



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

---

# TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

## CAMPUS CALKINÍ

### **EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES PESADOS DE BACTERIAS HALÓFILAS MODERADAS**

#### **TESIS**

Que presenta:

**CARLOS ANDRÉS SÁNCHEZ GARCÍA**

Como requisito para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA  
(BIOPROCESOS Y ALIMENTOS)**

Directores de tesis:

**DR. RACIEL JAVIER ESTRADA LEON**

**DR. LUIS ALFONSO CAN HERRERA**

Calkiní, Campeche, México

Agosto, 2022





*Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, en el Estado de Campeche*

Calkiní, Campeche a 25 de marzo de 2022.

El Comité de tesis del candidato (a) a grado: CARLOS ANDRÉS SÁNCHEZ GARCÍA, constituido por CC. Dr. Raciél Javier Estrada León, Dr. Luis Alfonso Can Herrera, Dra. Rosa Jazmín Us Camas, Dr. Erbin Guillermo Uc Cayetano habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Evaluación de la tolerancia a metales pesados de bacterias halófilas moderadas**, que presenta como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Ingeniería, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.15.5, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

**ATENTAMENTE**

**RACIEL JAVIER ESTRADA LEÓN**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. LUIS ALFONSO CAN HERRERA**

**CO-DIRECTOR**

**DRA. ROSA Y. US CAMAS**

**TUTOR**

**DR. ERBIN G. UC CAYETANO**

**TUTOR**



Calkiní, Campeche a 09 de mayo de 2022

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

DR. DANY ALEJANDRO DZIB CAUICH  
DIRECTOR ACADÉMICO  
PRESENTE.

Por medio del presente, nos permitimos informar, que el comité tutorial ha concluido con la revisión de la tesis "EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES PESADOS DE BACTERIAS HALÓFILAS MODERADAS" desarrollada por el estudiante Carlos Andrés Sánchez García, con matrícula G19136721 de la Maestría en Ciencias de la Ingeniería de la Línea de Generación y Aplicación de Conocimiento Bioprocesos y Alimentos; y autorizamos la impresión de la misma, para que el estudiante continúe con el trámite de titulación.

Sin más por el momento, nos despedimos quedando a sus órdenes para cualquier comentario o aclaración.

DR. RACIEL JAVIER ESTRADA LEON  
DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS ALFONSO CAN HERRERA  
CODIRECTOR DE TESIS

DRA. ROSA YAZMIN US CAMAS  
MIEMBRO COMITÉ TUTORIAL

DR. ERBIN G. UC CAYETANO  
MIEMBRO COMITÉ TUTORIAL



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE  
CALKINÍ, EN EL ESTADO DE CAMPECHE  
COORDINACIÓN DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN  
CLAVE: 04MSU0013P  
CALKINÍ, CAMPECHE, MÉXICO

DR. LUIS ALFONSO CAN HERRERA  
COORDINADOR DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN





## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado:

### **“EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES PESADOS DE BACTERIAS HALÓFILAS MODERADAS”**

Del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería fue llevado a cabo por CARLOS ANDRÉS SÁNCHEZ GARCÍA y se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, bajo la Dirección del **DR. RACIEL JAVIER ESTRADA LEÓN** y bajo la co-dirección del **DR. LUIS ALFONSO CAN HERRERA**.

ATENTAMENTE



MTRO. RODOLFO ENRIQUE CARDOZO RIVERO  
DIRECTOR GENERAL



Instituto Tecnológico Superior de Campeche, en el Estado de Campeche

Calkiní, Campeche a 9 de mayo de 2022.

### **DECLARATORIA DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mis estudios de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico Superior de Calkiní. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

---

Carlos Andrés Sánchez García





*Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, en el Estado de Campeche*

Calkiní, Campeche a 9 de mayo de 2022

**Asunto:** Carta de liberación de plagio

**CARLOS ANDRÉS SÁNCHEZ GARCÍA  
PRESENTE.**

Por este conducto me permito informarle que con base a los resultados obtenidos por el software institucional es posible afirmar que el porcentaje de similitud de la tesis es menor al máximo permitido por el consejo académico (18%). La tesis analizada corresponde al estudiante CARLOS ANDRÉS SÁNCHEZ GARCÍA con número de matrícula, G19136721 perteneciente al programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería cuyo título de tesis es **EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES PESADOS DE BACTERIAS HALÓFILAS MODERADAS** el cual es dirigido por DR. RACIEL JAVIER ESTRADA LEÓN.

Con base a lo descrito anteriormente, se establece la tesis como LIBERADA DE PLAGIO.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo

---

DR. EMILIO PÉREZ PACHECO  
COORDINACIÓN DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, doy gracias a Dios por permitirme culminar con la presente investigación, que con esfuerzo, perseverancia y dedicación logre plasmar en el presente trabajo. También agradezco a todos los docentes que me acompañaron durante mis estudios de posgrado por sus enseñanzas, en donde hago una mención especial a mi director y co-director de tesis, Dr. Raciél Javier Estrada León y Dr. Luis Alfonso Can Herrera por su ayuda, paciencia y conocimientos brindados para la elaboración de este documento. Por otra parte, agradezco al Instituto Tecnológico de Calkiní del Estado de Campeche por el apoyo brindado en el uso de equipos y materiales que fueron fundamentales para la realización de la investigación, destacando la atención prestada por la jefa de la unidad de administración de talleres y laboratorio, la Mtra. Marilú González Martínez. Por último, agradezco a mi esposa, Tila Del Carmen por su gran contribución al estar apoyándome en todo momento para lograr este objetivo, así como también a mis hijos: Damián, Tadeo y Daniela, que fueron mi mayor motivación para realizarlo, con la idea de aportar conocimientos que contribuyan a mejorar el mundo que los rodea.

## ÍNDICE

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>                                                                     | <b>01</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                    | <b>02</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>                                                                | <b>03</b> |
| <b>CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....</b>                                                    | <b>05</b> |
| <b>1.1 METALES PESADOS.....</b>                                                         | <b>05</b> |
| <b>1.2 CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR METALES PESADOS.....</b>                              | <b>05</b> |
| <b>1.3 TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS Y SU EFECTO<br/>        SOBRE LA SALUD.....</b> | <b>07</b> |
| <b>1.4 PRINCIPALES FUENTES DE METALES PESADOS.....</b>                                  | <b>08</b> |
| 1.4.1 Potenciales rutas para la liberación de metales en los<br>sistemas acuáticos..... | 10        |
| 1.4.1.1 Efluente industrial.....                                                        | 10        |
| 1.4.1.2 Aguas residuales.....                                                           | 10        |
| 1.4.1.3 Hidrocarburos y actividad relacionadas.....                                     | 11        |
| 1.4.1.4 Dragado y Recuperación.....                                                     | 12        |
| 1.4.1.5 Agricultura y ganadería.....                                                    | 12        |
| <b>1.5 METALES PESADOS EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.....</b>                              | <b>14</b> |
| 1.5.1 Riesgos de los metales pesados prevaletentes en la<br>Península de Yucatán.....   | 16        |
| 1.5.1.1 Cobre (Cu).....                                                                 | 17        |



|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.5.1.2 Zinc (Zn).....                                                                                              | 17        |
| 1.5.1.3 Plomo (Pb).....                                                                                             | 18        |
| 1.5.1.4 Cadmio (Cd).....                                                                                            | 19        |
| <b>1.6 MÉTODOS PARA LA ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS.....</b>                                                      | <b>19</b> |
| 1.6.1 Métodos convencionales.....                                                                                   | 20        |
| 1.6.2 Métodos biológicos.....                                                                                       | 21        |
| 1.6.2.1 Bioabsorción bacteriana de metales pesados.....                                                             | 22        |
| <b>1.7 MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS.....</b>                                                                        | <b>23</b> |
| <b>1.8 AMBIENTES SALINOS.....</b>                                                                                   | <b>24</b> |
| <b>1.9 MICROORGANISMOS HALÓFILOS.....</b>                                                                           | <b>26</b> |
| 1.9.1 Dominio Bacteria de microorganismos halófilos.....                                                            | 28        |
| 1.9.2 Estrategias de adaptación y mecanismos de resistencia al estrés<br>osmótico de microorganismos halófilos..... | 30        |
| <b>1.10 BACTERIAS HALÓFILAS TOLERANTES A METALES PESADOS<br/>Y/O CAPACES DE BIOACUMULARLOS.....</b>                 | <b>33</b> |
| <b>1.11 ANÁLISIS METAGENÓMICO.....</b>                                                                              | <b>35</b> |
| 1.11.1 Técnica de secuenciación masiva.....                                                                         | 36        |
| 1.11.2 Análisis de la microbiota de una muestra.....                                                                | 38        |
| <b>JUSTIFICACIÓN.....</b>                                                                                           | <b>41</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                               | <b>43</b> |
| Objetivo general.....                                                                                               | 43        |

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Objetivos específicos.....                                                                                | 43        |
| <b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y METODOS.....</b>                                                             | <b>44</b> |
| <b>2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....</b>                                                                   | <b>44</b> |
| 2.1.1 Obtención de pH de las muestras.....                                                                | 44        |
| <b>2.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....</b>                                                                         | <b>45</b> |
| <b>2.3 ANÁLISIS METAGENÓMICO.....</b>                                                                     | <b>45</b> |
| 2.3.1 Preparación de bibliotecas específicas.....                                                         | 45        |
| 2.3.2 Secuenciación.....                                                                                  | 45        |
| 2.3.3 Análisis bioinformático.....                                                                        | 46        |
| <b>2.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO CULTIVO PARA</b><br><b>MICROORGANISMOS MODERADAMENTE HALÓFILOS.....</b>      | <b>46</b> |
| <b>2.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS VIABLES CON DIFERENTES</b><br><b>CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO.....</b> | <b>46</b> |
| <b>2.6 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE.....</b>                                                           | <b>47</b> |
| <b>2.7 DETERMINACIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES PESADOS.....</b>                                          | <b>47</b> |
| <b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                                          | <b>49</b> |
| <b>3.1 pH DE LAS MUESTRAS.....</b>                                                                        | <b>49</b> |
| <b>3.2 SECUENCIAS OBTENIDAS.....</b>                                                                      | <b>49</b> |
| <b>3.3 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA.....</b>                                                                     | <b>50</b> |
| <b>3.4 RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES DE BACTERIAS</b><br><b>MODERADAMENTE HALÓFILAS.....</b>                | <b>53</b> |

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBIDORA DE<br/>METALES TÓXICOS.....</b> | <b>56</b> |
| <b>CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES.....</b>                                  | <b>59</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                               | <b>60</b> |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Metales pesados reportados en la Península de Yucatán.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 14 |
| Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos.....                                                                                                                                                                                                                                        | 21 |
| Diferentes condiciones ambientales extremas y grupos de extremófilos adaptados a tales condiciones.....                                                                                                                                                                                                       | 24 |
| El árbol filogenético universal basado en la comparación de secuencias de ARNr de subunidades pequeñas. Se destacan aquellas ramas en las que se han identificado microorganismos halófilos. Se indican los géneros representativos de microorganismos halófilos pertenecientes a cada una de esas ramas..... | 27 |
| Ilustración esquemática de la estrategia de salt out de una célula microbiana a los desafíos hiper e hipoosmóticos.....                                                                                                                                                                                       | 32 |
| Solutos compatibles orgánicos encontrados en microorganismos halófilos y haloterantes.....                                                                                                                                                                                                                    | 33 |
| Esquema general de los procesos a llevar a cabo para realizar un experimento de secuenciación masiva.....                                                                                                                                                                                                     | 37 |
| Flujograma del análisis de la microbiota desde las reads hasta la taxonomía.....                                                                                                                                                                                                                              | 39 |
| Puntos de muestreo (del 1 al 4) recolectados en la comunidad de Isla Arena.....                                                                                                                                                                                                                               | 44 |
| Graficas de abundancia relativa nivel Filo.....                                                                                                                                                                                                                                                               | 51 |
| Graficas de abundancia relativa nivel Clase.....                                                                                                                                                                                                                                                              | 52 |
| Grafica comparativa de células viables en cada muestra con 5%, 7.5% y 10% de NaCl (p/v).....                                                                                                                                                                                                                  | 53 |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Colonias formadas por la muestra M1 con concentraciones<br>de 5%, 7.5% y 10% de NaCl (p/v).....                      | 54 |
| Concentración inhibidora de metales Cu, Zn, Cd y Pb de las<br>bacterias modernamente halófilas de la muestra M1..... | 56 |
| Colonias formadas de la muestra M1 con diferentes<br>concentraciones de Cu.....                                      | 57 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Principios y efectos de algunos metales pesados<br>sobre la salud humana.....                                  | 08 |
| Fuentes naturales y antrópicas de metales y elementos<br>de la lista de contaminantes prioritarios.....        | 09 |
| Concentraciones de metales pesados y oligoelementos<br>en aguas residuales.....                                | 11 |
| Desventajas de los métodos convencionales de<br>remoción de metales.....                                       | 20 |
| Clasificación en base al crecimiento óptimo de microorganismos<br>con respecto a la concentración de NaCl..... | 26 |
| Cantidad de reactivo utilizada para preparar concentraciones<br>de soluciones madre.....                       | 47 |
| Cantidad de la solución madre utilizada para preparar 250ml<br>de medio de cultivo.....                        | 48 |
| pH obtenido en los sitios de muestreo.....                                                                     | 49 |
| Número de lecturas procesadas de cada muestra.....                                                             | 49 |

---

## RESUMEN

Las bacterias halófilas se encuentran comúnmente en entornos naturales que contienen una concentración significativa de NaCl, como los hábitats ubicados en zonas próximas a la costa. En este trabajo se obtuvieron 4 muestras de suelo de diferentes puntos de la comunidad de Isla Arena ubicada en las coordenadas 20° 70' N - 90° 45' W, de Campeche, México. Se determinó la diversidad bacteriana utilizando técnicas de secuenciación masiva. Encontrando que cada muestra estaba compuesta principalmente por 4 filos, *Firmicutes* (18% en M1, 51% en M2, 20% en M3 y 43% en M4), *Proteobacteria* (19% en M1, 25% en M2, 25% en M3 y 87% en M4), *Chloroflexi* (9% en M1, 15% en M2 y 6% en M3) y *Actinobacteria* (8% en M2 y 11% en M3). Se determinó el número de células viables moderadamente halófilas por el método diluciones seriadas y cuenta en placa. Encontrando que la muestra M1 contenía el UFC más alto de  $5.67 \times 10^4$  en agar nutritivo suplementado con 5% de NaCl (p/v), además los microorganismos de esta muestra pudieron desarrollarse en una concentración de 10% de NaCl (p/v). Por último, se determinó la concentración mínima inhibidora de los microorganismos contenidos en la muestra M1 con los metales Cu, Zn, Cd y Pb siendo 1mM, 1mM, 0.5mM y 1.5mM los resultados obtenidos respectivamente.

