



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

TITULO DEL TRABAJO:

**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ACUMULADORES DE METALES Y  
FORMACIÓN MICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.**

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO (A) BIOTECNOLOGO

PRESENTA:

**XOCHITL CORTÉS VÁZQUEZ**

ASESOR INTERNO: DR. LUIS CARLOS FERNÁNDEZ LINARES

EVALUADORES: DR. EDGAR SALGADO MANJARES

DR. LUIS GILBERTO TORRES BUSTILLOS

México, D.F. Mayo 2009

# CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>7</b>
2.1 MICROORGANISMOS .....	7
2.1.1 <i>Clasificación de los Microorganismos</i> .....	8
2.1.2 <i>Microorganismos Extremófilos</i> .....	12
2.2 METALES.....	13
2.2.1 <i>Arsénico</i> .....	14
2.2.2 <i>Cobalto</i> .....	14
2.2.3 <i>Cobre</i> .....	15
2.2.4 <i>Molibdeno</i> .....	15
2.2.5 <i>Selenio</i> .....	16
2.3 INTERACCIONES MICROORGANISMO METAL.....	17
2.3.1 <i>Mecanismos de Acumulación Microbiana de Metales</i> .....	17
2.3.2 <i>Interacciones Extracelulares</i> .....	18
2.3.2.1 <i>Movilización</i> .....	18
2.3.2.2 <i>Inmovilización</i> .....	18
2.3.2.3 <i>Sideróforos</i> .....	19
2.3.3 <i>Interacciones con la Superficie Celular</i> .....	19
2.3.4 <i>Interacciones Intracelulares</i> .....	20
2.3.4.1 <i>Bioacumulación</i> .....	20
2.4 NANOTECNOLOGÍA, NANOMATERIALES Y NANOPARTÍCULAS .....	21
2.4.1 <i>Bionanopartículas</i> .....	23
2.5 ABSORCIÓN ATÓMICA.....	24
2.5.1 <i>El Proceso de Absorción Atómica</i> .....	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
4.3 OBJETIVO GENERAL .....	27
4.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>29</b>
6.1 SELECCIÓN DE SITIOS Y MUESTREO .....	30
6.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS MUESTRAS .....	30
6.2.1 <i>pH (Potenciómetro)</i> .....	30
6.2.2 <i>Conductividad Eléctrica (Potenciómetro)</i> .....	30
6.3 ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	30
6.3.1 <i>Enriquecimiento</i> .....	30
6.3.2 <i>Aislamiento</i> .....	31
6.4 MANTENIMIENTO Y PRESERVACIÓN DE CULTIVOS PUROS .....	31
6.4.1 <i>Resiembra Periódica en Medios Frescos</i> .....	31
6.4.2 <i>Crioconservación</i> .....	31

6.5	RESISTENCIA A METALES Y ACUMULACIÓN DE METALES.....	32
6.5.1	<i>Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i> .....	32
6.5.2	<i>Acumulación Microbiana de Metales por el Método del H<sub>2</sub>S</i> .....	32
6.5.3	<i>Acumulación Microbiana de Metales por Espectroscopia de Absorción Atómica</i> .....	32
6.5.3.1	<i>Obtención de la Biomasa Bacteriana</i> .....	32
6.5.3.2	<i>Cinética de Adsorción (para determinar el equilibrio)</i> .....	33
6.5.3.3	<i>Determinación de la Capacidad de Biosorción (Para los metales de interés)</i> .....	33
6.5.3.4	<i>Elección de la Isotherma De Adsorción</i> .....	33
6.5.3.5	<i>Determinación de la disminución de Metales por Absorción Atomica</i> .....	33
6.6	ENSAYOS PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	34
6.6.1	<i>Determinación del Crecimiento Microbiano</i> .....	34
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
7.1	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS MUESTRAS .....	34
7.2	CEPAS AISLADAS RESISTENTES A METALES .....	35
7.2.1	<i>Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i> .....	39
7.3	SELECCIÓN DE LAS CEPAS PARA LOS ENSAYOS DE ACUMULACIÓN DE METALES Y FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	42
7.4	EFFECTO DE ALGUNOS METALES EN EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS “NEG” Y “ZN <sub>2</sub> ”.....	42
7.5	ACUMULACIÓN MICROBIANA DE METALES .....	42
7.5.1	<i>Revelado con H<sub>2</sub>S Gaseoso</i> .....	42
7.5.2	<i>Acumulación Microbiana de Metales por Espectrofotometría de Absorción Atómica</i> .....	43
7.5.2.1	<i>Cinética de Adsorción</i> .....	43
7.5.2.2	<i>Capacidad de Biosorción</i> .....	43
7.5.2.3	<i>Isotherma De Adsorción</i> .....	43
7.5.2.4	<i>Disminución de Metales por Absorción Atomica</i> .....	43
7.6	FORMACIÓN MICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	43
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO .....</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS.....	13
TABLA 2. PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LAS MUESTRAS .....	35
TABLA 3. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS .....	36
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS HONGOS AISLADOS .....	37
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LAS CEPAS AISLADAS .....	38
TABLA 6. CMI DE LAS CEPAS AISLADAS DE “SUELO CU” Y JAL MINERO “LA NEGRA” .....	39
TABLA 7. CMI DE LAS CEPAS DE “SUELO AZCAPOTZALCO” .....	40
TABLA 8. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN DE LA CEPA “NEG” ..	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. EJEMPLOS DE COMUNIDADES MICROBIANAS.....	7
FIGURA 2. POSICIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LA NATURALEZA .....	8
FIGURA 3. DIFERENTES CONDICIONES EXTREMAS Y GRUPOS DE MICROORGANISMOS ADAPTADOS .....	12
FIGURA 4. MECANISMOS DE INTERACCIÓN ENTRE MICROORGANISMOS Y METALES PESADOS.....	18
FIGURA 5. DIFERENCIAS DE COMPOSICIÓN ESTRUCTURAL DE LA SUPERFICIE CELULAR	18
FIGURA 6. CLASIFICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES .....	22
FIGURA 7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA GENERAL .....	29
FIGURA 8. CEPAS QUE INTERACTÚAN CON SELENIO Y CROMO .....	36
FIGURA 9. MORFOLOGÍA COLONIAL Y MICROSCÓPICA DE LA CEPA “NEG” .....	38
FIGURA 10. CEPA FÚNGICA “HCU” .....	38
FIGURA 11. ACUMULACIÓN DE PLATA EN LA CEPA “NEG” .....	43

## RESUMEN

Los organismos vivos se encuentran comúnmente expuestos en la naturaleza a los metales, presentes en la mayoría de los casos en sus formas ionizadas. Estos iones ejercen diversos efectos tóxicos sobre los microorganismos. Al mismo tiempo, la exposición de microorganismos ante los metales origina una selección natural de variedades microbianas capaces de tolerar la presencia de los metales.

Se conoce que existen diversas formas en las que los microorganismos pueden interactuar con los metales, estas interacciones ocurren a nivel extracelular, en la superficie bacteriana y a nivel intracelular. El estudio de los sistemas microbianos de tolerancia e interacción a metales representa un potencial de uso en procesos biotecnológicos; como la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales tóxicos (biominería), la valorización de residuos metálicos y la formación de nanopartículas.

Los microorganismos involucrados en estas interacciones se podrían clasificar como extremófilos, debido a las altas concentraciones de metales que algunos de ellos son capaces de tolerar.

El presente proyecto plantea el estudio de microorganismos con capacidad de acumular metales y formar nanopartículas metálicas valiosas. Los principales metales involucrados en este proyecto son: arsénico (As), cobalto (Co), y cobre (Cu), molibdeno (Mo) y selenio (Se), aunque también se involucraron metales como cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg), plata (Ag), plomo (Pb) y zinc (Zn). Estos metales son aquellos que se encuentran comúnmente en espacios contaminados tales como aguas residuales. Además son de interés para diferentes procesos.

A partir de sitios contaminados con metales, se aislaron microorganismos en Agar Nutritivo (AN) enriquecido con los metales en diferentes concentraciones que fueron de 0 a 50 mM, para observar la resistencia del microorganismo al metal. Posteriormente se determinó la formación y acumulación de las bionanopartículas metálicas por Microscopia Electrónica y Espectrofotometría de Absorción Atómica respectivamente.

Se aislaron 28 cepas resistentes a los metales estudiados, de las cuales 4 son hongos y 24 cepas bacterianas. De estas cepas se eligió a "Neg" y "Zn2" para los ensayos de acumulación de metales y formación de bionanopartículas metálicas.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los avances desarrollados de la ciencia y la tecnología han ocasionado un uso y explotación cada vez mayor de los recursos naturales; así mismo, ha traído como consecuencia perturbaciones en los diferentes entornos ambientales. El aumento excesivo de los contaminantes (relaves, emanaciones a la atmósfera de dióxido de azufre, monóxido de carbono, etc.), ocasiona que los procesos naturales de autodepuración ya no sean efectivos y por lo tanto de como resultado la acumulación de estos a niveles perjudiciales para el ambiente y la salud humana. Los metales debido a sus propiedades, como buenos conductores del calor y de electricidad, alta densidad, y sólidos a condiciones estándares de presión y temperatura (excepto el mercurio y el galio), son de los materiales más utilizados en todos los sectores, haciéndolos unos de los contaminantes más importantes. La obtención y procesamiento de los metales ha ocasionado su liberación al ambiente; la forma en la que pueden ser liberados es por desgaste, corrosión y como un producto secundario del refinado y fundición.

Las interacciones entre microorganismo y metal son conocidas y pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie bacteriana, o bien a nivel intracelular. a) A nivel extracelular se ha determinado la secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con alta afinidad por los elementos metálicos (sideróforos) (Schwyn y Neilands, 1987; Lindsay y Riley, 1994); las principales interacciones entre metales y bacterias a este nivel son la movilización e inmovilización de metales, que si bien no son interacciones, sino efectos, ofrecen una alternativa en la recuperación de metales de efluentes industriales (Chen *et. al.*, 1995; Ford y Ryan, 1995); b). Las interacciones con la superficie celular dependen del tipo de bacteria, ya que el metal interactúa con los grupos específicos cargados negativamente de cada una de ellas (bacterias). (Brierley y Brierley, 1997). c) A nivel intracelular, ocurre la bioacumulación del metal, seguido de transformaciones enzimáticas, cuyo objetivo es reducir el nivel de toxicidad del metal acumulado (Silver y Misra, 1988), o la síntesis de proteínas específicas conocidas como metalotioninas, cuya función es mantener la viabilidad del microorganismo en presencia del metal (Kasan, 1993), .

Las interacciones microorganismos metales han permitido el desarrollo y propuestas de aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación de suelos, la biominería, la valorización de los metales y recientemente ha surgido el desarrollo de nanopartículas de metales y carbono, de aplicación en diferentes áreas tecnológicas.

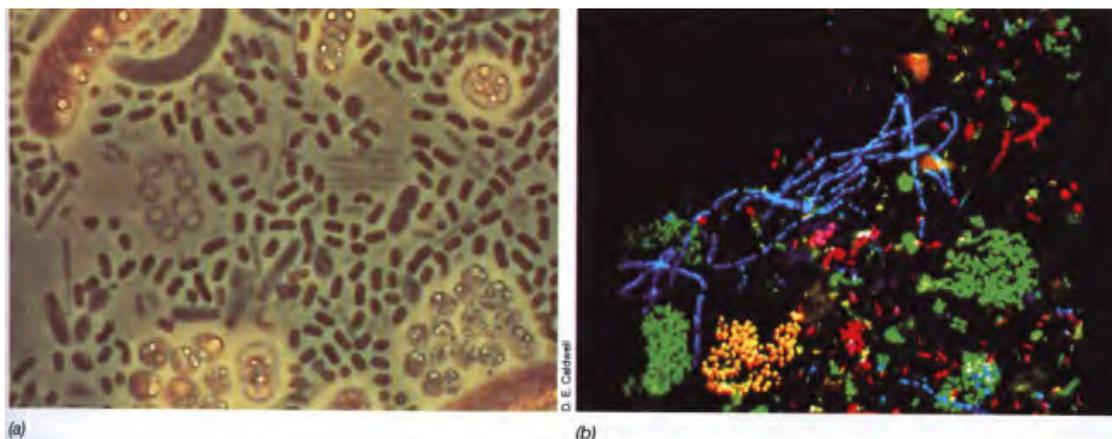
Asentándose en lo ya antes establecido, el presente proyecto planteó el aislamiento de microorganismos con la capacidad de acumular metales y formar nanopartículas metálicas de interés.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Microorganismos

Los microorganismos son organismos microscópicos constituidos por una sola célula o varias, incluyendo los virus. Los microorganismos son células que viven de manera independiente.

