



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA  
Y METALURGIA

CINÉTICA DE TOXICIDAD DE MANGANESO Y ZINC CON  
*Pseudomonas sp.* AISLADAS DE SEDIMENTOS  
CONTAMINADOS DEL RIO SAN PEDRO

Tesis

Que para obtener el título de:

**INGENIERO QUÍMICO**

Presenta

**Yesenia Felix Felix**

Hermosillo, Sonora

Abril, 2018

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **DEDICATORIAS**

**A Dios**, por permitirme llegar y estar en donde estoy, por darme la mejor familia, los mejores amigos, todo lo que tengo...

**A mis padres**, mi mayor bendición, mi luz, mi guía...

**A mi novio Juan Pedro**, por ser quien eres, por sonreír, por quererme...

**A toda mi familia**, que extraño con todo mi corazón y que quiero tanto...

**A mis amigos**, mi segunda familia en las buenas, en las malas, en todo momento...

**Gracias**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, a través del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, por ser mi casa y por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia y a la División de Ingeniería, por su apoyo en la adquisición de materiales y reactivos para la realización del trabajo de campo y de laboratorio.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Onofre Monge Amaya, directora de tesis, por su apoyo, paciencia, conocimientos transmitidos para concluir este trabajo y sobre todo por ese gran amor y entrega a su trabajo y al que me brindo a mí como su alumna.

Así mismo mi agradecimiento a la, Dra. Ramona Guadalupe Martínez Meza, Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia y Dra. María Teresa Certucha Barragán, por dedicar su tiempo y esfuerzo a todos los alumnos que formamos parte del laboratorio de Biorremediación, del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia.

A mis padres, que gracias a ellos estoy por concluir mis estudios.

A mi novio Juan Pedro Camou, quien me acompaña y apoyo en la realización de la experimentación de este trabajo.

A mis amigas, Michell López, Dennise Loreto, Luz María León, Sofía Gómez, Lourdes Ortega, Araceli Cisneros, Karina Limón, Areli Aguirre, compañeras de generación, de tareas, de desvelo y sobre todo amigas, que tanto quiero.

A mis amigos David Orantes, Carlos Barceló, Orlando Moreno, Daniel Avilés, Angel Aguilar, Fernando Sau, Gustavo Sánchez, Cesar Cuevas, David Vencedor, con quienes pasé momentos de risas, alegrías y de apoyo a lo largo de mi carrera universitaria.

También se agradece a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización del presente trabajo.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

## Página

DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo general.....	3
2.1.1 Objetivos específicos.....	3
<b>III. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
3.1 Contaminación de sedimentos.....	4
3.1.2 Contaminación de sedimentos por metales pesados.....	5
3.2 Metales pesados.....	6
3.2.1 Toxicidad de los metales pesados.....	7
3.2.3 Manganeso.....	7
3.2.4 Zinc.....	8
3.3 Biorremediación.....	9
3.3.1 Proceso de biosorción de metales pesados.....	10
3.3.2 Bacterias en la descontaminación.....	12
3.3.2.1 <i>Pseudomonas sp.</i> .....	14
3.4 Curvas de crecimiento.....	15
<b>IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>17</b>
4.1 Muestreo y análisis.....	18
4.1.1 Muestreo.....	18

4.1.2 Determinaciones analíticas de temperatura y pH .....	18
4.2 Desarrollo de microorganismos.....	19
4.2.1 Aislamiento .....	19
4.2.2 Caracterización microscópica y macroscópica .....	21
4.2.2.1 Caracterización bioquímica de <i>Pseudomonas sp.</i> .....	21
4.3 Cinética de crecimiento.....	21
4.4. Concentración inhibitoria ( $CI_{20,50,80}$ ) .....	22
4.5 Constante de inhibición para la biomasa .....	23
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
5.1 Muestreo de sedimentos .....	24
5.1.3 Aislamiento de microorganismos .....	24
5.2 Selección de cepas .....	26
5.2.1 <i>Pseudomonas sp.</i> .....	26
5.2.1.2 Identificación de <i>Pseudomonas sp.</i> .....	26
5.3 Cinética de crecimiento <i>P. flourescens</i> utilizada como biomasa .....	27
5.4 Efecto inhibitorio de manganeso y zinc con <i>P. flourescens</i> utilizada como biomasa ( $CI_{20,50,80}$ ) .....	28
5.5 Constante de inhibición de <i>P. flourescens</i> utilizada como biomasa.....	32
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
ANEXOS.....	35
ANEXO A.....	35
ANEXO B.....	36
ANEXO C.....	38
ANEXO D.....	40
ANEXO E .....	42
ANEXO F .....	44
REFERENCIAS .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Interacción entre metales y microorganismos.....	11
2. Crecimiento microbiano en un cultivo discontinuo.....	16
3. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.....	17
4. Diagrama de flujo para el aislamiento de microorganismos.....	20
5. Velocidad de reacción con la concentración de biomasa.....	23
6. Tinción Gram de cepas resultantes de selección de <i>Pseudomonas sp</i> .....	26
7. Cinética de crecimiento de cepa <i>P. fluorescens</i> .....	28
8. Datos de transmitancia a diferentes concentraciones de Mn con respecto al tiempo con biomasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	29
9. Datos de transmitancia a diferentes concentraciones de Zn con respecto al tiempo con biomasa de <i>Pseudomonas Fluorescens</i> .....	29
10. Efecto inhibitorio de la concentración del Mn sobre la velocidad de crecimiento de la biomasa a 48 horas.....	31
11. Efecto inhibitorio de la concentración del Zn sobre la velocidad de crecimiento de la biomasa a 48 horas.....	32
12. Coeficiente específico de crecimiento, manganeso y zinc.....	33
C-1. Datos de absorbancia contra tiempo obtenidos en la cinética de crecimiento de la cepa <i>P. fluorescens</i> .....	38
D-1. Gráfico que expresa la velocidad de crecimiento de la cepa con respecto a la concentración de manganeso (mg/L).....	41
E-1. Gráfico que expresa la velocidad de crecimiento de la cepa con respecto a la concentración de zinc (mg/L).....	43
F-1. Curvas estándares de nefelómetro con transmitancia (%) y densidad celular (Monge 2009).....	44
F-2. Gráfico que expresa la etapa exponencial de la cinética de Crecimiento de <i>P. fluorescens</i> a 150 mg/L.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Localización geográfica de las estaciones de muestreo en el Río San Pedro.....	18
II. Condiciones de pH, temperatura y concentración de Mg y Zn de la (E1) y (E2).....	24
III. Morfología colonial bacteriana de las cepas aisladas.....	25
IV. Pruebas bioquímicas para <i>Pseudomonas sp.</i> .....	27
A-1. Composición del sedimento.....	35
B-1. Tinción Gram y morfología de cepas aisladas de la Estación 1 (E-1)....	36
B-2. Tinción Gram y morfología de cepas aisladas de la Estación 2 (E-2)....	37
C-1. Datos de Cinética de Crecimiento a 7 horas.....	38
C-2. Resultados obtenidos de la cinética de crecimiento basados en la escala de nefelómetro de McFarland.....	38
D-1. Resultados de transmitancia a 600 nm obtenidos de la cinética de toxicidad de manganeso a diferentes concentraciones.....	44
D-2. Resultados de absorbancia a 600 nm obtenidos de la cinética de toxicidad de zinc a diferentes concentraciones.....	40
E-1. Resultados de transmitancia a 600 nm obtenidos de la cinética de toxicidad de manganeso a diferentes concentraciones.....	42
E-2. Resultados de absorbancia a 600 nm obtenidos de la cinética de toxicidad de zinc a diferentes concentraciones.....	42
F-1. Estándares del nefelómetro de McFarland.....	44
F-2. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomona fluorescens</i> a 150 mg/L.....	45



## RESUMEN

Los metales son emitidos a la atmósfera, descargados sobre el suelo ó en las aguas residuales y acumulados finalmente en los sedimentos. En el país existen una gran cantidad de sitios contaminados por metales pesados y residuos provenientes de la industria minera. El grado de toxicidad potencial de los metales pesados depende de la propia naturaleza del metal y de su disponibilidad en el ambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética de toxicidad de manganeso (Mn) y zinc (Zn) con *Pseudomonas sp.* aisladas de sedimentos contaminados del Río San Pedro. El muestreo de sedimentos fue realizado en el Río San Pedro, localizado al norte del estado de Sonora, México, entre los paralelos 30 ° 52 ' y 31 ° 20' latitud norte y entre 110 ° 06 ' y 110 ° 31' longitud oeste. Para el aislamiento de microorganismos se tomaron muestras de 8 g de sedimentos con 90 mL de caldo nutritivo incubándose a 35°C por 48 horas y 100 rpm. Se logró aislar 38 bacterias y 9 levaduras. A las cepas aisladas e identificadas como del género *Pseudomonas sp* se les realizaron pruebas bioquímicas, y fueron identificadas como *P. flourescens*, *P. mallei* y *P. maltophilia*. La cinética de crecimiento fue con la cepa seleccionada de *Pseudomonas flourescens*, y con esta se llevó a cabo la cinética de toxicidad de Mn y Zn, a diferentes concentraciones iniciales (0, 10 20, 50, 80, y 150 mg/L) en matraces de 250 mL y pH 6, los matraces fueron colocados en incubadora con agitación a 100 rpm y 35 °C. La curva de crecimiento se realizó con *P. flourescens* y se determinó la toxicidad en términos de concentración inhibitoria ( $CI_{20,50,80}$ ) para manganeso y zinc. El estudio de toxicidad muestra que la biomasa es inhibida en un 50% a 70 mgMn/L y 68.5 mgZn/L, y un 20% a 20 mgMn/L y 15 mgZn/mL. En conclusión se puede decir que es recomendable utilizar *Pseudomona flourescens* aisladas del Río San Pedro para la biosorción de manganeso y zinc a concentraciones cercanas a los 70 mgMn/L y 68.5 mgZn/L.

## I. INTRODUCCIÓN

Los agentes contaminantes, son un conjunto de factores o sustancias que están presentes en el medio ambiente y que causan efectos desfavorables para la salud o el medio ambiente, suelen distinguirse por: agentes biológicos, agentes físicos, y agentes químicos (Lucho *et al.*, 2005).

La contaminación del agua, aire y suelo por metales pesados es uno de los problemas ambientales más severos, además de ser muy difícil de resolver. Las fuentes más comunes de contaminación por dichos metales son los procesos de petróleo, las plantas generadoras de energía y los procesos metalúrgicos (Acosta *et al.*, 2007).

En las últimas cinco décadas, los metales pesados se han convertido en contaminantes ambientales de primera importancia, principalmente por el incremento y la diversificación de los procesos industriales (Lucho *et al.*, 2005).

Los metales son emitidos a la atmósfera, descargados sobre el suelo ó en las aguas residuales y acumulados finalmente en los sedimentos (Sternbeck y Óstlund, 2001).

Los metales pesados en el sedimento, se presentan en diversas formas geoquímicas, que tienen distinta movilidad, toxicidad biológica y comportamiento químico (Tejeda *et al.*, 2005).

En el país existen una gran cantidad de sitios contaminados por metales pesados y residuos, provenientes de la industria minera. Hasta la fecha los trabajos realizados para la recuperación y remediación de estos sitios en México, han sido sumamente escasos, razón por la cual es de gran importancia que instituciones de investigación evalúen y desarrollen alternativas tecnológicas, acordes a las

condiciones específicas de cada sitio, que permitan su remediación a través de la remoción y/o estabilización de los contaminantes inorgánicos (Volke *et al.*, 2004).

Un ejemplo de lo anterior se encuentra en el estado de Sonora, donde por varias décadas, se ha explotado principalmente plata (Ag) y cobre (Cu). Los distritos mineros más explotados en el estado se ubican en el municipio de Cananea, donde se han realizado estudios de calidad de agua superficial del río San Pedro durante los años 1997 y 1999, desde su origen cerca de la ciudad de Cananea, Sonora, México hasta el límite con Estados Unidos de América (Gómez-Álvarez *et al.*, 2004) y recientemente Gómez-Álvarez *et al.*, (2007) han realizado estudios sobre la evaluación de metales pesados entre ellos cadmio (Cd), cobre (Cu), fierro (Fe), manganeso (Mn), plomo (Pb), zinc (Zn), en los sedimentos del río San Pedro.

Los microorganismos son una alternativa potencial sobre los procesos convencionales para la recuperación de metales de soluciones industriales, este fenómeno es conocido como biosorción y se refiere a las interacciones fisicoquímicas entre la biomasa microbiana y el metal pesado. Se han detectado bacterias de ambientes mineros, como las del género *Pseudomonas*, que presentan resistencia a metales pesados como cadmio (Cd), cobre (Cu) y plomo (Pb) (Rivas *et al.*, 2004).

Por tal motivo, en el presente estudio se generó información científica que da a conocer que tan viable es el biorremediar sedimentos con *Pseudomonas sp*, para metales pesados (Mn y Zn). Para ello, se realizaron muestreos en sedimentos del Río San Pedro con el propósito de aislar y purificar microorganismos aerobios e identificar y seleccionar *Pseudomonas sp* para llevar a cabo la curva de crecimiento y cinética de toxicidad de las cepas. Este estudio puede permitir el desarrollo de metodologías y estrategias relacionadas para la limpieza de sedimento contaminado con diferentes metales utilizando *Pseudomonas sp*.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar la cinética de toxicidad de manganeso (Mn) y zinc (Zn) con *Pseudomonas sp* aisladas de sedimentos contaminados del Río San Pedro.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Aislar y purificar los microorganismos aerobios presentes en las muestras de sedimentos contaminados del Río San Pedro.
- Identificar y seleccionar *Pseudomonas sp* de acuerdo a sus propiedades bioquímicas.
- Determinar la cinética de crecimiento de *Pseudomonas sp*.
- Evaluar la cinética de toxicidad de los metales Mn y Zn en sistema batch con *Pseudomonas sp*.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Contaminación de sedimentos

El sedimento es aquella materia orgánica e inorgánica en partículas que se acumula de una manera suelta, sin consolidar. Puede precipitarse químicamente a partir de una solución, segregada por organismos o transportada por el aire, el hielo, el viento o el agua depositada (Espino *et al.*, 2007).