---

## ABSTRACT

Halophilic bacteria are commonly found in natural environments that contain a significant concentration of NaCl, such as habitats located near the coast. In this work, 4 soil samples were obtained from different points of the Isla Arena community located at coordinates 20° 70' N - 90° 45' W, Campeche, Mexico. Bacterial diversity was determined using massive sequencing techniques. Finding that each sample was mainly composed of 4 phyla, Firmicutes (18% in M1, 51% in M2, 20% in M3 and 43% in M4), Proteobacteria (19% in M1, 25% in M2, 25% in M3 and 87% in M4), Chloroflexi (9% in M1, 15% in M2 and 6% in M3) and Actinobacteria (8% in M2 and 11% in M3). The number of viable moderately halophilic cells was determined by serial dilutions and plate count method. Finding that sample M1 contained the highest CFU of  $5.67 \times 10^4$  in nutrient agar supplemented with 5% NaCl (w/v), in addition, the microorganisms in this sample were able to develop in a concentration of 10% NaCl (w/v). Finally, the minimum inhibitory concentration of the microorganisms contained in the M1 sample with the metals Cu, Zn, Cd and Pb was determined, with 1mM, 1mM, 0.5mM and 1.5mM being the results obtained, respectively.



---

## INTRODUCCIÓN

El agua, es una sustancia fundamental para el sostenimiento de la vida en el planeta, por ser indispensable para el desarrollo de los diferentes procesos biológicos. Es importante mencionar que el volumen total de agua en nuestro planeta no ha variado en los últimos 30 o 40 mil años, pero sí ha sufrido un notorio deterioro en su calidad, debido a la contaminación generada por el crecimiento de la población y sus actividades (Auge, 2007).

Entre los diversos contaminantes que han ocasionado el deterioro del agua, se encuentran los metales pesados, los cuales son considerados a nivel mundial como los contaminantes inorgánicos más importantes para el ambiente, por su estabilidad, biodisponibilidad en medios acuosos y poder de biomagnificación, que al llegar a ciertas concentraciones pueden ser tóxicos, generando graves problemas para la perennidad de los ecosistemas (Sandoval, 2006). En cuanto a los seres humanos, dependiendo del grado y tiempo de exposición, pueden causar daños al sistema nervioso central y periférico, renal, hematopoyético y esquelético, así como efectos carcinogénicos (Rodríguez, 2009). El origen de estos elementos se debe a su uso en actividades antropogénicas que utilizan materiales o materias primas que los contienen.

En la Península de Yucatán dadas a sus características kársticas predominantes, cuenta con suelos altamente porosos y permeables, que al estar formados principalmente por carbonatos de calcio y de magnesio; hacen que el acuífero subterráneo del cual depende toda la población sea altamente vulnerable a la contaminación por metales pesados, (Batllori-Sampedro, 2016). Al respecto, Existen reportes de la presencia de Cadmio (Cd) en el agua de la Península de Yucatán, observándose concentraciones por encima de los valores máximos permisibles. Ávila et al. (2004), informaron en un estudio de calidad del agua subterránea, en los sistemas municipales de abastecimiento del Estado de Yucatán, que el 72% de sus muestras sobrepasaron los límites de cadmio permitidos por la NOM-127-SSA11994, sobre salud ambiental para agua de consumo y uso humano.

Ante la necesidad de controlar la presencia de metales pesados por encima de sus valores críticos, se han utilizado para su eliminación o remediación métodos convencionales como la osmosis inversa, la electrodiálisis, la recuperación por evaporación, la ultrafiltración, el intercambio iónico y la fitorremediación. Sin embargo, a pesar de la existencia de estos

---

---

métodos, se presentan varias desventajas al aplicarlos, como ser ineficientes, antieconómicos, crean problemas ambientales y generan desechos secundarios (Ahalya et al., 2003; Aryal y Liakopoulou-Kyriakides, 2015).

En la actualidad, a fin de superar las desventajas de las técnicas convencionales, se han desarrollado nuevas tecnologías de separación económicas y efectivas para la eliminación de metales pesados tóxicos. Tal es el caso del uso de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, utilizados para la eliminación de metales pesados en sitios contaminados; técnica de gran potencial, ya que ha demostrado ser un biosorbente potencial para la recuperación de metales (Rajendran et al., 2003; Wasi et al., 2013; Kordialik Bogacka y Diowksz, 2014). Debido a lo anterior, en la naturaleza podemos encontrar microorganismos que habitan en ambientes hipersalinos, como son lagos salinos y otros sistemas de agua, además de los suelos salinos, denominados microorganismos halófilos por su requerimiento de NaCl para su crecimiento o halotolerantes al crecer aún en ausencia NaCl (Kushner, 1988). Estos microorganismos extremófilos, tienen la característica de hacer frente no solo a las altas concentraciones de aniones y cationes sino también a otros factores ambientales como los valores de pH alcalino, la baja disponibilidad de oxígeno, las temperaturas altas o bajas, la presencia de metales pesados y/u otros compuestos tóxicos, etc. (Oren 2002; Ventosa 2006). Por lo que dichas propiedades los hacen los candidatos adecuados para mejorar la eficiencia de los procesos biológicos utilizados actualmente para la remoción de metales pesados en el agua. En este sentido, El objetivo del presente estudio es: Evaluar la capacidad de tolerar NaCl y metales pesados como el Cu, Zn, Cd y Pb por partes de consorcios microbianos moderadamente halofilos, obtenidos de sedimentos en aguas salinas de la comunidad de Isla Arena, ubicada en el municipio de Calkiní en el Estado de Campeche.

## **CAPÍTULO I. ANTECEDENTES**

### **1.1 METALES PESADOS**

Los metales pesados, son un grupo de elementos que presentan propiedades metálicas, en el que están contenidos metales de transición, algunos semimetales, lantánidos y actínidos. El criterio más frecuente para su clasificación se basa en la densidad específica, de acuerdo con la cual se encierran en este grupo elementos con una densidad mayor a 5 g/cm<sup>3</sup> (Covarrubias y Cabriaes 2017).

### **1.2 CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR METALES PESADOS**

El agua, es un recurso valioso, trascendente para el ser humano y primordial para el desarrollo socioeconómico. Sin embargo, a pesar de su importancia para la vida del hombre, los animales y las plantas, vemos cada día como se va deteriorando en calidad por las diferentes actividades humanas, contaminándola y destruyendo cada día más los cuerpos de agua y con esto todas las especies que se benefician y viven por este recurso hídrico.

En el planeta Tierra existe aproximadamente 1,385,000,000 Km<sup>3</sup> de agua, de los cuales 97.3% es salada, 2.08% se encuentra congelada en los polos y solo la pequeña parte restante está efectivamente disponible para nuestras necesidades (Jiménez, 2001). Se considera que el agua, está contaminada cuando su composición se encuentra alterada y no es adecuada para algunos fines de uso doméstico, industrial, agrícola, recreacional, o bien, para bebida de animales o la vida acuática (De Fernícola, 1983). La tasa de contaminación del agua puede ser estimada en 2000 millones de metros cúbicos diarios. Se hace evidente una crisis de este recurso para los próximos años, lo que comprometería el cumplimiento de uno de los objetivos de Desarrollo del Milenio de la Organización de Naciones Unidas (ONU-DAES, 2005-2015).

En septiembre de 2015, la Asamblea general de la ONU, pactó como objetivo “asegurar la disponibilidad y la gestión sostenible de agua y saneamiento para todos”, concediéndole al

agua un carácter fundamental para todos los países miembro (Reyes et al., 2016). Dentro de los contaminantes que más han llamado la atención se encuentran los metales pesados causado principalmente por las actividades antrópicas del ser humano.

El agua puede contaminarse por metales de manera natural o a través de diferentes procesos de captación y tratamientos, así como su almacenamiento y distribución, afectando su calidad en el punto final de consumo (Rodríguez, 2009). Debido a al movimiento de estos elementos en los ecosistemas acuáticos naturales (aguas subterráneas y superficiales) y a su toxicidad para el sistema biótico, los iones metálicos en general son considerados a nivel mundial como los contaminantes inorgánicos más significativos en el ambiente, por su poder de biomagnificación, sus concentraciones pueden llegar a ser tóxicas, planteando graves problemas para la perennidad de los ecosistemas y la salud del hombre (Sandoval, 2006).

Entre los metales pesados más peligrosos para la vida acuática se encuentran el Pb, Cu, Zn y Cd, ya que son altamente tóxicos aún en concentraciones relativamente mínimas, no son biodegradables y por el contrario se acumulan a lo largo de la cadena trófica (Fergusson 1992). Algunas especies tales como ostras, mariscos y moluscos acumulan el cadmio proveniente del agua en forma de péptidos ligadores hasta conseguir valores de concentración entre 100 y 1000 µg/kg. En la carne, el pescado y frutas se han reportado valores de concentración entre 1 y 50 µg/kg y en algunos granos entre 10 y 150 µg/kg (Reyes et al., 2016).

### 1.3 TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS Y SU EFECTO SOBRE LA SALUD

La gran parte de los elementos metálicos de la tierra, están abundantemente distribuidos en la litósfera, la hidrósfera y la atmósfera. El hombre, está expuesto a estos cuando come sus alimentos, bebe agua y respira el aire. No obstante, es importante considerar que los seres vivos requieren mínimas cantidades de estos metales, por ejemplo: cobre, zinc, hierro, etc., para diversas funciones biológicas. Sin embargo, una escasa o excesiva concentración de éstos pueden perturbar procesos bioquímicos y/o fisiológicos en el organismo (Londoño et. al., 2016). De la concentración total del metal, sólo algunas formas químicas son tóxicas para los organismos, éstas incluyen iones libres y metales liposolubles (Chen et. al., 1996). Podemos mencionar entonces los más importantes mecanismos de toxicidad a nivel molecular de estos metales:

1. Por la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), debido a la autooxidación de metales como  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^+$ , lo que resulta en la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y del radical OH vía reacción de Fenton (Schützendübel y Polle, 2002). El radical OH es uno de los más reactivos que se conocen, por su capacidad de iniciar reacciones en cadena de radicales libres que ocasionan modificaciones y daño irreversible a compuestos celulares como carbohidratos, ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y particularmente lípidos (Mithöfer et. al. 2004).
2. El traslado de centros catiónicos en enzimas fundamentales, como es el caso de la ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (rubisco), la cual tiene un centro catiónico de  $\text{Mg}^{2+}$  que puede ser retirado en presencia de cationes divalentes como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . Dicho proceso provoca que la mencionada enzima pierda su función (Schützendübel y Polle, 2002).
3. Aislamiento de grupos funcionales esenciales en biomoléculas, debido a la alta similitud de los cationes metálicos por los grupos sulfhidrilos de las proteínas, específicamente a los residuos de cisteína, lo que produce su desnaturalización (Schützendübel y Polle, 2002).

Los metales pesados, además se caracterizan por tener efecto bioacumulativo y en concentraciones superiores a las normas establecidas causan daños al sistema nervioso central y periférico, renal, hematopoyético y esquelético, así como también efectos

carcinogénicos; la gravedad del detrimento depende del grado y tiempo de exposición de dichos elementos (Rodríguez, 2009). Debido a lo anteriormente mencionado, los metales pesados se han convertido en una preocupación mundial por los efectos negativos sobre los seres vivos aun en bajas concentraciones y el rápido aumento en los cuerpos de agua naturales. En el cuadro 1 se muestran las principales afectaciones de salud que se han atribuido a los metales pesados.

**Cuadro 1.1** Principios y efectos de algunos metales pesados sobre la salud humana

| Elemento | Efectos sobre la salud                                                                        | Limites (EPA y FDA, 2009) |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| As       | Cancerígeno, náuseas, vómitos, leucopenia, eritrocitopenia, bradicardia                       | 0.01 mg/L                 |
| Ba       | Vómitos, diarreas, calambres, anomalías en la presión sanguínea, debilidad muscular           | 2.0 mg/L                  |
| Cd       | Dolor de cabeza, daño hepático, renal, pulmonar, óseo y fuerte irritación estomacal.          | 0.005 mg/L                |
| Pb       | Cancerígeno, daño al sistema nervioso, debilidad muscular, función motriz disminuida, anemia. | 15.0 g/L                  |
| Cu       | Problemas gastrointestinales, daño hepático y renal                                           | 1.3 mg/L                  |
| Zn       | Molestias estomacales, náuseas, no se conocen los efectos tóxicos a largo plazo.              | de 15 a 22 mg/día         |
| Cr       | Cancerígeno, irritación de la mucosa, y de la piel, daño hepático, sistema nervioso y renal.  | 0.1 mg /L                 |
| Hg       | Cancerígeno, daño sistema nervioso, irritabilidad, calambres, vómitos, mareos, taquicardia    | 2.0 g/L                   |

Tomado o Adaptado de: (WHO, 2003; Marin y Griswold 2009).

#### 1.4 PRINCIPALES FUENTES DE METALES PESADOS

La contaminación por metales pesados produce una serie de impactos en el hombre y en los ecosistemas. Dependiendo de sus comienzos, tendrá unas consecuencias a corto o a largo plazo, estos pueden ser naturales o antropogénicos (Cuadro 2). Los metales pesados se localizan generalmente como elementos naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados fácilmente de forma natural o biológica ya que algunos no tienen funciones metabólicas determinadas para los seres vivos (Barceló y Poschenrieder, 1992). Estos elementos se ingresan a los ecosistemas por fuentes antropogénicas que manejan materiales o materias primas que los

contienen. Estos pueden llegar a depositarse en el agua, lo cual provoca su movilidad a través de ambientes naturales provocando la contaminación de suelo, agua superficial y subterránea, así como diferentes ambientes acuáticos (SEMARNAT, 2009).

