDENTIFICATION OF HALOPHILIC BACTERIA TOLERANT TO HEAVY METALS

Rosas-Ramírez J. R.¹, Isaac-Olivé K.¹, Moreno-Pérez P. A.¹, Sandoval-Trujillo H.²,
Ramírez-Durán N.^{1*}.

¹ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan esq. Jesús Carranza, Colonia Moderna de la Cruz, Toluca, Estado de México, México. C.P. 50180.

² Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México.

* Correspondencia: Tel.: +52 (722) 217 3552, ext. 109. nramirezd@uaemex.mx,
ninfard@hotmail.com

8.3. Carta de envío

Manuscript submitted to Journal of Applied Microbiology - JAM-2017-2391



Applied Microbiology <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Hoy, 07:27 p.m.

Tú; ninfard@hotmail.com; nramirez@uamex.mx; kisaaco@uamex.mx; saieto@hotmail.com; sandov@hotmail.com; +2 destinatarios



Responder | v

05-Dec-2017

Dear Dr. Ramírez Durán

The following manuscript has been successfully submitted to Journal of Applied Microbiology:

Manuscript ID: JAM-2017-2391

Title: IDENTIFICATION OF HALOPHILIC BACTERIA TOLERANT TO HEAVY METALS

Authors: Rosas Ramírez, Jonathan; Isaac Olivé, Keila; Moreno Pérez, Pablo; Sandoval Trujillo, Horacio; Ramírez Durán, Ninfa

If there are any errors in the manuscript details above or in your contact details, please contact us at jamlam@wiley.com.

Your manuscript will now be checked for compliance with the guidelines to authors, and you will be contacted if further information is required. Once the submission is confirmed as complete, the Chief Editor will then assign the manuscript to a handling Editor, who assesses the manuscript for suitability in the journal. At this screening stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal, and authors should not expect full comments if papers are rejected at this stage. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript.

You can keep track of your manuscript by logging on to ScholarOne Manuscripts at:

<https://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>

The summary status of your manuscript will be displayed in your Author Centre. Should you have any queries please contact jamlam@wiley.com, using your Manuscript ID as a reference.

Co-authors: Please contact me at jamlam@wiley.com as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript. As co-author, you will not be contacted again during the review process of this manuscript; all further correspondence will be sent to Dr. Ninfa Ramírez Durán.

Thank you for your submission to Journal of Applied Microbiology.

Kind regards

Ms. Emma Stephens
Journal of Applied Microbiology

IDENTIFICATION OF HALOPHILIC BACTERIA TOLERANT TO HEAVY METALS

Journal:	<i>Applied Microbiology</i>
Manuscript ID	Draft
Journal Name:	Journal of Applied Microbiology
Manuscript Type:	JAM - Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rosas Ramírez, Jonathan; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Isaac Olivé, Keila; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Moreno Pérez, Pablo; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Sandoval Trujillo, Horacio; Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Sistemas Biológicos Ramírez Durán, Ninfa; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina; Universidad Autónoma del Estado de México
Key Words:	Diversity, Environmental, Filamentous bacteria, Identification, Resistance

SCHOLARONE™
Manuscripts

8.4. Abstract

Aims: Heavy metals released into the environment cause deterioration of environmental health. Its elimination by biological means is a strategy under study. The objective of this investigation was to identify halophilic bacteria isolated from saline-sodic soils and to determine their tolerance to heavy metals As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} . **Methods and Results:** Strains were cultured in MH medium, without and with the presence of each metal, at 10% NaCl, pH 8.0 ± 0.2 and 37°C . Those that showed greater tolerance to each metal were identified by sequencing the 16S rRNA gene and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. Seventy-five halophilic strains were isolated. The most tolerant species were: *Salinicoccus roseus* [MIC (Hg^{2+}) of 0.1 mmol l^{-1}]; *Hallomonas pantelleriensis* [MIC (Pb^{2+}) of 7.0 mmol l^{-1}]; *Nocardiopsis xinjiangensis* [CMI (As^{3+}) of 8.5 mmol l^{-1}] and *Nocardiopsis salina* [CMI (As^{3+}) of $27.25 \text{ mmol l}^{-1}$; CMI (Cr^{6+}) $1250.0 \text{ mmol l}^{-1}$; CMI (Hg^{2+}) $0.075 \text{ mmol l}^{-1}$ and CMI (Pb^{2+}) 7.5 mmol l^{-1}]. **Conclusions:** There are no reports of tolerance to metals of the species *Nocardiopsis xinjiangensis* and *Nocardiopsis salina* and the latter was the one that tolerated the highest number of metals at high concentrations. **Significance and Impact of Study:** First report showing that *Nocardiopsis salina* is a candidate for bioremediation of saline environments contaminated with metals.

8.5. Keywords

Halophilic-bacteria, halophilic-actinobacteria, tolerant, heavy metal.

8.6. Introduction

Metallic chemical elements with a density at least five times higher than water or a high atomic number, and toxic or poisonous at low concentrations are considered heavy metals (Barceló and Poschenrieder 1992; Alloway 2013). The most studied of these, due to their abundance and toxicity, are Hg, As, Pb and to a lesser extent Cr (Covarrubias *et al.* 2015). The principal problems associated with environmental contamination by heavy metals are bioaccumulation in the food chain and persistence in the environment (Zahoor and Rehman 2009). Most heavy metals are released into water bodies as a result of anthropogenic activities such as wastewater discharges, industrial waste, agricultural residues and mining.

Unlike organic contaminants, biological, chemical or physical processes cannot always eliminate metals (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005). Depending on the nature of the metals in question, biological methods, better known as bioremediation techniques, can be used to remove them. In these cases, the metabolic potential of microorganisms (bacteria and fungi) or plants is used to clean contaminated ecosystems (Gadd 2010) by mobilization or immobilization of heavy metals (Lovley and Coates 1997). Bacteria are among the most commonly used microorganisms in bioremediation processes (Schippers and Sand 1999) as they have specific genetic mechanisms for tolerance and interaction with heavy metals (Silver and Misra 1988; Mindlin *et al.* 2001).

In some bacterial species, low concentrations of metals such as Ni, Fe, Cu and Zn are essential for metabolism. Heavy metals such as Hg, Ag, Cd and Pb, on the other hand, are toxic to most microorganisms, even at low concentrations, since they are not biologically active (Hughes and Poole 1989).

Diverse bacteria have proved capable of surviving in the presence of heavy metals. These microorganisms have been isolated from little-studied ecosystems such as saline environments (Haefeli *et al.* 1984; Duxbury 1986; Basu *et al.* 1997; Choudhury and Kumar 1998; Castro-Silva *et al.* 2003; Otth *et al.* 2005; Lima-Bittencourt *et al.* 2007) where halophilic bacterial species predominantly develop. Such species require high concentrations of salts such as NaCl for growth and survival (Oren 2005).

There are many reports of heavy metal contamination in soil, wastewater, and water bodies such as rivers and lakes (Yang *et al.* 2009). Some of these concern the use of bacteria in bioremediation. Zahoor and Rehman (2009) report that *Bacillus* sp and *Staphylococcus capitis* reduced Cr⁶⁺ to Cr³⁺ with 86 and 89% efficiency respectively after 144 h of exposure to industrial effluents. Lin and Lai (2006) have shown that Pb²⁺ is bioaccumulated by immobilized pellets of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 with an efficiency of 0.723 mg g⁻¹ cells. Lu *et al.* (2006) isolated *Enterobacter* sp from a sewage treatment plant, exposing this species to 100 mg l⁻¹ of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺, and concluded that it bioaccumulated 50.9 mg Pb²⁺, 32.5 mg Cu²⁺, and 46.2 mg Cd²⁺ per gram of cells.

Heavy metal tolerance studies have also been conducted using actinobacteria, as described by Yang *et al.* (2009). The latter authors isolated *Intrasporangium* sp Q5-1 in soil from a manganese-chromium mine, finding that it is highly resistant to Cr⁶⁺ and efficiently removes this metal under aerobic conditions. El Baz *et al.* (2014) isolated and identified *Streptomyces* sp BN2, *Amycolatopsis tucumanensis* and *Amycolatopsis* sp GT6, GT15 and GT39 from mining areas in the Marrakech region (Morocco). The strain *Streptomyces* sp BN2 is tolerant to Pb²⁺ at a maximum concentration of 0.55 mg ml⁻¹. The strain *A. tucumanensis* was found to tolerate Cu²⁺ at a maximum concentration of 0.08 mg ml⁻¹, while *Amycolatopsis* sp GT6, GT15 and GT39 tolerated Pb²⁺, Cu²⁺, Cr⁶⁺ and Zn²⁺ at maximum concentrations of 0.25, 10.10, 0.15 and 0.10 mg ml⁻¹ respectively.

Bueno *et al.* (2008) tested *Rhodococcus opacus* for bioaccumulation of Pb²⁺, Cr³⁺ and Cu²⁺ at pH 5 and 25°C, and concluded that this species bioaccumulated 94.3, 72.9 and 32.2 mg g⁻¹cells of Pb²⁺, Cr³⁺ and Cu²⁺ respectively.

In Mexico, various extreme saline environments have been identified, such as former Lake Texcoco, in which heavy metal-tolerant halophilic bacteria with bioremediation potential may be present. However, bacteria from this region are not known to have this potential. The main purpose of the present study was to identify heavy metal-tolerant halophilic bacteria isolated from former Lake Texcoco.

8.7. Materials and methods

Sampling and physicochemical characterization of samples

Samples of saline-sodic soil were collected in the vicinity of former Lake Texcoco (State of Mexico). In all samples, the physicochemical parameters % NaCl and pH were determined. Dry soil (1 g) from each sample was placed in a test tube and 9 mL distilled water was added. The mixture was Vortex-shaken for 10 min and filtered overnight through Whatmann No. 2 filter paper. Determination of % NaCl and pH in the filtrate was carried out using a refractometer (Hanna, HI931100) and potentiometer (Hanna, HI98128) respectively.

Preparation of culture medium for halophilic bacteria

A culture medium for halophilic bacteria (MH) (Ventosa *et al.* 1982) was prepared: 10 g l⁻¹ yeast extract, 5 g l⁻¹ proteose peptone, 1 g l⁻¹ glucose, 18 g l⁻¹ bacteriological agar and 10% NaCl solution. The pH was adjusted to 7.2 ± 0.2. The medium was sterilized by autoclaving at 121°C for 15 min, cooled down to 50°C and poured into Petri dishes. The plates were maintained at 37°C for 24 h to test sterility.

Halophilic bacteria isolation and purification

From each sample, 1 g of soil was weighed out and placed in a test tube to which 9 ml of 10% NaCl solution (w/v) were added and the mixture was Vortex-shaken for 30 s. Aliquots of 200 µl of each suspension were inoculated in MH culture medium and incubated for 10 days at 37°C. At the end of this period, isolation and purification of strains was carried out by reseeded in the same medium until a

single strain was obtained in each Petri dish, confirming purification by uniformity of cell morphology.

Morphological characterization of strains

The macroscopic morphology of purified bacterial strains was described according to the following characteristics: size, color, form, texture, and presence of aerial or vegetative mycelium. The microscopic morphology of the strains was determined by response to Gram's stain, form, clustering, as well as presence of filamentous cells and branching.