Un sedimento contaminado puede ser definido como aquel material acumulado en el fondo de cuerpos de agua conteniendo sustancias químicas que se encuentran en exceso, en relación a criterios geoquímicos y/o toxicológicos de calidad, o que pueden tener efectos adversos en el ambiente o en la salud humana (Burton, 2002).

Los cuerpos de agua reciben directa o indirectamente descargas de contaminantes como consecuencia de las diferentes actividades antrópicas que tienen lugar en las cercanías de los mismos. Cuando los desechos tóxicos son vertidos a un cuerpo de agua, dichos compuestos se dividen entre la fase acuosa y la fase particulada, y son éstas formadoras de sedimentos a lo largo del tiempo (Rand *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 2006). De esta manera los sedimentos se comportan como aceptores finales de contaminantes pudiendo actuar como fuentes secundarias de contaminación (Burton, 2002). Los contaminantes asociados a los sedimentos pueden ser resuspendidos de forma natural, por procesos físicos o biológicos (bioturbación), o por la actividad humana, tal como frecuentemente ocurre en la actividad de dragado (USEPA, 1998; Sprovieri *et al.*, 2007). Estos mecanismos generan la removilización y redistribución de los contaminantes a la columna de agua desde los sedimentos (Walker *et al.*, 2006; Hill, 2010).

### **3.1.2 Contaminación de sedimentos por metales pesados**

Las actividades humanas producen diferentes tipos de vertidos que incrementan la concentración de metales en los sedimentos fluviales. Según su forma de asociación los metales son susceptibles o no de solubilizar durante las modificaciones fisicoquímicas estacionales (Falaki *et al.*, 2004).

La contaminación de los sedimentos ocurre principalmente debido a que muchos compuestos químicos se unen a partículas orgánicas o inorgánicas que eventualmente se sedimentan en el fondo de arroyos, ríos, lagos, estuarios o aguas marinas. Una vez que los contaminantes se unen a partículas superficiales o se adsorben en su matriz interior comienzan a biotransformarse y disolverse de manera lenta. Sin embargo, los contaminantes adsorbidos podrían permanecer por largos períodos de tiempo en el sedimento. Los contaminantes asociados a los sedimentos tienden a acumularse en partículas pequeñas de pequeño tamaño de grano y se sedimentan en áreas de depósito. Los sedimentos son extremadamente importantes para las cadenas tróficas y sirven como hábitat para las comunidades bénticas, así como reservorios contaminantes para la bioacumulación y transferencia trófica (Burton y Landrum, 2003).

Los sedimentos son quizás los componentes más importantes de los ecosistemas acuáticos ya que son el sitio principal de los ciclos biogeoquímicos y la base para las redes tróficas. Pueden actuar como portadores y posibles fuentes de contaminación porque los metales pesados no se quedan permanentemente y pueden ser liberados a la columna del agua por cambios en las condiciones ambientales tales como pH, potencial redox, oxígeno disuelto o la presencia de quelatos orgánicos (Rodríguez *et al.*, 2008). En ríos contaminados por metales - metaloides, los sedimentos consisten en una mezcla compleja de varias fases geoquímicas que contienen metales potencialmente tóxicos debido a su resistencia a la descomposición química. Estos metales son almacenados en los sedimentos bajo unas condiciones determinadas, y en caso de alteración de las

condiciones físico sistema es posible que los metales almacenados sean liberados y produzcan un impacto ambiental. Cabe destacar que en el caso de los impactos producidos 5, que acabarán depositándose en los sedimentos de los ríos (Vaithiyanathan *et al.*, 1993; Raju *et al.*, 2013). En los últimos años, se han publicado diversos estudios sobre metales tóxicos acumulados en sedimentos y sus posibles efectos ecológicos y sobre la salud humana.

### **3.2 Metales pesados**

Metales pesados son aquellos que, en concentraciones por encima de determinados límites, pueden producir efectos negativos en la salud humana, flora o fauna.

Son un grupo de elementos traza de gran interés. Algunos pueden ser esenciales para la vida, aunque también pueden causar daño a diferentes organismos vivos, como seres humanos, microorganismos, plantas y animales, cuando se encuentran en niveles altos en el medio ambiente (Volke *et al.*, 2004).

Constituyen un grupo de aproximadamente 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm<sup>3</sup> en su forma elemental. Estos están conformados por 38 elementos, pero son 12 los considerados tóxicos y que son descargados como parte de una serie de residuos al medio ambiente: cadmio (Cd), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), fierro (Fe), plata (Hg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plomo (Pb), estaño (Sn) y zinc (Zn).

El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados, es que aun cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el magnesio (Mg), calcio (Ca), vanadio (V), manganeso (Mn), fierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn) y molibdeno (Mo), se ha reportado que también tienen efectos tóxicos para las células, al estar en concentraciones superiores a las fisiológicas

normales, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Cañizares-Villanueva, 2000).

### **3.2.1 Toxicidad de los metales pesados**

Los metales pesados, están considerados como uno de los grupos más peligrosos debido a su no biodegradabilidad, su alta toxicidad a bajas concentraciones y su capacidad para acumularse en diferentes organismos (Reyes *et al.*, 2006).

El grado de toxicidad potencial de los metales pesados depende de una serie de factores. En primer lugar, depende de la propia naturaleza del metal y también de su disponibilidad en el ambiente. Atendiendo a estos dos factores, se clasificaron los metales en tres categorías:

No críticos: fierro (Fe), manganeso (Mn) y aluminio (Al).

Tóxicos pero muy insolubles: titanio (Ti), hafnio (Hf), niobio (Nb), tantalio (Ta), renio (Re), galio (Ga), rodio (Rh), iridio (Ir), rutenio (Ru) y bario (Ba).

Muy tóxicos y relativamente disponibles: berilio (Be), cobalto (Co), níquel (Ni), zinc (Zn), estaño (Sn), cromo (Cr), arsénico (As), selenio (Se), telurio (Te), paladio (Pd), plata (Ag), cadmio (Cd), platino (Pt), oro (Au), mercurio (Hg), talio (Tl), plomo (Pb), antimonio (Sb) y bismuto (Bi).

Otros factores que influyen en la toxicidad del elemento, son entre otros el estado molecular que presenta el metal, el tiempo de residencia en el sistema, el pH, el potencial redox del ambiente, los iones inorgánicos presentes en las aguas, la temperatura y diversos factores biológicos (Juviña y Torres, 2005).

### **3.2.3 Manganeso**

Elemento químico, símbolo Mn, de número atómico 25 y de peso atómico 54.938. Es uno de los metales de transición del primer periodo largo de la tabla periódica;



se encuentra entre el cromo y el hierro. Tiene propiedades en común con ambos metales. Aunque poco conocido o usado en su forma pura, reviste gran importancia para la práctica en la fabricación del acero (Lenntech, 2014).

Es un elemento bastante abundante en la naturaleza, donde alcanza un porcentaje de masa alrededor del 0.11%. Como ocurre con la mayoría de los metales no se encuentra libre, el principal compuesto natural es la pirolusita o dióxido de manganeso ( $MnO_2$ ). Es un metal reductor, se disuelve en ácidos no oxidantes desprendiendo hidrógeno. Recuerda también en su comportamiento a los metales alcalinos y alcalinotérreos, ya que en contacto con agua se oxida lentamente produciendo desprendimiento de  $H_2$ . El manganeso es uno de los elementos que presenta mayor número de estados de oxidación estables, por eso, los compuestos de manganeso son muy variados (Caselles *et al.*, 2010).

La disponibilidad del manganeso depende del potencial de óxido reducción y del pH del suelo, encontrándose en mayor porción en la solución del suelo bajo condiciones reductoras y/o en suelos con valores de pH ácidos. La reducción del manganeso en los suelos se efectúa por medio de bacterias anaerobias (Riojas, 2004). Los límites máximos permisibles que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 para la concentración de manganeso en el agua es de 0.15 mg/L.

### **3.2.4 Zinc**

Elemento químico de símbolo Zn, número atómico 30 y peso atómico  $65.37 \text{ g mol}^{-1}$ . Es un metal maleable, dúctil y de color gris. Se conocen 15 isótopos, cinco de los cuales son estables y tienen masas atómicas 64, 66, 67, 68 y  $70 \text{ g mol}^{-1}$ . Cerca de la mitad del zinc común se encuentra como isótopo de masa atómica 64.

Es uno de los elementos menos comunes; se estima que forma parte de la corteza terrestre en un 0.0005-0.02%. Ocupa el lugar 25 en orden de abundancia entre os

elementos. Su principal mineral es la blenda, marmatita o esfalerita de zinc, ZnS. Es un elemento esencial para el desarrollo de muchas clases de organismos vegetales y animales (Lenntech, 2014; Hernández-Mata, 2013).

Ocurre de forma natural en el aire, agua y suelo, pero las concentraciones están aumentando por causas no naturales, debido a la adición de zinc a través de las actividades humanas. La mayoría del zinc es adicionado durante actividades industriales, como es la minería, la combustión de carbón y residuos y el procesado del acero. La producción mundial de zinc está todavía creciendo. Esto significa básicamente que más y más zinc termina en el ambiente. El agua es contaminada con zinc, debido a la presencia de grandes cantidades de zinc en las aguas residuales de plantas industriales. Estas aguas residuales no son depuradas satisfactoriamente. Una de las consecuencias es que los ríos están depositando fango contaminado con zinc en sus orillas (Lenntech, 2014; Gómez-Álvarez, 2008).

El Zinc es considerado tóxico en cantidades que varían entre 100 y 500 mg por día (Volesky y Holan, 1995). En suelo, permanece formando compuestos insolubles, y se moviliza a pH neutro o ácido (Volke *et al.*, 2005). La Norma NOM-001-SEMARNAT-1996, establece para el zinc en suelo y ríos, en uso en riego agrícola en promedio mensual de 10 mg/L y de 20 mg/L promedio diario.

### **3.3 Biorremediación**

La biorremediación es una técnica de descontaminación muy utilizada actualmente. Se basa en el uso de diferentes organismos (plantas, levaduras, hongos, bacterias, para neutralizar sustancias tóxicas, bien transformándolas en sustancias de carácter menos tóxico o bien convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Este tipo de tratamiento puede ser muy

efectivo en la eliminación de compuestos orgánicos tóxicos y biodegradables en suelos y aguas residuales (Gómez *et al.*, 2008).

### **3.3.1 Proceso de biosorción de metales pesados**

El término de biosorción se utiliza para referirse a la captación de metales que llevan diferentes microorganismos (vivos o muertos), a través de mecanismos fisicoquímicos como la absorción o el intercambio iónico. Cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir en el proceso. El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente) y una fase líquida (solvente, que es normalmente el agua), que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, como iones metálicos). Debido a la gran afinidad del sorbente por las especies del sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido. La afinidad del sorbente por el sorbato determina su distribución entre fases sólidas y líquidas. La calidad del sorbente está dada por la cantidad del sorbato que puede atraer y retener en forma inmovilizada. El potencial para la biosorción de metales por biomasa, ha quedado bien establecido. Algunos tipos de biomasa que absorben metales en cantidades elevadas, sirve como base para los procesos de biosorción de metales, previendo su uso particularmente como medio muy competitivo para la destoxificación de efluentes industriales, que contienen metales y para la recuperación de metales preciosos (Cañizares-Villanueva, 2000).

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el Cd, Cr, Pb, Ni, Zn y Cu. Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. Esto minimiza los costos en un proceso de remediación, ya que no requiere el agregado de nutrientes al sistema,

al no requerir un metabolismo microbiano activo. La biomasa capaz de participar en estos procesos es fácilmente extraíble de sistemas acuosos como cursos de aguas o efluentes de diversos orígenes, por lo que el proceso global de biorremediación sería rentable. Es por ello que la búsqueda de este tipo de microorganismos se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de sistemas biosorbentes, como por ejemplo, la utilización de consorcios microbianos, o sistemas mixtos formados por microorganismos y macromoléculas (polímeros) sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de metales pesados (Vullo, 2003).

Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos, pertenecientes a la superficie celular (Figura 1). Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo. Es un mecanismo de cinética rápida, que no presenta una alta dependencia con la temperatura y en muchos casos, puede estudiarse en detalle mediante la construcción de los modelos de isothermas de Langmuir y Freundlich (Vullo, 2003).

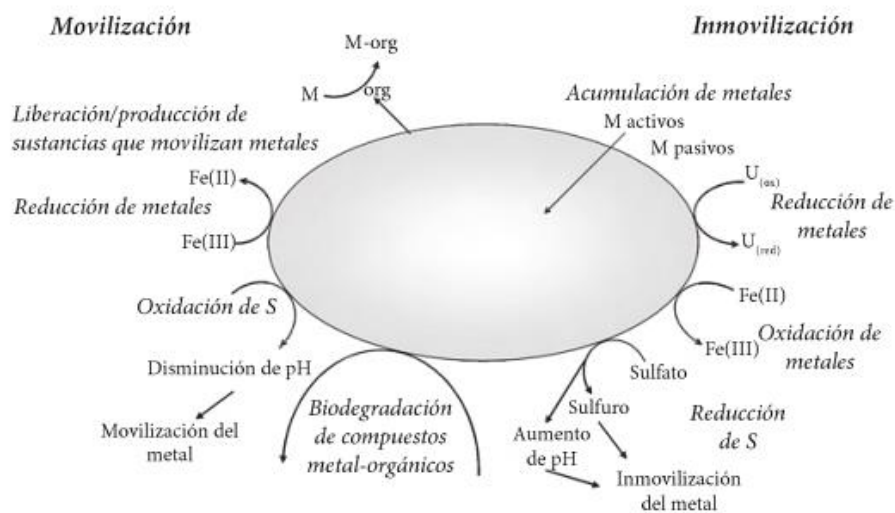


Figura 1. Interacción entre metales y microorganismos  
Fuente: INE, 2005.