**Cuadro 1.2** Fuentes naturales y antrópicas de metales y elementos de la lista de contaminantes prioritarios.

| Elemento | Fuente natural o minerales metálicos.                                                                                                     | Fuentes antrópicas                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cobre    | Metal libre ( $\text{Cu}^0$ ), Sulfuro de cobre ( $\text{CuS}_2$ ), Calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), drenaje de minas.                   | Minería y fundición, manufactura metálica, industria microelectrónica, tratamiento de la madera, almacenes de desechos y escombreras metálicas, industria pirometalúrgica, estiércol de cerdos, plaguicidas, residuos.                                    |
| Zinc     | Blenda ( $\text{ZnS}$ ), Willemita ( $\text{ZnSiO}_4$ ), Calamina ( $\text{ZnCO}_3$ ), drenaje de minas.                                  | Minería y fundición, manufactura metálica, industrias textil y microelectrónica, depósitos de residuos y escombreras metálicas, industria pirometalúrgica, lodos de depuradora, plaguicidas, residuos.                                                    |
| Cromo    | Cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}$ ), Óxido de cromo (III).                                                                                | Manufactura metálica, industria del plástico, tratamiento de la madera, refinerías, industria pirometalúrgica, partículas residuales de minerales.                                                                                                        |
| Plomo    | Galena ( $\text{PbS}$ ).                                                                                                                  | Minería y fundición, industria del hierro y acero, refinerías, industria de la pintura, gases de escape de los automóviles, fontanería de plomo, manufactura de baterías, lodos de depuradora, plaguicidas, depósitos de residuos minerales y escombreras |
| Arsénico | Arseniuros y arseniatos metálicos, sulfuros minerales (Arsenopirita), Arsenita ( $\text{AsO}_2$ ), gases volcánicos, fuentes geotérmicas. | Industria pirometalúrgica, depósitos de desechos y escombreras metálicas, fundición, conservación de la madera, combustión de fuel fósil, estiércol de aves, plaguicidas, vertederos de basuras.                                                          |
| Cadmio   | Carbonatos y sulfuros minerales de cinc y cobre.                                                                                          | Minería y fundición, manufactura metálica, industria del plástico, industria microelectrónica, manufactura de baterías, depósitos de residuos y escombreras metálicas, fertilizantes fosfatados, lodos de depuradora.                                     |

Modificado de Trace Elements in Terrestrial Environments. Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. 2001.



#### **1.4.1 Potenciales rutas para la liberación de metales en los sistemas acuáticos**

A nivel mundial, debido a la rápida industrialización y al desarrollo económico de las últimas décadas, se ha elevado la contaminación por metales en el medio marino; siendo las principales rutas para la liberación de metales en los sistemas acuáticos los efluentes industriales, las descargas de aguas residuales municipales y domésticas, las actividades agrícolas y ganaderas, la exploración y producción de petróleo/gas, la refinación de petróleo además del dragado y recuperación de tierras (Pan y Wang, 2012; Ra et al., 2014).

##### **1.4.1.1 Efluente industrial**

El enriquecimiento de metales pesados en los ecosistemas costeros y estuarinos debido a la descarga directa de aguas residuales o desechos sólidos de diversas actividades industriales, incluidas la minería, la fundición de metales, la impresión, el transporte marítimo y el puerto, las plantas desalinizadoras, el reciclaje de desechos eléctricos y electrónicos (e-waste), ha sido ampliamente reportado. (Youssef y El Said, 2011; Pan y Wang, 2012; Wang et al., 2013; Ra et al., 2014). Cada año, se estima que 160.000 fábricas vierten entre 41.000 y 57.000 toneladas de productos químicos orgánicos tóxicos y 68.000 toneladas de metales tóxicos en las aguas costeras (UNEP y UN HABITAT 2005).

##### **1.4.1.2 Aguas residuales**

Aproximadamente el 67% de las aguas residuales de las zonas urbanas se vierten sin tratamiento en lagos, ríos y aguas costeras, y las instalaciones de tratamiento de aguas residuales vierten anualmente 5.9 billones de galones de aguas residuales en las aguas costeras (UNEP y ONU-HABITAT 2005). La composición de los efluentes de las aguas residuales incluye contaminantes biológicos y químicos con metales pesados y oligoelementos (Cuadro 3) que pueden deteriorar la calidad de los ambientes marinos y costeros receptores (Al-Muzaini et al. 1999; Singh et al. 2004; Naser 2013). Por cierto, la carga total de metales pesados de las aguas residuales crudas en un proceso convencional de tratamiento de aguas residuales generalmente termina en el lodo o permanece en el

efluente final, porque dichos sistemas de tratamiento están diseñados principalmente para la separación de sólidos / líquidos, reducción de materia orgánica y nutrientes. Por ejemplo, en una investigación sobre la presencia y el destino de los metales pesados durante el proceso de tratamiento de aguas residuales operado en modo de lodo activado, Karvelas et al. (2003), informaron que el 47-63% de la entrada diaria de Cr, Pb, Ni, Cd, Zn y Fe terminan en el efluente tratado que finalmente se hunde en los sedimentos a través de los sistemas acuáticos receptores

**Cuadro 1.3** Concentraciones de metales pesados y oligoelementos en aguas residuales

| Metales en aguas residuales | Concentración (mg/l) |
|-----------------------------|----------------------|
| As                          | $\leq 1$             |
| Cd                          | $\leq 0.02$          |
| Cr                          | 0.1 - 0.5            |
| Cu                          | 0.2 - 0.5            |
| Pb                          | 0.08 - 0.4           |
| Hg                          | -                    |
| Ni                          | $\leq 0.02$          |
| Ag                          | $\leq 0.02$          |
| Zn                          | 0.4 – 0.7            |

Adaptada del Islam y Tanaka, 2004

#### 1.4.1.3 Hidrocarburos y actividad relacionadas

La cantidad medible de varios metales, como Ni, Cu, Cr, Cd, Pb, Fe, Zn, vanadio (V), Mn y Co, son constituyentes normales del petróleo crudo o los hidrocarburos (Mudiaga et al., 2011; Onojake y Frank 2013). Por lo tanto, la descarga de aguas residuales de refinerías de petróleo en el medio marino puede contribuir a una mayor concentración de metales pesados. Por otra parte, las actividades de exploración y producción de petróleo / gas en alta mar, podrían conducir a una posible contaminación de sedimentos con metales, al generar cantidades considerables de recortes de perforación y fluidos de desechos de perforación en el fondo marino de las plataformas petrolíferas circundantes (Newbury 1979; Agwa et al. 2013). Las estimaciones sugieren que se han acumulado de 7 a 12 millones de

m de recortes de perforación en el lecho del Mar del Norte, debido a la actividad de perforación de petróleo / gas y, por lo tanto, se informaron concentraciones elevadas de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en los sitios de perforación cercanos (revisado por Breuer et al. 2004). Además de las refinerías y terminales de petróleo (es decir, plataformas petrolíferas en alta mar, oleoductos submarinos), los derrames accidentales de petróleo de los buques (petroleros) y los residuos de petróleo de las aguas de lastre y las unidades terrestres (es decir, las unidades industriales y de construcción naval), están causando contaminación por metales al introducir petróleo hidrocarburos en el medio marino (Naser, 2013).

#### **1.4.1.4 Dragado y Recuperación**

Debido a los importantes desarrollos habitacionales, recreativos y económicos, que incluyen islas artificiales, puertos, plantas de energía / desalinización, hoteles, puertos pesqueros, proyectos de acuicultura, las costas de muchos países se han visto sometidas a actividades de construcción masiva que a menudo implican la conversión de áreas costeras, debido a las acciones intensivas de dragado y recuperación de tierras (Naser, 2013; Freije, 2015). Los procesos de dragado y recuperación, incluida la extracción de materiales de construcción, causan alteraciones físicas (p. Ej., Anoxia), químicas (p. Ej., Toxicidad) o biológicas (p. Ej., pérdida de especies) temporales y/o permanentes en el medio marino que pueden causar una reducción de la biodiversidad, la riqueza, abundancia y biomasa de organismos marinos (Smith y Rule, 2001). De hecho, se informó que un nivel elevado de metales pesados se moviliza en el medio acuático debido a tales actividades (Guerra et al., 2009; Hedge et al., 2009) que pueden entrar en componentes importantes de la red alimentaria, lo que representa una amenaza para la salud humana.

#### **1.4.1.5 Agricultura y ganadería**

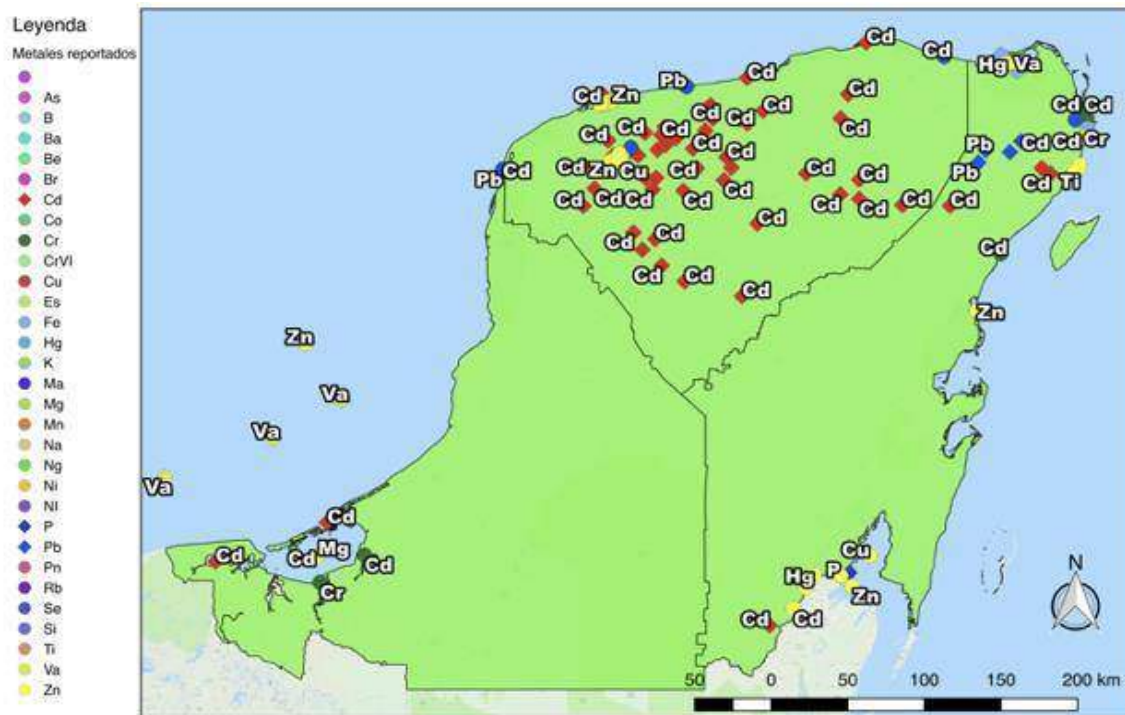
La población mundial en constante crecimiento, requiere un uso intensivo de la tierra para la producción de alimentos, lo que incluye el aporte repetido de fertilizantes y pesticidas. Los fertilizantes se agregan al suelo para proporcionar nutrientes adicionales a los cultivos

o cambiando las condiciones del suelo, como el pH, para que los nutrientes estén más biodisponibles y los pesticidas se utilizan para proteger los cultivos. Los fertilizantes fosfatados, contienen diversas cantidades de Zn, Cd y otros metales pesados, según la roca madre a partir de la cual se haya producido el fertilizante. Los que están hechos de rocas sedimentarias tienden a tener altos niveles de Cd, mientras que los que están hechos de rocas magmáticas tienen solo pequeñas concentraciones de Cd (Adriano 2001). Las diferencias en el contenido de metales pesados son causadas por impurezas coprecipitadas con los fosfatos. Por lo tanto, la entrada de Cd en los suelos agrícolas varía considerablemente según la concentración de Cd del fertilizante utilizado (Hutton y Symon 1986). Aunque los pesticidas a base de metales ya no se usan, su aplicación anterior condujo a una mayor acumulación de metales pesados, especialmente de Hg de metil mercuriales, de As y de Pb de arseniato de plomo en suelos y aguas subterráneas.

En cuanto a la ganadería, está se ha desarrollado de manera intensiva y a gran escala, aumentando significativamente la cantidad de estiércol a nivel mundial. Los aditivos minerales se usan comúnmente en la alimentación animal para satisfacer los requisitos minerales y mejorar el rendimiento de crecimiento del ganado. Los elementos minerales, como el cobre, el zinc, el hierro, el cromo, el manganeso y el cobalto son esenciales para el ganado (Feng et. al. 2018). Debido a la baja pureza de los aditivos minerales utilizados en la alimentación animal, se introducen oligoelementos no esenciales, como cadmio, mercurio, arsénico, plomo y otros metales pesados en la ganadería (Nies 1999; Hill et al. al. 2000). Solo pequeñas cantidades de metales pesados en el alimento son realmente absorbidas por los animales; la mayoría se excreta en las heces (Cang et al. 2004). Como es el caso del cobre y el zinc que absorbe del 5% al 15 % respectivamente, excretando el resto. Por lo tanto, es posible que la porción de Cu y Zn asimilable del suelo suba a límites de toxicidad ante una práctica periódica de fertilización con el estiércol (FAO–INTA, 2012).

## 1.5 METALES PESADOS EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

La península de Yucatán debido a su acelerado crecimiento económico, así como las características geológicas de la misma, contribuyen al deterioro de los numerosos sistemas ambientales y sus recursos; como el de mayor importancia para el ser humano que es el agua (Arcega Cabrera et al., 2014). Esta situación también conlleva a la prevalencia de los metales pesados en la región se incrementa cada vez más en el vital líquido. De acuerdo a una recopilación de información, se reportan 26 metales pesados, donde el Cd (16%) y Pb (14%) son los que predominan (Yañez 2020). Las concentraciones registradas para el Cd son de 1 a 15 µg/L y para el Pb de 1 a 0.66 µg/L (Figura 1).



**Figura 1.1** Metales pesados reportados en la Península de Yucatán (Yañez 2020).

Lo anterior, lo demuestran estudios realizados por diferentes investigadores, tal es el caso de Ávila et al. (2004), quienes reportaron que el 72% de muestras obtenidas rebaso para el Cd los niveles establecidos por la NOM-127-SSA11994 de salud ambiental para agua de

uso y consumo humano. En 2012, los mismos autores reportaron que el 29% de las muestras rebasaron la NOM-127SSA1-1994. Sin embargo, estas concentraciones de acuerdo a los autores fueron favorecidas gracias a el paso del huracán Isidore en 2004, mismo que causo una gran entrada de agua al acuífero provocando una disminución en su concentración.