Physiological characterization of halophilic bacteria

NaCl concentration for optimum growth of halophilic isolates

The optimal concentration of NaCl for growth of purified strains was determined by seeding each strain in MH medium adjusted to different concentrations of NaCl: 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30% (w/v) at pH 7.2 ± 0.2 . Seeding was done by streaking; plates were incubated at 37°C and colony growth was observed for 10 days. The optimal NaCl concentration for growth was determined to be the one at which growth was most abundant.

pH value for optimum growth of halophilic isolates

The optimal pH value for growth of purified strains was determined using MH culture medium adjusted to the corresponding concentration of the previously determined NaCl concentration for optimum growth. The pH was adjusted to 6, 7,

8, 9, 10, 11 and 12. Each strain was inoculated by streaking in MH medium and incubated at 37°C for 10 days, during which growth was observed. The optimum pH for growth of each strain was determined as the value at which colony growth was most abundant.

Tolerance of bacterial strains to heavy metals

Tolerance of strains to each of the metals was determined as follows. Strains were inoculated in flasks with MH medium at 10% NaCl and pH 8.0 ± 0.2 , supplemented with the corresponding metal in the following chemical species and concentrations: As³⁺ (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 and 12.0) mmol l⁻¹; Cr⁶⁺ (0.0, 100.0, 200.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 700.0, 800.0, 900.0, 1 000.0, 1 100.0 and 1 200.0) mmol l⁻¹; Hg²⁺ (0.0, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.35, 0.04, 0.45, 0.05, 0.55, 0.06, 0.65, 0.07, 0.75, 0.08, 0.85, 0.09, 0.95 and 0.1) mmol l⁻¹; Pb²⁺ (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0) mmol l⁻¹. The flasks were maintained on an orbital shaker at 150 rpm and 37°C for 15 days to determine the highest metal concentration at which strains were capable of growing. Heavy metal-tolerant strains were defined as bacteria capable of reproducing after incubation for 15 days in the presence of the abovementioned metal concentrations.

Genetic identification of heavy metal-tolerant strains

Strains which tolerated higher concentrations of one or more metals were genetically identified by 16S rRNA gene sequence analysis.

Biomass extraction and DNA extraction

Strains were seeded in MH medium at 10% NaCl and pH 8.0 ± 0.2 , and incubated at 37°C and 45 x g for 1 week. Biomass was extracted by centrifuging at 3000 x g for 10 min. Extraction of bacterial DNA was performed according to the protocol in the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega A1120).

Amplification of the 16S rRNA gene

Genetic identification of bacteria was made by 16S rRNA gene sequencing, using the following universal primers: 27F: 5' – AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG – 3'; 518F: 5' – CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG – 3'; 1492R: 5' – TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T – 3'; 800R: 5' – TAC CAG GGT ATC TAA TCC – 3'.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed using Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B (Storage Buffer B, Bioline® BIO21105). Thermal cycling conditions were: pre-denaturation for 5 min at 94°C; followed by 34 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 20 s at 52°C and extension for 1:30 min at 72°C; and final extension for 7 min at 72°C. Amplified fragments were visualized in 1% agarose gel stained with ethidium bromide (SIGMA 46065).

Amplification products were purified using the Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit (Millipore® UFC901008) and were sent to the Macrogen (MD) DNA sequencing service.

Identification of species tolerant to heavy metals

Obtained sequences were aligned and assembled using ChromasPro v1.5 (Technelysium Pty, <http://www.technelysium.com>) and BioEdit v7.0.9 (Hall 1999). Consensus sequences were compared with validated sequences in the GenBank database (National Center for Biotechnology Information, NCBI) using the program Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (Altschul *et al.* 1990).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC of identified strains was determined in order to find the exact concentration inhibiting their growth. Strains were cultured in MH medium with 10% NaCl at pH 8.0 ± 0.2 , supplemented with the respective metal at the following concentrations: As^{3+} , $3.0\text{-}13.0 \pm 0.25 \text{ mmol l}^{-1}$; Cr^{6+} , $300.0\text{-}1300.0 \pm 25 \text{ mmol l}^{-1}$, Hg^{2+} , $0.0\text{-}0.1 \pm 0.025 \text{ mmol l}^{-1}$; and Pb^{2+} , $3.0\text{-}10.0 \pm 0.5 \text{ mmol l}^{-1}$. Bacterial strains were incubated for 15 days to determine the concentration at which they were no longer able to grow (Shakoori *et al.* 1998).

Growth curve and morphological changes in the presence of heavy metals

Two flasks with MH culture medium at 10% NaCl and pH 8.0 ± 0.2 were set up for each strain identified, and one flask was supplemented with the maximum tolerable concentration (MTC) of the metal. The strain inoculum in each flask was adjusted to McFarland standard No. 2 ($6.0 \times 10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$) and the flasks were maintained on an orbital shaking platform at $45 \times g$ and 37°C . A growth curve was plotted for each flask to assess growth behavior in normal conditions (no metal) and in the

presence of the tolerated metal. Bacterial growth was determined by turbidimetry on aliquots taken from the flask at different time intervals, measuring optical density at 660 nm.

As a complement to this test, two Petri dishes with MH medium at 10% NaCl and pH 8.0 ± 0.2 were set up in duplicate. One plate was added the MTC of the metal. The corresponding strains were seeded and incubated at 37°C for 15 days. At the end of this period, the morphological characteristics of colony growth were macroscopically examined including size, color, form, texture, and presence of aerial or vegetative mycelium. Comparison was made of colony growth in normal conditions (no metal) and in the presence of the tolerated metal.

8.8. Results

Physicochemical characterization of samples

In samples of saline-sodic soils collected in the former Lake Texcoco, NaCl ranged 14 to 24% with pH values ranging 7.2 to 10.

Isolation of halophilic strains

A total of 75 bacterial strains were isolated from saline-sodic soil samples. All strains displayed growth in MH medium at 10% NaCl and pH 7.2 ± 0.2 .

A major macroscopic morphological characteristic of the strains is coloring. Identified strains were yellow, orange or white. They were circular or irregular in form and had smooth or undulate margins, a smooth texture and a rough or mucoid consistency; some glistened and others were opaque. As regards microscopic characteristics, the following were noted: positive or negative to Gram's stain, bacillary or coccoid form, in some cases presence of mycelia, and paired clusters or single cells.

Physiological characterization of halophilic bacteria

All strains required a minimum concentration of at least 3% NaCl for growing; none grew in the absence of salt and all were therefore classed as halophilic. The strains were able to grow up to a maximum concentration of 15% NaCl, being classified as moderate halophiles. All strains grew up to a maximum pH value of 10 and began the growing at pH values 6-7, therefore were classified as alkalotolerant. Optimum

growth in the majority of the strains was found at 10% NaCl and pH 8; most strains were therefore classified as moderate halophilic and alkalotolerant bacteria.

Heavy metal tolerance of bacterial strains

Table 1 shows the distribution by MTC of the 75 strains evaluated.

In the case of As^{3+} and Pb^{2+} , of the 75 strains evaluated at least one tolerated each of the tested concentrations. As regards Cr^{6+} , 69 strains tolerated at least one of the tested concentrations while only 39 did so in the case of Hg^{2+} . Strains tolerating higher concentrations of the metals were identified. The most toxic metal of all was Hg^{2+} since it was tolerated by the smallest number of strains and its MTC was much lower than the MTC of other metals.

Genetic identification of strains that have a greater tolerance to heavy metals

Strains showing tolerance to higher concentrations of one or more of the metals were identified by comparative 16S rRNA gene sequence analysis as *Salinicoccus roseus* (TX3SA-2MHG1 and TX3SA-4MHG1), *Halomonas pantelleriensis* (TXO4B-1SG9), *Nocardiopsis xinjiangensis* (TXO7B-1SG12 and TXV10-3SG5) and *N. salina* (TXV7-8SG2). Similitude percentages obtained with BLASTn, classification according to physiological characterization, maximum tolerance to evaluated metals and MIC are shown in Table 2.

Heavy metal MICs in identified strains

The MICs of metals evaluated in the identified strains are listed in Table 2. *N. salina* tolerated three of these metals (As^{3+} , Cr^{6+} and Pb^{2+}) at their maximum concentration. While it also tolerated a high concentration of Hg^{2+} , the strain resistant to the highest concentration of this metal was *S. roseus*.

Effect of heavy metals on bacterial growth

As a result of exposure of the strains to the MTC of individual metals, growth curves were obtained (Fig. 1) showing the effect of the tolerated metal on the corresponding strain. These curves reveal that metal presence extended the latency period in some cases, lengthening the time required to reach maximum growth, while in other cases, metal presence did not extend the latency period but prevented maximum growth attainment as compared to growth in the absence of metals.

Figure 2 shows that metal presence induced morphological changes in some heavy metal-tolerant strains. *S. roseus*, in the presence of Hg^{2+} has smaller colonies of pale orange color; the colonies have an elevated center and confluent develop, have the same texture and maintain the absence of aerial mycelium. *H. pantelleriensis*, in the presence of Pb^{2+} presents a slightly smaller colony of dark brown color, maintains the same texture and there is absence of aerial mycelium. *N. xinjiangensis*, in presence of As^{3+} does not present changes in size or color,

rounded edges are observed, same texture and the presence of aerial mycelium is maintained.

N. salina, in the presence of As^{3+} maintains the same morphological characteristics as its growth without metal (control). This species in the presence of Cr^{6+} does not change its size, its color changed to light brown, its shape and texture are the same, and the absence of aerial mycelium is observed. The same species in the presence of Hg^{2+} decreases notably its size, changed to a light orange color, presents semi-round shape, smooth texture and absence of aerial mycelium. Finally, this strain in the presence of Pb^{2+} have the most notorious changes, the size of the colony decreases slightly, the color changes to dark brown with some black zones, rounded edges are noticed, the soft texture is maintained and the diminished presence of the aerial mycelium is observed

8.9. Discussion

The present study identified halophilic bacteria showing growth at concentrations of 3-10% NaCl (w/v), pH values 6-10 and 37°C. Therefore, microorganisms displaying these two physiological properties are expected to be able to grow in contaminated environments within these NaCl and pH ranges. These bacteria include the species *S. roseus*, which has been reported by Amoozegar *et al.* (2008) to tolerate tellurium (Te) at a MIC of 12 mmol l⁻¹ in conditions of 10% NaCl, pH 7-8 and 34-38°C. According to Amoozegar *et al.* (2008), this strain removed 75% of the metal in the medium within 72 h. Moreno *et al.* (2012) have also reported the identification of *S. roseus* and its tolerance to Cd, Zn, Ni, Fe, Cu and Co. In our study, this species showed the highest tolerance to Hg²⁺ with a MIC of 0.1 mmol l⁻¹.

VanEngelen *et al.* (2008) identified the genus *Halomonas*, which showed tolerance to and reduced Cr⁶⁺ and Fe³⁺ in alkaline conditions. One microorganism identified in our study belongs to this genus: *H. pantelleriensis*; it showed the highest tolerance to Pb²⁺ (MIC = 7.0 mmol l⁻¹). In our study, *H. pantelleriensis* showed a MTC for Cr⁶⁺ of 900 mmol l⁻¹, which is not the highest tolerated concentration but still it is high.