El objetivo de la biosorción se centra en dos necesidades que surgen de las actividades mineras: Proteger el medio ambiente de los metales tóxicos contenidos en los efluentes líquidos, eliminándolos en los residuos, previo a su disposición, para recuperar los metales que se encuentran en baja concentración en los procesos mineros. Estos objetivos los sustentan razones de orden legal, social y productivo en los países industrializados, la toxicidad de los denominados metales pesados, confirma su impacto sobre el medio ambiente y la salud de las poblaciones. En estas circunstancias, la búsqueda de tecnologías para la eliminación y recuperación metálica, se orienta por criterios de eficiencia y bajo costo. La ventaja de la biosorción está en que cumple con estos requisitos: Es una tecnología limpia; utiliza materiales naturales o los residuos de la industria (utilizando productos crudos, no sintéticos), es al mismo tiempo una técnica de fácil implementación (Flores *et al.*, 2001).

### **3.3.2 Bacterias en la descontaminación**

Los microorganismos se utilizan ampliamente en el tratamiento biológico de residuos sólidos y líquidos (Atlas y Bartha, 2002). Es importante observar a los microorganismos empleados en el tratamiento biológico como una asociación, una comunidad o un consorcio (Eweis *et al.*, 1999).

Las bacterias son un grupo extremadamente diverso de organismos con variaciones extensivas de las propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas, que debido a su diversidad, se encuentran regularmente en comunidades heterogéneas.

Los microorganismos son una alternativa potencial sobre los procesos convencionales para la recuperación de metales de soluciones industriales, este fenómeno es conocido como biosorción y se refiere a las interacciones fisicoquímicas entre la biomasa microbiana y el metal pesado (Rivas *et al.*, 2004).

En los últimos años, la tecnología de biosorción, basada en la habilidad de ciertas biomazas de capturar especies metálicas de soluciones acuosas, ha recibido especial atención por su potencialidad para el tratamiento de aguas residuales (Volesky, 1999). Varios estudios han demostrado que la biomasa de diferentes especies de bacterias, hongos y algas es capaz de concentrar en su estructura iones metálicos que se encuentran en ambientes acuáticos (Basso *et al.*, 2002). Se han detectado bacterias de ambientes mineros, como las del género *Pseudomonas*, que presentan resistencia a metales pesados como Cd, Cu y Pb (Rivas *et al.*, 2004).

En otras investigaciones se tiene conocimiento de cepas microbianas que tienen la capacidad de biorremediar suelos contaminados con distintos metales y compuestos orgánicos.

Leung *et al.*, (2000) aislaron especies de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Aeromonas* de efluentes industriales y aguas residuales municipales para llevar a cabo la biosorción de metales pesados y reportan a *Pseudomonas cepacia* como una de las cepas que tiene buena capacidad de biosorción de cobre y plomo. En estudios de suelos contaminados tanto con metales pesados como con contaminantes orgánicos, utilizando los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Arthrobacter*, se ha encontrado que resisten distintas concentraciones de cadmio. Algunas especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* presentan un mecanismo de acumulación intracelular del metal, con una resistencia de hasta 225 y 275 µg/mL, respectivamente, mientras que otras especies de *Pseudomonas* y *Arthrobacter* resisten una concentración de 20 y 50 µg/mL del metal, respectivamente, formando una pared polimérica extracelular a la cual se une el metal (Mijares, 2003).

Perez-Silva *et al.*, (2009), utilizaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de sitios contaminados con petróleo para la biosorción de cromo, cobre, manganeso, zinc dando resultados idóneos para el tratamiento de metales pesados .

### 3.3.2.1 *Pseudomonas sp.*

*Pseudomonas sp.* es un bacilo Gram negativo aerobio, no formador de esporas. Puede presentar de 1.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, y un diámetro de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$ . Las especies de este género son móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares. La mayoría de las células de *P. aeruginosa* presentan un único flagelo polar, aunque en algunas ocasiones se han observado algunos aislados con dos o tres flagelos. La movilidad les permite responder a estímulos químicos (quimiotaxis) así como localizar substratos en bajas concentraciones (Palleroni *et al.*, 2001).

Es oxidasa y catalasa positiva. La mayoría de las especies del género, no crecen bajo condiciones ácidas (pH 4.5 o menor). Crecen en agar MacConkey, como no fermentadores de lactosa. Poseen un metabolismo aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando nitrato ( $\text{NO}_3$ ) o la arginina como aceptores finales de electrones (Palleroni *et al.*, 2001).

Cuando crecen en medio líquido se puede observar la formación de una película superficial, que refleja la preferencia de este microorganismo por las condiciones aeróbicas. Puede oxidar la glucosa y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno gas. El género *Pseudomonas* es muy versátil nutritivamente, y algunas especies pueden utilizar carbohidratos, alcoholes y aminoácidos como fuente de carbón. La mayoría de las especies tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos con elevado contenido de sales, y en un rango de temperatura de entre 40-42°C. (Palleroni *et al.*, 2001).

Tienen la capacidad de producir morfologías coloniales distintivas y pigmentadas. Algunas cepas forman una cápsula polisacáridica que hace que las colonias sean mucosas. El crecimiento confluyente, a menudo, presentan un brillo metálico y olor a fruta (Meyer *et al.*, 2002).

### 3.4 Curvas de crecimiento

Si se coloca una bacteria en un ambiente propicio para su desarrollo y se trata de esquematizar en un gráfico de coordenadas el número de bacterias presentes en un lapso determinado, se aprecia que el gráfico describe una curva que no es igual para todas ellas, aunque pueden distinguirse distintas fases (Negroni, 2009).

Las curvas de crecimiento microbiano, de forma general, poseen cuatro fases en el tiempo (Figura 2) (Fontúrbel e Ibañez, 2004; Henry y Heinke, 1999):

- A. Fase de latencia: Las células se ajustan a su nuevo medio. Puede ser que les falte ciertas enzimas o coenzimas necesarias para metabolizar los nutrientes circundantes. Por consiguiente, las células deben sintetizar estas enzimas. A medida que se forma nuevo protoplasma las células individuales aumentan de tamaño más allá de sus límites normales. Cuando este período ha terminado, la célula puede dividirse y comenzar a reproducirse de manera normal.
  
- B. Fase de crecimiento logarítmico (fase exponencial): La población se duplica a intervalos regulares. En condiciones óptimas éste es el periodo de más rápido crecimiento. Durante este periodo la población bacteriana tiene la máxima uniformidad en términos de composición química, tasas metabólicas y otras características fisiológicas. Es obvio que esta fase de crecimiento no puede continuar de manera indefinida porque la provisión de alimento es limitada, y las células comienzan a morir. Esto da por resultado una disminución de la velocidad de crecimiento hasta que la misma alcanza un valor de cero.
  
- C. Fase de crecimiento menguante (fase estacionaria): El número de células que se producen es igual a las que mueren, se alcanza un equilibrio dinámico, en el cual la población ya no aumenta. La razón de la interrupción



de la fase de crecimiento casi siempre es el agotamiento de uno o más nutrientes.

D. Fase endógena (fase de muerte): Se alcanza cuando la tasa de mortalidad comienza a superar la velocidad de crecimiento. Además del agotamiento de nutrientes, se acumulan en el medio subproducto tóxico del metabolismo celular, inhibiendo así el crecimiento (Henry y Heinke, 1999).

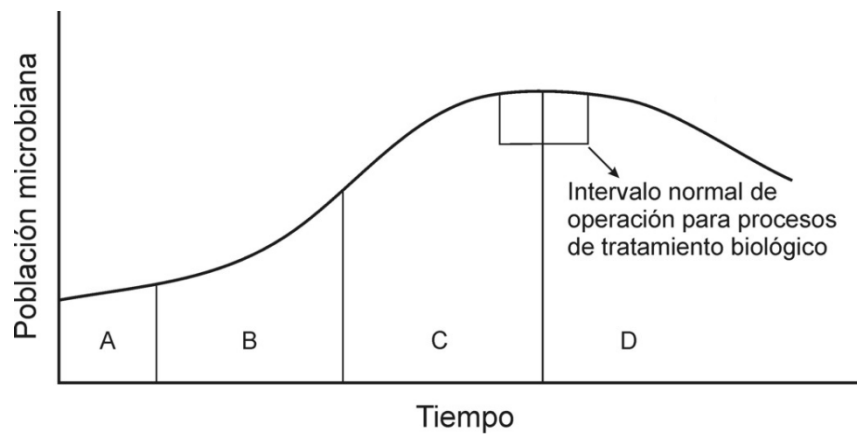


Figura 2. Crecimiento microbiano en un cultivo discontinuo  
Fuente: Fontúrbel e Ibañez (2004)

#### IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología utilizada se detalla en el diagrama esquemático de la Figura 3:

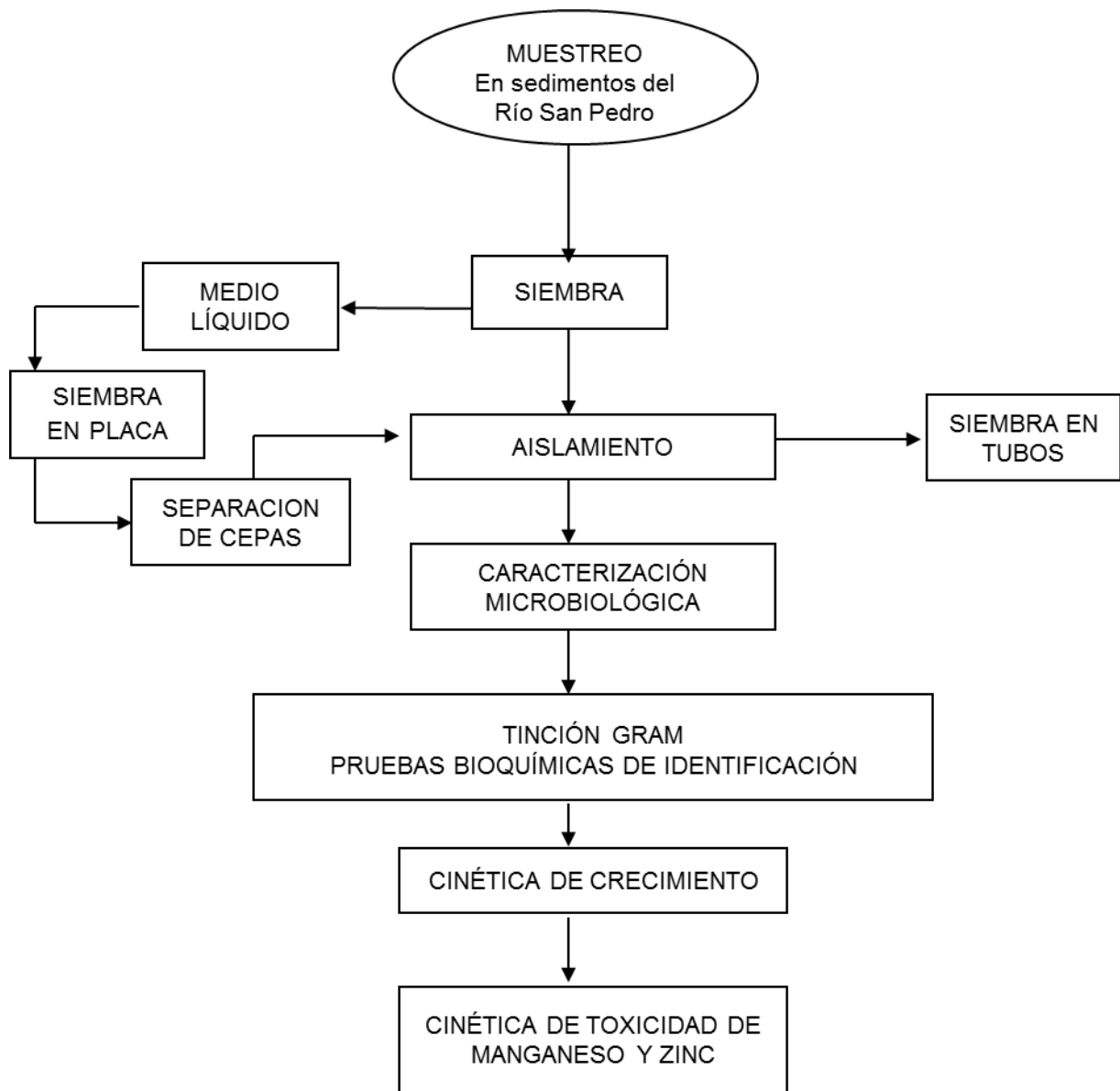


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.

## 4.1 Muestreo y análisis

### 4.1.1 Muestreo

El muestreo de sedimentos fue realizado en el Río San Pedro, localizado al norte del estado de Sonora, México, entre los paralelos 30 ° 52 ' y 31 ° 20' latitud norte y entre 110 ° 06 ' y 110 ° 31' longitud oeste. Partiendo desde la ciudad de Cananea, en el Estado de Sonora, a 1660 metros sobre el nivel del mar (MSNM) y hacia el norte, hasta la estación hidrométrica Palominas en el estado de Arizona (EUA), aproximadamente a 1280 MSNM (INEGI, 1993).