También en el estado de Yucatán, en el agua de diversos cenotes, Arcega Cabrera et al. (2014), informaron que, durante tres años consecutivos de muestreos anuales en estos cuerpos de agua, el Pb y el Cd exceden el nivel de daño crónico a la biota de los SQUIRTS (Buchman, 2008). El Cu rebasa no solo el nivel de daño crónico, sino también el nivel de daño agudo a la biota, lo que muestra un aporte significativo de aguas residuales al sistema del acuífero, tanto de agricultura como urbanas. Asimismo, se descubrió que el Cd es el metal que se presenta de forma permanente en el sistema hídrico, y sus variaciones indicaron la influencia hidrológica y el transporte desde el interior del Estado hacia la zona costera. En ese sentido González et al. (2004), encontraron en tres zonas de la costa de Yucatán: San Felipe, Progreso y Sisal, concentraciones de los metales pesados Cd, Cr, Cu y Pb en sedimentos de dichos lugares, los cuales fueron 2.224 mg/kg, 4.548 mg/kg, 1.844 mg/kg y 19.373 mg/kg. respectivamente. Por consiguiente, una vez que los metales se incorporen a los sedimentos, podrían no estar fácilmente disponibles para los hábitats acuáticos, pero los cambios en las condiciones fisicoquímicas como el pH, la temperatura, la salinidad, el potencial redox y las concentraciones de ligandos orgánicos pueden ayudar a disolver los metales de una fase sólida. En consecuencia, las condiciones ambientales de un área determinan en gran medida la biodisponibilidad, la movilidad y la toxicidad de los metales (Nobi et al., 2010; Cukrov et al., 2011; Mashiatullah et al. 2013; Sany et al. 2013).

Por otra parte, De La Cruz-Landero et al. (2013), determinaron en la Laguna de Términos en el estado de Campeche, concentraciones de Cadmio (Cd), Plomo (Pb) y Níquel (Ni) en sedimentos, destacando en dos sitios de su muestreo valores superiores a los permisibles para estos metales. En uno de ellos metales como Cd y Pb presentaron concentraciones de 0.75 y 16.05 mg/kg respectivamente, mientras en el segundo sitio hubo concentraciones más altas de 82 mg/kg para el Pb. Con respecto a concentraciones presentes en la biota acuática, Rojas-Mingüer & Morales-Vela (2010), Whelan III et al., (2011) y Alvarado Flores et al., 2017, reportan Cd y Pb en tejidos óseo, algas, en la lorica de diatomeas,

dinoflagelados, rotíferos, cladóceros, copépodos y escamas de peces en los ecosistemas acuáticos del noreste de Quintana Roo, México.

En el caso de metales como el cobre (Cu) y zinc (Zn) están presentes en la región a causa de la porcicultura, considerada la actividad ganadera predominante de la zona. En el cual para incrementar la producción de carne de cerdo hace que el uso de aditivos sea comúnmente utilizado en su alimentación, pero solo pequeñas cantidades de los metales en el alimento son realmente absorbidas, ya que la mayoría se excreta en las heces; en este caso los cerdos tienen tasas de absorción del cobre y el zinc de solo del 10% y 20% (Feng et al., 2018). En consecuencia, las descargas de aguas residuales porcinas contendrán altas concentraciones de material orgánico, patógenos y metales pesados que la convierten en una fuente de contaminación peligrosa (Perez, 2001), que a la vez aumentarían las concentraciones de Cu y Zn en nuestros suelos y, por ende, en las aguas subterráneas de la región.

Por último, se puede mencionar que este aumento de concentración de metales pesados ha traído severas consecuencias; como lo demuestra los estudios realizados por Arcega Cabrera y Fargher (2016) en donde para conocer los niveles actuales de metales en la población infantil (de 6 a 9 años de edad), reportaron la presencia de As, Cd, Cu, Ni y Pb en la orina o sangre de los niños. Las concentraciones encontradas, en algunos casos, excedieron las recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). De igual forma, se mostró que la exposición a metales pesados en la población infantil depende, en gran medida, de su contexto biosocial, es decir, de sus prácticas socioculturales y de su nivel socioeconómico; por ejemplo, se encontró Cu, Pb y Ni, en las familias que manejan leña para cocinar y que se alimentan de pollo de traspatio, mientras la presencia de As, Cd y Cu se manifestó en las familias que consumen pollo o puerco de granja, o donde fumar es una costumbre.

#### **1.5.1 Riesgos de los metales pesados prevalecientes en la Península de Yucatán.**

En la Península de Yucatán, donde se llevan a cabo actividades tales como agricultura, ganadería, manufacturas diversas, turismo, etc., así como la presencia de centros urbanos,

se manejan y desechan para el desarrollo cotidiano de sus actividades una serie de elementos que pueden llegar a significar un peligro para la salud, dependiendo de su concentración y de su forma química. Se carece, en la mayoría de los casos, de sistemas de tratamiento o de drenaje (Arcega Cabrera et al., 2014). A continuación, se menciona algunos riesgos los principales metales pesados reportados en la región.

#### **1.5.1.1 Cobre (Cu)**

El Cu a una concentración adecuada, puede mejorar el crecimiento de microorganismos y sus capacidades para transformar y explotar las fuentes de carbono en forma de polímeros, promoviendo así la descomposición de los desechos agrícolas. Sin embargo, la alta concentración de Cu ampliaría este proceso, lo que puede explicarse por la conexión entre la concentración de Cu y las actividades enzimáticas (Guo et al., 2012; Azarbad et al., 2013). El Cu es más tóxico que el Zn para el catabolismo microbiano del suelo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Obuekwe y Semple, 2013). El Cu excesivo también puede dañar al ganado y a los humanos (Uauy et al., 2008). En este sentido hay que suponer que, por su alta toxicidad, en su estado oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ) participa en reacciones en las que se originan radicales hidroxilos libres ( $\text{OH}\cdot$ ), además del anión superóxido ( $\text{O}_2^{2-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) atacan a las biomembranas a través del proceso peroxidación lipídica, desestabilizan su organización y perturban sus funciones celulares. Además, pueden oxidar directamente a las proteínas y desnaturalizar el ADN y el ARN, lo que puede provocar deterioros que contribuyen al desarrollo de diversos padecimientos como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y al envejecimiento celular (Pizzino et al., 2017).

#### **1.5.1.2 Zinc (Zn)**

Los efectos más distintivos del zinc en los ecosistemas acuáticos son el aumento de la acidez del agua. Los peces pueden almacenar zinc, por lo tanto, el zinc ingresa a los cuerpos de estos peces, dando como consecuencia la biomagnificación en la cadena



alimentaria. Referente a la salud las concentraciones de zinc pueden causar complicaciones de salud eminentes, como son úlcera de estómago, irritación de la piel, vómitos, náuseas y anemia. Altos niveles de zinc pueden perjudicar el páncreas y trastornar el metabolismo de las proteínas, y causar arterioesclerosis. Exposiciones al clorato de zinc intensivas pueden causar desordenes respiratorios. Además, puede causar la gripe conocida como la fiebre del metal. El zinc puede afectar fetos y a los recién nacidos. Cuando sus madres han ingerido grandes concentraciones de zinc los niños pueden estar expuestos a éste a través de la sangre o la leche de sus madres (Moreno Grau, 2003).

#### **1.5.1.3 Plomo (Pb)**

De acuerdo con la Directiva Europea (Mohapatra et al. 2017), el límite máximo permisible de plomo y su compuesto en aguas superficiales es de 0.0072 mg/l y se recomienda menos de 10 µg/l como nivel seguro permisible de consumo de agua (Muñoz et al. 2015). El plomo puede ingresar al cuerpo humano por inhalación, ingestión, contacto dérmico o transferencia a través de la placenta. La acumulación en los tejidos vivos puede causar problemas de salud graves, como encefalopatía, hepatitis y síndrome nefrítico, dañar el sistema nervioso, los riñones y el sistema reproductivo, especialmente en los niños debido a una toxicidad extrema (Tunali et al. 2006; Ren et al. 2015). El plomo es un metal mutagénico y teratogénico que provoca graves riesgos para la salud al acumularse en el cuerpo humano, principalmente en los órganos internos, como el hígado, el bazo, el páncreas y el estómago (Siripongvutikorn et al. 2016). Una alta concentración de exposición al plomo puede causar deterioro neurodegenerativo, daño del sistema nervioso central y periférico, insuficiencia renal, daño reproductivo, trastorno esquelético, retraso mental, disminución de los niveles de coeficiente intelectual de los niños y cáncer (AAP 2005; Bhakta et al. 2012; Järup 2003). Niveles elevados de Pb en sangre (>70 mg dl) inducen nefropatía, alteración del comportamiento, problemas de aprendizaje, déficit en el desarrollo motor fino y grueso, reducción de la fertilidad tanto en hombres como en mujeres, neuropatía, enfermedad de Alzheimer, aumento de la presión intracraneal, convulsiones y muerte (Navas -Acien et al., 2007; Iqbal et al. 2008; Woodruff et al., 2008; Sowmya et al., 2014).

#### **1.5.1.4 Cadmio (Cd)**

El cadmio y sus compuestos son solubles en agua y, por lo tanto, entran fácilmente en la cadena alimentaria humana y se acumulan en los organismos vivos. Incluso a una concentración muy inferior (0.001–0.1 mg/l), el cadmio puede provocar una toxicidad grave en las células vivas (Huang et al. 2014). El Cd interrumpe la función de la proteína al unirse al glutatión y los grupos sulfhidrilo de la proteína y desplaza el zinc y el hierro de las proteínas (Banjerdikij et al. 2005; Flora et al. 2008; Sabdono 2010; Mathivanan y Rajaram 2014a, b). Los iones de cadmio son extremadamente peligrosos para la salud humana y causan daños renales y hepáticos, problemas del tracto respiratorio, problemas pulmonares crónicos, problemas cardiovasculares, problemas del sistema nervioso, osteoporosis y fracturas, anemia, eosinofilia, anosmia, apoptosis, diabetes mellitus, insuficiencia renal, activación de oncogenes, enfermedad de Itai-Itai y provocar la muerte (Waisberg et al., 2003; Edwards and Prozialeck, 2009; Semerjian, 2010; Abd-Elnaby et al., 2011; Khan et al. 2016). La naturaleza tóxica del Cd también afecta a los organismos acuáticos, incluida la inhibición severa de sus procesos fisiológicos, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Shamim y Rehman 2012).

#### **1.6 MÉTODOS PARA LA ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS**

Las estrictas leyes con las que se cuenta a nivel mundial sobre la contaminación de metales pesados exigen un tratamiento para estos, por lo que se han determinado diferentes métodos fisicoquímicos para su biorremediación (Mishra y Malik, 2013).

En contraste con los contaminantes orgánicos, los metales no logran descomponerse por vía biológica, física o química (Trejo y David, 2005). De acuerdo a su naturaleza, los métodos de remediación se pueden clasificar en: fisicoquímicos o biológicos (Covarrubias et al., 2015). En el caso de los métodos fisicoquímicos se derivan la mayor parte de los métodos comúnmente utilizados para la eliminación de metales pesados denominados también convencionales.

### 1.6.1 Métodos convencionales

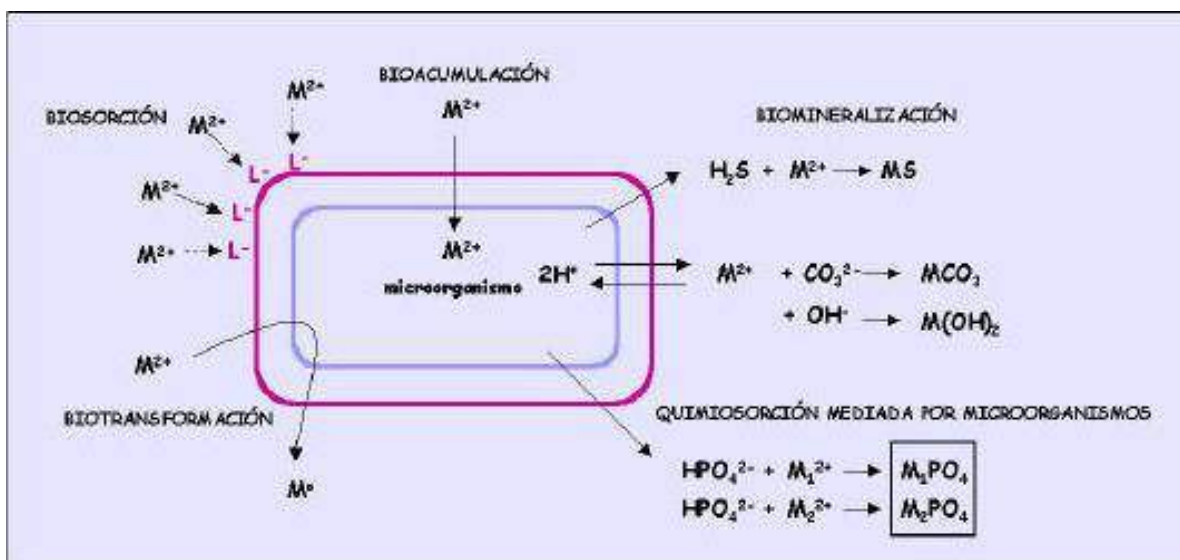
La presencia de metales pesados por encima de los valores críticos en el medio ambiente es inaceptable y su remediación / eliminación debería ser necesaria (Aryal y Liakopoulou-Kyriakides 2015). En su programa de eliminación / remediación se utilizan varios métodos convencionales de uso común tales como osmosis inversa, electrodiálisis, recuperación por evaporación, ultrafiltración, intercambio iónico, fitorremediación. Estos métodos tienen varias desventajas, como la generación ineficiente y antieconómica de desechos secundarios, la creación de problemas ambientales como se describe en el cuadro 4 (Ahalya et al., 2003; Aryal y Liakopoulou-Kyriakides 2015). Estas técnicas también son inconvenientes para el tratamiento de efluentes industriales que tienen menos de 100 mg/l de iones metálicos tóxicos disueltos (Gabr et al. 2008).