Los microorganismos pueden encontrarse tanto en ambientes familiares, como en sitios poco comunes, como aquellos tan extremos que se consideran inadecuados para formas de vida superiores. Las poblaciones celulares rara vez se encuentran solas en la naturaleza, antes bien se relacionan con otras formando comunidades microbianas (Figura 1). Estas comunidades pueden ser formadas por células libres en medios acuáticos o terrestres.



Fuente: Brock, "Biología de los Microorganismos, 10 edición.

Figura 1. Ejemplos de comunidades microbianas. (a) Micrografía de una comunidad bacteriana que se desarrolla en las profundidades de un pequeño lago (Lago Wintergreen, Michigan): Se muestran células de diversos tamaños. (b) Comunidad microbiana en una muestra de sedimento de agua residual. La muestra se tiñó con una serie de colorantes, cada uno de los cuales tiñe un grupo bacteriano diferente.

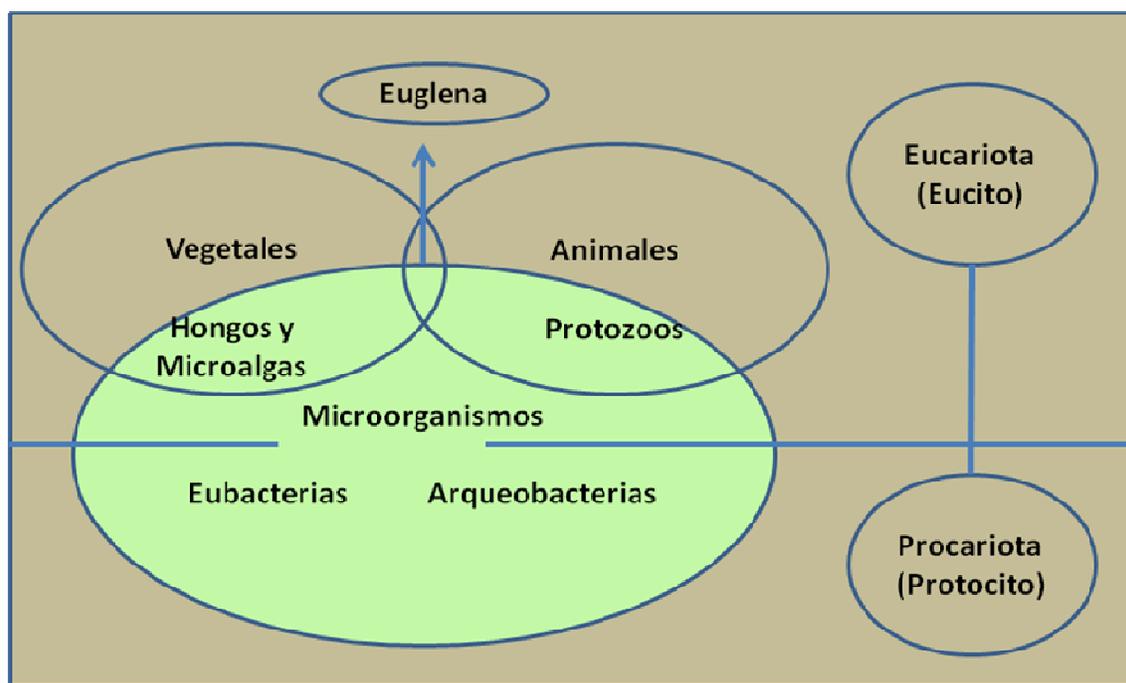
Las poblaciones de comunidades microbianas se relacionan de maneras diferentes y tales interacciones pueden ser perjudiciales o beneficiosas. En muchos casos las poblaciones interactúan y cooperan en sus funciones nutricionales con los productos de

desecho derivados del metabolismo de algunas células, sirviendo como nutrientes para otras. Los organismos de un hábitat también se relacionan con su ambiente físico y químico. Los hábitat tienen características diferentes, y un hábitat que favorece el crecimiento de un microorganismo puede ser dañino para otro. Por tanto, la composición de una comunidad microbiana en un hábitat concreto está determinada en gran parte por las características físicas y químicas de ese medio.

### 2.1.1 Clasificación de los Microorganismos

Los microorganismos se clasifican en grupos o taxones en función de semejanzas mutuas o del parentesco evolutivo.

Dentro de los microorganismos se encuentran organismos unicelulares procariotas, como las bacterias, y eucariotas, como los protozoos, una parte de las algas, hongos e incluso organismos ultramicroscópicos como los virus.



Fuente: Hans G. Schelegel, "Microbiología General, Última Edición, 1997.

Figura 2. La posición de los microorganismos en la naturaleza.

**Bacterias:** Las bacterias son organismos de una sola célula. Su forma puede ser esférica, espiral, de bastón, filamentosas, etc. Pueden existir como organismos individuales, formando cadenas, grupos o pares. Las bacterias son las formas de vida más abundantes en la tierra. Tienen una longitud entre 0.4 y 14  $\mu\text{m}$  y un ancho entre 0.2 a 12  $\mu\text{m}$

(Fredrickson J, Zachara J, Balkwill D, *et al*, 2004). Las bacterias se reproducen mediante la replicación del ADN, y división en dos células independientes. En circunstancias normales este proceso dura entre 15, 30 y 60 minutos. Algunas bacterias pueden formar esporas. Estas esporas se caracterizan por presentar una capa protectora resistente al calor y que protege a la bacteria de la falta de humedad y nutrientes. Las bacterias tienen un papel funcional ecológico específico, por ejemplo, algunas realizan la degradación de la materia orgánica, otras integran su metabolismo con otros organismos o el del ser humano (Sears C, 2005).

La clasificación taxonómica más utilizada divide a las bacterias en cuatro grandes grupos según las características de la pared celular. La división *Gracilicutes* incluye a las bacterias con pared celular delgada del tipo Gram negativas; las bacterias de la división *Firmicutes* tienen paredes celulares gruesas del tipo Gram positivas; las de la *Tenericutes* carecen de pared celular y las de la cuarta división *Mendosicutes* tienen paredes celulares poco comunes, formadas por materiales distintos a los típicos peptidoglucanos bacterianos

La filogenia molecular ha podido demostrar también que los microorganismos procariotas se dividen en dos dominios, originalmente denominados *Eubacteria* y *Archaeobacteria* (Woese C, Kandler O, Wheelis M, 1990), y ahora renombrados como *Bacteria* y *Archaea*, que evolucionaron independientemente desde un ancestro común (Gupta R, 2000).

**Protozoos:** Los protozoos se incluyen en el reino Protistas, junto con otros organismos unicelulares cuyo núcleo celular está rodeado de una membrana. Los protozoos no tienen estructuras internas especializadas a modo de órganos o, si las tienen, están muy poco diferenciadas. Entre los protozoos se suelen admitir varios grupos: los flagelados del grupo de los Zoomastiginos, con muchas especies que viven como parásitos de plantas y de animales; los ameboides del grupo *Sarcodinos*, que incluyen a los Foraminíferos y Radiolarios, y que son componentes importantes del plancton; los *Cilióforos*, que son ciliados, con diversos representantes que poseen estructuras especializadas que recuerdan a la boca y al ano de los organismos superiores; los *Cnidosporidios*, parásitos de invertebrados, de peces y de algunos reptiles y anfibios, y los *Esporozoos*, con diversas especies parásitas de animales y también de seres humanos. Se conocen más de veinte mil especies de protozoos, que incluyen organismos tan conocidos como los paramecios y las amebas.

Muchas especies viven en hábitats acuáticos como océanos, lagos, ríos y charcas. Su tamaño varía desde 2 hasta 70 micrómetros. Los protozoos se alimentan de bacterias, productos de desecho de otros organismos, algas y otros protozoos. Muchas especies son capaces de moverse utilizando diversos mecanismos: flagelos, estructuras propulsoras con forma de látigo; cilios de aspecto piloso, o por medio de un movimiento ameboide, un tipo de locomoción que implica la formación de pseudópodos (extensiones a modo de pie).

**Algas:** Se llaman algas a diversos organismos fotosintetizadores de organización sencilla que viven en el agua o en ambientes muy húmedos. Las algas son los organismos autótrofos que realizan la fotosíntesis oxigénica (fotosíntesis que produce oxígeno). Se trata de un grupo polifilético o artificial (no es un grupo de parentesco), y no tiene por lo tanto ya uso en la clasificación científica moderna, aunque sigue teniendo utilidad en la descripción de los ecosistemas acuáticos (Baldauf, 2003).

**Hongos:** La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que ostenta el centro de cada septo. No obstante, hay un filo de hongos, que se asemejan a algas, cuyas hifas generalmente no tienen septos y los numerosos núcleos están esparcidos por todo el protoplasma. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio. Cuando el micelio se desarrolla puede llegar a formar grandes cuerpos fructíferos, tales como las setas y los pedos o cuescos de lobo. Otros tipos de enormes estructuras de hifas permiten a algunos hongos sobrevivir en condiciones difíciles o ampliar sus fuentes nutricionales. Las fibras, a modo de cuerdas, del micelio de la armilaria color de miel (*Armillaria mellea*), facilitan la propagación de esta especie de un árbol a otro. Ciertos hongos forman masas de micelio resistentes, con forma más o menos esférica, llamadas esclerocios. Éstos pueden ser pequeños como granos de arena, o grandes como melones (Alexopoulos *et al*, 1996).

La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular. El champiñón silvestre puede formar doce mil millones de esporas en su cuerpo fructífero; así mismo, el pedo o cuesco de lobo gigante puede producir varios billones.

Las esporas se forman de dos maneras. En el primer proceso, las esporas se originan después de la unión de dos o más núcleos, lo que ocurre dentro de una o de varias células especializadas. Estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas. Los cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera (oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas) definen los cuatro grupos principales de hongos. Las oosporas se forman por la unión de una célula macho y otra hembra; las zigosporas se forman al combinarse dos células sexuales similares entre sí. Las ascosporas, que suelen disponerse en grupos de ocho unidades, están contenidas en unas bolsas llamadas ascas. Las basidiosporas, por su parte, se reúnen en conjuntos de cuatro unidades, dentro de unas estructuras con forma de maza llamadas basidios.

A pesar de que en muchos textos se emplean sistemas de clasificación relativamente complicados, los micólogos utilizan por lo común un sistema sencillo, que tiene la ventaja de ser cómodo de usar. Según este sistema, los cuatro filos principales son: Oomicetes (Oomycota), Zigomicetes (Zygomycota), Ascomicetes (Ascomycota) y Basidiomicetes (Basidiomycota) y sus respectivos individuos forman oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas (Fuller, 1978; Berry, 1982; Barnett y Hunter, 1987). Una gran variedad de especies se colocan, de forma arbitraria, en un quinto filo: Deuteromicetes (Deuteromycota), también llamados hongos imperfectos. Se incluyen en este grupo aquellos hongos en los que sólo se conocen procesos de multiplicación vegetativa. Sin embargo, la mayoría de esas especies están emparentadas con los ascomicetes.