N. xinjiangensis had a high tolerance to As³⁺ (MIC = 9.75 mmol l⁻¹). The species *N. salina* recorded the highest tolerance to three of the metals evaluated, with MICs of (27.25, 1250.00 and 7.75) mmol l⁻¹ for As³⁺, Cr⁶⁺ and Pb²⁺ respectively. It also showed substantial resistance to Hg²⁺ (MIC = 0.075 mmol l⁻¹). There are no

previous reports of heavy metal tolerance in *N. xinjiangensis* and *N. salina*, so that the present study is the first to report tolerance to the metals herein evaluated in these two species.

Bacterial growth in the presence of As^{3+} showed no apparent changes in morphology since strains developed the same form and color, indicating perhaps that this metal does not affect their growth. Colony growth in the presence of Cr^{6+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} induced changes. Strains took on a darker color, probably due to reduction of Cr^{6+} to Cr^{3+} and formation of PbS and HgS .

A total of 75 halophilic strains isolated from former Lake Texcoco showed tolerance to As^{3+} and Pb^{2+} at concentrations of 1.0-27.0 mmol l^{-1} and 1.0-7.0 mmol l^{-1} respectively. Of these strains, 69 were resistant to Cr^{6+} at concentrations of 100-1200 mmol l^{-1} , and 39 to Hg^{2+} at concentrations of 0.005-0.80 mmol l^{-1} . Species tolerating higher concentrations of these metals include *N. salina* (As^{3+} , Cr^{6+} and Pb^{2+}), *N. xinjiangensis* (As^{3+}), *S. roseus* (Hg^{2+}) and *H. pantelleriensis* (Pb^{2+}). The metals Cr^{6+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} induced morphological changes in the growth of these strains, while As^{3+} had no such effect. Since there are no reports to date of heavy metal tolerance in *N. salina*, the latter species may be proposed as a research alternative in the bioremediation of saline environments contaminated with As^{3+} , Cr^{6+} or Pb^{2+} , as well as for possible study of its metabolism and tolerance to other metals.

8.10. Acknowledgements

The authors acknowledge the support of the academic network "Microbiology and Chemistry in Health Sciences 1039 / 2014RIFC" and to the Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) from the Secretary of Public Education (SEP), through the network "Red-hispano-mexicana para la búsqueda y aprovechamiento de microorganismos extremófilos con aplicaciones ambientales y biomédicas". This work is derived from a Master thesis from the Master of Health Science Program recognized by the Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PNPC-CONACYT).

8.11. Conflict of interest

Authors declare do not have any conflict of interest.

8.12. References

- Alloway, B.J. (2013) Heavy Metals in Soils, Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, 3rd ed. Reading, UK: Springer.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

- Amoozegar, M. A., Ashengroph, M., Malekzadeh, F., Razavi, M. R., Naddaf, S., & Kabiri, M. (2008). Isolation and initial characterization of the tellurite reducing moderately halophilic bacterium, *Salinicoccus* sp. strain QW6. *Microbiological research*, 163(4), 456-465.
- Barceló, J. and Poschenrieder, C.H. (1992) Respuesta de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta* **2**, 345-361.
- Basu, M., Bhattacharya, S. and Paul, A.K. (1997) Isolation and characterization of chromium-resistant bacteria from tannery effluents. *Bull Environ Contam Toxicol* **58**, 535-542.
- Bueno, B.Y.M., Torem, M.L., Molina, F. and de Mesquita, L.M.S. (2008) Biosorption of lead (II), chromium (III) and copper (II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. *Miner Eng* **21**, 65-75.
- Castro-Silva, M.A., Souza Lima, A.O., Gerchenski, A.V., Jaques, D.B., Rodrigues, A.L., Lima de Souza, P. and Rörig, L.R. (2003) Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. *Braz J Microbiol* **34**, 45-47.

Choudhury, P. and Kumar, R. (1998) Multidrug- and metal-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from *Penaeus monodon* of the coastal waters of deltaic Sundarban. *Can J Microbiol* **44**, 186-189.

Covarrubias, S.A., García Berumen, J.A. and Peña Cabriales, J.J. (2015) El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria* **25** (NE-3), 40-45.

Duxbury T. (1986) Microbes and heavy metals: an ecological overview. *Microbiol Sci* **3**, 330-333.

El Baz, S., Baz, M., Barakate, M., Hassani, L., El Gharmali, A. and Imziln, B. (2015) Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *Sci World J* 2015, Article ID 761834, 14 pages.

Gadd, G.M. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156** (Pt 3), 609-643.

Haefeli, C., Franklin, C. and Hardy, K. (1984) Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J Bacteriol* **158**, 389-392.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98.

Hughes, M.N. and Poole, R.K. (1989) The functions of metals in microorganisms. In *Metals and Microorganisms* ed. Hughes, M.N. and Poole, R.K. pp.1-38. London: Chapman and Hall.

Lima-Bittencourt, C.I., Cursino, L., Gonçalves-Dornelas, H., Pontes, D.S., Nardi, R.M.D., Callisto, M., Chartone-Souza, E. and Nascimento, A.M.A. (2007) Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. *Genet Mol Res* **6**, 510-521.

Lin, C. and Lai, Y. (2006) Adsorption and recovery of lead (II) from aqueous solutions by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* PU21 beads. *J Hazard Mater* **137**, 99-105.

Lovley, D.R. and Coates, J.D. (1997) Bioremediation of metal contamination. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 285-289.

Lu, W.-B., Shi, J.-J., Wang, C.-H. and Chang, J.-S. (2006) Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *J Hazard Mater* **134**, 80-86.

Mindlin, S., Kholodii, G., Gorlenko, Z., Minakhina, S., Minakhin, L., Kalyaeva, E., Kopteva, A., Petrova, M., Yurieva, O. and Nikiforov, V. (2001) Mercury resistance transposons of Gram-negative environmental bacteria and their classification. *Res Microbiol* **152**, 811-822.

Moreno, M.L., Piubeli, F., Bonfa, M.R.L., García, M.T., Durrant, L.R. and Mellado, E. (2012) Analysis and characterization of cultivable extremophilic hydrolytic bacterial community in heavy-metal-contaminated soils from the Atacama Desert and their biotechnological potentials. *J Appl Microbiol* **113**, 550-559.

Oren, A. (2005) Halophilic microorganisms: Physiology and phylogeny. In *Origins* ed. Seckbach, J. pp.413-426. Netherlands: Springer.

Ott, L., Solís, G., Wilson, M. and Fernández, H. (2005) Susceptibility of *Arcobacter butzleri* to heavy metals. *Braz J Microbiol* **36**, 286-288.

Schippers, A. and Sand, W. (1999) Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulphur. *Appl Environ Microbiol* **65**, 319-321.

Shakoori, A.R., Zaidi, K.S. and Haq, R. (1998) Cadmium resistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella* sp isolated from industrial effluents and their possible role in cadmium detoxification. *World J Microbiol Biotechnol* **15**, 249-254.

- Silver, S. and Misra, T.K. (1988) Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annu Rev Microbiol* **42**, 717-743.
- VanEngelen, M.R., Peyton, B.M., Mormile, M.R. and Pinkart, H.C. (2008) Fe (III), Cr (VI), and Fe (III) mediated Cr (VI) reduction in alkaline media using a *Halomonas* isolate from Soap Lake, Washington. *Biodegradation* **19**, 841-850.
- Ventosa, A., Quezada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Comenzana, A. (1982) Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol* **128**, 1959-1968.
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J.A. and De la Rosa-Pérez, D.A. (2005) Suelos contaminados por metales pesados y metaloides. Mexico: INE-Semarnat.
- Yang, J., He, M. and Wang, G. (2009) Removal of toxic chromate using free and immobilized Cr (VI)-reducing bacterial cells of *Intrasporangium* sp Q5-1. *World J Microbiol Biotechnol* **25**, 1579-1587.
- Zahoor, A. and Rehman, A. (2009) Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *J Environ Sci* **21**, 814-820.

8.13. List of tables

Table 1. Distribution of 75 bacterial strains by maximum tolerable concentration (mmol l⁻¹) of the heavy metals evaluated

Metal		Concentration (mmol l⁻¹) and Number of strains									
As ³⁺	Concentration	1.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	9.0	27.0		
	No. of strains	7	35	22	4	2	3	1	1		
Cr ⁶⁺	Concentration	0	100	200	300	400	500	600	700	900	1200
	No. of strains	6	19	9	3	16	1	2	3	15	1
Hg ²⁺	Concentration	0.000	0.005	0.010	0.015	0.020	0.060	0.080			
	No. of strains	36	11	15	2	9	1	1			
Pb ²⁺	Concentration	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0			
	No. of strains	6	3	8	48	8	1	1			

Table 2. Optimum growth, classification, tolerance, minimum inhibitory concentration and identification of bacterial strains that proved able to grow in the presence of higher heavy metal concentrations

Strains	Range of %NaCl for growing	% NaCl for optimal growth/ classification	Range of pH for growing	pH for optimal growth / classification	Metal	Tolerance (mmol l ⁻¹)	MIC (mmol l ⁻¹)	Species	bp	Closest matching reference strain	% Similarity
TXV7-8SG2	3-15	10% / moderate halophilic	7-10	8 / alkalotolerant	As ³⁺	27.00	27.25	<i>Nocardiopsis salina</i>	1444	YIM 90010	99.0
					Cr ⁶⁺	1 200	1 250				
					Hg ²⁺	0.060	0.065				
					Pb ²⁺	7.00	7.75				
TXO7B-1SG12	5-15	10% / moderate halophilic	6-10	8 / alkalotolerant	As ³⁺	8.00	8.20	<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	1498	YIM 90004	99.0
TXV10-3SG5	3-15	10% / moderate halophilic	6-10	8 / alkalotolerant	As ³⁺	9.00	9.75	<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	1493	YIM 90004	99.0
TX3SA-2MHG1	5-15	10% / moderate halophilic	7-10	8 / alkalotolerant	Hg ²⁺	0.06	0.06	<i>Salinicoccus roseus</i>	1508	DSM 5351	98.0
TX3SA-4MHG1	5-15	10% / moderate halophilic	7-10	8 / alkalotolerant	Hg ²⁺	0.08	0.10	<i>Salinicoccus roseus</i>	1512	DSM 5351	99.0
TXO4B-1SG9	5-15	10% / moderate halophilic	6-10	8 / alkalotolerant	Pb ²⁺	6.00	7.00	<i>Halomonas pantelleriensis</i>	1468	AAP	99.0

MIC = minimum inhibitory concentration; bp = base pairs

Figure 1. Growth curves of bacterial strains in the presence/absence of the tolerated heavy metal. A) *Salinicoccus roseus* growth, without metal and with 0.08 mmol l⁻¹ (Hg²⁺). B) *Halomonas pantelleriensis* growth, without metal and with 6.00 mmol l⁻¹ (Pb²⁺). C) *Nocardiopsis xinjiangensis* growth, without metal and with 9.00 mmol l⁻¹ (As³⁺). D) *Nocardiopsis salina* growth, without metal and with 27.00 mmol l⁻¹ (As³⁺), 1200 mmol l⁻¹ (Cr⁶⁺), 0.07 mmol l⁻¹ (Hg²⁺), and 7.00 mmol l⁻¹ (Pb²⁺).