**Cuadro 1.4** Desventajas de los métodos convencionales de remoción de metales

| Métodos convencionales   | Desventajas                                                                                                     | Referencias                                                 |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Osmosis inversa          | Alto costo                                                                                                      | Ahalya et al. (2003)                                        |
| Electrodiálisis          | Formación de hidróxidos metálicos que obstruyen la membrana                                                     | Ahalya et al. (2003)                                        |
| Ultrafiltración          | Generación de lodos                                                                                             | Ahalya et al. (2003)                                        |
| Intercambio iónico       | Alto costo y remoción parcial de ciertos iones                                                                  | Ahalya et al. (2003); Aryal y Liakopoulou-Kyriakides (2015) |
| Precipitación química    | Gran cantidad de lodos que contienen compuestos tóxicos producidos durante el proceso                           | Ahalya et al. (2003); Aryal y Liakopoulou-Kyriakides (2015) |
| Fitorremediación         | La eliminación de metales lleva mucho tiempo y la generación de una planta para una mayor biosorción es difícil | Ahalya et al. (2003); Aryal y Liakopoulou-Kyriakides (2015) |
| Recuperación evaporativa | Limitación en la aplicabilidad, rentable, menos eficiente                                                       | Ahalya et al. (2003); Aryal y Liakopoulou-Kyriakides (2015) |

## 1.6.2 Métodos biológicos

Para superar las desventajas de las técnicas convencionales anteriores, se han desarrollado nuevas tecnologías de separación económicas y efectivas para la eliminación de metales pesados tóxicos. Los que se encuentran en este rubro son denominados como métodos biológicos, que son aquellos que aprovechan el potencial metabólico de organismos vivos para limpiar ambientes contaminados (Covarrubias et al., 2015; Gadd, 2010; Watanabe, 2001) y son también nombrados como métodos de biorremediación. Las bacterias y los hongos son los microorganismos más utilizados en los procesos de biorremediación de metales pesados (Schippers y Sand, 1999; Valls y De Lorenzo, 2002; Gadd, 2010; Gonzalez-Chavez, 2004) Los procesos de biorremediación que ofrecen los microorganismos para el tratamiento de la contaminación por metales son de una alta especificidad mediante mecanismos de bioabsorción, bioacumulación, biotransformación y biomineralización (Figura 2), muchas veces transformando los metales a formas no tóxicas (Vullo, 2003).



**Figura 1.2** Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos (Vullo 2003)

De estos mecanismos los más usados por los microorganismos son la biosorción y la bioacumulación. En este caso la biosorción de metales se define como la eliminación o

acumulación de iones metálicos de la solución de desecho mediante el uso de materiales biológicos a través de una variedad de procesos de absorción metabólicamente mediados o físico-químicos (Fourest y Roux, 1992; Ahalya et al., 2003). La retención de iones de metales pesados dentro de la célula microbiana mediante biosorción se denomina bioacumulación (Liang et al., 2014).

#### **1.6.2.1 Bioabsorción bacteriana de metales pesados**

Las bacterias son de naturaleza generalizada y tienen la capacidad de adaptarse y realizar sus diversas actividades celulares fisiológicas en cualquier condición ambiental extrema. Las bacterias son más capaces de adaptarse rápidamente a los cambios y el deterioro ambientales y actúan como posibles candidatas al desempeñar un papel importante en la protección y el desarrollo de la sostenibilidad del ecosistema deteriorado (Dash et al. 2013). Las bacterias de hábitats contaminados con metales poseen altos niveles de capacidad de tolerancia a los metales y pueden ser útiles en la biorremediación de metales tóxicos (biosorción / bioacumulación / biotransformación) mediante una variedad de mecanismos inherentes que incluyen la precipitación de metales como fosfato, sulfuro, carbonato; volatilización mediante metilación / etilación; exclusión física en membranas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS); sistema de eflujo metálico impulsado por energía y secuestro intracelular mediado por proteínas similares a la metalotioneína (Naik et al. 2012; Alencar et al. 2017). La biomasa bacteriana tiende a eliminar los metales pesados de las soluciones acuosas en condiciones muy diluidas.

## 1.7 MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS

Los microorganismos son un grupo diverso y grande de organismos microscópicos que pueden llevar a cabo sus procesos metabólicos de crecimiento, generación de energía y reproducción, de manera independiente de otras células (Madigan et al., 2003). Entre estos microorganismos encontramos los denominados extremófilos, que se distinguen por desarrollarse bajo condiciones que podrían matar a la mayoría de las otras criaturas. Su hábitat natural son los ambientes extremos, el cual es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pero pueden ser vitales para la supervivencia de otro organismo. Estos ambientes son aquellos que presenta valores extremos de determinadas medidas físico-químicos tales como temperatura, pH, salinidad, irradiación solar, concentración de nutrientes o metales tóxicos, situaciones inusuales poco propicios o letales para la gran parte de microorganismos (MacElroy, 1974).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente estos microorganismos se clasifican en base a la condición física o química extrema del ambiente donde habitan (figura 3): termófilos (temperatura óptima de desarrollo arriba de 45 °C); dentro de éstos se hallan los hipertermófilos (temperatura óptima de desarrollo superior a 80 °C); psicrófilos (temperatura óptima de desarrollo por abajo de 10 °C); acidófilos (pH óptimo de desarrollo por abajo de 5); alcalófilos (pH óptimo de desarrollo por arriba de 8); halófilos (habitan en medios hipersalinos, de 5% a 30% de sal); osmófilos (habitan en altas presiones osmóticas); radiófilos (resisten altos niveles de radiación); metalófilos (toleran altas concentraciones de metales pesados); piezófilos (antes llamados barófilos, toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm) (Oliart et al., 2016).

Muchas veces se tiene la idea simplista de considerar que los extremófilos solo son capaces de resistir a una situación extrema de un ambiente extremo (Harrison et al., 2013), pero se han descrito un número considerable de especies de los tres dominios de vida que han sido aisladas de estos lugares, con capacidad para tolerar varias condiciones extremas, permaneciendo en donde el pH, la presión, la temperatura, la radiación, la salinidad son muy elevadas o de carácter muy variable, estos microorganismos resisten ante una poliextremofilia (Seckbach et al., 2013).



**Figura 1.3** Diferentes condiciones ambientales extremas y grupos de extremófilos adaptados a tales condiciones (Modificado de Comerio et al., 2007).

Los extremófilos han despertado un gran interés en distintas industrias, debido a sus enzimas, catalizadores biológicos que aligeran las reacciones químicas de la célula, como en el caso de las arqueas extremófilas les conceden colonizar los ambientes más inhóspitos. Las enzimas habituales tienen ciertas restricciones, sin embargo, las extremoenzimas, inician a operar justo en el punto donde las habituales dejan de funcionar. Existen numerosos procesos industriales que requieren el uso de estos aceleradores químicos, tal es el caso de las enzimas que participan en la producción de edulcorantes, papel, síntesis de detergentes, elaboración de alimentos como pan y vino, tratamiento de residuos, extracción de petróleo, obtención de biochips para la identificación de personas y el diagnóstico de enfermedades (Van Den Burg 2003).

## 1.8 AMBIENTES SALINOS

Los ambientes salinos e hipersalinos son ambientes extremos que se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de sal. Estos ambientes contienen una cantidad muy alta de iones (factor que le atribuye la característica de ser un ambiente inhóspito para la

mayoría de los microorganismos), elevadas o muy bajas temperaturas, elevados valores de pH o bajas concentraciones de oxígeno (Rodríguez-Valera, 1993).

Los ambientes hipersalinos acuáticos en los que la concentración de sal es superior a la del agua de mar (3.5% de sales totales) pueden ser de origen natural como el Gran Lago Salado en Estados Unidos o el Mar Muerto en Israel. Pero también pueden ser de origen artificial como las salinas construidas por el hombre para la obtención de sal. Por otra parte, gran parte de las salinas están ubicadas en la costa, ya que la sal se adquiere por la evaporación del agua de mar (Soria, 2004). Por consiguiente, lo que necesita un ambiente para que adquiera un carácter evaporítico y se conserve es poseer un cuerpo de agua poco profundo y cerrado, de lo contrario la sal que se precipita no se concentrará en un mismo lugar, y podría moverse o dispersarse a otros afluentes, por lo tanto, la concentración de sal se reducirá. Por otra parte, se ha mencionado que las zonas salinas están dentro de componentes climáticos áridos y semiáridos. Otro punto importante es el espacio de alojamiento del entorno salino debe estar sobre un hundimiento sedimentario que no esté completamente lleno o cubierto por otros sedimentos, y por último el suelo debe mantenerse compacto para que la sal que se precipita no pase al subsuelo, y solo por los pequeños poros disponibles el agua se escurra, lo que permitirá una mayor concentración salina (Warren, 2016).

La poliextremofilia y poliextremotrofia reside en la adaptación a la combinación de condiciones extremas, y en la mayoría de los ambientes hipersalinos se pone en marcha esta múltiple resistencia, debido a que la concentración elevada de sal no es el única responsable de causar estrés para desencadenar adaptación en los microorganismos, existe acidez, alcalinidad y temperaturas frías o calientes en los lagos y suelos hipersalinos, encargados de seleccionar la microbiota de estos lugares (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Todas las características mencionadas de estos microorganismos, ha despertado el interés de su estudio para su uso biotecnológico debido a sus biomoléculas son basicamente resistentes a las condiciones agresivas de su ambiente, lo cual provoca que la comunidad científica realice intensos trabajos para intentar entender los mecanismos íntimos de resistencia, pero también para estudiarlos en la perspectiva del desarrollo de aplicaciones industriales entre las que la PCR constituye el más notorio ejemplo (Rossi et al., 2003)



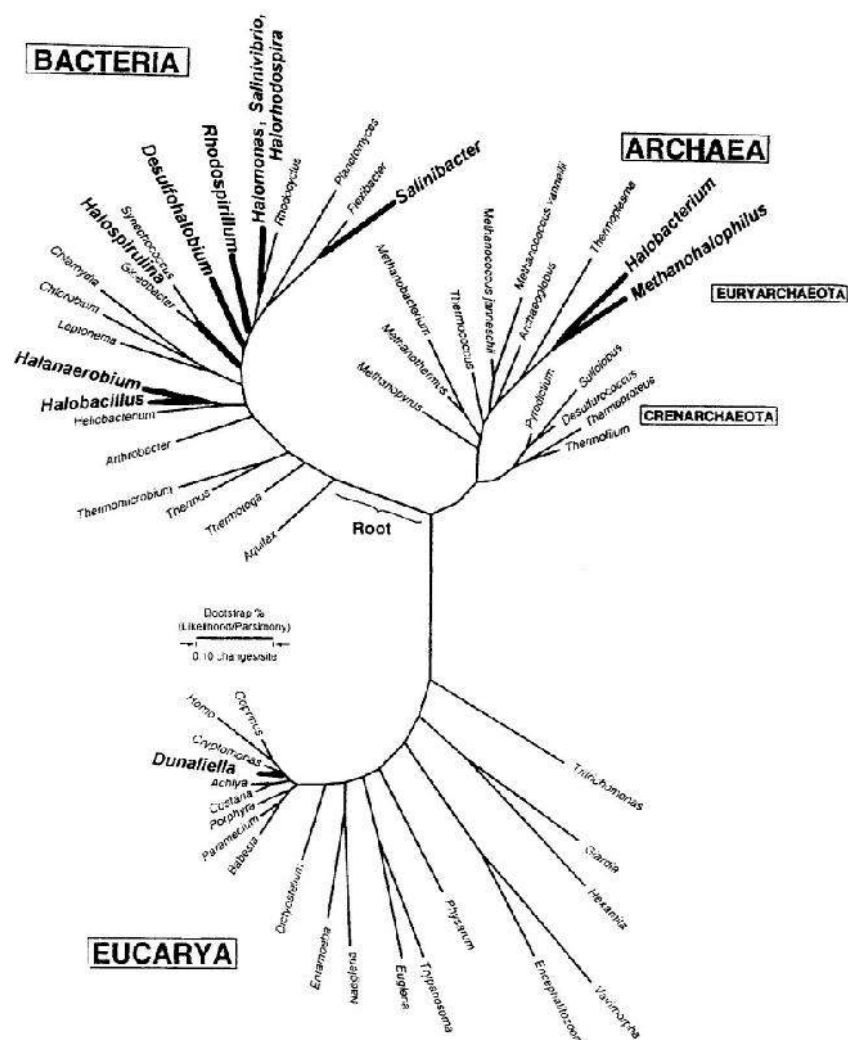
## 1.9 MICROORGANISMOS HALÓFILOS

Los ambientes hipersalinos están ampliamente distribuidos en nuestro planeta y están representados principalmente por lagos salinos y otros sistemas de agua, así como por suelos salinos. Los microorganismos que habitan esos hábitats se designan como halófilos y son organismos extremófilos que deben hacer frente no solo a la alta composición iónica sino también a otros factores ambientales como los valores de pH alcalino, la baja disponibilidad de oxígeno, las temperaturas altas o bajas, la presencia de metales pesados y/u otros compuestos tóxicos, etc. (Oren 2002; Ventosa 2006). La expresión «halófilo» viene del griego donde «halo» cuyo significado es «sal» y «filo» que significa «amante de» es decir, significa «amante de la sal» (Soria 2004). Sin embargo, no todos los microorganismos halófilos tienen los mismos requerimientos de sal, por lo que tienden a agruparse en función del rango de sales que necesitan para tener un desarrollo óptimo (Cuadro 5).

**Cuadro 1.5** Clasificación en base al crecimiento óptimo de microorganismos con respecto a la concentración de NaCl (Kuhner, 1988).

| Grupos                | Crecimiento óptimo con respecto a la concentración de NaCl         |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|
| I. No requieren sal   |                                                                    |
| A. No halófilos       | Crecen mejor en medios con menos de 1% (0.2 M) de NaCl             |
| B. Halotolerantes     | Pueden tolerar altas concentraciones de NaCl                       |
| II. Requieren sal     |                                                                    |
| A. Halófilos extremos | Crecen de manera óptima en medios con 15 a 30% (2.5–5.2 M) de NaCl |
| B. Halófilo moderados | Crecen de manera óptima en medios con 3 a 15% (0.5–2.5 M) NaCl     |
| C. Halófilos leves    | Crecen de manera óptima entre 1% y 3% (0.2 0.5 M) de NaCl          |

Los microorganismos halofílicos se encuentran en los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eucarya (Oren, 2002). En cada uno de estos dominios nos encontramos con representantes que pueden crecer hasta las concentraciones de sal más altas. La figura 4



**Figura 1.4** El árbol filogenético universal basado en la comparación de secuencias de ARNr de subunidades pequeñas. Se destacan aquellas ramas en las que se han identificado microorganismos halófilos. Se indican los géneros representativos de microorganismos halófilos pertenecientes a cada una de esas ramas (Oren, 2002).