El muestreo realizado el día 6 de febrero de 2015 fue de tipo vertical con perforadores para obtener el núcleo de perfil de suelo. El muestreo correspondiente en dos diferentes estaciones jale (E-1) y mezcla (E-2), la muestra de sedimento se colectó mediante perforadores tomando núcleos de sedimento, de manera posterior se depositó la muestra utilizando recipientes de plástico limpios y descontaminados, se le analizó inmediatamente el pH y temperatura. En la Tabla 1 se encuentra la localización geográfica de las estaciones de muestreo en el Río San Pedro.

Tabla I. Localización geográfica de las estaciones de muestreo en el Río San Pedro.

<b>Estación</b>	<b>Nombre</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
E-1	Jales	30°59`34”	110°18`33”
E-2	Mezcla	30°59`19”	110°18`09”.

### 4.1.2 Determinaciones analíticas de temperatura y pH

Las muestras de sedimento fueron tomadas de las estaciones 1 y 2, y se les realizaron lecturas de pH y temperatura *in situ*, posteriormente fueron almacenadas en recipientes limpios y descontaminados para su transporte en

hielo hacia el laboratorio de Biorremediación de la Universidad de Sonora-Hermosillo para su análisis.

## **4.2 Desarrollo de microorganismos**

### **4.2.1 Aislamiento**

Para el aislamiento de bacterias se hicieron siembras en un medio general para su desarrollo, como es el caldo nutritivo para enriquecer las muestras en matraz Erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de caldo nutritivo y 8 gramos de sedimento incubándose a 35°C por 48 horas y 100 rpm.

Por la técnica de siembra por estría se agregó 1mL de muestra de cultivo crecido de 48 horas y fueron incubados en un periodo de 24 horas, la siembra se realizó en los medios de cultivo específicos seleccionados: agar nutritivo BD (marca Bioxon); agar EMB (Eosina Azul de Metileno) (marca Bioxon) para *Enterobacterias*; agar *Pseudomonas* (marca Difco) para *Pseudomonas sp*; mientras que para el aislamiento de hongos y levaduras se realizó la incubación a 22° C en incubadora (Modelo 1500E VWR Scientific), en agar APD (Agar Papa Dextrosa) (Marca Difco).

De los cultivos en placa que presentaron crecimiento se tomaron los que tuvieron forma diferente y se sembraron de manera sucesiva en otra placa nueva del mismo medio de donde fue obtenido para aislar las cepas hasta llegar a la purificación de la cepa bacteriana. Después de purificar las cepas, estas fueron resguardadas para su conservación por el método de congelación y posteriores análisis por transferencia periódica en tubos con tapa de rosca inclinados (agar en pico de flauta). La Figura 4 muestra el diagrama del aislamiento de microorganismos.

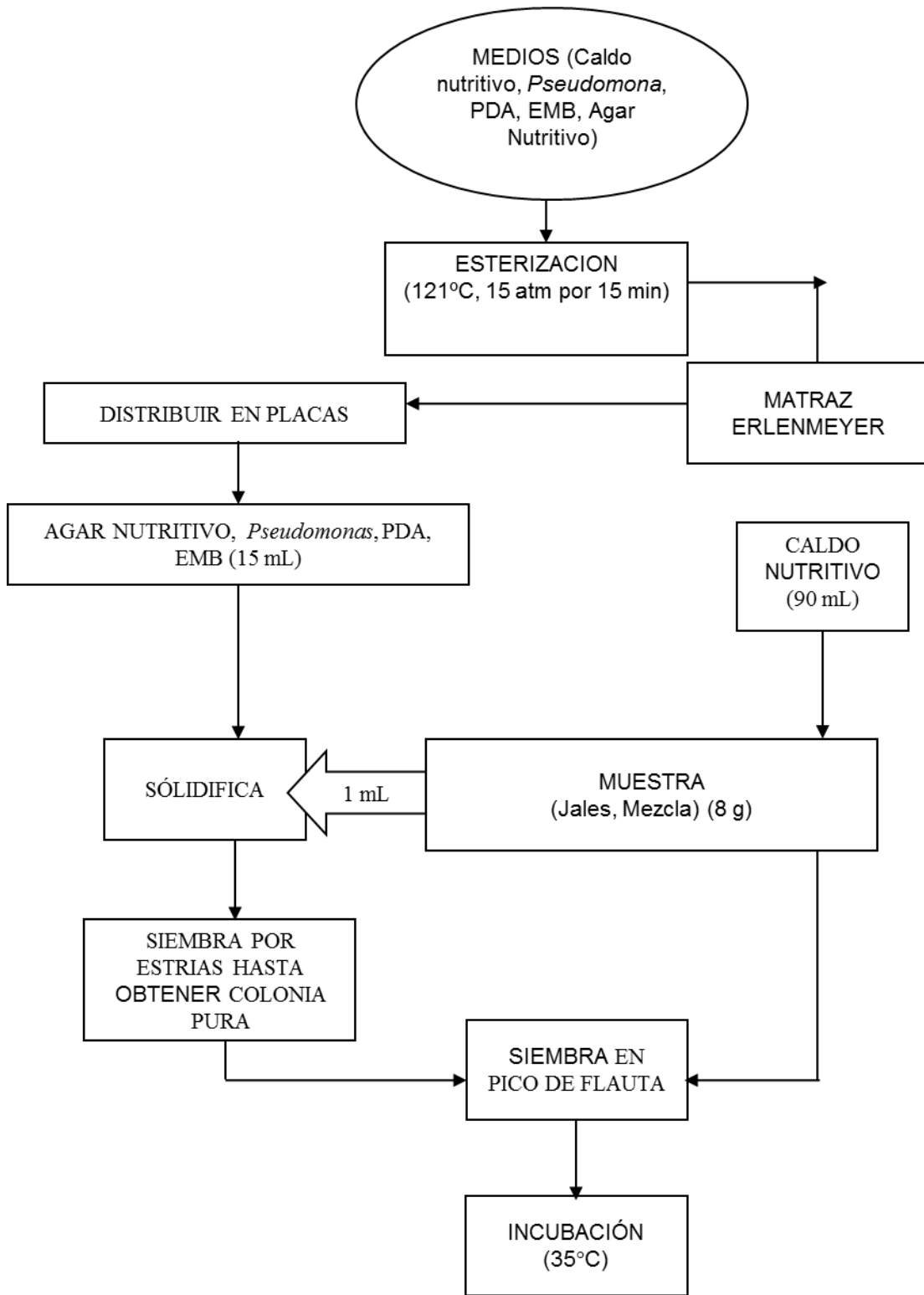


Figura 4. Diagrama de flujo para el aislamiento de microorganismos.

#### **4.2.2 Caracterización microscópica y macroscópica**

La caracterización microscópica se llevó a cabo por medio de tinción de Gram la cual se observó en microscopio, a las cepas aisladas que crecieron en agar nutritivo, EMB y Agar *Pseudomona*, y a los microorganismos que crecieron en PDA se consideran como hongos y levaduras, se les hicieron observaciones con colorante azul de lactofenol y solución salina, respectivamente, se observó en microscopio para ver forma, color y tamaño (Koneman *et al.*, 2003).

##### **4.2.2.1 Caracterización bioquímica de *Pseudomonas sp***

Con el fin de evaluar la actividad metabólica e identificación de las cepas seleccionadas, se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: producción de catalasa, oxidasa, motilidad, citrato de Simons, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Caldo de NaCl al 6.5%, y agar Mac Conkey (Koneman *et al.*, 2001; Mc Faddin, 2003). Para determinar la resistencia a bajo pH, este se modificó en los medios de cultivo de 3 a 6. El pH se midió con un potenciómetro (Fisher Scientific Accumet), se ajustó con NaOH 10 M (hidróxido de sodio) y HCl<sub>(ac)</sub> 10 M (ácido clorhídrico). Con estas pruebas se conocieron las especies de las cepas aisladas de *Pseudomonas sp*.

#### **4.3 Cinética de crecimiento**

Las bacterias pueden crecer exponencialmente bajo condiciones ideales para su desarrollo; el crecimiento depende del cultivo, especie, temperatura, pH y de grado de aireación. Mientras la densidad del cultivo se incrementa, la velocidad de reproducción va aumentando en la fase logarítmica y al final de esta fase la velocidad disminuye al iniciar la fase estacionaria (Leal, 2001)

El método turbidimétrico es un método indirecto para la estimación del contenido de microorganismos. El crecimiento del microorganismo inoculado en un tubo con caldo produce cierto grado de turbidez que varía con el desarrollo del

microorganismo. Se realizan mediciones de la turbidez en lapsos constantes de tiempo, lo que origina una curva de crecimiento en la cual se puede monitorear el desarrollo del microorganismo (Pelczar *et al.*, 1993).

Para el estudio de la cinética de crecimiento de las bacterias, se utilizaron 5 mL de cultivo de 24 h de las cepas seleccionadas y se inocularon en 90 mL de caldo nutritivo. Las condiciones fueron: pH de 6, a 35 °C y 100 rpm de agitación. Las muestras se leyeron cada 30 minutos en un espectrofotómetro visible (Spectronic 20D+) a 600 nm, sustituyendo las lecturas de transmitancia (%T) en la ecuación siguiente:

$$A = 2 - \log_{10} (\%T) \quad \text{Donde A, es la absorbancia.}$$

Las diferentes fases de la cinética de crecimiento se observan al graficar el log (%T) contra tiempo (Pelczar *et al.*, 1993).

Para conocer la cantidad de biomasa producida en células/mL se determinó con la tabla del nefelómetro de McFarland, descrita por Koneman *et al.* (1999) y Monge (2009) (Anexo 7).

#### **4.4. Concentración inhibitoria (CI<sub>20,50,80</sub>)**

La concentración inhibitoria, corresponde a la concentración de un compuesto tóxico, muestra o efluente que puede producir una reducción de una respuesta biológica en una población expuesta (Ramírez-Romero *et al.*, 2008).

Por tanto para evaluar el efecto tóxico de manganeso y zinc para estas bacterias es necesario determinar la concentración inhibitoria CI<sub>20,50,80</sub> que es la concentración de manganeso y zinc a la cual inhibe el 20, 50 y 80% del crecimiento de la biomasa.

En matraces Erlenmeyer de 125 mL, se agregaron 10 mL de biomasa, 90 mL de medio mineral con sulfato de manganeso monohidratado ( $\text{Mn SO}_4 \text{H}_2\text{O}$ ) y sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a diferentes concentraciones (0, 10, 20, 50, 80, y 150 mgMn/L o mgZn/L) a un pH de 6, los matraces fueron colocados en incubadora con agitación a 100 rpm y 35° C. La lectura de densidad poblacional se realizó en un espectrofotómetro cada 8 horas a 600 nm por 48 horas (Almendáriz, 2005).

#### 4.5 Constante de inhibición para la biomasa

Por analogía de la ecuación enzimática,  $\mu = \mu_0 / (1 + (\frac{I}{K_I}))$ , (Almendáriz-Tapia, 2001), fue posible determinar el valor de la constante de inhibición  $K_I$  del metal hacia el consorcio bacteriano.

La ecuación puede ser linealizada graficando  $(\frac{\mu_0}{\mu})$  contra la concentración del inhibidor ( $I$ ), donde  $(\mu_0)$  es la velocidad específica de crecimiento sin la presencia del inhibidor,  $(\mu)$  es la velocidad específica de crecimiento en presencia del inhibidor,  $(I)$  es el inhibidor y  $(K_I)$  es la constante de inhibición (Figura 5). Linealizando la ecuación se obtiene:

$$\frac{\mu_0}{\mu} = \frac{I}{K_I} + b$$

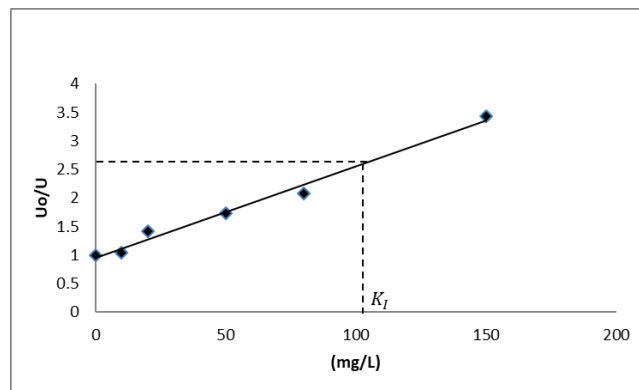


Figura 5. Velocidad de reacción con la concentración de la biomasa.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Muestreo de sedimentos

Del muestreo realizado, los resultados se presentan en la Tabla II, donde se muestran los valores a las cuales fueron tomadas las muestras.

Tabla II. Condiciones de pH, temperatura y concentración de Mg y Zn de la (E-1) y (E-2).

Estación	Nombre	pH	Temperatura	Concentración promedio (mgMn/L)	Concentración promedio (mgZn/L)
E-1	Jales	3.48	16.6°C	5.2450	3.5035
E-2	Mezcla	5.99	18.8°C	2.2800	2.1500

Los valores de pH de la E-1 fueron más ácidos, esto ya que el lugar está más cercano a la explotación minera, mientras que la muestra procedente de la E-2 presentó pH neutros debido a que son mezclas de la Estación 1 y de las aguas negras de la ciudad de Cananea, además este punto de muestreo se encuentra más alejado de los desechos industriales. Las temperaturas variaron debido a la época del año que se llevaron a cabo los muestreos del río.

#### 5.1.3 Aislamiento de microorganismos

Se aislaron 34 bacterias y 9 levaduras con diferente morfología colonial mismos que se purificaron por sucesivos pasos en agar nutritivo, PDA, EMB y Agar *Pseudomonas*. En la tabla III se presentan las principales características obtenidas en las cepas aisladas.

Se realizó una tinción Gram de las cepas aisladas, obteniendo como resultado bacilos, cocos y cocobacilos gramnegativos y grampositivos. En el Anexo B se

muestras las diferentes bacterias que fueron aisladas (Koneman *et al.*, 2001; Mc Faddin, 2003).