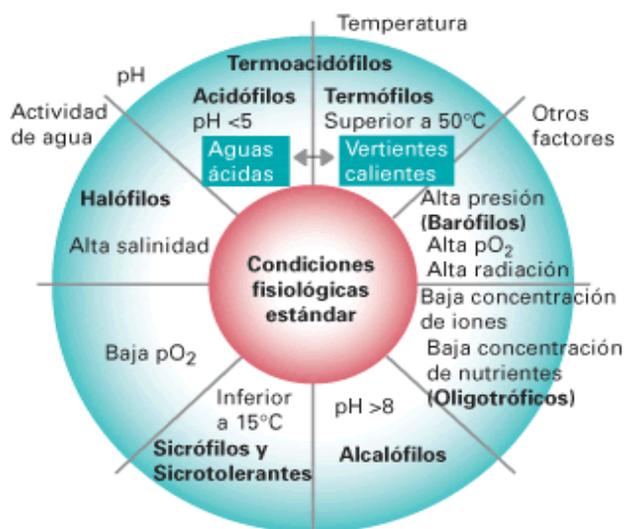
**Virus:** Los virus son entidades no celulares de muy pequeño tamaño (normalmente inferior al del más pequeño procarionta), por lo que debe recurrirse al microscopio electrónico para su visualización. Son agentes infectivos de naturaleza obligadamente parasitaria intracelular, que necesitan su incorporación al protoplasma vivo para que su material genético sea replicado por medio de su asociación más o menos completa con las actividades celulares normales, y que pueden transmitirse de una célula a otra. Cada tipo de virus consta de una sola clase de ácido nucleico (ADN o ARN, nunca ambos), con capacidad para codificar varias proteínas, algunas de las cuales pueden tener funciones enzimáticas, mientras que otras son estructurales, disponiéndose éstas en cada partícula virásica (virión) alrededor del material genético formando una estructura regular (cápsida); en algunos virus existe, además, una envuelta externa de tipo membranoso, derivada en parte de la célula en la que se desarrolló el virión (bicapa lipídica procedente de membranas celulares) y en parte de origen virásico (proteínas) (Prescott, 1993).

Pueden clasificarse en tres grandes grupos, atendiendo al tipo de organismos que afectan: fitófagos, cuando atacan a las plantas, las que determinan multitud de enfermedades: zoófagos, cuando atacan a los animales, distinguiéndose entre estos los dermatropos, que afectan a la piel (viruela, herpes, sarampión), neurotropos, que afectan a las vías respiratorias (gripe, neumonitis), viscerotropos, que atacan a diversas vísceras (hepatitis víricas, etc.), etc. y los bacteriófagos, cuando atacan a los cultivos bacterianos .

### 2.1.2 Microorganismos Extremófilos

Generalmente la mayor parte de los organismos se encuentran en ambientes moderados; término relativo, que incluye usualmente pH neutro (7), temperatura de 25°C (o un rango que va de 25-35 °C), presión de 1 atm, concentración de nutrientes y salinidad adecuada, niveles normales de radiación, etc. Si las condiciones mencionadas varían, ya sea solo una de estas o más; los organismos habitantes de estos sitios son clasificados como extremófilos (Figura 3). Los microorganismos extremófilos son aquellos que viven en ambientes que combinan uno o varios factores de estrés, como pueden ser alta o muy baja temperatura, condiciones ácidas o alcalinas o alta salinidad. Algunos microorganismos extremófilos son eubacterias, sin embargo, la gran mayoría y los más extremos pertenecen al dominio taxonómico de las Archaeas.

Los microorganismos extremófilos se clasifican de acuerdo a las condiciones óptimas de crecimiento (Tabla 1):



Fuente: [www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy99/bacterias.htm](http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy99/bacterias.htm)

Figura 3. Diferentes condiciones ambientales “extremas” y grupos de microorganismos adaptados a ellas.

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos extremófilos.

CLASIFICACIÓN	CRITERIO
Termófilos	Soportan temperaturas de crecimiento mayores a 50 °C.
Psicrófilos	Crecen a temperaturas menores de 15 °C, incluso pueden crecer a -10 °C.
Halófilos	Requieren del 3-30 % de concentración de sal para poder llevar a cabo su crecimiento.
Alcalófilos	Requieren de un pH mayor a 10.
Acidófilos	Requieren de un pH por debajo de 2.5.
Barófilos	Se desarrollan en ambientes con presión muy alta.

Además de los criterios mencionados en la tabla anterior, por los cuales se clasifica a los microorganismos como extremófilos, cabe mencionar que las resistencias a altas concentraciones de metales pesados, puede ser considerada como una condición extrema por la cual el microorganismo esta creciendo. Los jales que aun no han sido estudiados como nichos de esta clase de microorganismos, representan una fuente potencial para obtener nuevas especies de interés para ser utilizadas en la biorremediación.

## 2.2 Metales

Los metales son materiales ampliamente utilizados en diversos ámbitos, debido a sus características como buenos conductores de calor y electricidad, poseen un brillo característico, dúctiles, puntos de fusión altos y se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente, a excepción de los alcalinos, que son suaves, y el mercurio y el galio que se encuentran en estado líquido.

El comportamiento de los metales se explica debido a su estructura electrónica, es decir la especiación y su destino en el ambiente, e incluso si participan como nutrientes o al contrario tienes un efecto toxico ante los elementos de un ecosistema.

Las propiedades químicas que poseen los metales son: reaccionan con ácidos, forman óxidos básicos, cationes y haluros iónicos (Sengupta, 2002).

### **2.2.1 Arsénico**

Existen tres grandes grupos de compuestos de arsénico (As):

1. compuestos de arsénico inorgánico
2. compuestos de arsénico orgánico
3. gas arsina y arsinas sustituidas.

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y principalmente en los minerales sulfurosos. La arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) es la forma más abundante.

#### ***Arsénico Elemental***

El arsénico elemental se utiliza en aleaciones con el fin de aumentar su dureza y resistencia al calor, como en las aleaciones con plomo para la fabricación de municiones y de baterías de polarización. También se utiliza para la fabricación de ciertos tipos de vidrio, como componente de dispositivos eléctricos y como agente de adulteración en los productos de germanio y silicio en estado sólido.

#### ***Distribución y Usos***

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y principalmente en los minerales sulfurosos. La arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) es la forma más abundante.

### **2.2.2 Cobalto**

#### ***Distribución y Usos***

El cobalto es un elemento químico de número atómico 27 y símbolo **Co** situado en el grupo 9 de la tabla periódica de los elementos.

El cobalto es un metal duro, ferromagnético, de color blanco azulado. Su temperatura de Curie es de 1388 K. Normalmente se encuentra junto con níquel, y ambos suelen formar parte de los meteoritos de hierro. Es un elemento químico esencial para los mamíferos en pequeñas cantidades. El Co-60, un radioisótopo de cobalto, es un importante trazador y agente en el tratamiento del cáncer.

El cobalto metálico está comúnmente constituido de una mezcla de dos formas alotrópicas con estructuras cristalinas hexagonales y cúbica centrada en las caras siendo la temperatura de transición entre ambas de 722 K.

Presenta estados de oxidación bajos. Los compuestos en los que el cobalto tiene un estado de oxidación de +4 son poco comunes. El estado de oxidación +2 es muy frecuente, así como el +3. También existen complejos importantes con el estado de oxidación +1.

El cobalto es empleado en aleaciones, imanes, catálisis de petróleo, como pigmento, entre otros usos.

### **2.2.3 Cobre**

El cobre (Cu) es maleable y dúctil, un excelente conductor del calor y la electricidad, y su capacidad funcional se altera muy poco con la exposición al aire seco. Si se encuentra en una atmósfera húmeda con anhídrido carbónico, se cubre con una capa verde de carbonato. El cobre es un elemento esencial del metabolismo humano.

#### ***Distribución y Usos***

El cobre se encuentra principalmente en forma de compuestos minerales en los que el  $^{63}\text{Cu}$  constituye el 69,1 % y el  $^{65}\text{Cu}$  el 30,9 % del elemento. El cobre está ampliamente distribuido en todos los continentes y forma parte de la mayoría de los organismos vivos. Aunque se han descubierto algunos depósitos naturales de cobre metálico, generalmente se extrae en forma de sulfuros, como es el caso de la covelita ( $\text{CuS}$ ), la calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y la bornita ( $\text{Cu}_3\text{FeS}_3$ ); o de óxidos, como la malaquita  $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ; la crisocola ( $\text{CuSiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y la calcantita ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Debido a sus propiedades eléctricas, más del 75 % del cobre que se produce se utiliza en la industria eléctrica. Entre otros usos de este metal se encuentra la fabricación de cañerías para el agua, material para techumbres, baterías de cocina, equipos químicos y farmacéuticos y producción de aleaciones de cobre. El cobre metálico también se utiliza como pigmento y como precipitante del selenio.

### **2.2.4 Molibdeno**

#### ***Distribución y usos***

El molibdeno (Mo) está ampliamente distribuido por la corteza terrestre, pero sólo existen minas de este elemento en algunos países; hay muy pocos depósitos de mineral molibdenita ( $\text{MoSO}_2$ ) que tengan una calidad suficientemente alta. Cierta cantidad de molibdeno se obtiene como subproducto durante el proceso de los minerales de cobre. Las centrales eléctricas que utilizan carbón pueden ser fuentes importantes de molibdeno. El molibdeno es un oligoelemento esencial. Forma una gran variedad de compuestos

comercialmente útiles con las valencias 0, +2, +3, +4, +5 y +6. Modifica rápidamente su estado de valencia (se desproporciona) con cambios mínimos en las condiciones externas. Muestra una fuerte tendencia a formar complejos; con excepción de los sulfuros y los haluros, existen muy pocos compuestos simples más. El molibdeno +6 forma ácidos isopólicos y heteropólicos. Más del 90 % del molibdeno que se produce se utiliza como elemento de aleación para el hierro, el acero y metales no ferrosos, especialmente por sus propiedades de resistencia al calor; el resto se utiliza en la fabricación de productos químicos y lubricantes. Como aleación del acero, el molibdeno se utiliza en la industria eléctrica, electrónica, militar y automovilística, así como en ingeniería aeronáutica. Otro uso importante del molibdeno es la producción de pigmentos, tintes y lacas de molibdeno inorgánico. Una cantidad pequeña, aunque cada vez más importante, de molibdeno se utiliza como elemento traza en los fertilizantes. El compuesto de molibdeno más importante es el *trióxido de molibdeno* ( $\text{MoO}_3$ ), que se obtiene por calcinación del mineral de sulfuro. El trióxido de molibdeno puro se utiliza para la fabricación de productos químicos y catalizadores, y también se añade al acero como agente de aleación. Se emplea asimismo como catalizador en la industria del petróleo y como componente de cerámicas, barnices y pigmentos. El *disulfuro de molibdeno* ( $\text{MoS}_2$ ) se usa como lubricante resistente a altas temperaturas o como aditivo para lubricantes. El *hexacarbonilo de molibdeno* ( $\text{Mo}(\text{CO})_6$ ) es la materia prima utilizada para la fabricación de colorantes orgánicos de molibdeno y cada vez se emplea más para el recubrimiento con molibdeno mediante descomposición térmica. Los compuestos de molibdeno se utilizan mucho como catalizadores y activadores o promotores de catalizadores, especialmente en las operaciones de hidrogenación-cracking, alquilación y reformado en la industria petrolífera. También se utilizan como reactivos de laboratorio (fosfomolibdatos), en galvanoplastia y en los procesos de curtido.