Una característica en los halófilos bacterianos es la falta de peptidoglucanos, no sólo en las paredes de las *halobacterias* (Brown y Shorey, 1963; Brown, 1964), sino también en las paredes de las gram-positivas como los *halococci*. Se cree que la ausencia de peptidoglucanos en las bacterias halófilas se debe a una imposibilidad para sintetizar ácido murámico (Galinski, 1993). Los más importantes ácidos fosfatídicos de los lípidos Halobacteriales derivan del 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol. Los fosfátidos con mayor presencia en las halobacterias son análogos, como el diéster del fosfatidil glicerol fosfato, el cual puede almacenarse hasta llegar a un 70 % del fósforo lipídico en *H. cutirubrum* y un 80 % en *H. halobium* (Marshall y Brown, 1968). Los éteres lipídicos no son propios de los organismos halófilos (Snyder, 1972), pero no son muy frecuentes en las bacterias. Los lípidos de los organismos halófilos son muy ácidos, una propiedad de relevancia directa, en relación con la presencia de medios salinos (Langworthy et al. 1974).

Se han elaborado diversos medios sintéticos para las bacterias halófilas. Dundas et al. (1963), manejaron un medio que tenía 10 aminoácidos y ácido cítrico, el cual estimuló el desarrollo limitado. Además, estos mismos autores concluyeron que la valina, metionina, isoleucina y leucina son fundamentales para el crecimiento de *H. salinarium*. Sus resultados mostraron además que la lisina no es esencial. Por otra parte, Onishi et al., coincidieron con alguno de los resultados mencionados anteriormente en donde los aminoácidos esenciales para *H. cutirubrum* son la arginina, leucina, lisina y valina. Por otra parte, Onishi et al., manejaron un medio que contenía 15 aminoácidos, 2 nucleótidos, glicerol y asparagina o  $\text{NH}_4^+$ , que mostró resultados más favorables.

### **1.9.1 Dominio Bacteria de microorganismos halófilos**

En los tres dominios de la vida nos podemos encontrar con representantes que pueden crecer hasta las concentraciones de sal más altas, pero es en el dominio Bacteria en el que nos podemos encontrar un grupo versátil, adaptadas a vivir en bajos rangos de salinidades y con posibilidad de ajustarse rápidamente a los cambios en la concentración de sal externa. En contraste, con halófilas Archea (familia *Halobacteriaceae*) que mayormente son encontradas en salinidades superiores, las hace rigurosamente dependientes de la

presencia de altas concentraciones de sales, en este caso de 3 a 4M para la mayoría parte de las especies (Ventosa et al., 1998).

Este dominio se subdivide actualmente en 28 filos y las especies moderadamente o extremadamente halófilas con nombres válidamente publicados se incluyen en los siguientes filamentos: *Proteobacterias*, *Firmicutes*, *Actinobacterias*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae*, *Cyanobacteria* y *Tenericutes* (Ventosa et al. 2012). Las bacterias halófilas y halotolerantes varían ampliamente en sus propiedades fisiológicas: encontramos especies aeróbicas y anaeróbicas, quimioheterótrofos, fotoautótrofas y fotoheterotróficas, así como quimiotitrofos (Oren, 2002).

De acuerdo a estudios realizados por Rodríguez et al. (1981), bacterias heterótrofas halófilas de cepas no pigmentadas muestran un mejor crecimiento a una concentración de 10% al 15% de sal, dando como un carácter de halófilo moderado, mientras las bacterias pigmentadas crecen en una concentración del 25% al 30% de sal. En estos estudios se determina además que para especies de bacterias halófilas pigmentadas la morfología con mayor presencia son los bastones, seguida de la forma de coco, y presentando un mayor polimorfismo en concentraciones menores del 10-20%. Para el caso de las bacterias no pigmentadas la forma era distinta, según las concentraciones de sales; las colonias derivadas de una concentración del 10-20% de sales, los microorganismos con mayor representación tienen forma de espiral, seguidos de bastones con movilidad, con baja proporción cocos y bastones con movilidad.

La transferencia de nutrientes a través de la membrana celular tanto en halófilos aerobios Gram-positivos como Gram-negativos dependen del  $\text{Na}^+$  (Oren, 2002). Para bacterias halotolerantes las concentraciones de sodio entre 0.2 y 1 M acrecienta la semejanza del sistema de transporte, mientras que para concentraciones sobre 1 M la semejanza se ve disminuida. En algunos casos el  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ , o  $\text{NH}_4$  pueden ser reemplazados por el  $\text{Na}^+$  (Ventosa et al., 1998).

### **1.9.2 Estrategias de adaptación y mecanismos de resistencia al estrés osmótico de microorganismos halófilos**

Las disminuciones y aumentos de la osmolaridad externa son señales ambientales omnipresentes y factores estresantes que afectan el crecimiento y la supervivencia de muchos organismos (Bremer 2000). La respuesta celular a las fluctuaciones en la osmolaridad externa se ha estudiado de manera particularmente intensiva en bacterias y estos estudios han proporcionado un marco básico para comprender sus estrategias adaptación al estrés osmótico.

Uno de estos descubrimientos es la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares ante a una nueva situación de estrés osmótico que incluye alteraciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos. Con respecto a los fosfolípidos, a medida que se acrecienta la salinidad, la membrana se enriquece en fosfatidilglicerol y/o en difosfatidilglicerol (cardiolipina), fosfolípidos cargados negativamente, a costa de una baja en la fosfatidiletanolamina, un fosfolípido neutro. Estas modificaciones en la composición de lípidos polares contribuyen a una consistencia en la membrana, a la vez que son necesarios para mantener la estructura en doble capa lipídica, ya que la fosfatidiletanolamina, en respuesta a la salinidad, tiende a crear fases en una única capa (Ramírez et al., 2004).

La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana también experimenta alteraciones con respecto a la temperatura y la salinidad, siendo diferentes en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Así, en bacterias halófilas moderadas Gram-negativas, el cambio más destacable es el incremento de los ácidos grasos ciclopropánicos, a costa de los insaturados, de los cuales proceden. Este efecto se ha explicado en *Pseudomonas halosaccarolytica* (Monteoliva et al., 1993), *H. halmophila* (Monteoliva et al.1988) y *H. salina* (Valderrama, 1998).

Además de la adaptación la membrana celular para hacer frente a los aumentos repentinos o sostenidos de la osmolaridad y/o salinidad ambiental los microorganismos también han desarrollado dos mecanismos que generalmente se conocen como “salt-in” y “salt-out” (Bremer, 2000; Kempf y Bremer, 1998). En el caso de “salt-in”, su ajuste a un entorno de alta osmolaridad requiere contramedidas activas para mantener un citoplasma

adecuadamente hidratado y un nivel de turgencia fisiológicamente adecuado (Van Den Berg et al., 2017; Wood 2011; Roeßler y Müller 2001; Kempf y Bremer 1998). Un número limitado de bacterias y arqueas que viven principalmente en ecosistemas de alta salinidad permanente utilizan este mecanismo de “salt-in” y acumulan concentraciones molares de iones  $K^+$  y  $Cl^-$  de forma permanente para equilibrar el gradiente osmótico a través de su membrana citoplásmica (Oren 2013). Si bien es energéticamente favorable (Oren 2011), el citoplasma de alta fuerza iónica resultante forzó ajustes de todo el proteoma para mantener la funcionalidad biológica de todos los componentes extra e intracelulares.

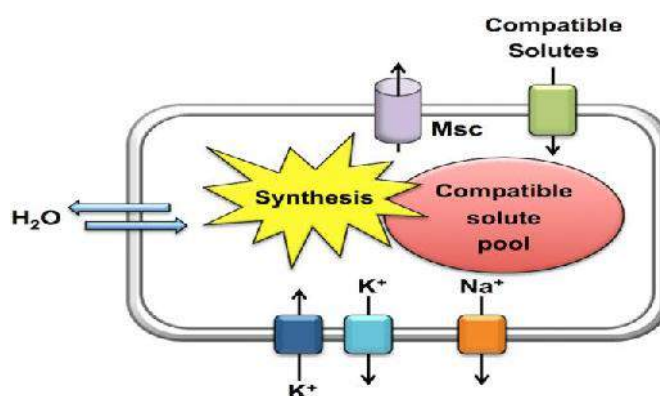
En una escala de tiempo evolutiva, esto ha dejado una firma ácida en el proteoma con una distribución estrecha de puntos isoeléctricos como consecuencia de la hidrofobicidad reducida de las proteínas y un fuerte aumento de los aminoácidos cargados negativamente expuestos en las superficies de las proteínas. En un citoplasma altamente enriquecido en los iones  $K^+/Cl^-$ , estas modificaciones aumentan la hidratación, solubilidad, estabilidad y funcionalidad de las proteínas y se pensó que estaban acopladas con la halofilia de la proteína obligada (Oren, 2013; Talon et al., 2014; Becker et al., 2014). La identificación de un proteoma ácido se consideró predictiva del uso de la sal en la estrategia de adaptación de osmostress. Si bien esto probablemente sea correcto en general, los hallazgos recientes llevaron a modificaciones de esta visión de largos datos (Oren 2013), debido a que se descubrió un número considerable de Halobacteriales, un grupo de arqueas halófilas, que combinan un citoplasma con alto contenido de  $K^+$  con la acumulación de solutos compatibles (Youssef et al. 2014).

Lo anterior da la pauta para el segundo mecanismo, conocido como “salt out”, el cual es utilizado por las bacterias halófilas como halotolerantes y las arqueas metanógenas. En este caso el balance osmótico se fundamenta mediante pequeñas moléculas que son sintetizadas por las células o tomadas del lugar donde se encuentran disponibles. Este mecanismo también es llamado “compatible solute” o “solutos compatibles”. Los solutos compatibles se definen como solutos que a concentraciones superiores permiten a las enzimas desempeñarse adecuadamente (González y Peña, 2002).

Los microorganismos que emplean este mecanismo de eliminación de sal importan grandes cantidades de iones  $K^+$  como respuesta inicial y rápida al estrés osmótico, pero evitan su

acumulación a largo plazo en condiciones de estrés osmótico sostenido. La exportación de  $\text{Na}^+$  citotóxico que puede ingresar a la célula a través de varios procesos, como por ejemplo, a través de transportadores acoplados a  $\text{Na}^+$  para solutos compatibles (Bremer 2000).

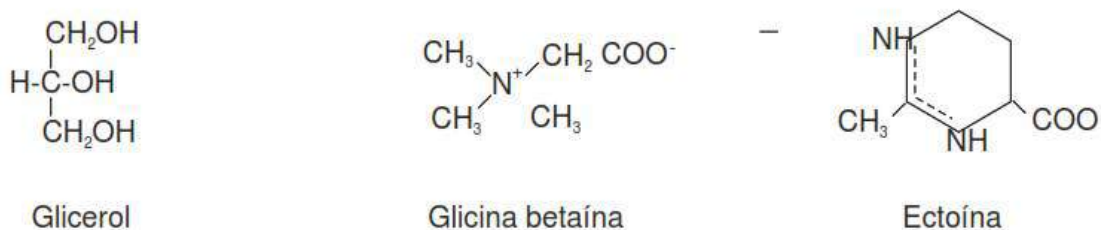
Por lo tanto, en lugar de iones, los microorganismos que han adoptado la estrategia “salt-out”, equilibran el gradiente osmótico a través de su membrana citoplasmática principalmente por una alta acumulación de varios tipos de solutos compatibles (Wood 2011; Roeßler y Müller 2001; Kempf y Bremer 1998; Street et al., 2006). Esto les permite reducir posteriormente la reserva de  $\text{K}^+$  mediante la exportación (figura 5) sin comprometer el nivel del potencial osmótico del citoplasma requerido para el crecimiento y mantenimiento de la turgencia (Van Den Berg et al., 2017; Wood 2011; Rojas y Huang 2018). La acumulación de solutos compatibles también contrarresta el plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas que se producirán tras la imposición de estrés osmótico (Street et al., 2006; Stadtmiller et al., 2017). La acumulación de solutos compatibles se puede lograr mediante síntesis estimulada osmóticamente o mediante la absorción de fuentes ambientales a través de sistemas de transporte controlados osmóticamente (Wood 2011; Roeßler y Müller 2001; Kempf y Bremer 1998).



**Figura 1.5** Ilustración esquemática de la estrategia de salt out de una célula microbiana a los desafíos hiper e hipoosmóticos (Czech y Bremer 2018).

Aunque la síntesis e importación de solutos compatibles es, desde un punto de vista energético, mucho más exigente que la estrategia salt-in (Oren 2013), proporciona un grado considerable de flexibilidad a los que adoptan “salt-out” porque no los vincula permanentemente ecofisiológicamente con una solución salina alta o con hábitats de alta

osmolaridad. En conjunto, estos microorganismos se adaptan a aumentos repentinos y sostenidos de la osmolaridad ambiental a través de cambios coordinados en su perfil transcripcional de todo el genoma, a través de la inducción de genes de respuesta osmostress para importadores de solutos compatibles y la modulación de la actividad de estos sistemas de transporte (Wood 2011; Kempf y Bremer 1998). Los solutos compatibles más destacados para que estas bacterias toleren permanecer en estos entornos son glicerol, glicina betaína y ectoína mostrados en la figura 6 (González y Peña, 2002).



**Figura 1.6** Solutos compatibles orgánicos encontrados en microorganismos halófilos y haloterantes  
(Modificado de González y Peña, 2002)

## 1.10 BACTERIAS HALÓFILAS TOLERANTES A METALES PESADOS Y/O CAPACES DE BIOACUMULARLOS

Las bacterias halófilas o moderadamente halófilas han demostrado ser útiles para la investigación de las bases moleculares de la resistencia a los metales pesados, por ejemplo, Massadeh et al. (2005), encontraron bacterias moderadamente halófilas capaces de crecer en medio nutritivo suplementado con 10% de NaCl y 2250 ppm de Pb. Además, se observó por medio de espectrometría de absorción atómica que eran capaces de absorber el 96 % y 89.79% de Pb y Cd respectivamente de una solución con 500 ppm de ambos elementos en un lapso de 3 semanas. Del mismo modo Amoozegar et. al. (2005), utilizando bacterias moderadamente halófilas aisladas de ambientes salinos de Irán, encontró una capaz de eliminar Pb y Cd en medios suplementados con 5mM de estos metales tóxicos. De acuerdo a la caracterización fenotípica y el análisis filogenético basado



en comparaciones de secuencias del gen 16S rRNA indican que este microorganismo pertenece al género *Halomonas*.