Tabla III. Morfología colonial bacteriana de las cepas aisladas.

<b>Según crecimiento en diferente agar</b>	<b>Características</b>	
Agar nutritivo	Forma:	Irregular
	Bordes:	Ondulado
	Elevación:	Plana
	Superficie:	Rugosa
	Consistencia:	Cremosa
	Color:	Blanco metálico y traslúcido
EMB	Forma:	Rizoide
	Bordes:	Filamentoso
	Elevación:	Plana
	Superficie:	Rugosa
	Consistencia:	Membranosa
	Color:	Verde, morado
<i>Pseudomonas</i>	Forma:	Irregular
	Bordes:	Ondulado
	Elevación:	Convexa
	Superficie:	Lisa
	Consistencia:	Cremosa
	Color:	Blanco metálico
PDA	Forma:	Irregular
	Bordes:	Ondulado
	Elevación:	Plana
	Superficie:	Rugosa
	Consistencia:	Membranosa
	Color:	Blanco opaco, café

## 5.2 Selección de cepas

### 5.2.1 *Pseudomonas sp.*

De las cepas aisladas de sedimentos del Río San Pedro se seleccionaron bacterias del género *Pseudomonas sp.* (Figura 6), resultado como la bibliografía lo indica bacilos gram negativo

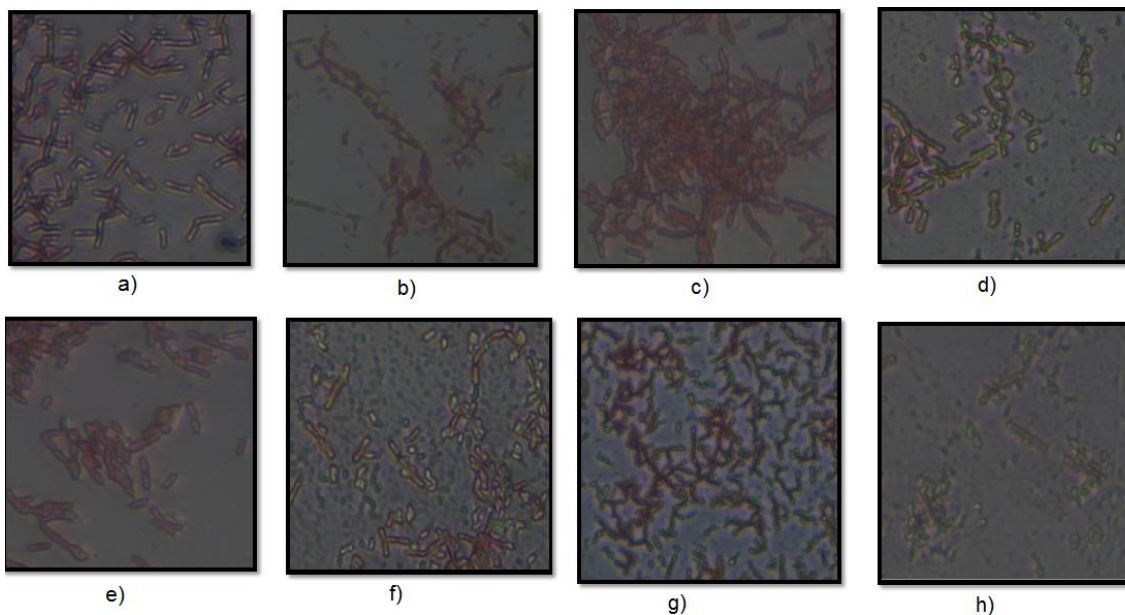


Figura 6. Tinción Gram de cepas resultantes de selección de *Pseudomonas sp.*  
a) *fluorescens*, b) *fluorescens*, c) *mallei*, d) *fluorescens*, f) *mallei*, g) *maltophilia*, h) *fluorescens*, g) *fluorescens*

#### 5.2.1.2 Identificación de *Pseudomonas sp.*

A las colonias aisladas se les realizó una coloración de Gram. Los bacilos Gram-negativos fueron los seleccionados para las siguientes bioquímicas: catalasa, C (Citrato), M (Motilidad), MC (MacConkey), O (Oxidasa), VP (Voges Proskauer), RM (Rojo de metilo), los resultados se muestran en la Tabla IV.

Mediante caracterización bioquímica, se identificaron *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mallei* y *Pseudomonas maltophilia* (Mac Faddin, 2003).

Tabla IV. Pruebas bioquímicas para *Pseudomonas sp.*

Cepa	Catalasa	O	Agar MC	C	VP	RM	Caldo NaCl	M	Resultado
1A	+	+	G	+	-	-	G	-	<i>fluorescens</i>
1B	+	+	G	+	-	-	NG	-	<i>fluorescens</i>
1D	+	+	G	-	-	-	NG	-	<i>mallei</i>
1E	+	+	G	+	-	-	NG	-	<i>fluorescens</i>
2A	+	+	G	-	-	-	NG	-	<i>mallei</i>
2D	+	-	G	+	-	-	NG	-	<i>maltophilia</i>
2C	+	+	G	+	-	-	NG	-	<i>fluorescens</i>
2E	+	+	G	+	-	-	NG	-	<i>fluorescens</i>

G: Crecimiento

NG: Crecimiento nulo

### 5.3 Cinética de crecimiento *P. fluorescens* utilizada como biomasa

La *P. fluorescens* fue la cepa más repetida y se seleccionó para llevar a cabo las pruebas de cinética de crecimiento, debido a que es necesario conocer la fase de crecimiento exponencial, ya que en este momento la bacteria se encuentra en su máximo periodo de desarrollo, por lo tanto, se obtuvo la curva de crecimiento de esta especie.

En la Figura 7, se muestra la cinética de crecimiento para la cepa *fluorescens* donde se observa que la fase exponencial empieza a los 30 minutos y termina las 4 horas.

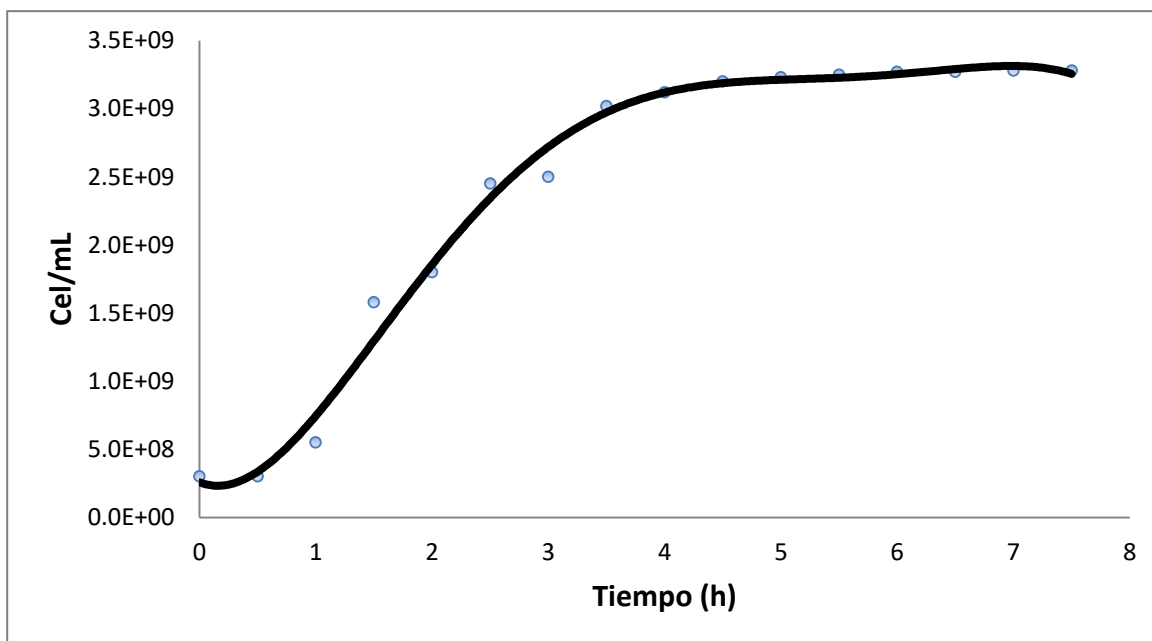


Figura 7. Cinética de crecimiento de cepa *P. fluorescens*.

#### 5.4 Efecto inhibitorio de manganeso y zinc con *P. fluorescens* utilizada como biomasa (CI<sub>20,50,80</sub>)

La CI<sub>20</sub> es la concentración de metal que causa una disminución del 20% de la actividad de crecimiento de los microorganismos, mientras que CI<sub>50</sub> inhibe el 50%, y la CI<sub>80</sub> disminuye el 80% de la actividad de crecimiento bacteriano.

En los Anexos D y E, se encuentran las tablas con los datos para los porcentajes de transmitancia y absorbancia que se presentan en las Figuras 8 y 9, en las cuales se observan la tendencia a disminuir a cada diferente concentración inicial de Mn y Zn, realizadas para el cálculo del efecto inhibitorio de *Pseudomonas Fluorescens*.

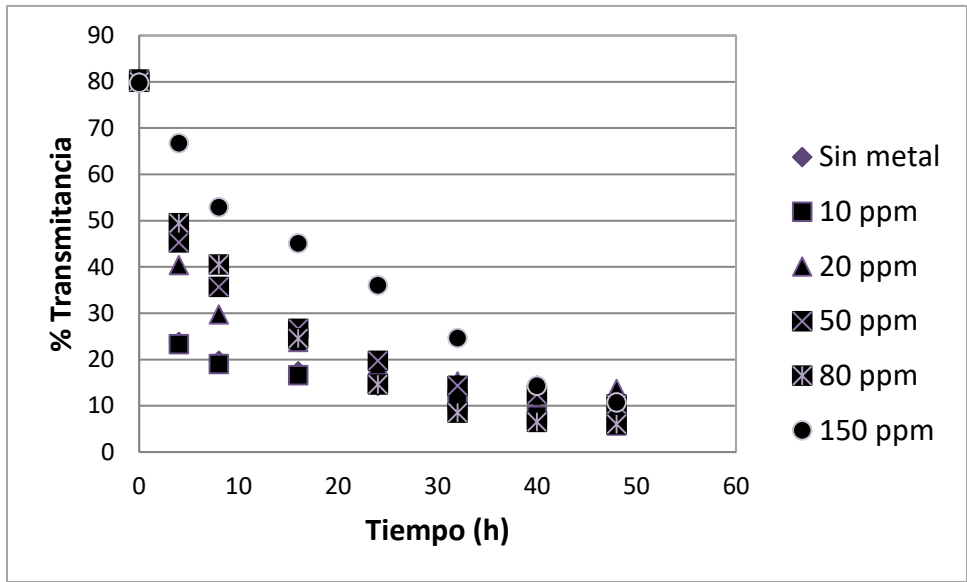


Figura 8. Datos de transmitancia a diferentes concentraciones de Mn con respecto al tiempo con biomasa de *Pseudomonas Fluorescens*.

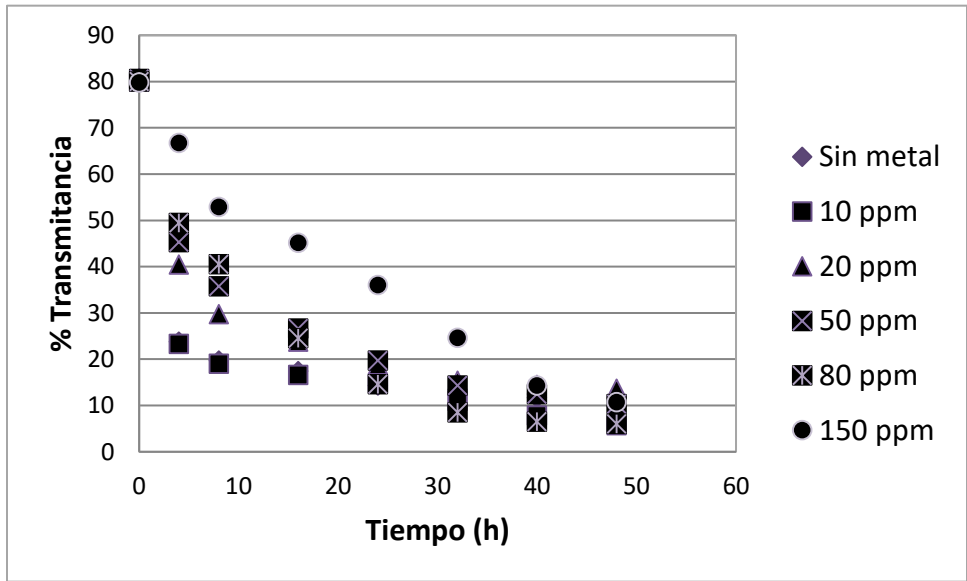


Figura 9. Datos de transmitancia a diferentes concentraciones de Zn con respecto al tiempo con biomasa de *Pseudomonas Fluorescens*.

El manganeso presentó un efecto inhibitorio sobre la velocidad de crecimiento poblacional, obteniendo mayor inhibición a concentraciones altas de manganeso (Figura 10). Al graficar el % Actividad de crecimiento del consorcio bacteriano contra la concentración de manganeso, se encontró que la concentración inhibitoria  $CI_{20}$  fue 20 mgMn/L, para un  $CI_{50}$  fue de 70 mgMn/L, mientras que para un  $CI_{80}$  no fue posible alcanzar este porcentaje de inhibición. Esto indica que para esta biomasa no se recomienda llevar a cabo pruebas de biosorción a concentraciones más elevadas de 70 mgMn/L.