### **2.2.5 Selenio**

#### ***Distribución y usos***

El selenio (Se) se encuentra en las rocas y suelos de todo el mundo. No existen verdaderos depósitos de selenio y no puede recuperarse directamente de forma rentable. Los cálculos sobre la cantidad de selenio existente en la corteza terrestre varían entre 0,03 y 0,8 ppm, y las mayores concentraciones conocidas se encuentran en el azufre nativo de los volcanes, que contiene hasta 8.350 ppm. El selenio se encuentra junto con el telurio en los sedimentos y barros resultantes del refinado electrolítico del cobre. Las principales fuentes mundiales son las industrias refinadoras de cobre en Canadá, Estados

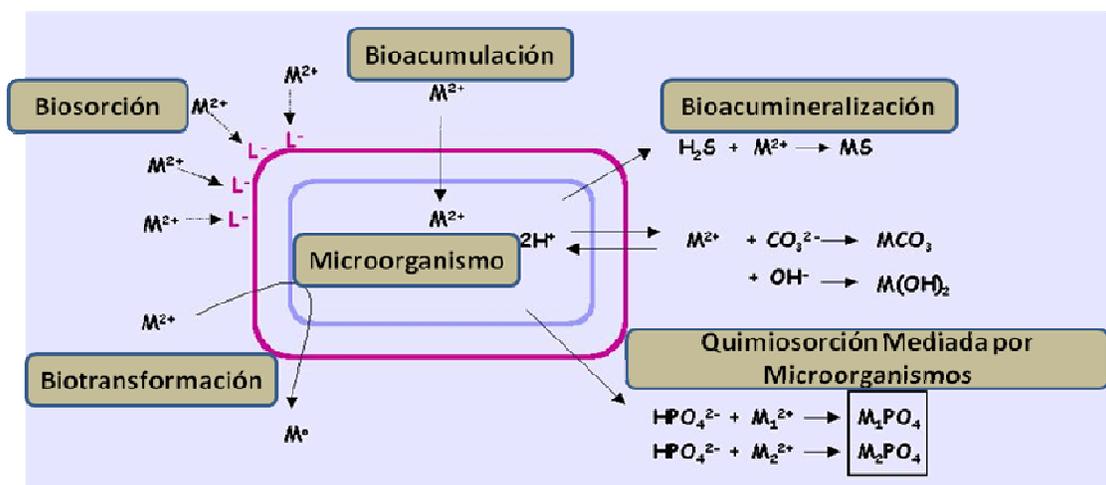
Unidos y Zimbabwe, donde los barros contienen hasta un 15 % de selenio. La fabricación de rectificadores de selenio, que convierten la corriente alterna en continua, absorbe más de la mitad de la producción mundial de selenio. El selenio se utiliza también para decolorar el cristal verde y para la fabricación del cristal rojo, como aditivo en las industrias de goma sintética y natural, como insecticida y en aleaciones con acero inoxidable y cobre. El  $^{75}\text{Se}$  se emplea para la exploración con marcadores radiactivos del páncreas, para la xerografía de rayos X y para la xerografía fotoestática. El *óxido de selenio* o *dióxido de selenio* ( $\text{SeO}_2$ ) se produce quemando selenio en oxígeno y es el compuesto de selenio más utilizado en la industria. Se emplea en la fabricación de otros compuestos de selenio y como reactivo para alcaloides. El *cloruro de selenio* ( $\text{Se}_2\text{Cl}_2$ ) es un líquido estable de color rojo o marrón oscuro que se hidroliza en el aire húmedo produciendo selenio, ácido selenioso y ácido clorhídrico. El *hexafluoruro de selenio* ( $\text{SeF}_6$ ) se emplea como aislante eléctrico gaseoso (Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo).

### **2.3 Interacciones Microorganismo Metal**

La acumulación microbiana de metales se lleva a cabo por interacciones microorganismo metal. Este acto se debe a la existencia de una amplia diversidad microbiana que involucra microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes; los primeros se clasifican así por realizar mecanismos de detoxificación inducidos por la presencia del metal; mientras que los tolerantes son capaces de adaptarse y crecer en presencia de uno o varios metales, sin desarrollar un mecanismo para ello (Vullo, 2003).

#### **2.3.1 Mecanismos de Acumulación Microbiana de Metales**

La resistencia de estos microorganismos puede ser descrita por variadas interacciones que se llevan a cabo en diferentes zonas de la célula (Figura 4), como se indicara a continuación:



Fuente: [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.jpg](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.jpg)

Figura 4. Mecanismos de interacción entre microorganismos y metales pesados.

Las interacciones entre los microorganismos y los iones metálicos han sido divididas en tres procesos distintos: Interacciones extracelulares, Interacciones con la pared celular e interacciones que se describen por separado (Interacciones intracelulares) (Suarez y Reyes 2002).

### 2.3.2 Interacciones Extracelulares

#### 2.3.2.1 Movilización

Capacidad que presentan ciertas bacterias para liberar los metales constitutivos de algunos compuestos químicos. Existe poca información relacionada con la movilización de metales en el ambiente, El ejemplo más conocido es el de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*, bacteria responsable de la lixiviación de Fe, Cu y Mo, razón por la que se utiliza en la extracción industrial de estos metales (Unz y Shutt-leworth, 1996; Novo *et al.*, 2000).

#### 2.3.2.2 Inmovilización

Capacidad que presenta la biomasa microbiana para atrapar metales, uniéndoseles a sus componentes estructurales. Se utiliza para recuperar metales de efluentes industriales, depende de las propiedades químicas, físicas y biológicas de la biomasa bacteriana. A continuación se describen los procesos de inmovilización conocidos:

## **1. Bioabsorción**

Propiedad de la biomasa, de inmovilizar y concentrar los metales que se encuentran en soluciones acuosas (López *et al.*, 2000). En esta interacción los componentes de la superficie celular actúan como bioabsorbentes, estos son polímeros estructurales y extracelulares con un alto contenido de grupos funcionales. Los grupos funcionales (polianiones) atrapan a los metales dentro de su estructura (Churchill *et al.*, 1995). Este método tiene las ventajas de que es empleado para recuperar metales valiosos, además de ser una tecnología económica, es decir requiere de bajo capital y tiene bajos costos de operación, ya que se emplea biomasa que puede ser producida a gran escala, además el desecho de esta técnica es mínimo.

## **2. Polímeros Extracelulares**

Son componentes primordiales de la cápsula celular, cuyas funciones se piensa son la adhesión de las bacterias a cualquier superficie tales como partículas u otros organismos y el atrapamiento de iones metálicos (Chen *et al.*, 1995). La composición de estos polímeros extracelulares son polisacáridos y algunas proteínas. Las interacciones con los metales son debidas a la disposición de grupos funcionales que se encuentran cargados negativamente como son el piruvato, fosfato, hidroxilo, succinilo y ácido urónico (Ford y Michael, 1992).

### **2.3.2.3 Sideróforos**

A pesar de ser uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, el Fe es limitante para el crecimiento bacteriano, porque forma complejos insolubles (hidróxidos férricos) bajo condiciones aeróbicas y pH neutro, que restringen su disponibilidad (Schwyn y Neilands, 1987; Ventury *et al.*, 1995). A consecuencia de esta pequeña disponibilidad de Fe, las bacterias desarrollaron un sistema activo de alta afinidad para adquirir el metal. Este sistema de transporte involucra la excreción de ligandos de bajo peso molecular llamados sideróforos, con alta afinidad por el ión férrico.

### **2.3.3 Interacciones con la Superficie Celular**

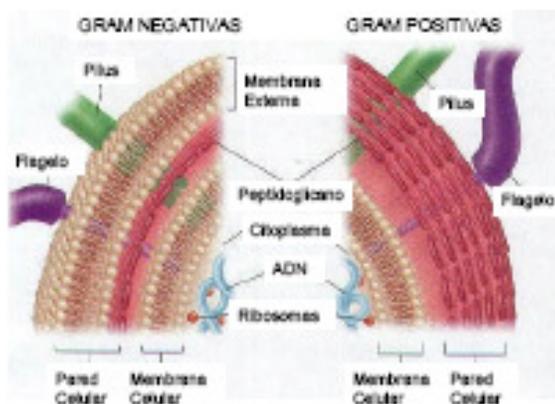
Ocurren por atracción electrostática entre los iones cargados en solución y los grupos funcionales de la superficie celular microbiana.

En las bacterias Gram positivas el carboxilato del peptoglicano y el ácido teicoico corresponden a los sitios aniónicos. Por otra parte los sitios catiónicos se encuentran en

la D-alanina presente en el ácido teicoico, los grupos amino de los azúcares (glicanos) y el ácido diaminopimérico que es una porción peptídica del peptoglicano. Los grupos mencionados tienen una función mediadora entre la pared celular y los iones metálicos.

En las bacterias Gram negativas al igual que en las Gram positivas son los grupos hidroxilo del peptoglicano quienes tienen una fuerte unión con los iones metálicos (Doyle *et al.*, 1980).

Las bacterias Gram positivas tienen mayor capacidad de unir o atraer especies metálicas que las Gram negativas, esto como consecuencia de la diferencia entre la composición estructural de la superficie celular.



Fuente: [www.biologycorner.com/resources/gram\\_bacteria.jpg](http://www.biologycorner.com/resources/gram_bacteria.jpg)

Figura 5. Diferencias de composición estructural de la superficie celular. Interacciones Intracelulares

Se inician con un proceso activo conocido como bioacumulación, seguida de transformaciones enzimáticas y/o inducción de la síntesis de proteínas enlazadoras.

### **2.3.4 Interacciones Intracelulares**

#### **2.3.4.1 Bioacumulación**

La absorción de iones metálicos es un proceso que involucra la interacción con la superficie celular y es el primer paso para la acumulación. El siguiente paso de la acumulación es dependiente del metabolismo celular, es decir ocurre la acumulación de especies metálicas dentro de las células bacterianas.

A nivel de microorganismo, hay un límite para la cantidad de metal que se puede acumular sin perder la viabilidad y por lo general antes de llegar concentraciones letales

del metal, se activan mecanismos de resistencia; estos mecanismos son las transformaciones mediadas por compuestos enzimáticos a especies de menor toxicidad y la síntesis de proteínas llamadas metalotioninas que hacen que las bacterias sean resistentes a altas concentraciones de metales (Silver, 1994).

### ***Transformaciones Medidas por Enzimas***

Estas transformaciones disminuyen la toxicidad de la especie metálica, es decir la especie metálica es metabolizada por el microorganismo.

### ***Síntesis de Metalotioninas***

La metalotioninas son proteínas que están dirigidas a incrementar la resistencia a metales pesados de distintas especies. La síntesis de metalotioninas en bacterias constituye un mecanismo posible para explicar los procesos de bioacumulación de metales pesados, además representan una herramienta potencial para el tratamiento de ambientes contaminados por metales.

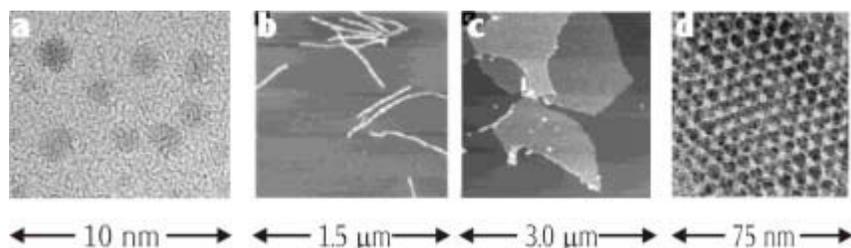
Algunos estudios han demostrado la bioacumulación de metales pesados como arsénico en organismos como el pez *Cyprinus carpio*, aves y microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Saccaromyces cerevisiae* que acumulan uranio. En el caso de la levadura el metal se localizó en el citoplasma (Silver y Misra, 1998; Huckle *et al.*, 1993).

Las *Pseudomonas* al exponerse a iones metálicos producen un polipéptido cuya estructura es muy parecida a una fitoquelatina que es uno de los tipos de metalotioninas presentes en organismos autótrofos y también en levaduras (Higham *et al.*, 1986; Silver y Misra, 1998). La causa a la cual se debe la importancia de las fitoquelatinas es porque son ligandos de amplia afinidad que complejan metales pesados (Navarro *et al.*, 2006).

## **2.4 Nanotecnología, Nanomateriales y Nanopartículas**

Sin duda en la actualidad algunas de las prioridades del desarrollo científico y tecnológico son la nanotecnología, biotecnología y la tecnología en información. La nanotecnología se fundamenta en el estudio de los fenómenos ocurridos a nanoescala y en los nanomateriales, para lograr así el entendimiento de la relación entre las propiedades y fenómenos físicos, químicos y las dimensiones de los materiales.

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales que pueden ser cerámicas, semiconductores, polímeros o metales e incluso una combinación de ellos, en donde una sus dimensiones se encuentran entre 1 y 100 nm. Estos representan una transición entre las moléculas y átomos. Los nanomateriales, se pueden clasificar de acuerdo al número de dimensiones que se encuentran en el régimen nanométrico en cuatro tipos (Figura 6):



Fuente: [www.inin.mx/publicaciones/documentospdf/39%20NANOPARTICULAS.pdf](http://www.inin.mx/publicaciones/documentospdf/39%20NANOPARTICULAS.pdf)

Figura 6. Clasificación de los nanomateriales. a) 0-D Nanopartículas de oro, b) 1-D Fibras3 poliméricas, c) 2-D Películas poliméricas y d) 3-D superred obtenida por auto ensamblaje de nanopartículas de oro.