Por otra parte, Osma et al. (2010), descubrió una cepa bacteriana con una alta resistencia al cobre, de hasta  $1.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; aunque también era resistente a otros metales como el níquel, el cobalto y el zinc. El análisis parcial de ARNr 16S reveló que la cepa pertenecía al género *Halomonas*. La absorción de cobre, medida por espectrometría de absorción atómica, fue mayor en ausencia de NaCl que en presencia de  $0.5\text{-}1.0 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl durante 5 a 15 min de incubación. También Xu et al. (2013), descubrió una bacteria moderadamente halófila, en un sedimento de aguas profundas recogido en el Océano Atlántico Sur capaz crecer en un líquido que contenía altas concentraciones de metales pesados, como  $\text{Mn}^{2+}$  (200 mM),  $\text{Co}^{2+}$  (1,0 mM),  $\text{Cu}^{2+}$  (2,5 mM) y  $\text{Zn}^{2+}$  (14 mM). Este último elemento el zinc, es de alta toxicidad para halófilos moderados y su toxicidad puede verse notablemente influida por los componentes inorgánicos, aniónicos y catiónicos del medio, así como por la materia orgánica soluble (Nieto et al., 1989). Por tal motivo, la tolerancia al zinc se confirmó en placas medio halo, medio marino y solución salina (Nieto et al., 1989) que contienen 5% de NaCl (p / v) y diferentes concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  (0, 1, 10, 15, 20 y 30 mM). Por ultimo mencionaremos que estudios realizados sobre aislados de *haloarqueas* de los géneros *Haloferax*, *Halococcus*, *Halorubrum* y *Haloarcula* mostraron un patrón de resistencia equivalente al descrito por Nieto (1991), con las cepas *Haloferax* BBK2 y *Halococcus* BK6 que revelaron mayor tolerancia al  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  con 0.5mM. Sin embargo, se observaron concentraciones máximas de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  de 4mM y 2mM respectivamente, que favorecieron el crecimiento utilizando medio de extracto de levadura de triptona suplementado con NaCl (Chaudhary et al., 2014; Salgaonkar et al., 2016).

### 1.11 ANÁLISIS METAGENÓMICO

La metagenómica se fundamenta en el uso de técnicas de biología molecular para estudiar la variedad de genomas microbianos, llamados también metagenomas, a partir de muestras ambientales. La diversidad microbiana de los metagenomas se ha detallado mediante el uso del gen 16S rRNA, que codifica para el ARN ribosómico que conforma la subunidad pequeña de los ribosomas (Cortés-López et al., 2020). El gen 16S rRNA se ha manejado como marcador molecular, y se piensa que es la herramienta idónea para la clasificación taxonómica, ya que son genes conservados y evolutivamente estables, pero que contienen regiones hipervariables. La secuenciación de dichas regiones ha creado grandes bases de datos que permiten la clasificación taxonómica (D'Amore et al., 2016).

El análisis metagenómico se inició con el uso de distintos marcadores moleculares como el 16S rRNA entre otros, en donde se ha visto que algunos de estos marcadores mejoran su eficacia cuando la técnica que se utiliza para identificarlos incluye una secuenciación en lugar de caracterizarlos por medio de reacciones con enzimas de restricción y/o amplificación por PCR. Desde sus principios, la secuenciación del ADN con la tecnología de Sanger generó un gran impacto en casi todas las ramas de las ciencias biológicas dentro de las cuales se encuentran los estudios de comunidades microbianas. En la actualidad, el uso de la secuenciación Sanger puede crear hasta 96 secuencias por corrida con una longitud promedio de 650 pb, lo que tal vez sería suficiente para un análisis de marcadores filogenéticos (Escobar-Zepeda et al., 2015). Este tipo de estudios son conocidos como secuenciación de primera generación y da como resultado secuencias de alta calidad de una longitud entre 500 a 1000 pb. Sin embargo, su desventaja es que la proporción de marcadores moleculares que pueden ser secuenciados en una corrida, comparado con el total de microorganismos presentes en una muestra metagenómica es muy pequeña (Pacheco-Arjona y Sandoval-Castro, 2018).

Con el surgimiento de las tecnologías de secuenciación masiva, llamadas en su momento como “Next Generation Sequencing technologies (NGS)” se pueden secuenciar millones de moléculas de ADN simultáneamente, lo que ayuda en gran medida el estudio de la diversidad microbiana (Escobar-Zepeda et al., 2015). Diversos procesos biológicos y ecológicos que precedentemente no podían ser estudiados por su elevado costo, pueden

ser estudiados realizados a través de la secuenciación de genomas y transcriptomas o del genotipado masivo de individuos (López De Heredia, 2016).

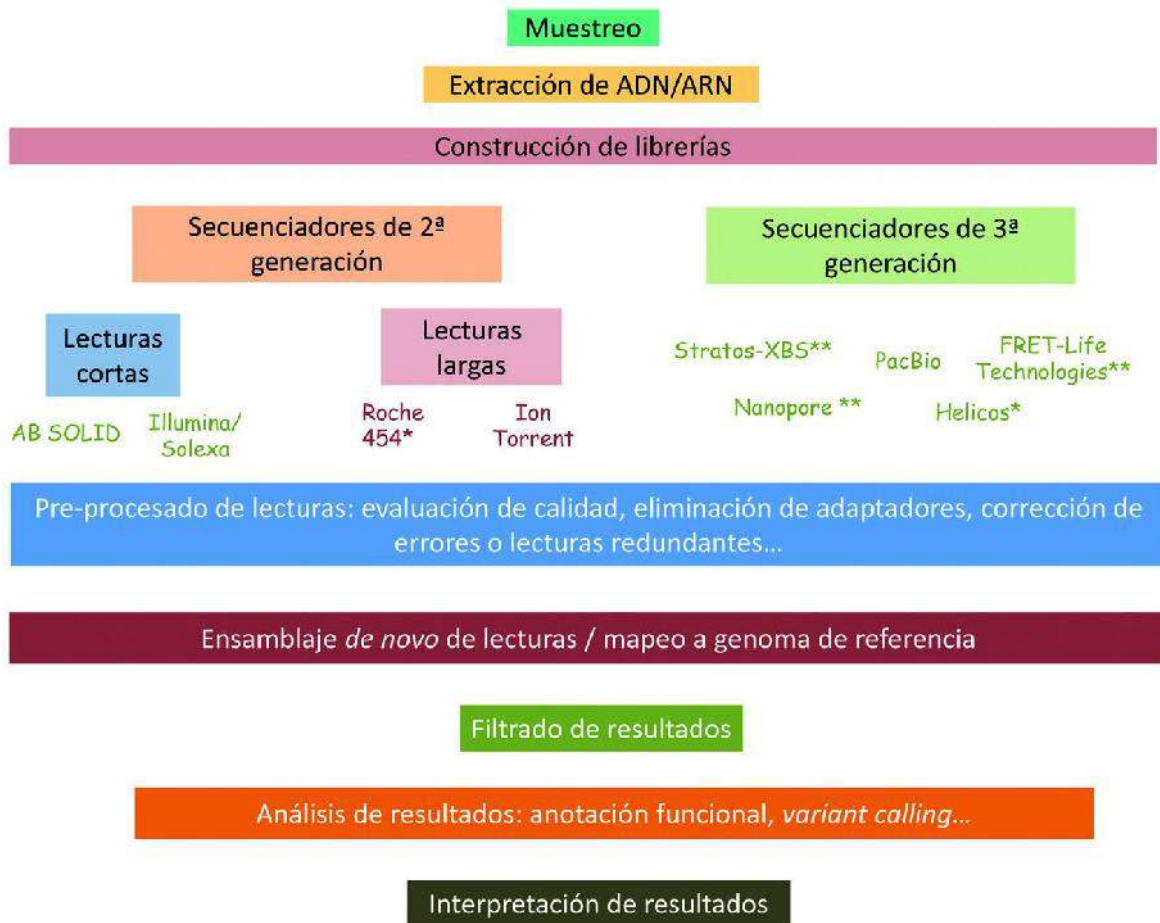
### **1.11.1 Técnica de secuenciación masiva**

La secuenciación masiva concede, entre otras aproximaciones, lograr de manera relativamente sencilla un gran número de marcadores genéticos en especies no modelo para estudios filogenéticos, de diversidad, o de mapeo genético (Baird et al., 2008; Davey et al., 2011), la determinación de patrones de expresión y regulación génica (Wang et al., 2009) o identificar las especies de microorganismos presentes en muestras ambientales (Venter et al., 2004).

Las técnicas que se favorecen de la secuenciación masiva deben abordar inevitablemente la construcción de bibliotecas genómicas de acuerdo a la Técnica ensayada, seguida de la secuenciación de dichas bibliotecas en una plataforma de secuenciación. La metodología para construir las bibliotecas es determinada de cada técnica (López De Heredia, 2016).

Una parte fundamental para el flujo de trabajo en la secuenciación masiva es el procesamiento bioinformático de los datos de secuenciación (figura 7). Una vez purificado el ADN microbiano de la muestra, realizada la PCR y la librería, y secuenciados los amplicones, se obtiene el archivo FASTQ, en el cual se refleja la conversión de la señal cruda obtenida por el secuenciador en millones de secuencias cortas de ADN, correspondientes a las llamadas lecturas (reads en inglés). Los reads contienen la secuencia de cada una de las lecturas obtenidas, con un valor de calidad para cada nucleótido (Jauk, 2019).

A partir del archivo FASTQ también se realiza en todos los casos el filtrado por calidad, en el que diferentes parámetros como el *phred*, la longitud, el contenido en GC, los primers, los barcodes, etc., deben ser valorados con programas como FastQC, en tanto que otros programas como Trimmomatic, Prinseq o Sickle se usan para excluir restos de barcodes y primers, y filtrar las secuencias basándose en su calidad (Hernández et al., 2020).



**Figura 1.7** Esquema general de los procesos a llevar a cabo para realizar un experimento de secuenciación masiva (López De Heredia, 2016).

Una vez que se han filtrado por su calidad, las lecturas o reads pueden ser ensamblados en unidades mayores denominados contigs. El resultado, en general de este ensamblaje, es un draft genome en formato FASTA, formado por un cierto número de fragmentos o contigs, que cubren entre el 95% y 99% del genoma. Este ensamblaje es uno de los “cuellos de botella” del proceso, computacionalmente hablando, por lo que existen varios programas que pueden funcionar directamente desde las reads. Tal es el caso de Kraken que permite identificar taxonómicamente una especie o género de forma rápida sin ensamblar los reads, utilizando alineamientos exactos de *k-mers* contra su propia base de datos, por lo que es una herramienta muy útil para detectar contaminaciones (Wood y Salzberg, 2014), o *snippy*,

que mapea las reads contra un genoma de referencia con el objeto de descubrir polimorfismo. Una de las aplicaciones más interesantes de la secuenciación masiva es la posibilidad de descubrir varinates. Esto se logra a partir de un mapeo de las lecturas el cual emite un archivo llamado SAM (Sequence Alignment/Map) que luego es comprimido en forma binaria a BAM (Binary Alignment/Map). La información contenida en estos archivos puede ser mostrada por el programa IGV (Integrative Genomic Viewer) u otro softteare de visualización genómica, visualizando la secuencia, mapeo y alineamiento de cada una de las lecturas (Thorvaldsdóttir et al., 2013). A partir de este tipo de archivos intermedios y luego de aplicar ciertos algoritmos por parte de una serie de herramientas bioinformáticas, se logra por fin el llamado de variantes en archivo VCF (Variant Call Format), un archivo de texto delimitado por tabulaciones que incluye: genoma de referencia, coordenadas cromosómicas de la variante, tipo de cambio de secuencia, valores de calidad del llamado de variantes, etc. En este archivo son llamadas todas las variantes que muestran alguna diferencia con el genoma de referencia (Jauk, 2019). Por último, con el llamado de variantes, se realiza la anotación y el filtrado de cada una de ellas según el objetivo del análisis. La anotación se basa en la utilización de bases de datos y puede incluir información genómica (gen, exón, variante en secuencia codificante y en la proteína, etc.), información funcional, frecuencia poblacional de la variante, información fenotípica o clínica vinculada a la variante, etc.

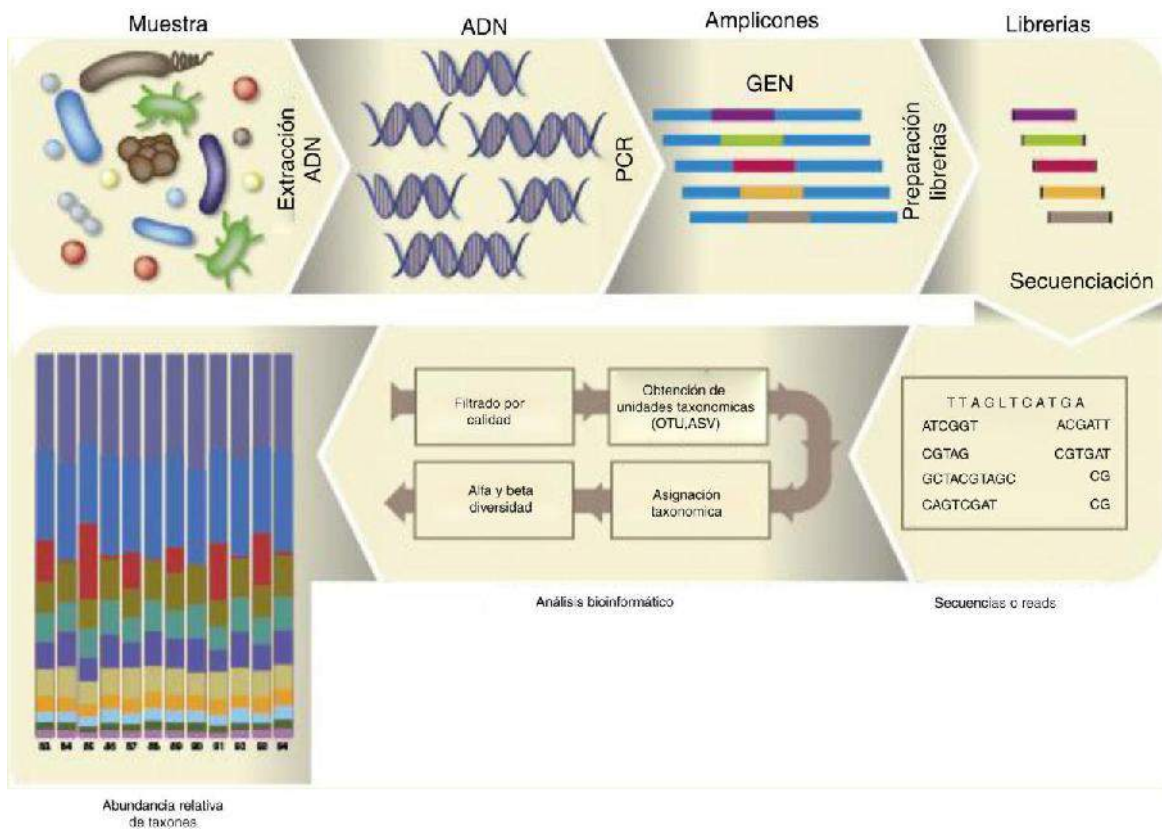
### **1.11.2 Análisis de la microbiota de una muestra**

La mayoría de los métodos de ecología bacteriana se establecen en la secuenciación en concreto con el gen que codifica la subunidad del ribosoma 16S (16S ARNr). Sobre esta base se han definido numerosas combinaciones de primers o cebadores, que permiten amplificar un fragmento del ADN de forma inespecífica en todas las especies bacterianas, pero a su vez es posible realizar la identificación indiscutible de cualquier bacteria, porque la secuenciación de la región interna es característica de cada especie (Hernández et al., 2020).