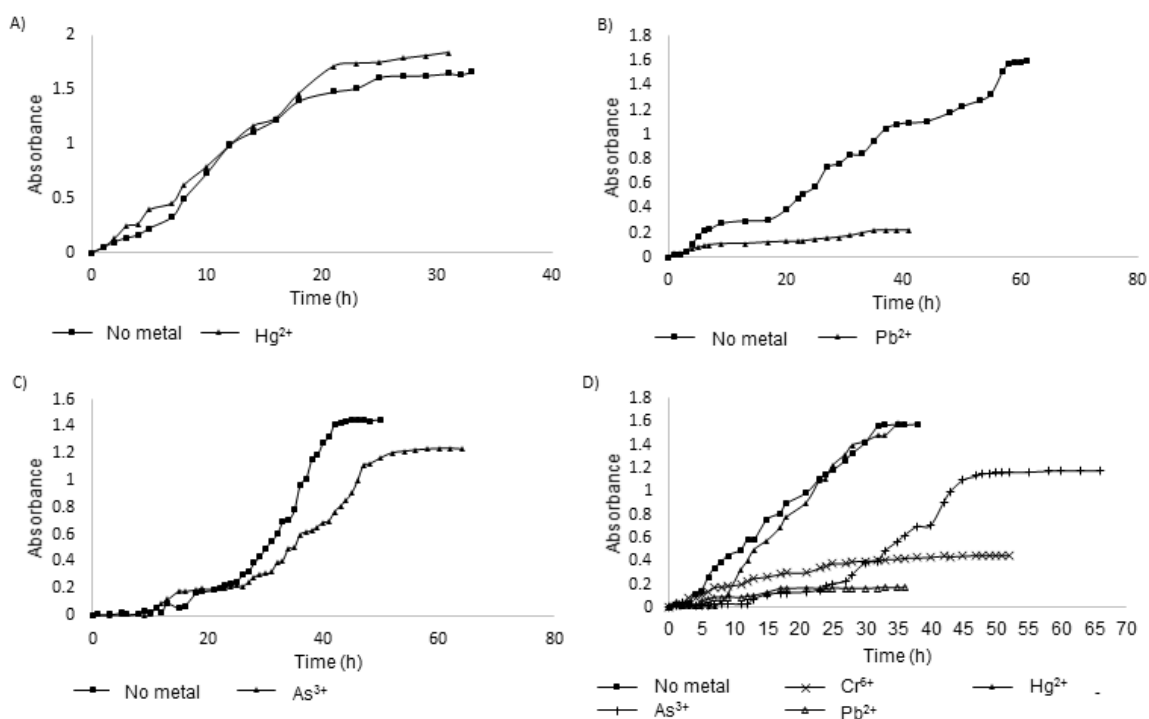
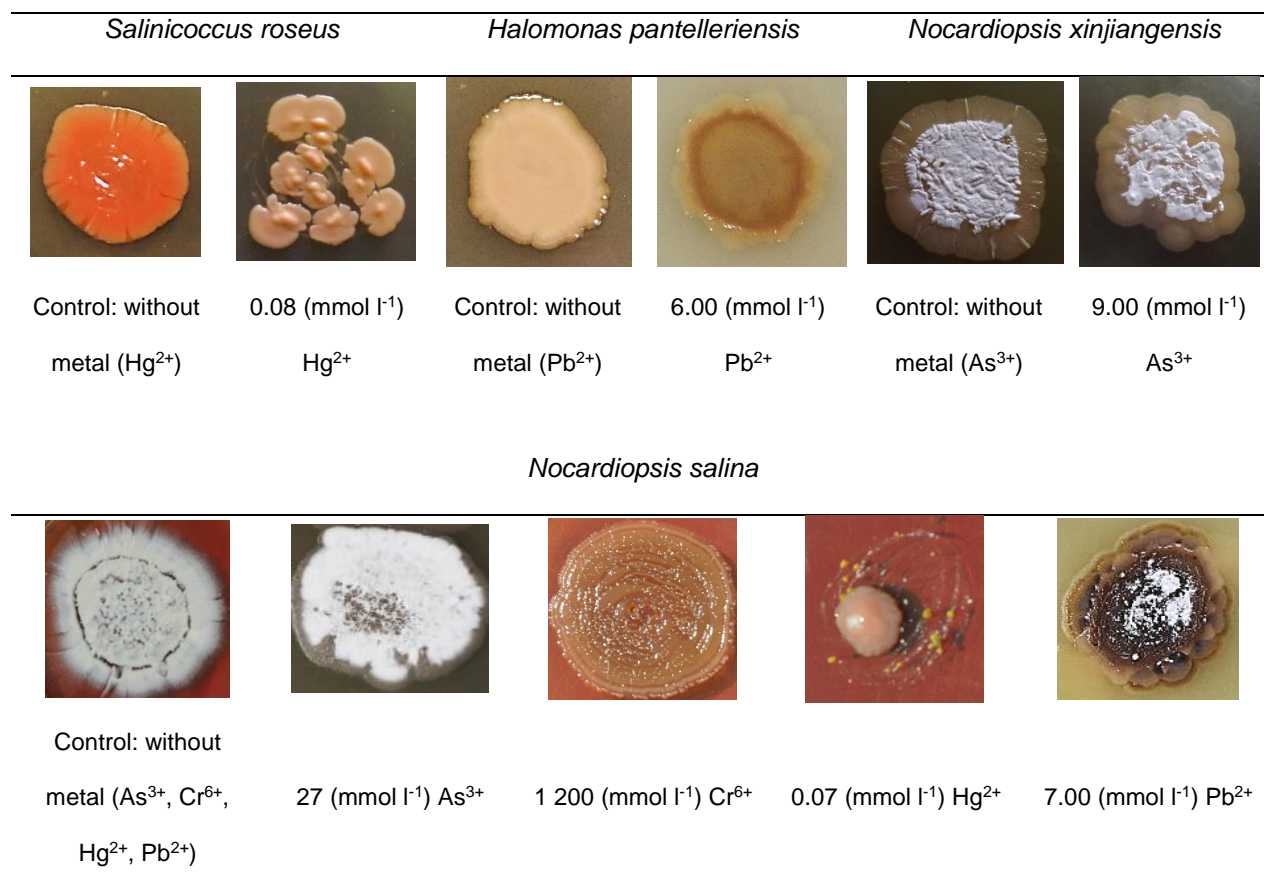


Figure 2. Macroscopic images of growth, morphology in control strains (without heavy metals) as compared to strains growing in the presence of heavy metals



9. RESULTADOS ADICIONALES

9.1. Cepas aisladas

Se aislaron 75 cepas bacterianas correspondientes a muestras de suelo salino del ex Lago de Texcoco, las cuales presentaron crecimiento en diferentes rangos de concentración de NaCl y pH, así como un crecimiento óptimo en cada una de estas variables. Por lo tanto fueron clasificadas como halófilas moderadas con respecto a la concentración de NaCl mostrado y como alcalotolerantes por los valores de pH óptimo de crecimiento (Tabla 9).

Tabla 9 – Clasificación de cepas aisladas de muestras de suelo salino del ex Lago de Texcoco.

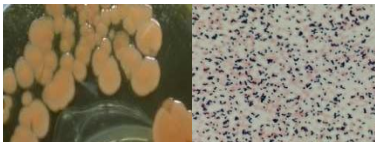
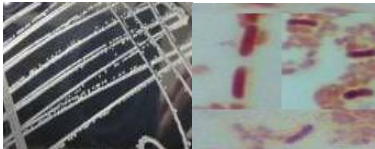
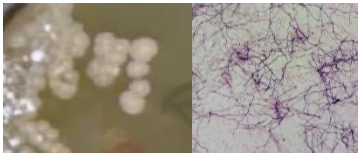

No.	CLAVE	NaCl			pH		
		Rango de %NaCl para crecimiento	%NaCl para crecimiento óptimo	Clasificación	Rango de pH para crecimiento	pH para óptimo crecimiento	Clasificación
1	TX2SC-1MHG1	10-15	15	Halófila moderada	9-10	8	Alcalotolerante
2	TX2SC-3MHG2	3-15	15	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante
3	TX2SC-5MHG2	3-15	15	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante
4	TX2SC-8MHG2	3-15	10	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante
5	TX2SC-9MHG2	3-15	10	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante
6	TX3SA-10MHG2	5-15	15	Halófila moderada	9-10	9	Alcalotolerante
7	TX3SA-11MHG2	5-15	15	Halófila moderada	9-10	9	Alcalotolerante
8	TX3SA-13MHG2	5-15	15	Halófila moderada	9-10	9	Alcalotolerante
9	TX3SA-14MHG2	5-15	15	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
10	TX3SA-15MHG2	5-15	15	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
11	TX3SA-1MHG2	3-15	15	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
12	TX3SA-2MHG1	5-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
13	TX3SA-4MHG1	5-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
14	TX3SA-5MHG1	5-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
15	TX3SA-7MHG1	5-15	10	Halófila moderada	9-10	9	Alcalotolerante
16	TX3SA-8MHG1	10-15	15	Halófila moderada	9-10	8	Alcalotolerante
17	TX3SA-9MHG2	5-15	15	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
18	TX3SB-2MHG1	5-15	10	Halófila moderada	9-10	10	Alcalotolerante
19	TX4SC-1MHG1	5-15	10	Halófila moderada	9-10	8	Alcalotolerante
20	TX4SC-2MHG3	3-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
21	TX4SC-3MHG3	3-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
22	TX5SEB-7MHG6	3-15	10	Halófila moderada	9-10	10	Alcalotolerante
23	TX6SEA-1SG1	3-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
24	TX6SEA-3SG1	3-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
25	TX6SEA-4SG1	3-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
26	TXO4B-1SG9	5-15	10	Halófila moderada	6-10	8	Alcalotolerante
27	TXO4B-2SG9	5-15	10	Halófila moderada	9-10	9	Alcalotolerante
28	TXO4B-3SG4	5-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
29	TXO7D-3MHG9	5-10	10	Halófila moderada	9-10	9	Alcalotolerante
30	TXV11-5SG1	3-15	10	Halófila moderada	9-10	8	Alcalotolerante
31	TXV16-3MHG6	5-10	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
32	TXV2-6MHG1	3-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
33	TXV4-3SG4	3-15	10	Halófila moderada	9-10	9	Alcalotolerante
34	TXV6-19SG3	3-15	10	Halófila moderada	9-10	8	Alcalotolerante
35	TXV7-7MHG5	5-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante

Tabla 9 (continuación) – Clasificación de cepas aisladas de muestras de suelo salino del ex Lago de Texcoco.