- a) Materiales de dimensión cero (0-D): Es decir las tres dimensiones se ubican en régimen nanométrico, estas corresponden a las **nanopartículas**.
- b) De una dimensión (1-D), teniendo una longitud variable, conservan una sola dimensión en el régimen de nanómetros, como es el caso de los nanoalambres y los nanotubos.
- c) De dos dimensiones (2-D), con áreas de tamaño indefinido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm, como el caso de películas delgadas.
- d) Por ultimo, de tres dimensiones (3-D), en este caso los sólidos están formados por unidades nanométricas tridimensionales.

Las nanopartículas metálicas en particular, poseen propiedades sumamente interesantes, con aplicaciones extensas, es decir en varias áreas tecnológicas. En lo que respecta a sus primeras aplicaciones es necesario citar a la cultura egipcia, que empleó nanopartículas metálicas de oro como coloides medicinales con el fin de preservar la juventud y mantenerse saludables, en la actualidad se siguen empleando para tratamientos de artritis. Por su parte, la civilización china, además de utilizarla con fines curativos, empleaban nanopartículas metálicas como colorantes para porcelanas.

Sin embargo aunque se conocía la existencia de nanopartículas metálicas en la antigüedad, no es sino hasta 1857 que Faraday, realiza el primer estudio sistemático de nanopartículas, enfocándose en la síntesis y propiedades de los coloides de oro empleados por la cultura egipcia. Desde ese año a la fecha se han alcanzado avances grandes en el conocimiento de las nanopartículas metálicas: se desarrollaron diversos métodos de síntesis físicos, químicos (reducción con alcoholes) y biológicos (se forman por interacciones entre microorganismos y metales, por lo cual son llamadas bionanopartículas, debido al método de obtención), (Narayanan, 2005), teniendo como finalidad diseñar las dimensiones, formas, composición y modificadores de superficie y de esta forma poder tener control sobre el comportamiento frente a estímulos diferentes como: la radiación electromagnética o reactividad química, entre otros.

El conocimiento de este tipo de propiedades y características ha hecho posible la aplicación de las nanopartículas a diferentes tecnologías, en áreas como electrónica, óptica, medicina y catálisis (Pellegrini, *et al*, 1997; Gould, 2004), pero existen otras áreas en las que las nanopartículas no solo han sido utilizadas para crear dispositivos sofisticados o de alta precisión, sino también para crear tecnologías de uso doméstico.

Ejemplos de tecnologías innovadoras en medicina, es el uso de nanopartículas de oro, para la detección de niveles de glucosa, y en conjunto con nanopartículas magnéticas se emplean para la detección de células cancerígenas, de VIH y Alzheimer en etapas tempranas.

Otra aplicación se refiere a la desulfurización de combustibles empleando nanopartículas de MoS<sub>2</sub>, extremadamente pequeñas con forma particular (Bohnet, 2007).

#### **2.4.1 Bionanopartículas**

Se definen como fracciones moleculares, proteínas, nanopartículas orgánicas/inorgánicas funcionalizadas con componentes biológicos.

El origen de las bionanopartículas metálicas se debe a interacciones entre microorganismo y metal.

Se conoce poco acerca de la resistencia de microorganismos a metales nobles que pudiesen ser de interés por ejemplo: la plata y el oro, de la plata se sabe que actúa como agente antimicrobiano. Independientemente de esto se ha reportado que existen microorganismos resistentes a plata de sitios contaminados de este metal que utilizan como mecanismo de resistencia su acumulación dentro de la bacteria, sugiriendo la

utilización de esta para recobrar este metal a partir de efluentes industriales o de sus yacimientos minerales.

Un ejemplo de la acumulación de plata es el de *Moraxella guanajuatensis*, que fue aislada de una zona minera de Guanajuato, como una bacteria resistente a varios metales en pruebas de laboratorio, además cuenta con la capacidad de de cambiar el estado redox del ión plata a su forma metálica, mediante mecanismos que aun se están estudiando a nivel bioquímico y molecular. Las nanopartículas formadas oscilan entre 20 y 40 nm. Las bionanopartículas se alojan en el espacio periplásmico y en el interior de la bacteria. Esta bacteria llega a acumular hasta 80 mg de Ag / g de peso seco, este hecho la coloca como una más de las cepas hiperacumuladoras de plata (García y Díaz, 2002), como son las *Pseudomonas stutzeri* y *Tiobacillus sp*, que registran acumulaciones en pruebas de laboratorio de 2 y 250 mg de Ag<sub>2</sub>S / g de peso seco, respectivamente, este ultimo sobre la superficie de la bacteria (Sanchez y López, 2003; Haefeli *et al*, 1984).

## **2.5 Absorción Atómica**

### **2.5.1 El Proceso de Absorción Atómica**

Los métodos de absorción atómica están basados en la absorción selectiva, la cual ocurre solo cuando la radiación luminosa pasa a través de un vapor atómico. En donde “Solo la longitud de onda que responda al vapor atómico será absorbida”, a esto se le conoce como absorción selectiva.

La absorción atómica ocurre solamente dentro de un intervalo de longitud de onda muy estrecha, de aquí se genera el término popular de absorción por línea. La longitud de onda de una línea en particular es característica del elemento presente, mientras que el grado de absorción indica su concentración.

La absorción y concentración del analito están cuantitativamente relacionadas por la ley de Lambert-Beer, expresada simplemente por la ecuación:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Donde:

A= Es la absorbancia y representa al parámetro determinado espectrofotométricamente.

$a$ = Es la absorptividad, la cual es una constante específica para una longitud de onda y un elemento dado.

$b$ = Es el paso de la luz.

$c$ = Es la concentración.

Por lo general, se usan soluciones de referencia a manera de calibrar al sistema instrumental. La absorptividad y el largo del camino permanecen constantes, de tal manera que al graficar la absorbancia contra la concentración del analito, la grafica que resuelve deberá ser siempre lineal. En la práctica sin embargo las desviaciones a la ley de Beer son muy comunes debido a las limitaciones instrumentales, éstas causan un doblamiento en la curva de calibración.

El principio de operación de un espectrofotómetro de absorción atómica es de la siguiente manera: La fuente de luz es dirigida a través de la muestra atomizada en donde se lleva a cabo la absorción selectiva. La porción transmitida entra entonces al monocromador el cual aísla la longitud de onda analítica y la envía al detector.

Una señal eléctrica es resultante la cual es proporcional a la intensidad de la radiación. La señal es entonces procesada por el amplificador y finalmente traducida a una lectura digital por medio de un dispositivo electrónico.

Actualmente dos mediciones son requeridas por cada lectura de absorbancia: primero de  $I_0$ , que representan la intensidad del haz incidente y después  $I_t$ , que representan la intensidad del haz transmitido. La razón de las dos intensidades es usada para determinar la absorbancia.

Básicamente los componentes de un instrumento de absorción atómica están integrados dentro de una unidad compacta.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El papel que desempeñan los microorganismos en los ecosistemas es de gran interés para la biotecnología, debido a que se encuentran expuestos a una gran variedad de ecosistemas y a la presencia de contaminantes, entre los cuales uno de los más importantes son los metales que se obtienen como productos de desecho de actividades minero-metalúrgicas e industriales. Aunado a lo anterior esta la consideración de la toxicidad que algunos metales representan para los organismos vivos y el ambiente.

Desde hace ya algunos años se sabe que los microorganismos que habitan lugares contaminados con metales tóxicos son capaces de interactuar con el mismo (metal). Las interacciones que se dan entre microorganismo-metal representan en la actualidad una alternativa en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas. Además los microorganismos que interactúan con metales son capaces también de formar nanopartículas metálicas de interés revalorizadas de sitios contaminados como los Jales. Estas nanopartículas pueden ser empleadas en diversas áreas tecnológica, como la medicina, la industria cosmética e incluso en la desulfurización de combustibles.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.3 Objetivo General**

- Determinar la acumulación de metales y formación de bionanopartículas metálicas por microorganismos aislados de suelos contaminados.

### **4.4 Objetivos Específicos**

- Establecer la resistencia de los microorganismos aislados a diferentes metales.
- Establecer la formación de nanopartículas metálicas por los microorganismos seleccionados.
- Determinar la capacidad de absorción específica y la afinidad de las cepas por el Cobalto y Cobre.
- Establecer la especificidad de las cepas para la acumulación de Cobalto y Cobre.

## **5. HIPÓTESIS**

Los microorganismos que habitan sitios contaminados con metales como los Jales y zonas industriales, poseen la capacidad de acumular metales y además formar nanopartículas metálicas.

## 6. METODOLOGÍA

La estrategia metodológica que se planteó para cubrir los objetivos establecidos del proyecto fue la obtención de las muestras de suelos contaminados de diferentes tipos, a las cuales se les determinaron parámetros físico-químicos como pH y conductividad eléctrica empleando un potenciómetro común. Con las muestras se realizó un enriquecimiento en medio líquido Caldo Nutritivo (CN) adicionando metales como Plomo (Pb), Zinc (Zn), Plata (Ag) y Cobre (Cu) en concentración 2 mM de cada uno de ellos. A partir de los medios enriquecidos que presentaron un buen crecimiento se llevó a cabo el aislamiento por la técnica de dilución en placa. Posteriormente a las cepas aisladas se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en metales como Arsénico (As), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo) y Selenio (Se) principalmente y algunos otros como Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Plata (Ag), Plomo (Pb) y Zinc (Zn). Se realizó un ensayo de acumulación de metales en medio sólido Agar Nutritivo (AN) empleando  $H_2S$  gaseoso. Se seleccionaron dos cepas resistentes para realizar los ensayos de acumulación de metales y formación de nanopartículas (Figura 7).

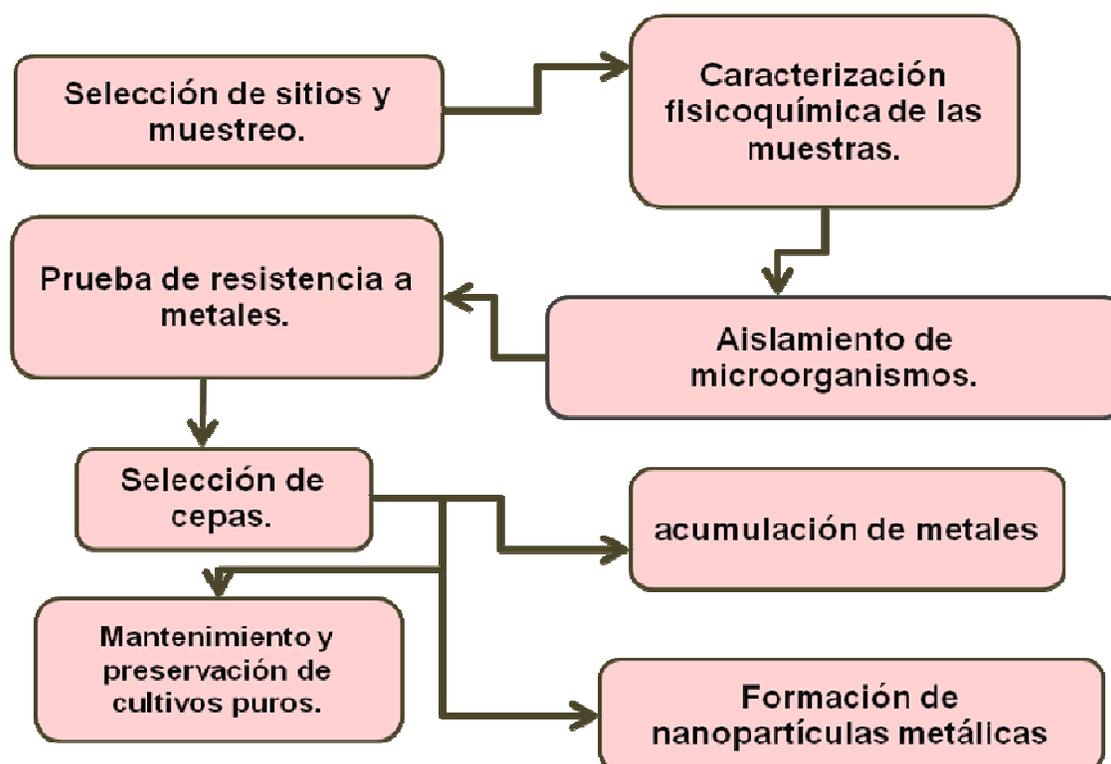


Figura 7. Estrategia Metodológica General.