Así mismo, se determinó el efecto inhibitorio del zinc sobre *P. fluorescens* (Figura 11), dando como resultado para  $CI_{20}$  de 15 mgZn/L, para  $CI_{50}$  de 68.5 mgZn/L, y de igual manera no fue posible alcanzar un  $CI_{80}$ , esto indica que para esta biomasa no se recomienda llevar a cabo pruebas de biosorción a concentraciones más elevadas de 68.5 mgZn.

Poirier *et al.*, (2008) aislaron cepas de *Pseudomonas fluorescens* de sedimentos marinos reportando un efecto inhibitorio del 50% en la actividad metabólica de 62 mg/L sobre el zinc, además (Mallevre *et al.*, 2014) reportan una evaluación ecotoxicológica utilizando bacterias del género *Pseudomonas putida* de aguas residuales artificiales con un  $CI_{50}$  de 100 mg/L de zinc.

De igual manera Nweke y Okpokwasill, (2011), realizaron estudios del efecto inhibitorio del zinc en la biosíntesis de  $\alpha$ - Glucosidase y  $\beta$ - Galactosidase de *Pseudomonas sp.* a partir de aguas residuales de la refinera de efluentes de petróleo reportando en la biosíntesis de  $\alpha$ - Glucosidase un efecto inhibitorio del zinc de  $CI_{20}$  de  $23.27 \text{ mg/L} \pm 3.073 \text{ mg/L}$ ,  $CI_{50}$   $51.0333 \text{ mg/L} \pm 3.661 \text{ mg/L}$ , y un  $CI_{80}$  de  $111.146 \pm 1.373 \text{ mg/L}$ ; mientras que para la  $\beta$ - Galactosidase se reporta un  $CI_{20}$  de  $6.473 \pm 0.261$ , para,  $CI_{50}$  de  $0.368 \pm 24.059$  y por último para un  $CI_{80}$  de  $89.439 \pm 7.164$ .

Perez-Silva *et al.* (2009) en estudios realizados reportan que *Pseudomonas aeruginosa* hasta concentraciones de 150 mgMn/L, fue capaz de sobrevivir, obteniendo una fase exponencial hasta un crecimiento de  $4.7E^{+09}$  cel/mL a las 24 horas, mientras en este estudio se reporta un crecimiento de  $8.0E^{+08}$  cel/mL en la fase exponencial a esa misma concentración (Anexo F).

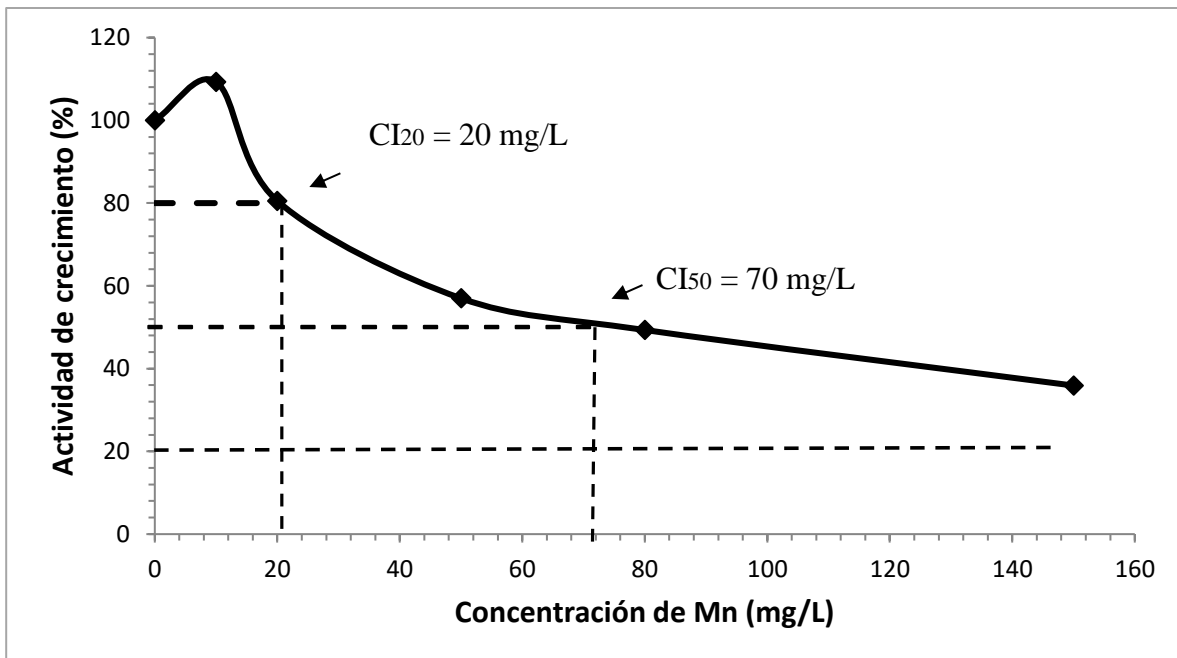


Figura 10. Efecto inhibitorio de la concentración del Mn sobre la velocidad de crecimiento de la biomasa a 48 horas.



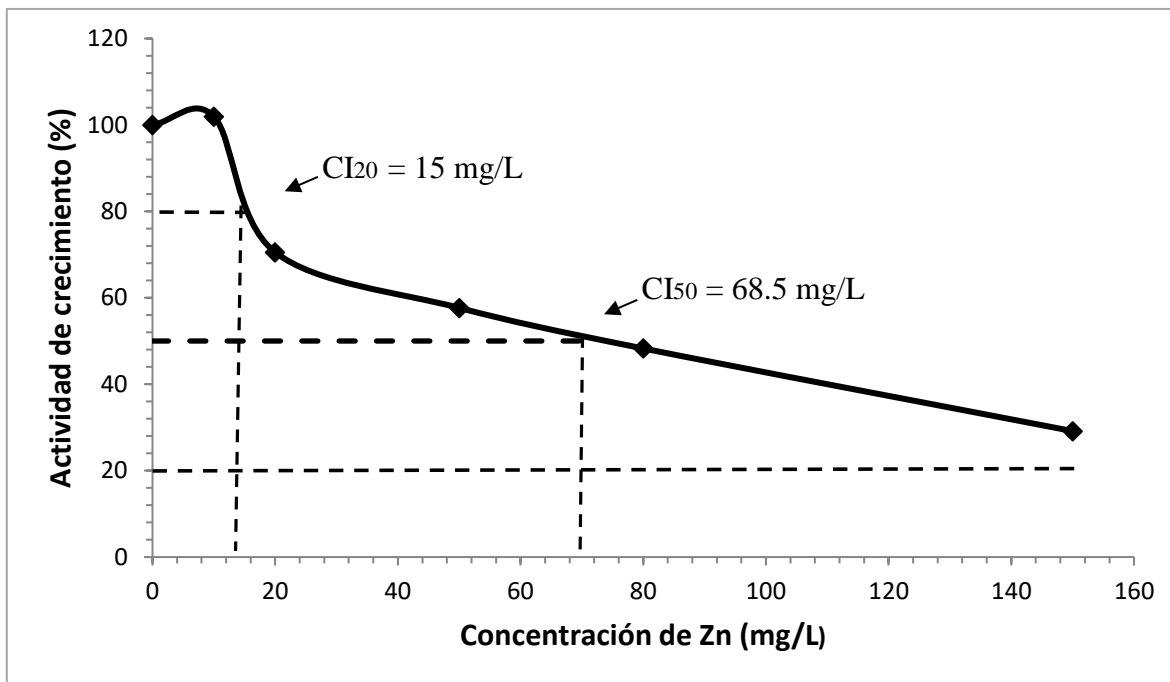


Figura 11. Efecto inhibitorio de la concentración del Zn sobre la velocidad de crecimiento de la biomasa a 48 horas.

### 5.5 Constante de inhibición de *P. fluorescens* utilizada como biomasa

De los datos experimentales se obtiene la pendiente la cual representa los valores de la constante de inhibición que fueron 80 mgMn/L y 62.11 mgZn/L, estos son los valores que representan la afinidad entre el metal y la bacteria (Figura 12). Según la ecuación propuesta por Michaelis y Menten, valores bajos de la constante de inhibición indican alta afinidad, es decir que será menor la cantidad de metal para alcanzar la velocidad máxima, por lo que será mayor la afinidad de la bacteria hacia el metal (Yúfera, 2007).

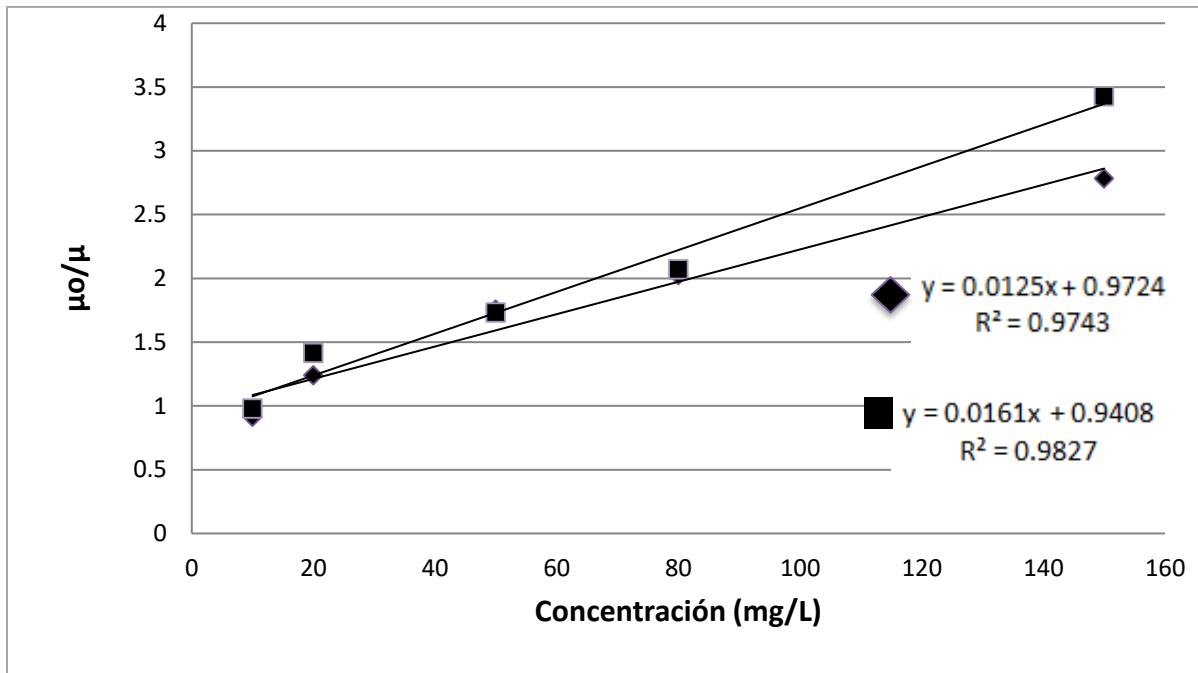


Figura 12. Coeficiente específico de crecimiento, manganeso (◆) y zinc (■).

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los sedimentos contaminados por la industria minera se logró el aislamiento e identificación de 38 cepas bacterianas y 9 levaduras con diferente morfología colonial. Para este estudio fueron seleccionadas las cepas de *Pseudomonas sp.* a las cuales se les hizo distintas pruebas para su identificación las cuales fueron identificadas como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mallei* y *Pseudomonas maltophilia*. La *P. fluorescens* fue la cepa más repetida y fue seleccionada para llevar a cabo las pruebas de cinética de crecimiento, y para observar su comportamiento en presencia de los metales manganeso y zinc.

*Pseudomonas sp* es capaz de crecer en presencia de ambos metales lo que la hace capaz para trabajar en la biosorción de los mismos. Sin embargo, en base a las pruebas de toxicidad es recomendable trabajar con sedimentos que contengan estos metales a concentraciones subtóxicas, es decir por debajo de la concentración que presentó el 50% de la inhibición de la actividad.

De los valores obtenidos en la cinética de toxicidad se puede decir que es recomendable utilizar *Pseudomonas fluorescens* aisladas del Río San Pedro para la biosorción de manganeso y zinc a concentraciones cercanas a los 70 mgMn/L y 68.5 mgZn/L, así mismo se puede trabajar en la biosorción de manganeso y zinc en los sedimentos del Río San Pedro ya que las concentraciones de dichos metales en el sedimento están por muy por debajo de las concentraciones que *Pseudomonas sp* puede soportar.

## ANEXOS

### ANEXO A

Tabla A-1 Composición de sedimento

Lecturas	Cu (mg/L)	Lectura (mg/g)	Zn (mg/L)	Lectura (mg/g)	Mn (mg/L)	Lectura (mg/g)	Fe (mg/L)	Lectura (mg/g)
Suelo E-1	10.43	1043	3.43	343	5.26	526	11	55000
Suelo E-1	11.24	1124	3.577	357.7	5.23	523	11.84	59200
Promedio (Valor)	10.835	1083.5	3.5035	350.35	5.245	524.5	11.42	57100
Suelo E-2	8.8	880	2.173	271.3	1.98	198	10.8	54000
Suelo E-2	8.735	873.5	2.127	212.7	2.58	258	10.69	53450
Promedio (Valor)	8.7675	876.75	2.15	215	2.28	228	10.745	53725

## ANEXO B

Tinción Gram y morfología de Microorganismos aislados de Sedimentos del Río San pedro

Tabla B-1. Tinción Gram y morfología de cepas aisladas de la Estación 1 (E-1).