No.	CLAVE	NaCl			pH		
		Rango de %NaCl para crecimiento	%NaCl para crecimiento óptimo	Clasificación	Rango de pH para crecimiento	pH para óptimo crecimiento	Clasificación
36	TXV8-6MHG6	5-15	15	Halófila moderada	9-10	8	Alcalotolerante
37	TXV9-1MHG6	10-15	10	Halófila moderada	9-10	9	Alcalotolerante
38	TX5SEB-1MHG6	5-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
39	TX5SEB-4MHG6	5-10	10	Halófila moderada	9-10	10	Alcalotolerante
40	TX5SEC-2SG2	5-15	10	Halófila moderada	9-10	10	Alcalotolerante
41	TX5SEC-3MHG6	3-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
42	TX5SEC-4SG2	3-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
43	TX5SEC-5SG2	3-10	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
44	TX5SEC-8SG2	3-15	10	Halófila moderada	8-10	9	Alcalotolerante
45	TX7SC-2SG2	3-15	10	Halófila moderada	8-10	9	Alcalotolerante
46	TXI4-2SG3	3-15	10	Halófila moderada	8-10	9	Alcalotolerante
47	TXO2-2MHG9	5-15	10	Halófila moderada	8-10	9	Alcalotolerante
48	TXO7B-1SG12	5-15	10	Halófila moderada	6-10	8	Alcalotolerante
49	TXV10-3SG5	3-15	10	Halófila moderada	6-10	8	Alcalotolerante
50	TXV10-4SG1	3-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
51	TXV12-7SG2	3-15	10	Halófila moderada	8-10	9	Alcalotolerante
52	TXV13-3SG2	3-15	10	Halófila moderada	8-10	9	Alcalotolerante
53	TXV3-12SG3	3-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
54	TXV3-6SG3	3-15	15	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante
55	TXV3-7SG3	3-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
56	TXV3-9SG3	3-15	10	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante
57	TXV4-1MHG3	5-15	10	Halófila moderada	9-10	10	Alcalotolerante
58	TXV4-4SG4	3-15	15	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante
59	TXV4-5SG2	3-15	10	Halófila moderada	9-10	10	Alcalotolerante
60	TXV5-11SG3	3-15	10	Halófila moderada	9-10	10	Alcalotolerante
61	TXV5-2SG4	3-15	15	Halófila moderada	8-10	9	Alcalotolerante
62	TXV5-3SG3	3-15	10	Halófila moderada	8-10	10	Alcalotolerante
63	TXV5-4SG2	3-15	15	Halófila moderada	8-10	10	Alcalotolerante
64	TXV6-14SG3	3-15	10	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
65	TXV6-4MHG6	5-15	10	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante
66	TXV6-5SG3	3-15	10	Halófila moderada	8-10	10	Alcalotolerante
67	TXV7-12MHG2	3-15	15	Halófila moderada	9-10	10	Alcalotolerante
68	TXV7-8SG2	3-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
69	TXV7-9SG2	3-15	10	Halófila moderada	8-10	10	Alcalotolerante
70	TXV8-15SG3	3-15	10	Halófila moderada	8-10	10	Alcalotolerante
71	TXV8-20SG3	3-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
72	TXV8-2SG2	3-15	10	Halófila moderada	7-10	8	Alcalotolerante
73	TXV8-2SG3	3-15	10	Halófila moderada	7-10	9	Alcalotolerante
74	TXV8-5MHG2	5-15	15	Halófila moderada	8-10	8	Alcalotolerante
75	TXV9-4MHG3	3-15	10	Halófila moderada	7-10	7	Alcalotolerante

9.2. Principales características macroscópicas y microscópicas encontradas en las bacterias aisladas.

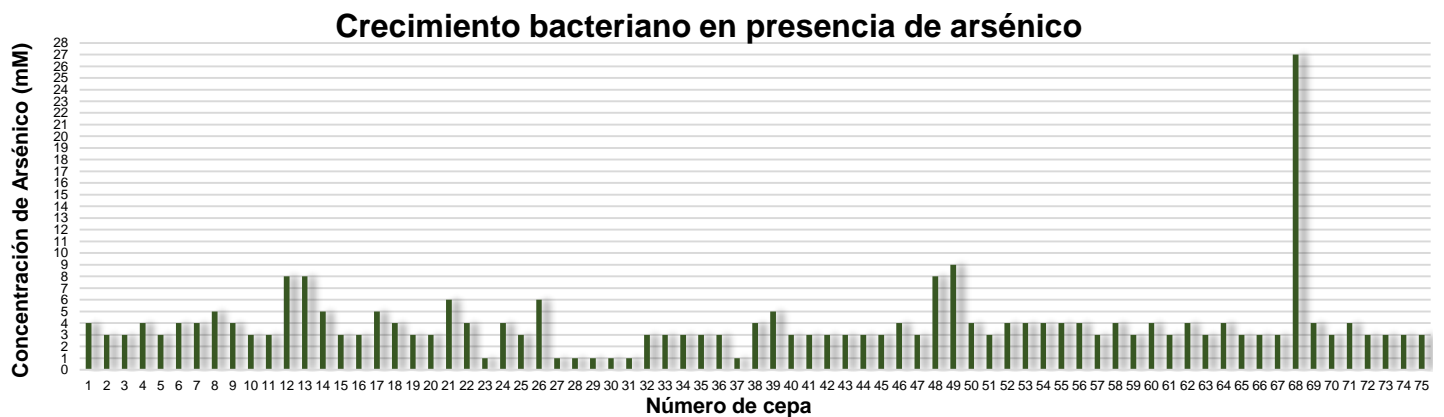
Cada una de las cepas aisladas fue observada macroscópicamente para conocer las características morfológicas de las colonias. También fueron observadas las características microscópicas de cada una de ellas por medio de tinción de Gram. En la Tabla 10 se mencionan algunas características principales de las cepas aisladas.

No.	Clave	Morfología	
		Características	Colonial
13	TX3SA-4MHG1	<p><u>Macroscópica:</u> Colonias grandes, cremosas y color rosado</p> <p><u>Microscópica:</u> Gram positivo, bacterias en forma de coco.</p>	
26	TXO4B-1SG9	<p><u>Macroscópica:</u> Colonias grandes, textura cremosa, color blanco.</p> <p><u>Microscópica:</u> Gram negativo, bacterias en forma de bacilos.</p>	
49	TXV10-3SG5	<p><u>Macroscópica:</u> Colonias blancas, redondas, rugosas, convexas y presentan micelio aéreo.</p> <p><u>Microscópica:</u> Gram positiva, se presentan filamentos delgados, aglomerados con ramificaciones.</p>	
68	TXV7-8SG2	<p><u>Macroscópica:</u> Colonias blancas, redondas, rugosas, convexas y presentan micelio aéreo.</p> <p><u>Microscópica:</u> Gram positiva, se presentan filamentos cortos y delgados, sin ramificación.</p>	

9.3. Tolerancia de las cepas a metal pesado.

9.3.1. Tolerancia a Arsénico (As^{3+})

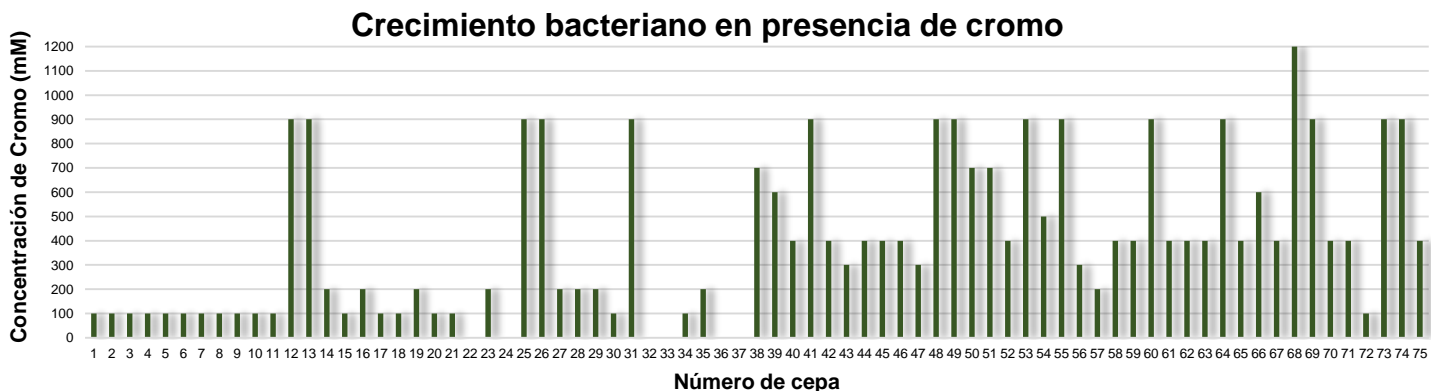
Se muestra la tolerancia de cada de una de las cepas al metal As^{3+} en la Gráfica 1, en esta gráfica se aprecia a aquellas cepas que presentaron mayor tolerancia a este metal, entre las que destacan las cepas No. 12 (TX3SA-2MHG1), 13 (TX3SA-4MHG1), 48 (TXO7B-1SG12) y 49 (TXV10-3SG5) con tolerancia de 8mM As^{3+} y 68 (TXV7-8SG2) con tolerancia de 27mM As^{3+} .



Gráfica 1. Tolerancia de las cepas en presencia de As^{3+}

9.3.2. Tolerancia a Cromo (Cr^{6+})

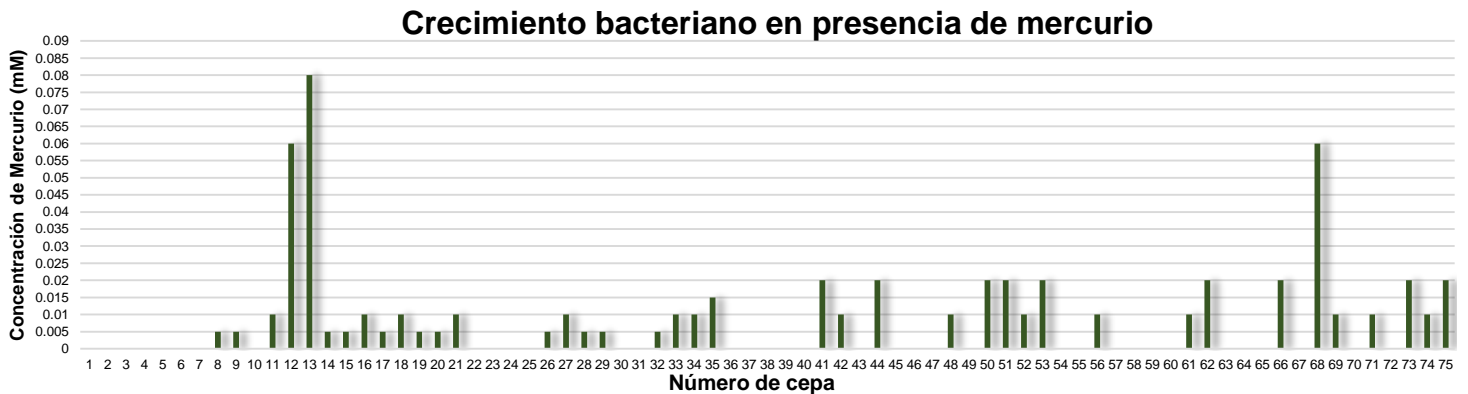
La tolerancia de cada una de las cepas se muestra en la Gráfica 2 donde se puede apreciar que sobresale un gran número de cepas que toleraron una concentración de 900 mM Cr^{6+} , así como la cepa número 68 (TXV7-8SG2) que mostró tolerancia de 1 200mM de este metal.