## **6.1 Selección de Sitios y Muestreo**

Para la elección de los sitios de muestreo, el criterio a valorar fue la presencia de compuestos metálicos en estos lugares, de esta forma se encontraría una selección natural de microorganismos capaces de tolerar metales pesados. Los sitios corresponden a tres espacios contaminados con metales, el primero de un suelo industrial contaminado particularmente con Cobre, el siguiente una presa de jales denominado “La Negra”, y el tercero fue de la ex refinería de Azcapotzalco, contaminada con hidrocarburos y metales.

Las muestras se tomaron en bolsas con sello hermético y se transportaron al laboratorio para su uso posterior. Los suelos se nombraron: “Suelo Cu”, la presa de jales “La Negra” y “Suelo Azcapotzalco”.

## **6.2 Caracterización Físicoquímica de las Muestras**

### **6.2.1 pH (Potenciómetro)**

Para determinar el pH de los suelos se adicionó 1 g de cada suelo y 10 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 25 mL y se mezcló con un agitador magnético. Se dejó reposar la solución durante 10 minutos. Posteriormente se determinó el pH con un potenciómetro Modelo ION 510 /Phmetro-ISE.

### **6.2.2 Conductividad Eléctrica (Potenciómetro)**

Para determinar la conductividad eléctrica de los suelos se adicionaron 2 g de cada suelo y 10 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 25 mL y se mezcló con un agitador magnético. Posteriormente se determinó la conductividad con un conductímetro marca OAKTON. El equipo se calibró con una solución estándar de cloruro de potasio 0.1 N. Se tomó la lectura en Siemens.

## **6.3 Enriquecimiento y Aislamiento de Microorganismos**

### **6.3.1 Enriquecimiento**

El enriquecimiento se llevó a cabo en Caldo Nutritivo adicionado con diferentes metales. Se realizó en tubos de ensaye con tapón de rosca, los tubos contenían 25 mL de medio. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave a 15 lb por 15 minutos, posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para adicionarles las soluciones de metales respectivos: Pb, Zn, Ag y Cu 1M, esterilizadas por filtración empleando Acrodiscos con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de apertura de poro marca Millipore. Las concentraciones finales de los metales en el medio fueron de 0.5, 1, 2 y 5 mM. Los medios de cultivo enriquecidos

fueron inoculados con aproximadamente un gramo de cada una de las muestras e incubados a 27°C en agitación 110 rpm, el crecimiento microbiano se observó por la turbidez en los medios.

### **6.3.2 Aislamiento**

A partir del crecimiento microbiano obtenido en los cultivos enriquecidos, se realizaron diluciones en placa en medio Agar Nutritivo adicionado con Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Molibdeno (Mo), Plata (Ag), Plomo (Pb), y Zinc (Zn); en concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 y 10 mM. Las diluciones empleadas fueron de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  (en solución salina al 0.85%), a partir de los tubos que presentaron mayor turbidez. Enseguida se realizó el aislamiento por la técnica de dilución en placa. En esta técnica se adiciona a la placa de Agar 0.1 mL de la dilución y se extiende con una varilla de vidrio en forma de “L”, esterilizada por flameo.

## **6.4 Mantenimiento y Preservación de Cultivos Puros**

Los cultivos puros se conservaron por dos métodos.

### **6.4.1 Resiembra Periódica en Medios Frescos**

La resiembra periódica es una técnica que permite la supervivencia de los cultivos en cortos períodos de tiempo, por eso se reconoce como un método de conservación a corto plazo. La técnica se basó en transferir el cultivo del medio seco a uno fresco (sólido) proporcionándole así las condiciones óptimas de crecimiento, aunque este método de conservación condicione un elevado riesgo de contaminación y variabilidad de las características de las cepas, las cuales establecen sus principales desventajas.

### **6.4.2 Crioconservación**

La crioconservación es un método que mantiene suprimidas las actividades metabólicas de: células, tejidos y organismos por efecto de las bajas temperaturas a las que se someten. En estas circunstancias los procesos de envejecimiento y deterioro celular disminuyen o cesan.

La cepa crecida en el medio de cultivo se le adicionó glicerol para obtener una concentración final del 10 %. Posteriormente en condiciones estériles se traspasó 1 mL del cultivo a un tubo de crioconservación de 1.5 mL de volumen. Los tubos se almacenaron a un congelador a -70 °C.

## **6.5 Resistencia a Metales y Acumulación de Metales**

### **6.5.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La prueba de resistencia a metales se llevó a cabo en medio sólido AN adicionando concentraciones de 0 a 50 mM de cada uno de los metales de interés: Arsénico, Cobalto, Cobre, Molibdeno y Selenio, y algunos otros como Cadmio, Cromo, Mercurio, Plata, Plomo y Zinc con un control sin metal, inoculando por picadura. Se observó el crecimiento en las placas determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que se refiere a la última concentración de metal que presenta crecimiento microbiano.

### **6.5.2 Acumulación Microbiana de Metales por el Método del H<sub>2</sub>S**

La acumulación microbiana de metales se determinó por el método de revelado con ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S); que consiste en inocular por picadura placas de medio AN adicionado con los metales de interés y revelarlas, después del crecimiento de la colonia, con ácido sulfhídrico gaseoso. Esta técnica del revelado consistió en mezclar 3ml de HCl, 2M y 2 ml de Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O, 0.5M, (vertidos en la tapa de la caja simultáneamente), colocando la caja con el medio y la colonia rápidamente, se dejó reposar durante 20 minutos, al transcurrir el tiempo mencionado, en un ensayo positivo se observa la formación de un halo alrededor de la colonia. Este ensayo se realizó en una campana de extracción, empleando guantes, máscara de protección y lentes de seguridad.

### **6.5.3 Acumulación Microbiana de Metales por Espectroscopia de Absorción Atómica**

*Importante: La experimentación referente a los ensayos de acumulación de metales por absorción atómica y la formación de nanopartículas metálicas aún no se realizan, pero se harán en los siguientes dos meses y se incluirá en la defensa de tesis de licenciatura.*

#### **6.5.3.1 Obtención de la Biomasa Bacteriana**

Se preparan pre-inoculos de 50 mL de las dos cepas seleccionadas para esta prueba en medio Caldo Nutritivo (CN) sin metal. Posteriormente se inocularán al 10% v/v de 500 mL de CN, para la propagación de biomasa microbiana. La biomasa se obtendrá por centrifugación a 7500 rpm por 15 minutos, lavando tres veces con solución salina al 0.85 % o bien CN limpio y estéril.

#### **6.5.3.2 Cinética de Adsorción (para determinar el equilibrio)**

#### **6.5.3.3 Determinación de la Capacidad de Biosorción (Para los metales de interés)**

#### **6.5.3.4 Elección de la Isoterma De Adsorción**

*Importante: La metodología aún se esta definiendo para los puntos: 6.5.3.2, 6.5.3.3 y 6.5.3.4.*

#### **6.5.3.5 Determinación de la disminución de Metales por Absorción Atómica**

La disminución de metales en el medio líquido será determinada por Espectrofotometría de Absorción Atómica, con un Espectrómetro Compacto de Absorción Atómica 932 Plus, de doble haz, con control automático de longitud de onda y apertura, corrección de fondo, soporte para fuente de aplicación o lámparas normales de cátodo hueco para cada muestra, controlado desde una computadora externa. Con control automático opcional de la flama.

La espectroscopia de absorción atómica se basa en la absorción de luz por los átomos de un elemento a cuantificar en una muestra, cuando se hace incidir en ella un haz de luz emitido por una lámpara con una rigurosa longitud de onda definida, la cual corresponde a la longitud de onda de emisión característica del elemento particular escogido para el análisis. La extensión a la cual la luz es absorbida provee una estimación de la concentración del elemento en la muestra, la cual debe estar en solución. La intensidad del rayo de luz emergente, después de la absorción por la muestra, es medida para determinar su absorción. Una lámpara diferente se requiere para cada longitud de onda característica de tal forma que el análisis de cada elemento necesita una medición por separado.

Las muestras de metales empleadas en la técnica pueden variar de 10 mg hasta 1 g. Normalmente se utiliza agua destilada para metales. Pocos mililitros de esta solución son aspirados para formar un fino spray, el cual es entonces llevado hasta la flama adecuada (p.e. aire/acetileno, óxido nítrico/acetileno), donde la solución es eficazmente atomizada. Para el análisis cuantitativo, se realiza una calibración con soluciones conteniendo cantidades conocidas de los elementos a analizar, es necesario que entre éstas haya una relación lineal y entre la concentración y la absorbancia (A).

## **6.6 Ensayos Para la Producción de Nanopartículas Metálicas**

Se crecerán los microorganismos en el medio Caldo Nutritivo y la concentración del metal óptima determinada; posteriormente al crecimiento de los microorganismos en el medio caldo nutritivo, se recupera la biomasa por centrifugación a final de la fase logarítmica y se lavará con medio de cultivo limpio y estéril o bien solución salina al 0.85%, se determinará la formación de partículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Scanning Electrón Microscopy SEM.

### **6.6.1 Determinación del Crecimiento Microbiano**

Se elaboró un pre- inóculo de 50 mL de medio Caldo nutritivo sin metal de la cepa “Neg”, elegida para los ensayos de acumulación de metales y producción de nanopartículas metálicas. Se incubó a 30 °C por 24 horas.

Con el pre-inóculo se inocularon matraces con 50 mL de medio Caldo Nutritivo con 10 % del volumen total contenido. Se realizó la cinética microbiana de la cepa “Neg”, en presencia de Arsénico (As) en concentración 10 m, y también sin el metal, tomando mediciones de la densidad óptica a 540 nm, cada hora, durante 8 tiempos.

*Nota: La cinética de crecimiento microbiano también se realizara para la cepa “Zn2”, que fue elegida para las pruebas de acumulación de metales y producción de nanopartículas metálicas como la cepa “Neg”.*

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 Caracterización Fisicoquímica de las Muestras**

Se tomaron tres muestras de localidades diferentes denominadas: “Suelo Cu”, la presa de jales “La Negra” y “Suelo Azcapotzalco”. La primera muestra corresponde a un suelo industrial contaminado particularmente con cobre (Cu), este suelo nombrado “Suelo Cu”, es fuertemente ácido y presenta un color azul, debido a su contaminante. La muestra que corresponde a la presa de jales “La Negra” es fuertemente alcalina. El “Suelo Azcapotzalco es y su conductividad eléctrica es. (Tabla 2).

*Nota: Los parámetros fisicoquímicos del “Suelo Azcapotzalco” aún no han sido determinados.*

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las muestras.

ORIGEN DE LA MUESTRA	pH	CONDUCTIVIDAD (mS)
“Suelo Cu”	2.75	11.74
Jal Minero “La Negra”	8.55	0.940
“Suelo Azcapotzalco”		

Los parámetros básicos en la caracterización de suelos son la concentración de iones hidrogeno (pH) y la conductividad eléctrica, ya que los procesos ya sean de origen físico, químico o biológico, dependen en gran medida de los valores de ambas características. La NOM-021-RECNAT-2000, con el fin de estandarizar las mediciones de estos parámetros y así eliminar fuentes de error en las lecturas por deficiencias del método empleado, estableció que para realizar medidas de pH se deberán preparar soluciones al 2% p/v de la muestra; Sin embargo en el caso de este experimento, se realizó el método establecido por Fernández *et al.*, (2006), el cual emplea la misma escala de evaluación que la NOM-021-RECNAT-2000 para clasificar a los suelos, pero varía en la concentración de la solución utilizada para el análisis que es del 10% p/v de la muestra.