Lugar	Medio	Cepa	Resultados Tinción	Morfología
Estación 1	<i>Pseudomona</i>	1A	-	Bacilos
		1B	-	Bacilos
		1D	-	Bacilos
		1E	-	Bacilos
	Agar nutritivo	1A1	-	Cocobacilos
		1A2	-	Bacilos
		1B1	-	Cocos
		1B2	-	Bacilos
		1E1	-	Bacilos
		1E2	-	Cocobacilos
		1F1	-	Cocos
	EMB	1G1	-	Cocos
		1C1	-	Bacilos
		1C2	-	Bacilos
		1D1	-	Bacilos
		1D2	-	Cocobacilos
		1F1	-	Bacillos
		1E1	-	Bacilos
	PDA	1E2	-	Bacilos
		1A	+	Cocobacilos
1B		+	Cocobacilos	
1C		+	Cocobacilos	
1D		+	Cocobacilos	
		1E	+	Cocobacilos

Tabla B-2. Tinción Gram y morfología de cepas aisladas de la Estación 2 (E-2).

Lugar	Medio	Cepa	Resultados tinción	Morfología
Estación 2	<i>Pseudomona</i>	2B	-	Bacilos
		2C	-	Bacilos
		2D	-	Bacilos
		2E	-	Bacilos
	Agar nutritivo	2A1	-	Bacilos
		2A2	-	Bacilos
		2B1	-	Bacilos
		2C1	-	Cocos
		2E1	-	Cocos
		2E2	-	Cocobacilos
	EMB	2A1	-	Cocos
		2B1	-	Cocos
		2C1	-	Cocos
		2C2	-	Cocos
		2C3	-	Cocos
	PDA	2A	+	Cocobacilos
		2B	+	Cocobacilos
		2C	+	Cocobacilos
		2D	+	Cocobacilos

## ANEXO C

Datos de cinética de crecimiento de cepa 1A *P. Fluorescens*.

Tabla C-1. Datos de Cinética de Crecimiento a 7 horas.

Tiempo	%T	log%T	%Abs
08:20	74.2	1.87040391	0.12959609
08:50	61.4	1.78816837	0.21183163
09:20	38.4	1.58433122	0.41566878
09:50	18.4	1.26481782	0.73518218
10:20	11.8	1.07188201	0.92811799
10:50	8.5	0.92941893	1.07058107
11:20	7	0.84509804	1.15490196
11:50	5.7	0.75587486	1.24412514
12:20	5	0.6989747	1.30103132
12:50	4.2	0.62324929	1.37675071
01:20	3.9	0.59106461	1.40893539
01:50	3.6	0.5563025	1.4436975
02:20	3.5	0.54406804	1.45593196
02:50	3.4	0.53147892	1.46852108
03:20	3.3	0.51851394	1.48148606
03:50	3.3	0.51851394	1.48148606

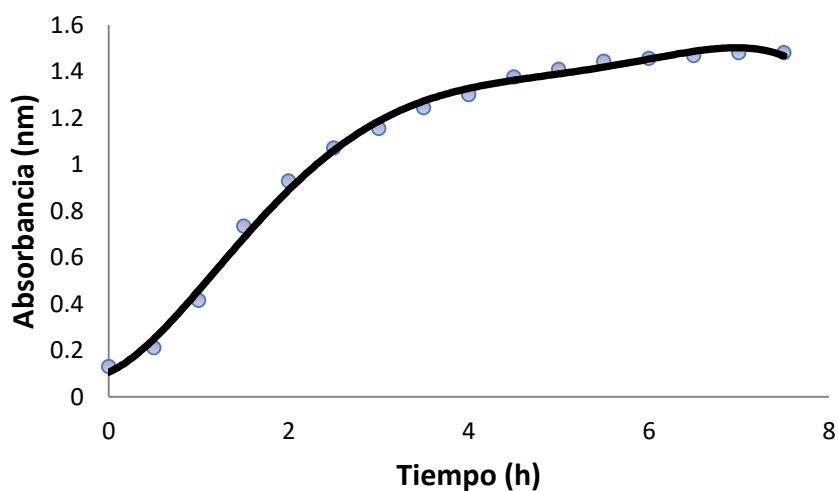


Figura C-1. Datos de absorbancia vs tiempo obtenidos en la cinética de crecimiento de la de la cepa *P. fluorescens*.

Tabla C-2. Resultados obtenidos de la cinética de crecimiento basados en la escala de nefelometro de McFarland.

<b>%T</b>	<b>Tiempo</b>	<b>cel/mL</b>
74.2	0	300000000
61.4	0.5	300000000
38.4	1	550000000
18.4	1.5	1580000000
11.8	2	1800000000
8.5	2.5	2450000000
7	3	2500000000
5.7	3.5	3020000000
5	4	3120000000
4.2	4.5	3200000000
3.9	5	3230000000
3.6	5.5	3250000000
3.5	6	3270000000
3.4	6.5	3270000000
3.3	7	3280000000
3.3	7.5	3280000000



## ANEXO D

Datos obtenidos de la cinética de toxicidad de manganeso con cepa *P. fluorescens* a las 48 horas.

Tabla D-1. Resultados de transmitancia a 600 nm obtenidos de la cinética de toxicidad de manganeso a diferentes concentraciones.

<b>Tiempo</b>	<b>Sin metal</b>	<b>10 (mg/L)</b>	<b>20 (mg/L)</b>	<b>50 (mg/L)</b>	<b>80 (mg/L)</b>	<b>150 (mg/L)</b>
0	80.7	78	80	82.2	80.6	80.3
4	23.8	21.4	30.4	64.3	60.7	62.6
8	19.7	16.7	25.7	36.8	40.2	48.4
16	17.4	14.9	21.5	35.3	32.4	36.3
24	14.3	14	19.6	28.7	29.2	30.2
32	12.3	11.9	15.2	19.7	20.4	27.7
40	11.7	11.4	13.6	14.6	15.4	19.7
48	9.7	10.1	10.1	10.2	12.3	15.3

Tabla D-2. Resultados de absorbancia a 600 nm obtenidos de la cinética de toxicidad de zinc a diferentes concentraciones.

<b>Tiempo</b>	<b>Sin metal</b>	<b>10 ( mg/L)</b>	<b>20 (mg/L)</b>	<b>50 (mg/L)</b>	<b>80 (mg/L)</b>	<b>150 (mg/L)</b>
0	0.093	0.1079054	0.096910013	0.08512818	0.09366496	0.09528445
4	0.623	0.66958623	0.517126416	0.19178903	0.21681131	0.20342567
8	0.706	0.77728353	0.590066877	0.43415218	0.39577395	0.31515464
16	0.759	0.82681373	0.66756154	0.45222529	0.48945499	0.44009337
24	0.845	0.85387196	0.707743929	0.5421181	0.53461715	0.51999306
32	0.910	0.92445304	0.818156412	0.70553377	0.69036983	0.55752023
40	0.932	0.94309515	0.866461092	0.83564714	0.81247928	0.70553377
48	1.013	0.99567863	0.995678626	0.99139983	0.91009489	0.81530857

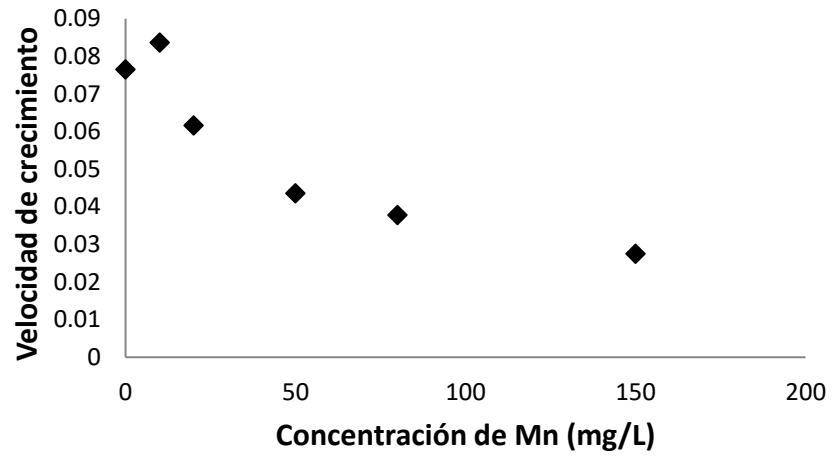


Figura D-1. Gráfico que expresa la velocidad de crecimiento de la cepa con respecto a la concentración de manganeso (mg/L).

## ANEXO E

Datos obtenidos de la cinética de toxicidad de zinc con cepa *fluorescens* a las 48 horas.

Tabla E-1. Resultados de transmitancia a 600 nm obtenidos de la cinética de toxicidad de zinc a diferentes concentraciones.

<b>Tiempo</b>	<b>Sin metal</b>	<b>10 (mg/L)</b>	<b>20 (mg/L)</b>	<b>50 (mg/L)</b>	<b>80 (mg/L)</b>	<b>150 (mg/L)</b>
0	80.7	80	80.3	80.5	80	79.8
4	23.8	23.3	40.4	45.3	49.4	66.7
8	19.7	19	29.7	35.7	40.5	52.9
16	17.4	16.6	23.8	26.6	24.5	45.1
24	14.3	14.7	18.8	19.7	14.6	36
32	12.3	11	15.3	14.3	8.5	24.6
40	11.7	7.8	14.4	12.4	6.5	14.3
48	9.7	5.7	13.6	10.3	6	10.7

Tabla E-2. Resultados de absorbancia a 600 nm obtenidos de la cinética de toxicidad de zinc a diferentes concentraciones.

<b>Tiempo</b>	<b>Sin metal</b>	<b>10 (mg/L)</b>	<b>20 (mg/L)</b>	<b>50 (mg/L)</b>	<b>80 (mg/L)</b>	<b>150 (mg/L)</b>
0	0.09312647	0.09691001	0.09528445	0.09420412	0.09691001	0.09799711
4	0.62342304	0.63264408	0.39361863	0.3439018	0.30627305	0.17587417
8	0.70553377	0.7212464	0.52724355	0.44733178	0.39254498	0.27654433
16	0.75945075	0.77989191	0.62342304	0.57511836	0.61083392	0.34582346
24	0.84466396	0.83268267	0.72584215	0.70553377	0.83564714	0.4436975
32	0.91009489	0.95860731	0.81530857	0.84466396	1.07058107	0.60906489
40	0.93181414	1.1079054	0.84163751	0.90657831	1.18708664	0.84466396
48	1.01322827	1.24412514	0.86646109	0.98716278	1.22184875	0.97061622

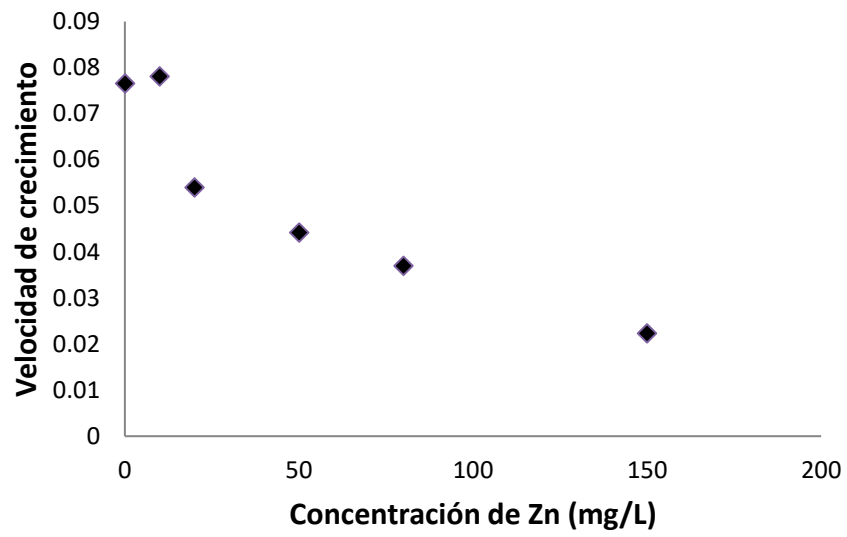


Figura E-1. Gráfico que expresa la velocidad de crecimiento de la cepa con respecto a la concentración de zinc (mg/L).

## ANEXO F

### Estándares del Nefelómetro de McFarland

- a) Organice 10 tubos de ensaye o ampollitas de igual tamaño y buena calidad: Use tubos nuevos lavados y completamente secos.
- b) Prepare  $H_2SO_4$  químicamente puro al 1%.
- c) Prepare una solución acuosa de cloruro de bario químicamente puro al 1%.
- d) Añadir a los tubos las cantidades designadas de las dos soluciones como se muestra en la Tabla 5 para hacer un total de 10 ml /tubo.
- e) Cierre los tubos o ampollitas. La suspensión de sulfato de bario corresponde a un precipitado aproximadamente homogéneo de la densidad de las células por mililitro, variable en el estándar, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla F-1. Estándares del nefelómetro de McFarland

No. de Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cloruro de bario (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Ácido sulfúrico (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Densidad Aprox. de célula ( $\times 10^8$ /mL)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

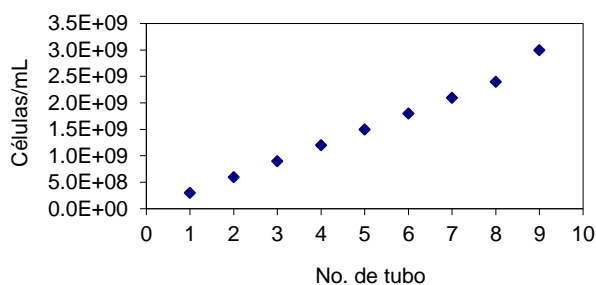
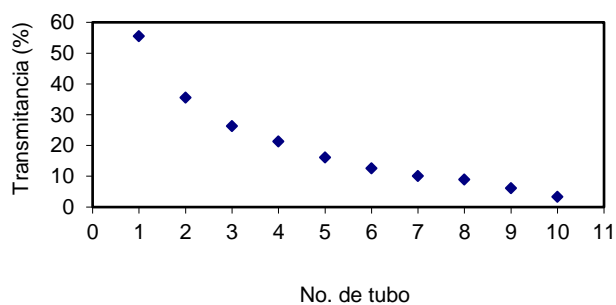


Figura F-1. Curvas estándares de nefelómetro con transmitancia (%) y densidad celular (Monge 2009).