Gráfica 2. Tolerancia de las cepas en presencia de Cr^{6+}

9.3.3. Tolerancia a mercurio (Hg²⁺)

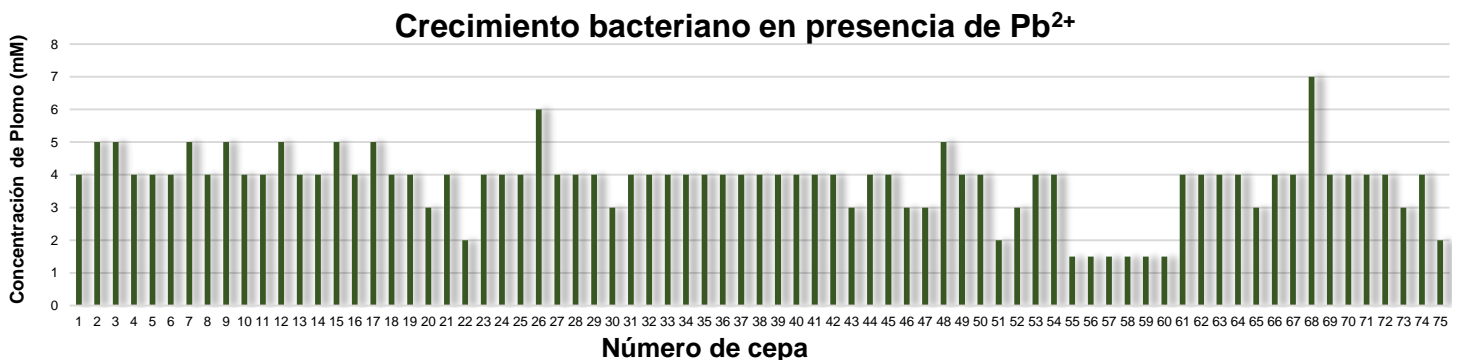
La tolerancia de cada una de las cepas aisladas se muestra en la Gráfica 3 en la cual se puede apreciar que un gran número de cepas no pudo tolerar la mínima concentración realizada para la prueba de tolerancia a este metal, así mismo se puede apreciar que varias cepas pudieron tolerar hasta 0.02mMHg²⁺ mientras que las cepas número 68 (TXV7-8SG2) y la número 13 (TX3SA-4MHG1) sobresalieron ya que lograron tolerar hasta 0.06 y 0.08 mM Hg²⁺ respectivamente.



Gráfica 3. Tolerancia de las cepas en presencia de Hg²⁺

9.3.4. Tolerancia a plomo (Pb²⁺)

Como resultado de la tolerancia de cada una de las al metal plomo Pb²⁺ se obtuvo que varias cepas toleraron hasta 5mM de concentración de este metal, y que las cepas número 26 (TXO4B-1SG9) y 68 (TXV7-8SG2) fueron las que toleraron mayor concentración, siendo estas de 6mM y 68mM respectivamente. Los resultados de tolerancia de cada una de las cepas a este metal se muestran en la Gráfica 4.



Gráfica 4 - Tolerancia de las cepas en presencia de Pb²⁺

La tolerancia de cada una de las cepas a cada metal fue muy distinta, por lo que se tomaron en consideración a aquellas cepas que pudieron tolerar uno o más de uno de los metales en su mayor concentración. Estas cepas se muestran en la Tabla 11, donde se indica a qué metal o metales fueron tolerantes y en qué concentración.

Tabla 11 - Cepas tolerantes a mayor concentración de metal pesado

Cepa		Concentración del metal (mM)			
No. Cepa	Clave	As ³⁺	Cr ⁶⁺	Hg ²⁺	Pb ²⁺
12	TX3SA-2MHG1	8.0	900.0	0.06	–
13	TX3SA-4MHG1	8.0	900.0	0.08	–
25	TX6SEA-4SG1	–	900.0	–	–
26	TXO4B-1SG9	–	900.0	–	6.0
31	TXV16-3MHG6	–	900.0	–	–
41	TX5SEC-3MHG6	–	900.0	–	–
48	TXO7B-1SG12	8.0	900.0	–	–
49	TXV10-3SG5	9.0	900.0	–	–
53	TXV3-12SG3	–	900.0	–	–
55	TXV3-7SG3	–	900.0	–	–
60	TXV5-11SG3	–	900.0	–	–
64	TXV6-14SG3	–	900.0	–	–
69	TXV7-9SG2	–	900.0	–	–
68	TXV7-8SG2	27.0	1200.0	0.06	7.0
73	TXV8-2SG3	–	900.0	–	–
74	TXV8-5MHG2	–	900.0	–	–

mM = mili molar, Cr⁶⁺ = Cromo hexavalente, Hg²⁺ = mercurio divalente, Pb²⁺ = Plomo divalente y As³⁺ = Arsénico trivalente

Como se puede apreciar en la tabla anterior, las cepas número 12 (TX3SA-2MHG1), 13 (TX3SA-4MHG1), 26 (TXO4B-1SG9), 48 (TXO7B-1SG12), 49 (TXV10-3SG5) y 68 (TXV7-8SG2) fueron las que toleraron la mayor concentración de uno o más metales. Estas cepas bacterianas fueron consideradas para llevar a cabo su identificación genética.

9.4. Identificación genética de cepas bacterianas con mayor capacidad de tolerancia a metal pesado.

Como resultado de la identificación genética de las seis cepas bacterianas que mostraron tolerancia en la mayor concentración de metal, en comparación con las bases de datos Ez-Taxon y BLAST, se tuvo que dos de ellas pertenecieron a la especie *Salinicoccus roseus*, dos a la especie *Nocardiopsis xinjiangensis*, una a la especie *Halomonas pantelleriensis* y la última a la especie *Nocardiopsis salina* como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Identificación bacteriana en comparación con las bases de datos Ez-Taxon y BLAST

No. Cepa	Clave	Nombre	Ez-Taxon			Cepa tipo
			Similitud	Longitud de alineamiento	Nucleótidos comparados	
12	TX3SA-2MHG1	<i>Salinicoccus roseus</i>	98.30%	1508 pb	1418 pb	DSM 5351
13	TX3SA-4MHG1	<i>Salinicoccus roseus</i>	99.25%	1512 pb	1474 pb	DSM 5351
21	TX4SC-3MHG3	<i>Staphylococcus equorum subsp. equorum</i>	98.69%	1494 pb	1452 pb	ATCC 43958
26	TXO4B-1SG9	<i>Halomonas pantelleriensis</i>	99.16%	1468 pb	1438 pb	AAP
48	TXO7B-1SG12	<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	99.12%	1498 pb	1480 pb	YIM 90004
49	TXV10-3SG5	<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	99.22%	1493 pb	1422 pb	YIM 90010
68	TXV7-8SG2	<i>Nocardiopsis salina</i>	99.02%	1444 pb	1222 pb	YIM 90010

No. Cepa	Clave	Nombre	BLAST			Cepa tipo
			Similitud	Longitud de alineamiento	Nucleótidos comparados	
12	TX3SA-2MHG1	<i>Salinicoccus roseus</i>	98%	1543 pb	1423 pb	DSM 5351
13	TX3SA-4MHG1	<i>Salinicoccus roseus</i>	99%	1543 pb	1485 pb	DSM 5351
21	TX4SC-3MHG3	<i>Staphylococcus equorum strain</i>	98%	1494 pb	1456 pb	PA 231
26	TXO4B-1SG9	<i>Halomonas pantelleriensis</i>	99%	1477 pb	1440 pb	AAP
48	TXO7B-1SG12	<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	99%	1525 pb	1486 pb	YIM 90004
49	TXV10-3SG5	<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	99%	1525 pb	1426 pb	YIM 90004
68	TXV7-8SG2	<i>Nocardiopsis salina</i>	99%	1449 pb	1217 pb	YIM 90010

10. DISCUSIÓN

Setenta y cinco cepas halófilas fueron aisladas de suelo salino del ex Lago de Texcoco. Mostraron crecimiento en concentraciones de 3-10% NaCl (p/v), 6-10 pH y 37 °C, por lo que se espera que los microorganismos que muestran estas propiedades fisiológicas puedan crecer en ambientes contaminados dentro de estos intervalos de NaCl y pH. Se identificaron las especies: *Salinicoccus roseus*, *Halomonas pantelleriensis*, *Nocardiopsis xinjiangensis* y *Nocardiopsis salina* por su capacidad de tolerancia a diferentes metales.

La especie *Salinicoccus roseus* que ha sido reportada por Amoozegar *et al.*, (2008) por tolerar telurio (Te) con una CMI de 12 mM en condiciones de 10% NaCl, pH 7-8 y 34-38 °C. De acuerdo con Amoozegar esta cepa eliminó el 75% del metal en el medio en 72 h. Moreno *et al.*, (2008) también informaron la identificación de *S. roseus* y su tolerancia a Cd, Zn Ni, Fe, Cu y Co. En el presente estudio, esta especie mostró la mayor tolerancia a Hg²⁺ con una CMI de 0.1 mM.

VanEngelen *et al.*, (2008) identificaron el género *Halomonas*, que mostró tolerancia y reducción de los metales Cr⁶⁺ y Fe³⁺ bajo condiciones alcalinas. En la presente investigación también se identificó a este género pero con la especie *H. pantelleriensis* la cual mostró la mayor tolerancia a Pb²⁺ con CMI de 7.0 mM. *H. pantelleriensis* también mostró una CMI de 900 mM a Cr⁶⁺, la cual no es la concentración más alta tolerada, pero aun así se considera entre las tolerancias más altas a este metal.

La bacteria identificada como *Nocardiopsis xinjiangensis* tuvo mayor tolerancia a As³⁺ demostrando una CMI de 9.75 mM. Y la especie identificada como *Nocardiopsis salina* mostró mayor tolerancia a tres metales con CMI de 27.25, 1250.00 y 7.75 mM a As³⁺, Cr⁶⁺ y Pb²⁺ respectivamente. También mostró una tolerancia considerable a Hg²⁺ con CMI de 0.075 mM. No hay informes previos de tolerancia a metales pesados por *N. xinjiangensis* y *N. salina*, por lo que el

presente estudio es el primero en informar la tolerancia a los metales aquí evaluados en estas dos especies.

Las células pudieron desarrollarse en medio de cultivo que contenía algún metal pesado, observando en algunos casos que el crecimiento disminuyó, la coloración cambió y el tamaño de las cepas se redujo debido a la presencia de metal pesado en el medio de crecimiento.

El desarrollo de las cepas en presencia de As^{3+} no mostró cambios en su morfología ya que las cepas desarrollaron la misma forma y color, lo que indica que este metal no afecta su crecimiento. El crecimiento de las colonias en presencia de Cr^{6+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} provocó cambios. Las cepas cambiaron a un color más oscuro probablemente por reducción del Cr^{6+} a Cr^{3+} y formación de PbS y HgS .

Las bacterias pueden desarrollar tolerancia a metales pesados debido a su capacidad de adaptación por diversos mecanismos bioquímicos. Algunas bacterias no sólo toleran sino que interactúan con metales pesados incorporándolos a sus vías metabólicas sin que tenga efecto negativo en su desarrollo, es por esto que se logra ver un cambio morfológico macroscópico en el crecimiento de la cepa en presencia de metal comparándolo con el crecimiento control.