## 7.2 Cepas Aisladas Resistentes a Metales

Se aislaron 2 cepas correspondientes a la muestra “Suelo Cu”, 25 cepas que pertenecen a la muestra “Suelo Azcapotzalco” y 1 cepa propia del Jal Minero “La Negra”, teniendo un total de 28 cepas, de las cuales 24 corresponden a cepas bacterianas. Es común que la mayoría de los microorganismos aislados correspondan a bacterias debido a que son la forma de vida más extensa en el planeta.

Las cepas bacterianas aisladas mostraron poca variabilidad en características morfológicas como: forma, elevación y consistencia (Tabla 3). Sin embargo algunas cepas en presencia de determinado metal cambiaron el color de la colonia, como las cepas “BPb”, “Cr3” y “Cr5” que tomaron un color rosa salmón cuando crecen en Selenio (Figura 8).

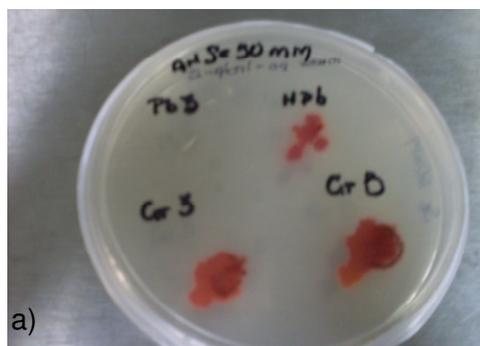


Figura 8. a) Cepas que después de crecer en presencia de Selenio cambiaron de un color amarillo (“BPb” y “Cr5”) y blanco (Cr3), a un color rosa salmón.

Un cambio en la morfología macroscópica, principalmente en el color de las cepas crecidas en medio con metales insinúa la bioacumulación del metal (Hernández *et al.*, 1998). Los metales ocasionan cambios en la estructura de los microorganismos y provocan que haya mayor afinidad de la pared celular por los iones metálicos. La afinidad por los iones metálicos es diferente en las bacterias Gram positivas, que en las Gram negativas, siendo para el primer caso mucho más complejo, debido a la naturaleza de la pared celular.

Tabla 3. Caracterización macroscópica de las cepas bacterianas aisladas de las tres muestras.

CEPA	FORMA	COLOR	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA
BCu	Irregular	Blanco	Lobulado	Plana	Rugosa	Viscosa
Mo1	Circular	Amarilla	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa
Mo2	Circular	Marrón	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa
Mo3	Circular	Beige	Entero	Elevada	Lisa	Viscosa
Mo4	Circular	Marrón	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa
Pb1	Irregular	Beige	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa
Pb2	Redonda	Café	Entero	Plana	Lisa	Viscosa
Pb3	Circular	Blanca	Ondulado	Elevada	Rugosa	Viscosa
Pb4	Circular	Café	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa
Pb5	Circular	Beige	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa

BPb	Circular	Ocre	Entero	Convexa	Rugosa	Dura
Cr3	Circular	Blanca	Entero	Elevada	Lisa	Viscosa
Cr4	Puntiforme	Amarilla	Entero	Elevada	Lisa	Viscosa
Cr5	Circular	Amarilla	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa
Cr6	Irregular	Blanca	Ondulado	Plana	Rugosa	Seco
Cr7	Circular	Blanca	Entero	Elevada	Lisa	Viscosa
Cr8	Circular	Blanca	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa
Co1	Circular	Blanca	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa
Cd2	Circular	Amarilla	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa
Hg1	Puntiforme	Blanca	Entero	Elevada	Lisa	Viscosa
Neg	Irregular	Blanco	Ondulado	Plana	Lisa	Húmeda

El crecimiento de las cepas bacterianas en medio sólido con metales, en la mayoría de los casos es más lento, en comparación con las cepas que se desarrollan en medios libres de metales. Esto se debe a que el microorganismo se encuentra bajo condiciones de estrés, enfocándose principalmente en conservar su viabilidad frente al agente tóxico al cual se encuentra sometido (Lindsay y Riley, 1994).

Por otra parte, los hongos aislados presentan características morfológicas similares entre ellos, a excepción del color de la pigmentación (Tabla 4). Además, algunos de los hongos aislados, también adquieren una pigmentación alrededor del hongo, que corresponde a la proporcionada por el metal al que se exponen.

Tabla 4. Características morfológicas de los hongos aislados.

CEPA	TAMAÑO	FORMA	ASPECTO	PRESENCIA DE PIGMENTO
HCu	1.3 cm	Irregular	Aterciopelado	Pigmento verde limón
HCu1	2.1 cm	Irregular	algodonoso	No
HCu2	1.5 cm	Irregular	Aterciopelado	Ocre en el centro

HCd1	1.2 cm	Irregular	Algodonoso	Verde oscuro alrededor
------	--------	-----------	------------	------------------------

Se aislaron 14 cepas Gram positivas, como la cepa “Neg” (Figura 9), 12 cepas Gram negativas y 4 Hongos, La mayoría de estas cepas se encuentra en forma de bacilo no agrupado, a excepción de las cepas Cr3, Mo3, Pb2 y Pb4, en las cuales se encuentran Estreptococos (Tabla 5).



Figura 9. A la izquierda - Cepa “Neg”. A la derecha – Bacilos Gram positivos, Cepa “Neg”.

La cepa fúngica “HCu” (Figura 10) fue aislada del “Suelo Cu” que es un suelo fuertemente ácido, por lo que se favoreció el crecimiento de este tipo de microorganismos debido a que son considerados como acidófilos (Tortora, 1993).



Figura 10. Cepa fúngica “HCu” aislada del “Suelo Cu”, contaminado con Cobre.

Tabla 5. Caracterización microscópica de las cepas aisladas.

CEPA	MORFOLOGÍA	TINCIÓN
BCu	Bacilos	Gram +
Mo1	Cocos	Gram -

Mo2	Cocos	Gram -
Mo3	Cocos	Gram -
Mo4	Cocos	Gram +
Pb1	Cocos	Gram +
Pb2	Cocos	Gram -
Pb4	Cocos	Gram +
Pb5	Bacilos	Gram +
BPb	Bacilos	Gram +
Cr3	Cocos	Gram +
Cr4	Cocos	Gram +
Cr5	Bacilos	Gram +
Cr6	Bacilos	Gram +
Cr7	Bacilos	Gram +
Cr8	Bacilos	Gram +
Co1	Bacilos	Gram -
Cd2	Bacilos	Gram +
Hg1	Bacilos	Gram +
<b>Neg</b>	Bacilos	Gram +
HCu	Hongo	Levadura
HCu1	Hongo	Levadura
HCu2	Hongo	Levadura
HCd1	Hongo	Levadura

### 7.2.1 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Las cepas aisladas a partir del Jal Minero “La Negra” y “Suelo Cu”, fueron probadas en un mayor número de metales a diferentes concentraciones (Tabla 6), en comparación con las cepas aisladas del “Suelo Azcapotzalco” (Tabla 8). Todas las cepas correspondientes a las tres muestras, poseen la capacidad de crecer bajo condiciones de estrés, a elevadas concentraciones de metales, incluso a aquellos metales que son considerados altamente tóxicos para organismos superiores como el Arsénico (As).

Tabla 6. CMI de las cepas aisladas de las muestras “Suelo Cu” y la presa de jales “La Negra”.

METAL (CONCENTRACIÓN Mm)	ORIGEN DEL SUELO		
	“Suelo Cu”		<i>Jal</i>
	“BCu”	“HCu”	“Neg”
Arsénico (As)	50	0	50
Cadmio (Cd)	0	0.5	0
Cobalto (Co)	0.5	0	0.5
Cobre (Cu)	0.5	5	1.5
Cromo (Cr)	3	1	2

Mercurio (Hg)	3	1	0.1
Molibdeno (Mo)	10	5	10
Plata (Ag)	0.5	0.5	7
Plomo (Pb)	3	0	3
Selenio (Se)	5	0	5
Zinc (Zn)	0.5	1	1

Al incrementar las concentraciones de metales en el medio, el crecimiento de las cepas tanto bacterianas como fúngicas se ve afectado, en comparación con las cepas que crecen en medios libres de metales. Las cepas bacterianas tienen mayor resistencia a los metales probados que el hongo "HCu". El metal que más afectó el crecimiento bacteriano de las cepas de las muestras "Suelo Cu" y Jal Minero "La Negra", fue el Cadmio. En el caso de la cepa "HCu" los metales que inhibieron de forma total el crecimiento de la cepa son el Plomo (Pb), Cobalto (Co) y Mercurio (Hg). La cepa "Neg" es la más resistente al metal Plata (Ag), ya que resistió hasta una concentración de 7 mM (Tabla 7), pese a que este metal en muy bajas concentraciones es capaz de ocasionar efectos letales sobre las bacterias. El metal que resistieron en mayor concentración las cepas "Neg" y "BCu" es el Arsénico (As).

Tabla 7. CMI de las cepas aisladas de la muestra "Suelo Azcapotzalco".

CEPA	METAL CONCENTRACIÓN (Mm)				
	Arsénico (As)	Cobalto (Co)	Cobre (Cu)	Molibdeno (Mo)	Selenio (Se)
Mo1	5	0	0	0	3
Mo2	3	0	3	20	3
Mo3	3	0.5	3	5	9
Mo4	3	0	2	20	1
Pb1	50	0	3	5	9
Pb2	7	0	5	20	9
Pb3	7	0	1	20	40
Pb4	0	0	3	2	1
Pb5	50	0	3	20	1
BPb	50	0	2	20	50
<b>Zn2</b>	50	0	3	20	10
Zn3	3	0	1	0	2
Zn6	0	0	0	0	0
Cr3	50	0	2	20	50
Cr4	3	0	2	20	20
Cr5	20	0	2	20	50
Cr6	1	0	1	20	3
Cr7	50	0	2	20	1
Cr8	1	0	1	20	3
HCu1	10	1	3	20	10
HCu2	1	0	2	20	0

Hg1	10	0	2	20	10
Co1	5	0.5	0	0	0
HCd1	10	0.5	10	20	3
Cd2	3	0	2	20	10

Las cepas aisladas de “Suelo Azcapotzalco”, son las más resistentes para los metales Molibdeno (Mo), Arsénico (As) y Selenio (Se). El crecimiento de la mayoría de las cepas se inhibió con Cobalto (Co), a excepción de “Mo3”, “HCu1”, “Co1” y “HCd1”, de estas la más resistente es “HCu1”, tolerando hasta una concentración de 1mM del metal.

En el caso del Arsénico (As), es sobresaliente la resistencia mostrada en medios sólidos por las cepas “Pb1”, “Pb5”, “BPb”, “Zn2”, “Cr3”, “Cr7”, “BCu” y “Neg”, que resisten hasta una concentración de 50 mM del metal. En trabajos anteriores como el reportado por Campos, *et al.*, (2007), se aisló una cepa de *Wautersia solanacearum*, con niveles de resistencia de 8 y 3mM, una cepa de *Pseudomonas alcaligenes* con niveles de resistencia de 8 y 1mM, *Burkordelia cepacia* con niveles de resistencia de 8 y 1mM y una *Enterobacter cloacae* con niveles de resistencia de 8 y 1mM, para As (III) y As (V), respectivamente.

El desarrollo bacteriano en medio líquido respecto al crecimiento en medios sólidos, en presencia de metales, es diferente: En medio líquido el metal está más disponible para los microorganismos, por lo que su toxicidad es más alta, debido a que no les es posible desarrollar mecanismos de defensa, como precipitación o transformaciones enzimáticas que permitirían disminuir el grado de toxicidad del metal, evitando que el elemento tóxico interactúe con proteínas esenciales para la viabilidad del microorganismo (Kasan, 1993).