Datos obtenidos de la cinética de crecimiento de *Pseudomona fluorescens* a una concentración de 150 mg/L, crecimiento basados en la escala de Nefelometro de Mcfarland.

Tabla F-2. Cinética de crecimiento de *Pseudomona fluorescens* a 150 mg/L.

Cel/mL	Tiempo (h)
300000000	0
300000000	4
300000000	8
600000000	16
820000000	24
900000000	32
1200000000	40
1000000000	48

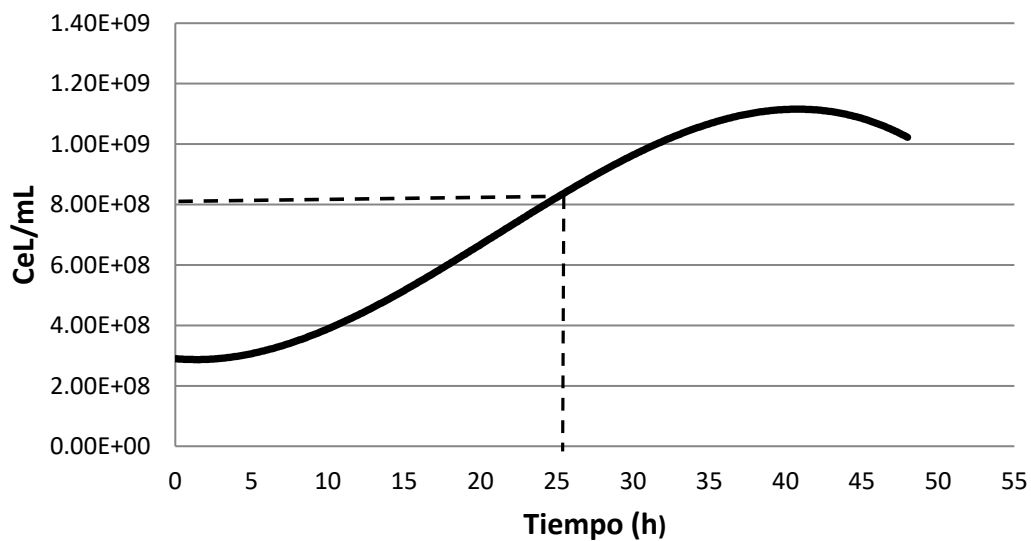


Figura F-2. Gráfico que expresa la etapa exponencial de la cinética de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* a 150 mg/L.

## REFERENCIAS

Acosta I., Moctezuma-Zárate M.G., Cárdenas J. F. Y Gutiérrez C. (2007). Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomásas fúngicas. Inf. Tec. 18, 9-14.

Almendariz-Tapia F. J. (2001). Degradación del alquilbencen sulfonato lineal (LAS) en un reactor acidogénico bioaumentado con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* M113. Tesis maestría UAM.

Atlas. M.R. y Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª Ed. Pearson educación. Madrid, España. Pp. 3-25.

Ávila P. P. (1995). Evaluación de los metales pesados Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb y Hg en agua, sedimento y lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) de la Presa José Antonio Alzate, Estado de México. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. 102 p.

Avila-Pérez P., Balcázar M., Zarazúa-Ortega G., Barceló-Quintal I., Díaz-Delgado C. (1999). Heavy metal concentrations in water and bottom sediments of a mexican reservoir. The Science of the Total Environment, 234: 185-196.

Bremer DJ, Staley JT, Krieg NR. Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speaciation. In: D. R. Boone, R. W. Castenholz, G. M. Garrity (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup>. Ed. Springer-Verlag. New York: 2001; 1:27-31.

Burton G.A y Ladrum, P. F. (2003). Toxicity of sediments. Encyclopedia of Sediments and Sedimentary Rocks. Middleton, G. V., Church, M. J., Corigilio, M., Hardie, L. A. Y Longstaffe Eds. Kluwer Academic publishers, Dordrecht. Pp. 748-751.

Burton, G.A., (2002). Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology*, pp.65-75. doi: 10.1007/s102010200008

Cañizares- Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42:131-143.

Caselles-Pomares, J.M., Gómez, M.R., Molero, M.M. (2010). Química aplicada a la Ingeniería. UNED. Universidad Nacional de Educación a distancia. Pp.470

Espino, G., Cáceres, C., Adame, S., Hernández, S. (2007). Diccionario de hidrología y ciencias afines. México, D.F. Plaza y Valdés. S.A. de C. V. Pp.65.

Ramirez-Romero, P., Mendoza-Cantú, A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. Primera edición. México. Pp. 359.

El Falaki, K., Perrin, C., Belkesam, L., Peisajovich, A., Martin, G.. (1994), Impacto de los detergentes sobre sedimentos. Movilización de metales, *Tecnología del agua*. 128: 25-31

Eweis J. B., Ergas S. J., Chang D. P., Schroeder E. D., Tejero M. I., Amieva del Val J.J. (1999). *Principios de biorrecuperación (Bioremediation)*. Primera Edición. Mac Graw Hall Interamericana de España. México. Pp. 4, 12, 21, 94.

Flores- Vásquez, J., Martha Ly., Tapia, H. N., Maldonado G. H. (2001). Biorremediación de Metales Tóxicos en Efluentes Mineros Aplicando Biosorción. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*. Vol. 4 N° 07.



Fontúrbel e Ibáñez. (2004). Fuentes de energía biológica: empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas. *Biología. Portal de biología y Ciencias de la Salud*. La revista: número 17: 1-6.

Gomez S., Amaya D., Maldonado C., Martínez M., Quevedo B., Soto A., y Pedroza M. (2008). Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. *Revista internacional de contaminación ambiental*, Vol. 24. No3, Pp. 93-106.

Gómez-Álvarez, A., Meza-Figueroa D., Villalba-Atondo A., Valenzuela-García J.L., Ramírez-Hernández J., Almendariz-Tapia J. (2008). Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993-2005), México-US border. *Environ. Geol.* Springer.

Gómez, A., Villalba-Atondo, A., Acosta-Ruiz, G., Castañeda Olivares, M., y Kamp, D. (2004). Metales pesados en el agua superficial del Río San Pedro durante 1997 y 1999. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 20(1) 5-12.

Gómez-Álvarez, A., Valenzuela-García, J. L., Aguayo-Salinas, S., Meza-Figueroa, D., Ramírez-Hernández, J., Ochoa-Ortega, G. (2007). Chemical partitioning of sediment contamination by heavy metals in the San Pedro River, Sonora, Mexico. *Chemical Speciation and Bioavailability*. Pp.19, 25-36.

Henry J. G. y Heinke W.G. (1999). *Ingeniería Ambiental*. Segunda edición. Ed Prentice Hall. México. Pp. 195, 196, 431.

Hernández-Mata, K. (2013). Biosorción de Metales Pesados (Zn, Cu, Fe y Mn) con Levaduras Aisladas de Ambientes Contaminados. Tesis para obtener el grado de Mestro en Ciencias de la Ingeniería. Universidad de Sonora. Hermosilo, Sonora.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática) (1993). Cartas topográficas H12B32, H12B33, H12B34, H12B42, H12B43, H12B44, H12B52, H12B53 Y H12B54. Esc 1:50, 000. México, D. F

Ingersoll, C.G. (1995). Sediment Test. In: "Fundamental of aquatic toxicology". Rand, G. M., Washinton, DC. Pp. 231-255.

Juviña, & Torres, A. (2005). Desarrollo e implementación de un sistema de monitorización mediante sensores químicos de un proceso de biosorción para la recuperación de ion cobre (II) en efluentes acuosos. Universitat Politècnica de Catalunya. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona .

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M. Schenrchenberger., Winn, W. C., (2003). Diagnostico Microbiológico. Quinta Edición. Ed. Médica Panamericana, México. Pp.344-757.

Leal, C. A. L. (2001). Degradación de Cianuro en Columna Utilizando una Mezcla de Bacterias Nativas de la Mina la Colorada. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora.

Leung W.C., Wong M-F., Chua H., Lo W., Yu P.H.F. y Leung C.K. (2000). Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. Water Science and Technology. 41, No 12. Pp: 233–240.

Lenntech (2016). Rotterdamseweg 402 M 2629 HH Delft. Fecha de consulta: 4 de Junio de 2016. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/mn.htm>.

Lucho C.A., Prieto F., Del Razo L.M., Rodríguez R. y Poggi H. (2005). Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. *Agric. Ecosyst. Environ.* 108, 57–71.

Mac Faddin J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Médica Panamericana. México, Pp: 73 -397.

Mallevre F., Fernandez T.F., Aspray T.J. (2014). Silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticle ecotoxicity to bioluminescent *Pseudomonas putida* in laboratory medium and artificial wastewater. *Environ Pollut.* 2014 Dec;195:218-25.

Meyer J, Geoffroy V.A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Palleroni J. Siderophore typing a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:2745-2753.

Mijares, M. A. P. (2003). Aislamiento y caracterización de Bacterias con Capacidad para Inmovilizar Cadmio. Tesis Licenciatura. Biología con área en Biotecnología. Universidad de las Américas, Puebla. Capítulo dos.

Monge A. O. (2009). Biosorción de cobre con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Ingeniería. Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería. Mexicali, B.C. P.p 150.

Negrón M. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. Segunda edición, Ed. Panamericana. Argentina, Pp.47.

Pelczar, J. M., Reid R. D., Chan E. C. S. (1993). *Microbiología*. Cuarta Edición, Ed. Mc Graw- Hill. México, Pp. 18-119.

Pelczar Michael J., Chan E. C. S., Krieg Noel R. 1993. Microbiology: Concepts and Applications. Pp. 18-119.

Poirier, Jean, N., Guary, J.C., Bertrand, M., (2008). Responses of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* to an excess of heavy metals: Physiological and biochemical aspects. *Science of the total environment*. 2008;406:76-87.

Pérez-Silva M., Ábalos-Rodriguez A., Gómez-Montes de Oca J., Cantero-Moreno D., (2009). Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. *Bioresource Technology* 100, Pp.1533–1538.

Sprovieri, M., Feo, M.L, Prevedello, L., Manta, D.S., Sammartino, S., Tamburrino, Steevens, J.A. & Marsella, E., (2007). Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). *Chemosphere*, 67(5), Pp.998-1009.

Nweke C. O., Okpokwasili G. C. (2011). Inhibition of  $\beta$ -galactosidase and  $\alpha$ -glucosidase synthesis in petroleum refinery effluent bacteria by zinc and cadmium. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* Vol. 3(3), Pp. 68-74.

Rand, G. M., Wells, P. G. & mccarty, L. S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G. M. (eds) "Fundamental of aquatic toxicology". Taylor and Francis, Washinton, DC, Pp. 3-66.

Reyes E. D., Cerino C. F. Y Suárez H. M. A. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*. IX, No. 31, Pp. 59-64.

Riojas H. (2004). Impacto en la salud del ecosistema por actividades antropogénicas en una cuenta manganesífera. Informe Final. Instituto de Salud, Ambiente y Trabajo.

Rivas B.G.A., Gutiérrez S. y Merino F. (2004). Biorremoción de metales pesados en solución por *Pseudomonas fluorescens* M1A-4S aisladas de ambientes mineros. En: Segunda Semana de Ciencia y Tecnología II-SCT-2004. Asociación Chotana de Ciencias. Perú.

Rodríguez, M. A. (2008). Caracterización química de los sedimento sumergidos, elementos clave dentro de un programa de monitoreo ambiental integral de las playas de Bahía de Matanzas. Oficina de Manejo Costero - Playa de Varadero, Cuba.

Sternbeck J, Östlund P. (2001). Metals in sediments from the Stockholm region: Geographical pollution patterns and time trends. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* 1: Pp.151-165.

Tejeda. S., Avila-Pérez. P., Zarazúa. G., Carapia-Morales. I., Díaz-Delgado C., Lugo J. (2005). La medición de sedimentos en México. Ed. IMTA, Jiutepec, Morelos, Pp:23-24

Raju, K. V. ; Somashekar, R K; Prakash, K L. (2013). Spatio-temporal variation of heavy metals in Cauvery River basin. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*; Hong Kong Tomo 3, N.º 1, Pp. 59-75

USEPA (Environmental Protection Agency).1998. Contaminated sediment management strategy. EPA 823-R-98-001. Office of Water, Washington, DC.

Vaithyanathan, P., et al.: (1993) Transport and distribution of heavy metal in Cauvery River. *Water, Air, and Soil Pollution*. 71: Pp. 13-28.

Voet Donald y Voet Judith. (2006). *Bioquímica*. Tercera Edición. Panamericana. Pp. 502.

Volesky, B., Holan, Z.R., (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, 11 Pp. 235-250.

Volke S. T. L., Velasco T.J.A., De la Rosa P.D.A. y Solórzano O.G. (2004). Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. INE. Dirección de Investigación en Residuos y Proyectos Regionales. Primer informe.

Vullo, D. L., (2003). Microorganismos y Metales Pesados: Una Interacción en Beneficio del Medio Ambiente. *Revista Química Viva*. Vol. 2, numero 3.

Yufera, Primo. E., (2007). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Fecha de consulta: 4 de Junio de 2016. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?id=aU\\_aBXvAB3MC&pg=PA1036&dq=michaelis+menten&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjA0tPJscHNAhXL34MKHcG9B3Y4FBDoAQgZMAA#v=onepage&q=michaelis%20menten&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=aU_aBXvAB3MC&pg=PA1036&dq=michaelis+menten&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjA0tPJscHNAhXL34MKHcG9B3Y4FBDoAQgZMAA#v=onepage&q=michaelis%20menten&f=false)

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sidly, R.M. & Peakall, D.B. (2006). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, Pp.315.