11. CONCLUSIONES

1. Un total de 75 cepas halófilas aisladas del ex Lago de Texcoco mostraron tolerancia a los metales As^{3+} y Pb^{2+} en concentraciones que variaron en los rangos 1.0 – 27.0 mM y 1.0 – 7.0 mM respectivamente. De estas, 69 fueron tolerantes a Cr^{6+} en el rango de concentración de 100 – 1200 mM y 39 toleraron Hg^{2+} en un rango 0.005 – 0.080 mM. Las especies que toleraron las mayores concentraciones de estos metales fueron *Nocardioopsis salina* (As^{3+} , Cr^{6+} y Pb^{2+}), *Nocardioopsis xinjiangensis* (As^{3+}), *Salinicoccus roseus* (Hg^{2+}) y *Halomonas pantelleriensis* (Pb^{2+}).
2. Seis bacterias halófilas aisladas de muestras de suelo salino del ex Lago de Texcoco tienen la capacidad de tolerar altas concentraciones de los metales As^{3+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} .
3. Los metales Cr^{6+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} provocaron cambios morfológicos en el crecimiento de las cepas de bacterias que toleraron estos metales, mientras que el metal As^{3+} no causó efecto.
4. Debido a que actualmente no existen reportes de la tolerancia a metales pesados por la especie *Nocardioopsis salina*, esta podría proponerse como alternativa para su investigación en la biorremediación de ambientes salinos contaminados con metales pesados As^{3+} , Cr^{6+} o Pb^{2+} , así como la posibilidad del estudio de su metabolismo y tolerancia a otros metales.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriano, D. C., Wenzel, W. W., Vangronsveld, J., & Bolan, N. S. (2004). Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma*, 122(3-4), 121-142.
- Adriano, D.C. (1986) Trace elements in the terrestrial environment. Springer Verlag. New York, pp 533.
- Agencia de Protección Ambiental (EPA). (2007). Reporte de calidad del agua potable. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories EPA 822-R-04-005
- Aitio, A., & Becking, G. (2001). Arsenic and arsenic compounds. *Environmental Health Criteria*, 224.
- Aleem, A., Isar, J., and Malik, A. (2003). "Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil," *Bioresource Technology*, vol. 86, no. 1, pp. 7–13.
- Alloway, B. J. (2013). Sources of heavy metals and metalloids in soils. In *Heavy metals in soils* (pp. 11-50). Springer Netherlands.
- Al-Saleh, I., & Al-Doush, I. (1998). Survey of trace elements in household and bottled drinking water samples collected in Riyadh, Saudi Arabia. *Science of the total environment*, 216(3), 181-192.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Amoozegar, M. A., Ashengroph, M., Malekzadeh, F., Razavi, M. R., Naddaf, S., & Kabiri, M. (2008). Isolation and initial characterization of the tellurite reducing moderately halophilic bacterium, *Salinicoccus* sp. strain QW6. *Microbiological research*, 163(4), 456-465.
- Anderson, R. A. (1989). Essentiality of chromium in humans. *Science of the Total Environment*, 86(1-2), 75-81.

- Baker-Austin, C., Dopson, M., Wexler, M., Sawers, R. G., Stemmler, A., Rosen, B. P., & Bond, P. L. (2007). Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon 'Ferroplasma acidarmanus' Fer1. *Extremophiles*, 11(3), 425-434.
- Barceló, J., & Poschenrieder, C. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2(2), 345-361..
- Beolchini, F., Pagnanelli, F., Toro, L., and Veglio, F. (2006). Ionic strength effect on copper biosorption by *Sphaerotilus natans*: Equilibrium study and dynamic modelling in membrane reactor. *Water Res.* 40, 144–152.
- Brim, H., McFarlan, S. C., Fredrickson, J. K., Minton, K. W., Zhai, M., Wackett, L. P., & Daly, M. J. (2000). Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology*, 18(1), 85-90.
- Brown, P. H., Welch, R. M., & Cary, E. E. (1987). Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant physiology*, 85(3), 801-803.
- Bueno, B. Y. M., Torem, M. L., Molina, F., and de Mesquita, L. M. S. (2008). Biosorption of lead (II), chromium (III) and copper (II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. *Miner. Eng.* 21, 65–75.
- Bustani A. (1994). Generation of hazardous wastes in México. Notas del taller internacional sobre manejo de residuos peligrosos. Instituto de Geografía de la UNAM.
- Camargo, F. A. Okeke, B. C. Bento, F. & Frankenberger, W. T. (2004). Hexavalent Chromium Reduction by Immobilized Cells and the Cell-Free Extract of *Bacillus* sp. ES 29. *Bioremediation Journal*. 8 (1–2) 23–30.
- Cardona, G., Peña, P y Ruiz, M. 2009. Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Rev. Biol. Trop. Colombia*. (57): 1119-1139.
- Carson, B. L., Ellis, H. V., & McCann, J. L. (1986). Toxicology and biological monitoring of metals in humans: Including feasibility and need.

- Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Omar, S. M., Siddiqui, K. S., and Williams, T. J. (2011). Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial biotechnology*. 4(4): 449-460.
- Chaudhary, A., Salgaonkar, B. B., & Braganca, J. M. (2014). Cadmium tolerance by haloarchaeal strains isolated from solar salterns of Goa, India. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 4(1), 1.
- Cheung K. H. y Gu J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *Int. Biod. and Biod.* 59, 8-15.
- Comerio R.d M., Tarapow M., Vazquez S. C. y Mc Cormak W. P. (2007). Bacterias adaptadas al frío. *Revista ciencia hoy en línea* 17(99).
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua) (2014). Estadísticas de Agua en México 2014. Recuperado el 04 de noviembre de 2015 de <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/EAM2014.pdf>.
- Covarrubias, S. A., García Berumen, J. A., & Peña Cabriales, J. J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, 25(3).
- Cuberos, E., Rodriguez, A. I., & Prieto-Suárez, 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*, 11(2), 278-289.
- Cursino, L., Mattos, S. V., Azevedo, V., Galarza, F., Bucker, D. H., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. (2000). Capacity of mercury volatilization by mer (from *Escherichia coli*) and glutathione S-transferase (from *Schistosoma mansoni*) genes cloned in *Escherichia coli*. *Science of Total Environment*, 261(1-3), 109-113.
- Davis, B. Ed. (1980). *Applied soil trace elements*. USA. John Wiley & Sons Ltd. 287-351

- Dermont, G., Bergeron, G., Mercier, G., & Richer-Lafleche, M. (2008). Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 1-31.
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R. & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212.
- Donati, E. R., & Sand, W. (Eds.). (2007). *Microbial processing of metal sulfides*. Springer Science & Business Media.
- Duraipandiyan, V., Sasi, A.H., Islam, V.I.H., Valanarasu, M., and Ignacimuthu, S. 2010. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Médicale*. India. (20): 15-20
- El Baz, S., Baz, M., Barakate, M., Hassani, L., El Gharmali, A., Imziln, B. (2014). Resistance to and accumulation of meavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining áreas. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal. Volume 2015, Article ID 761834, 14 pages.
- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., & Sivasithamparam, K. (2008). Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied soil ecology*, 39(2), 161-171.
- Esbri, J. M., Bernaus, A., Ávila, M., Kocman, D., García-Noguero, E. M., Guerrero, B. & Pérez-González, Gustavo (2009). Especiación de mercurio en tres distritos mineros mediante XANES.
- Ettema, T. J., Brinkman, A. B., Lamers, P. P., Kornet, N. G., De Vos, W. M., & Van der Oost, J. (2006). Molecular characterization of a conserved archaeal copper resistance (cop) gene cluster and its copper-responsive regulator in *Sulfolobus solfataricus* P2. *Microbiology*, 152(7), 1969-1979.

- Fang, D. Jin, C. and Zhou, L. X. (2007). Removal of Cr from tannery sludge by indigenous sulfur-oxidizing bacteria. *Journal of Environmental Science and Health A* (42): 2065-2069.
- Fergusson, J. E. (1990). *Heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects*. Pergamon.
- Förstner, U., & Wittmann, G. T. (2012). *Metal pollution in the aquatic environment*. Springer Science & Business Media.
- Franco-Correa, M., Gómez-Méndez, D., Castro-Medina, N., Rendón-Ruiz, M. 2008. Polihidroxialcanoatos en actinomicetos nativos de suelos Colombianos. *Revista Peruana de Biología*. 16(1): 115- 118.
- Fuge, R., & Perkins, W. (1991). Aluminium and heavy metals in potable waters of the north Ceredigion area, mid-Wales. *Environmental geochemistry and health*, 13(2), 56-65.
- Gadd, G. M. (1993). Interactions of fungus with toxic metals. *New Phytologist*, 124(1), 25-60.
- Gadd, G. M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122(2-4), 109-119.
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(Pt 3), 609-643.
- Gall, J. E., Boyd, R. S., & Rajakaruna, N. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental monitoring and assessment*, 187(4), 201.
- Gochnauer, M. B., Leppard, G. G., Komarata, P., Kates, M., Novitsky, T., & Kushner, D. J. (1975). Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Canadian journal of microbiology*, 21(10), 1500-1511.
- Gomes, J. and Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*. 42(4): 223-225.

- Gonzalez-Chavez, M. C., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S. F., & Nichols, K. A. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental pollution*, 130(3), 317-323.
- Green-Ruiz, C., & Páez-Osuna, F. (2001). Heavy metal anomalies in lagoon sediments related to intensive agriculture in Altata-Ensenada del Pabellón coastal system (SE Gulf of California). *Environment International*, 26(4), 265-273.
- Gutiérrez-Ruiz, M.E. & Bautista-Zúñiga, F., (1992). Evaluación de las afectaciones al ambiente relacionadas con las actividades del Consorcio Minero Benito Juárez Peña Colorada. Programa: Efecto de los residuos peligrosos sobre el ambiente. Informe del Convenio CMBJPC-Instituto de Geografía de la UNAM. 115 pp
- Gwaltney-Brant S. M. (2002). Heavy Metals. In: Haschek W. M., Rosseaux C. G., Wallig A. M., (eds), *Handbook of Toxicologic Pathology I.*, pp 712-716 (Academic Press, San Diego, CA).
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment Editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98
- Huo, Y. Y., Li, Z. Y., Cheng, H., Wang, C. S., & Xu, X. W. (2014). High quality draft genome sequence of the heavy metal resistant bacterium *Halomonas zincidurans* type strain B6 T. *Standards in genomic sciences*, 9(1), 30.
- Ibrahim, E. Arenskotter, M., Luftmann, H. & Steinbuchel, A. 2006. Identification of Poly(cis-1,4-Isoprene) Degradation Intermediates during Growth of Moderately Thermophilic Actinomycetes on Rubber and Cloning of a Functional Icp Homologue from *Nocardia farcinica* Strain E1. *Applied and Environmental Microbiology*. Alemania. (72): 3375–3382
- INEGI. (1994). Estadísticas del medio ambiente: México, 1994. INEGI. Aguascalientes, México
- Jayasinghe, D. & Parkinson, D. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology*. Canadá. (38): 109-118.