La CMI es un parámetro de caracterización de microorganismos con potencial para ser usado en biorremediación de ambientes contaminados con metales. El método más usado para esta determinación ha sido el denominado difusión en Agar (Gómez, *et al.*, 1999; Moraga, *et al.*, 2003; Spain, 2003, Camargo, *et al.*, 2003), sin embargo este método ofrece una desventaja severa, ya que se sobrestima el valor de la CMI, debido al carácter oligodinámico (capacidad que tienen los metales para inactivar a las enzimas) de los metales. Lo que no se presenta en medio líquido, donde el metal está más disponible o en contacto con las células microbianas.

### 7.3 Selección de las Cepas Para los Ensayos de Acumulación de Metales y Formación de Nanopartículas Metálicas

En base a la resistencia a varios de los metales de interés como el arsénico (As), el cobre (Cu), el cobalto (Co), el molibdeno (Mo) y el selenio (Se), determinada como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se seleccionaron dos cepas “Neg” y “Zn2”. Con las cuales se determinará la capacidad de adsorción, afinidad y formación de nanopartículas.

La causa por la cual se eligió a la cepa “Zn2”, es por la afinidad que tiene por el cobre (Cu) y no por el cobalto (Co), por lo que la cepa se supone, tiene la característica de acumular el cobre (Cu) contenido en un medio, separando de esta forma a estos dos metales.

### 7.4 Efecto de Algunos Metales en el Crecimiento de las Cepas “Neg” y “Zn2”

En presencia de arsénico 5 mM la velocidad de crecimiento de la cepa “Neg”, disminuyó en relación al medio libre de As. El tiempo de duplicación también fue afectado, incrementando en un 56 % (Tabla 8).

Tabla 8. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de la cepa “Neg”.

CEPA	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO $\mu$ (h <sup>-1</sup> )		TIEMPO DE DUPLICACIÓN (h)	
	As 5 mM	Sin Metal	As 5 mM	Sin Metal
“Neg”	0.450	0.702	1.540	0.987

### 7.5 Acumulación Microbiana de Metales

#### 7.5.1 Revelado con H<sub>2</sub>S Gaseoso

La técnica del revelado con H<sub>2</sub>S, solo se aplicó a la cepa “Neg”, con los metales: Cobre, Plata y Plomo, sin embargo esta cepa no mostró ningún halo alrededor de la colonia bacteriana. El único resultado observado fue la reacción del H<sub>2</sub>S con plomo. Esta reacción origina un cambio de coloración (negro) en el medio de cultivo Agar Nutritivo, adicionado con el metal. Sin embargo, la cepa “Neg”, sin realizar alguna reacción para evidenciar una interacción microorganismo – metal, si formó un halo transparente alrededor de colonias de la cepa “Neg” que crecieron en medio sólido Agar Nutritivo adicionado con Plata (Ag) 5 mM (Figura 11).

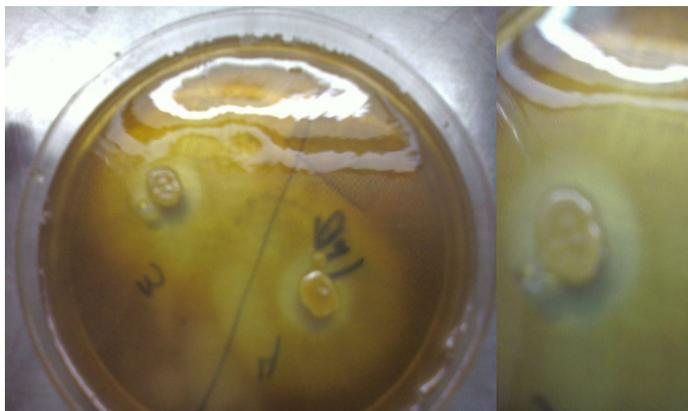


Figura 11. Formación de un halo de transparente alrededor de colonias de la cepa “Neg”.

## **7.5.2 Acumulación Microbiana de Metales por Espectrofotometría de Absorción Atómica**

### ***7.5.2.1 Cinética de Adsorción***

### ***7.5.2.2 Capacidad de Biosorción***

### ***7.5.2.3 Isoterma De Adsorción***

### ***7.5.2.4 Disminución de Metales por Absorción Atómica***

## **7.6 Formación Microbiana de Nanopartículas Metálicas**

## **8. CONCLUSIONES**

- De la muestra “Suelo Azcapotzalco”, se aisló el mayor número de microorganismos resistentes de metales, de los cuales 21 son cepas bacterianas y 3 cepas fúngicas.
- Del Jal Minero “La Negra”, se aisló la cepa “Neg” resistente a varios metales: Arsénico, Cobalto, Cobre, Molibdeno, Selenio, Cadmio, Cromo, Mercurio, Plata, Plomo y Zinc.
- Se aislaron 2 cepas del “Suelo Cu”; un hongo “HCu” y una bacteria “BCu”.
- El Cadmio fue el único metal de los ensayados que inhibió el crecimiento de la cepa “Neg”.
- La cepa “Neg” presentó una CMI de 7mM en plata, 10 mM en molibdeno y 50 mM en arsénico.

- La resistencia de arsénico de las cepas: “Pb1”, “Pb5”, “BPb”, “Zn2”, “Cr3”, “Cr7”, “BCu” y “Neg”, es sobresaliente, alcanzando una CMI de hasta 50 mM del metal.
- La cepa “Neg” presentó un halo alrededor de la colonia en medio con plata, lo que sugiere una interacción con plata.
- Las 28 cepas aisladas de “Suelo Cu”, “Suelo Azcapotzalco” y la presa de jales “La Negra”, acumulan selenio (Se).
- La presencia de arsénico 5 mM en el medio causa un incremento en el tiempo de duplicación de la cepa “Neg”.

## **9. RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO**

Se pretende comprobar la acumulación de algunos metales pesados y la formación de bionanopartículas metálicas, en las cepas elegidas “Neg” y “Zn2”. En el caso en el que se comprobaran estos sucesos, las cepas podrían ser estudiadas con fines aplicados a la biorremediación en sitios contaminados con compuestos metálicos, tales como suelos y aguas.

Otra expectativa futura será el estudio de la forma y tamaño de las bionanopartículas metálicas observadas, para así definir un posterior uso en diferentes áreas tecnológicas, tales como la medicina, la industria cosmética e incluso para mejorar la calidad de los combustibles empleando nanopartículas de MoS<sub>2</sub> (Noticias de Nanotecnología y Nanociencia, 2007).

Otras aplicaciones tecnológicas del presente proyecto, involucran la valorización y la biominería, también conocida como biolixiviación.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Alexopoulos C; Mims M; Blackwell. (1996). *Introductory Mycology*. 4th ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York. 869 págs.

Baldauf S. (2003). The deep roots of eukaryotes. *Science*. **300**: 1703-6.

Barnett. H; Hunter B. (1987). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Mac Millan Publishing Co. Nueva York.

Berry I. (1982). *The Biology of Yeast*. Edward Arnold Publ. Londres.

Brierley C; Brierley J. (1997). *Microbiology for the metal mining industry*. En Hurst CJ (Ed). *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press. Washington D.C. 876 pp.

Bohnet C. (2007). Bulk Molybdenun Disulphide is a Ubiquitous, Standard Solid Lubricant. However, Extremely Small MoS<sub>2</sub> Nanoparticles Have a Potentially Important Application as a Catalyst for Producing Sulphurfree Fuels. *Angewandte Chemie*. **46**: 623

Campos V; Valenzuela C; Alcorta M; Escalante G; Mondaca M. (2007). Aislamiento de Bacterias Resistentes a Arsénico desde Muestras de Rocas Volcánicas de la Quebrada Camarones. Región Parinacota Chile. *Gayana*. **71**: 150-155

Chen J; Czajka D; Lion L; Shuler M; Ghiorse W. (1995). Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ. Health Perspect*. **103**: 53-58.

Churchill S; Walters J; Churchill P. (1995). Sorption of heavy metals by prepared bacterial cell surfaces. *J. Environ. Engineer*. **121**: 706-711.

Doyle R. (1989). How cell walls of Gram-positive bacteria interact whit metal ions. En Beveridge T. Doyle R. *Metal Ions and Bacteria*. John Wiley & Sonns. USA. pp. 412-437.

Ford T; Mitchell R. (1992). Microbial transport of toxic metals. En Mitchell R (Ed) *Environ. Microbiol*. Wiley-Liss. New York. pp. 321-342.

Ford T; Ryan D. (1995). Toxic metals in aquatic ecosystems: A microbiological perspective. *Environ. Health Perspect*. **103**: 25-28.

Fredrickson J; Zachara J; Balkwill D. (2004). Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, Washington state. *Appl. Environ Microbiol*. **70**: 4230 - 41.

Fuller M. (1978). Lower Fungi in the Laboratory. *Department of Botany, University of Georgia, Georgia*.

García - Díaz. (2002). Caracterización molecular de los determinantes de Resistencia a plata en *Moraxella guanajuatensis* Ag. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Instituto de Investigación en Biología Molecular, *Facultad de Química, Universidad de Guanajuato*, México.

Gould P. (2004). Nanoparticles probe biosystems. *Materialstoday*. **7**: 36-43.

Gouzhong. (2004). Nanostructures and Nanomaterials, Sintesis, Properties and Applications. Imperial College.

Gupta R. (2000). The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Crit Rev Microbiol*. **26**: 111-31.

Hernández A; Mellado P; Martínez L. (1998). Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Appl. and Environ. Microbiol*. **64**: 4317-4320.

Huckle J; Morby A; Turner J; Robinson N. (1993). Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol. Microbiol*. **7**: 177-187.

Kasan H. (1993). The role of waste activated sludge and bacteria in metal-ion removal from Solution. *Crit. Rev. Environ. Sci-Technol*. **23**: 79-117.

Lindsay J; Rieley T. (1994). Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression. *Infec- Immun*. **62**: 2309-2314.

López A; Lizard N; Priego J; Marquez A. (2000). Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens 4K39*. *Industrial Microbiol. Biotechnol*. **24**: 146-151.

Lovley D. (1991). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) Reduction. *Microbiol Rev*. **55**: 259-287.

Narayanan R. (2005). Effect of colloidal nanocatalysis on the metallic nanoparticle shape: the Suzuki reaction. *El-Sayed. Langmuir*. **21**: 2027-2033.

Navarro E; Ramos P; Agapito R; Cuizano A. (2006). Propiedades ácido-básicas de *Lentinus edodes* y cinética de biosorción de Cadmio (II). *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. **2**: 47-54.

Novo M; Da Silva A; Mortto R; Cabral P; Costacurta A; Garcia O; Ottoboni L. (2000). *Thiobacillus ferroxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie-van-Leewenhoek*. **77**:187-195.

Pellegrini R; Trbojevich O; de Sanctis y K. Kadono. (1997). Fabrication of PbS nanoparticles embeded in silica gelby reverse micelles and Sol-Gel routes. *Science and Technology*. **8**: 1023.

Sánchez; López J. (2003). Caracterización fisiológica de la Resistencia a plata en *Moraxella guanajuatensis* Ag, con énfasis en el efecto tóxico del metal sobre los componentes de la cadena respiratoria. Tesis Profesional (Q.F.B). *Facultad de Química, Universidad de Guanajuato*, México.

Sears C. (2005). A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe*. **11**: 247 - 251.

Sengupta A. (2002). Principles of Heavy Metals Separation: An Introduction. En: *Environmental Separation of Heavy Metals*. Engineering Processes. Sengupta A. K. (ed). LewisPublishers. USA: 1-14.

Schwyn B; Neilands. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem*. **160**: 47-56.

Silver S. (1994). Exploiting heavy metal resistance systems in bioremediation. *Res. Microbial*. **195**: 61-66.

Silver S; Misra T. (1988). Plasmid-mediated heavy metal resistance. *Ann. Rev. Microbiol*. **42**. 717-43.

Suárez P; Reyes R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*. **27**: 160-164.

Tortora G. *Introducción a la Microbiología*. 9ª Edición. Buenos Aires: Medica Panamericana. 2007. pp. 959.

Unz R; Shuttleworth K. (1996). Microbial mobilization and immobilization of heavy metals. *Curr. Opinon Biotechnol*. **7**: 603-610.

Vullo L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista QuímicaViva*. **2**: 92-104.

Woese C; Kandler O; Wheelis M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **8**: 4576-9.