- Julca-Otiniano, A., Meneses-Florián, L., Blas-Sevillano, R., & Bello-Amez, S. (2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia (Arica)*, 24(1), 49-61.
- Kazuya, W. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 237-241.
- Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., & Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 13772-13799.
- Kirchman, D. L. (2012). *Processes in microbial ecology*. Oxford University Press.
- Kushner, D. J. (1978). *Vida Microbiana en Ambientes Extremos*. Londres: Academic Press, 317-368.
- Kushner, D.J. y Kamekura. M, (1988). Physiology of halophilic eubacteria. En F. Rodríguez- Valera (ed.). *Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. Pags.: 109- 138.
- Lacerda, L. D., & Solomons, W. (1991). Dutch Ministry of Housing. *Physical Planning and Environment, Chemical Time Bomb Project*.
- Lebeau, T., Braud, A., & Jezequel, K. (2008). Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environmental Pollution*, 153(3), 497-522.
- Lin, C., and Lai, Y. (2006). Adsorption and recovery of lead (II) from aqueous solutions by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* PU21 beads. *J. Hazard. Mater.* 137, 99–105.
- Lu, W. -B., Shi, J. -J., Wang, C. -H., and Chang, J. -S. (2006). Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *J. Hazard. Mater.* 134, 80–86.
- MacElroy, R. D. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6(1), 74-75.

- Madigan, M. y Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion Microbiology*; 2:365 –269.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). BROCK. Biología de los microorganismos. Decima Edición. *Editorial Prentice Hall, España*.
- Margesin, R. y Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*; 5: 73-83.
- Markert, B. (1994). Element concentration cadasters in ecosystems. *Progress report on the element concentration cadaster project ECCE of INTECOL/IUBS. 25th General Assembly of IUBS, Paris*.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M. L., Thomas, P., Ramirez, F., Casalot, L., Cayol, J. L. and Ollivier, B. (2004). *Petrotoga mexicana* sp. nov. a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54(1): 169–174
- Mishra A. & Malik A. (2013). Recent advances in microbial metal bioaccumulation. *Critical reviews in environmental science and technology*, 43: 1162-1222.
- Monroy C. Y. Y. (2014). Bacterias sulfato reductoras (Bachelor's thesis, Universidad Militar Nueva Granada).
- Moreno, M. L., Piubeli, F., Bonfa, M. R. L., García, M. T., Durrant, L. R., & Mellado, E. (2012). Analysis and characterization of cultivable extremophilic hydrolytic bacterial community in heavy-metal-contaminated soils from the Atacama Desert and their biotechnological potentials. *Journal of applied microbiology*, 113(3), 550-559.
- Morton-Bermea, O., Hernández-Álvarez, E., González-Hernández, G., Romero, F., Lozano, R., & Beramendi-Orosco, L. E. (2009). Assessment of heavy metal pollution in urban topsoils from the metropolitan area of Mexico City. *Journal of Geochemical Exploration*, 101(3), 218-224.
- Muñoz, R., Alvarez, M. T., Muñoz, A., Terrazas, E., Guieysse, B., & Mattiasson, B. (2006). Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere*, 63(6), 903-911.

- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., ... & Swartzell, S. (2000). Genome sequence of Halobacterium species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12176-12181.
- Nieto, J. J. (1991). The response of halophilic bacteria to heavy metals. In *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms* (pp. 173-179). Springer US.
- Okeke, B. C. (2008). Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(12), 1571-1579.
- Okino, S., Iwasaki, K., Yagi, O., & Tanaka, H. (2000). Development of a biological mercury removal-recovery system. *Biotechnology Letters*, 22(9), 783-788.
- Oren, A. (2005). Halophilic Microorganisms: Physiology and Phylogeny. In *Origins* (pp. 413-426). Springer Netherlands
- Papanikolaou, N. C., Hatzidaki, E. G., Belivanis, S., Tzanakakis, G. N., & Tsatsakis, A. M. (2005). Lead toxicity update. A brief review. *Medical science monitor*, 11(10), RA329-RA336.
- Peavy, H. S. R., & Tchobanoglous, D. R. (1985). *Environmental engineering* (No. 628 P4).
- Pinzón-Martínez, D. L., Rodríguez-Gómez, C., Miñana-Galbis, D., Valerio-Alfaro, G., and Oliart-Ros, R. M. (2010). Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: Isolation and potential applications. *Environmental Technology*. 31(8-9): 957-966
- Rawlings, D. E., & Silver, S. (1995). Mining with microbes. *Biotechnology*, 13, 773-738
- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., and Evilia, C. (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea*. 2013: 1-14.
- Rodríguez-Valera, F. (1993). Introduction to saline environments. En R.H. Vreeland y L. Hochstein (Eds.). *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. 1-23.

- Romero C. R. (2007). Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª edición. Ed. Panamericana: México. pp: 1001-1003.
- Rosas Rodríguez, H. (2001). *Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*. 409(6823): 1092-1101.
- Ruiz-Romero, E., Alcántara-Hernández, R., CruzMondragon, C., Marsch, R., Luna-Guido, M. L., and Dendooven, L. (2009). Denitrification in extreme alkaline saline soils of the former lake Texcoco. *Plant and Soil*. 319(1-2): 247-257
- Salgaonkar, B. B., Das, D., & Bragança, J. M. (2016). Resistance of extremely halophilic archaea to zinc and zinc oxide nanoparticles. *Applied Nanoscience*, 6(2), 251-258.
- Santos-Santos, E., Yarto-Ramírez, M., Gavilán-García, I., Castro-Díaz, J., Gavilán-García, A., Rosiles, R. & López-Villegas, T. (2006). Analysis of arsenic, lead and mercury in farming areas with mining contaminated soils at Zacatecas, Mexico. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50(2), 57-63.
- Say, R., Denizli, A., & Arica, M. Y. (2001). Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 76(1), 67-70.
- Schelert, J., Drozda, M., Dixit, V., Dillman, A., & Blum, P. (2006). Regulation of mercury resistance in the crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7141-7150.
- Schippers, A., & Sand, W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulphur. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 319-321.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales) , Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2009.

- SEMIP. (1992). Participación de la minería mexicana en el volumen de la producción mundial durante 1991. SEMIP, Dirección general de minas, dirección de estadística y análisis minero. México. 481 pp
- Shakoori, A.R., K.S. Zaidi, and R. Haq (1998). Cadmium resistant *Enterobacter clacae* and *Klebsiella* sp isolated from industrial effluents and their possible role in cadmium detoxification. *World Journal of Microbiology and biotechnology* 15: 249-254.
- Solano, G., Rojas-Jiménez, K., Jaspars, M., & Tamayo-Castillo, G. (2009). Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(1), 71-78.
- Soria, I. M. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e investigación*, 7(2), 13-17.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L. and Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy*. 103(17): 6565–6570.
- Taddei, A., Rodríguez, M., Márquez, E. & Castelli, C. 2006. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. *Microbiological Research*. Venezuela. (161): 222 – 231.
- Tam, N. F. Y., & Yao, M. W. Y. (1998). Normalisation and heavy metal contamination in mangrove sediments. *Science of the Total Environment*, 216(1), 33-39.
- Tam, N. F., & Wong, Y. S. (1995). Mangrove soils as sinks for wastewater-borne pollutants. In *Asia-Pacific Symposium on Mangrove Ecosystems* (pp. 231-241). Springer Netherlands..
- Tchobanoglous, George. *Integrated solid waste management engineering principles and management issues*. No. 628 T3. 1993.
- Technelysium Pty Ltd., 2006. Chromas. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

- Téllez, J., Roxs, M. C., & Gaitán, A. M. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Revista de la Facultad de Medicina*, 52(1), 50.
- Terkina, I., Parfenova, V. & Ahn, T. 2006. Antagonistic Activity of Actinomycetes of Lake Baikal. *Applied Biochemistry and Microbiology*. Japón. (42): 195–199.
- Thompson, M. F., & Tirmizi, N. M. (1995). Mangrove soil: its mineralogy and texture. *Rotterdam: AA Balkema*, 431-439.
- Trejo, J. A. V. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología.
- Ullah, A., Mushtaq, H., Ali, H., Munis, M.F.H., Javed, M.T., Chaudhary, H.J., 2015. Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 2505e2514.
- Uslu, G., and Tanyol, M. (2006). Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: Effect of temperature. *J. Hazard. Mater.* 135, 87–93.
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R. J., Enríquez-Aragón, J. A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C. and Marsch, R. (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*. 12(2): 247-254.
- Valls, M., & De Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 327-338.
- Van Deuren, J., Lloyd, T., Chetry, S., Liou, R., & Peck, J. (2002). *Remediation technologies screening matrix and reference guide*. Report by Platinum International, Inc. for US Army Environmental Center. Report No. SFIM-AEC-ET-CR-97053, <http://www.frtr.gov/matrix2/section1/toc.html>...
- Van-Engelen, M. R., Peyton, B. M., Mormile, M. R., & Pinkart, H. C. (2008). Fe (III), Cr (VI), and Fe (III) mediated Cr (VI) reduction in alkaline media using a *Halomonas* isolate from Soap Lake, Washington. *Biodegradation*, 19(6), 841-850.

- Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1982). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *Microbiology*, 128(9), 1959-1968.
- Volke, S. T., Velasco, T. J. A., & de la Rosa, P. D. (2005). Suelos contaminados por metales pesados y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *la edición. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. México, DF.*
- Wang, G., Kennedy, S. P., Fasiludeen, S., Rensing, C., & DasSarma, S. (2004). Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. *Journal of bacteriology*, 186(10), 3187-3194.
- Wang, H., Li, H., Shao, Z., Liao, S., Johnstone, L., Rensing, C., & Wang, G. (2012). Genome sequence of deep-sea manganese-oxidizing bacterium *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9. *Journal of bacteriology*, 194(4), 899-900.
- White, C., Sharman, A. K., & Gadd, G. M. (1998). An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nature Biotechnology*, 16(6), 572-575.
- Xu, L., Xu, X. W., Meng, F. X., Huo, Y. Y., Oren, A., Yang, J. Y., & Wang, C. S. (2013). *Halomonas zincidurans* sp. nov., a heavy-metal-tolerant bacterium isolated from the deep-sea environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(11), 4230-4236.
- Yang, J. He, M. and Wanh, G. (2009). Removal of toxic chromate using free and immobilized Cr (VI)-reducing bacterial cells of *Intrasporangium* sp. Q5-1. *World Journal of Microbiol Biotechnology*, 25: 1579-1587.
- Yosida M., Matsubara K., Kudo T., Horikoshi K. 1991. *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 15-20.
- Young, S. D. (2012). Chemistry of heavy metals and metaloids in soils. En B. J. Alloway (Ed.), *Heavy metals in soils trace metals and metaloids in soils and their bioavailability*. Berlin: Springer.

- Zahoor, A. and Rehman, A. 2009. Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environ. Science* 21: 814–820.
- Zhou, P., Huo, Y. Y., Xu, L., Wu, Y. H., Meng, F. X., Wang, C. S., & Xu, X. W. (2015). Investigation of mercury tolerance in *Chromohalobacter israelensis* DSM 6768 T and *Halomonas zincidurans* B6 T by comparative genomics with *Halomonas xinjiangensis* TRM 0175 T. *Marine genomics*, 19, 15-16.
- Zúñiga, F. B. (1999). *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados* (Vol. 1). Uady.