En el caso del estudio ecológico molecular de la microbiota mediante NGS consiste en la coamplificación de una región del gen 16ARN. Estos fragmentos amplificados, una vez

secuenciados, permite caracterizar la comunidad bacteriana coexistente, con la posibilidad de reconocer todas las especies de una muestra, incluso se puede realizar el análisis de subespecie de los taxones mediante herramientas como oligotyping o la resolución de amplicon sequence variants (ASVs). Pero no solo podemos obtener la caracterización de la composición taxonómica, sino también la abundancia relativa de las comunidades microbianas de una muestra (Hernández et al., 2020)..

El proceso de análisis de la microbiota de una muestra dada se describe en la figura 8. Este proceso empieza a partir del archivo FASTQ, en el cual los datos de este archivo se agrupan en secuencias idénticas con un 97% al 99% de identidad usando el método uclust en el que se denominan operational taxonomic units (OTUs). Sin embargo, hoy ya se utilizan las exact sequence variants (ESVs)- también denominadas amplicon sequence variants (ASVs) -, que agrupan solo aquellas secuencias idénticas (Callahan et al., 2017).



**Figura 1.8** Flujograma del análisis de la microbiota desde las reads hasta la taxonomía (Hernández et al., 2020).

Dos herramientas bioinformáticas han popularizado el análisis de la microbiota presente en una muestra: Mothur y QIIME que recientemente han lanzado su segunda versión. QIIME dispone de tutoriales descriptivos para ser ejecutados por línea de comando en la terminal y los archivos generados pueden ser visualizados en la web. La última versión introduce el uso del software DADA2, un sistema de filtrado de calidad de secuencia más preciso que favorece la posterior identificación de ASVs. QIIME2 hace el uso de diversos scripts para poder hacer alineamientos de las secuencias, hacer gráficos de mapas calientes de la taxonomía, inferir en árboles filogenéticos y efectuar análisis de diversidad alfa y de beta diversidad. La alfa diversidad de una muestra se establece contando el número de especies presentes, la diversidad relativa de las distintas especies y la heterogeneidad de la muestra. La beta diversidad mide la distancia o disimilaridad entre un par de muestras; se pueden realizar distintos análisis estadísticos que simbolizan las muestras en gráficos bio o tridimensionales (Hernández et al., 2020).

## JUSTIFICACIÓN

El uso de microorganismos halófilos y halotolerantes para la descontaminación del agua, contribuiría en el mejoramiento de los procesos biológicos utilizados hoy en día, gracias a que estos microorganismos no solo tienen la capacidad de reducir la demanda química de oxígeno (DQO) y otros contaminantes orgánicos (Kargi, 2002), sino que también pueden captar los metales pesados (Massadeh *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2018; Incharoensakdi y Kitjaharn, 2002).

Por otra parte, es bien sabido que las altas concentraciones de metales tóxicos han causado una gran contaminación ambiental en aguas superficiales y subterráneas. La Península de Yucatán no es la excepción, ya que los acuíferos costeros abastecen de agua dulce a las poblaciones establecidas en estas zonas, que además de presentar contaminación por metales pesados también conllevaría a cierto grado de salinización en el vital líquido. En estos casos los microorganismos halófilos y halotolerantes contribuirían a la disminución de este tipo de contaminantes, por sus propiedades excepcionales, es decir, son necesarias altas concentraciones de aniones y cationes para su crecimiento (Ventosa *et al.* 1998), esto hace que sean naturalmente tolerantes a algunos elementos que son tóxicos para otros microorganismos, como en este caso serían las sales y los metales pesados. Esto se debe a la cualidad que tienen las células bacterianas de tener una carga neta negativa, que les permite retener firmemente los iones en su superficie celular (Hamaide *et al.*, 1983), y en su pared celular proporciona un entorno esponjoso para los iones. Por lo que se cree que los componentes intracelulares retienen la mayor parte de los iones absorbidos (Massadeh *et al.* 2005). En el caso de las bacterias halotolerantes tienen la capacidad para adaptarse tanto a la ausencia de condiciones salinas como a concentraciones de sal relativamente altas, de hasta 2.5 M de sales totales (Hamaide *et al.*, 1983).

Por último, sería factible el uso de este método biológico por ser económico y efectivo para la eliminación de metales pesados, ya que el uso de métodos convencionales para la eliminación de metales pesados, son inconvenientes para el tratamiento de efluentes industriales que tienen menos de 100 mg/L de iones metálicos tóxicos disueltos (Gabr *et al.* 2008). En estos casos convendría ser utilizadas en las industrias relacionadas a la ganadería y agricultura, que son actividades importantes en nuestra región, así como



también la gran urbanización en suelos costeros que generan una gran cantidad de aguas residuales con este tipo de contaminantes.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Identificar especies de consorcios microbianos moderadamente halófilos y evaluar su resistencia a cobre (Cu), Zinc (Zn) y Cadmio (Cd).

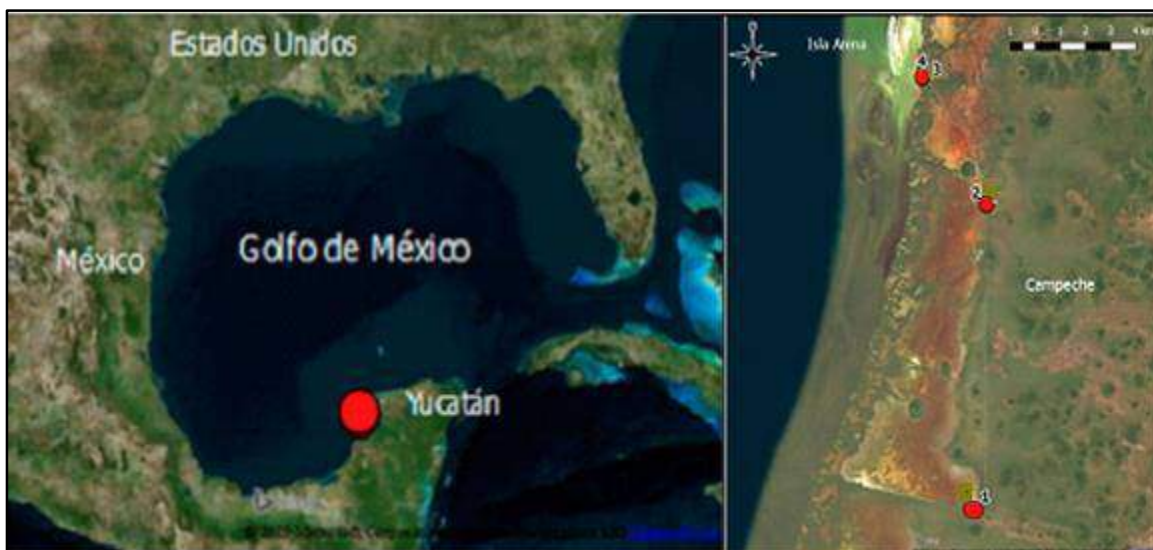
### **Objetivos específicos**

- Identificar las especies que conforman los consorcios microbianos por la técnica de secuenciación masiva.
- Realizar el recuento de células viables de cada consorcio a diferentes concentraciones de NaCl por el método diluciones seriadas y cuenta en placa.
- Determinar la concentración mínima inhibidora (CMI) de los metales Cu, Zn, y Cd en los consorcios por el método de disolución de agar.

## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se recolectaron muestras de suelo en cuatro diferentes sitios, pertenecientes a la comunidad de Isla Arena ubicada en el municipio de Calkiní en el Estado de Campeche (Figura 9). En cada sitio se obtuvieron 8 muestras, la cuales fueron tomadas de los primeros 10 cm de profundidad con la ayuda de tubos de PVC de un metro de longitud previamente esterilizados. Las muestras fueron colocadas individualmente en tubos estériles (50 ml, Corning, EE. UU.), que se etiquetaron. Las muestras recolectadas se colocaron en una nevera para luego ser transportadas al laboratorio.



**Figura 2.1** Puntos de muestreo (del 1 al 4) recolectados en la comunidad de Isla Arena.

#### 2.1.1 Obtención de pH de las muestras

Se preparó una dilución de suelo (1:10) en agua destilada, se homogenizo mediante agitación y se determinó el pH utilizando un medidor de pH calibrado con tampones de pH 4, 7 y 10 (Delgado-García et al., 2013).

## **2.2 EXTRACCIÓN DE ADN**

Una parte de las muestras recolectadas fue utilizada para la extracción de ADN total de los microorganismos presentes en el sedimento, el cual se aisló mediante el kit PowerSoil (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.), Según protocolo del fabricante. Antes de la elución del ADN, se dejó secar la columna MB Spin durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se eluyó con 20 µl de agua libre de RNasas. La concentración y la integridad del ADN total se determinaron utilizando un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, EE. UU.) y electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, respectivamente. Las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230 se encontraron en un intervalo entre 1.9 y 2.2 respectivamente, que son valores de pureza aceptados para secuenciación.

## **2.3 ANÁLISIS METAGENÓMICO.**

Las muestras de ADN se procesaron con secuenciación metagenómica dirigida por el servicio ZymoBIOMICS® (Zymo Research, Irvine, CA).

### **2.3.1 Preparación de bibliotecas específicas**

Las muestras de ADN se prepararon para la secuenciación dirigida utilizando conjuntos de cebadores personalizados [Quick-16S™ Primer Set V3-V4 (Zymo Research, Irvine, CA)] con el kit Quick16S™ NGS Library Prep Kit (Zymo Research, Irvine, CA). Los productos finales de la PCR se combinaron en base a la misma molaridad. La biblioteca combinada final se limpió con Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA) y luego se cuantificó con TapeStation® y Qubit®.

### **2.3.2 Secuenciación**

La biblioteca final se secuenció en Illumina® MiSeq™ con un kit de reactivos v3 (600 ciclos). La secuenciación se realizó con un aumento de PhiX> 10%.

### **2.3.3 Análisis bioinformático**

Se infirieron secuencias de amplicones únicas a partir de lecturas sin procesar utilizando la tubería Dada2 (Callahan et al., 2016). Las secuencias quiméricas también se eliminaron con la tubería Dada2. La asignación de taxonomía se realizó utilizando Uclust de Qiime v.1.9.1. y la base de datos interna 16S de Zymo Research.

## **2.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO CULTIVO PARA MICROORGANISMOS MODERADAMENTE HALÓFILOS**

El medio de cultivo utilizado para la obtención de bacterias moderadamente halófilas se basó en el procedimiento utilizado por Amoozegar et al. (2005); se utilizó agar nutritivo suplementado con concentraciones de 5%, 7.5% y 10% (p/v) de NaCl (Ventosa et al., 2012). Se ajustó el pH  $7\pm$  con NaOH 0.1M y se fraccionó en 25 ml utilizando tubos de cultivo con capacidad de 75ml. Posteriormente se esterilizó en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ / 20lb / 15 min. Para evitar la solidificación de los medios de cultivo hasta vertido en las placas Petri se colocaron en baño maría, manteniendo la temperatura en un intervalo de  $50^{\circ}\text{C}$  –  $55^{\circ}\text{C}$ .

## **2.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS VIABLES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl**

Se pesó diez gramos de la muestra para posteriormente en una zona aséptica (campana de flujo laminar) suspenderla en 100 ml de agua destilada esterilizada con 5%(p/v) de NaCl, posteriormente se agitó a 60 rpm durante 45 min (Massadeh et al. 2005). Se realizó esta misma operación en soluciones de 7.5% y 10% (p/v) de NaCl. Seguidamente se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ , utilizando tubos de ensayo estériles con 9 ml de solución con 5%, 7.5% y 10% (p/v) de NaCl respectivamente. Para esto se colocó una alícuota de 1 ml del sobrenadante de la muestra diluida al primer tubo de ensayo ( $10^{-2}$ ), se homogenizó con ayuda de un vortex, este procedimiento se repitió hasta llegar a último tubo ensayo ( $10^{-4}$ ). Al terminar las disoluciones seriadas, se transfirió 1000  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tubos a cajas de Petri estériles (Massadeh et al., 2005), colocando la punta de la micropipeta en el

fondo de las cajas. Por último, se agregó los 25 ml de agar nutritivo fundido con NaCl (Massadeh et al., 2005) de los tubos de cultivo a las cajas Petri; se agitó suavemente por rotación para distribuir homogéneamente el inóculo. Cada dilución se inoculó por triplicado. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 72hrs. Finalmente después del periodo de incubación, se realizó el recuento de colonias procurando utilizar aquellas placas que contengan entre 30 y 300 colonias para posteriormente calcular el número de microorganismos en dicha disolución con la siguiente formula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de microorganismos} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias} * \frac{1}{\text{ml diluidos en placa}} * \text{factor de dilucion}$$

## 2.6 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE

Se utilizó  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{ZnSO}_4$  de la marca Meyer, además de  $\text{CuSO}_4$  de la marca J.T. Backer. Se disolvieron soluciones madre de productos químicos en agua destilada, usando las concentraciones que se muestran en el cuadro 6. Las soluciones de trabajo se almacenaron en el refrigerador hasta por 10 días.

**Cuadro 2.1** Cantidad de reactivo utilizada para preparar concentraciones de soluciones madre

| Concentración de soluciones | Cantidad de reactivo diluido en 1L de agua |
|-----------------------------|--------------------------------------------|
| 5 mM de sulfato de zinc     | 807.38 mg de $\text{ZnSO}_4$               |
| 5 mM de sulfato de cobre    | 798.04 mg de $\text{CuSO}_4$               |
| 5 mM de nitrato de cadmio   | 1182.1 mg $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$       |

## 2.7 DETERMINACIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES PESADOS

De acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación de las células viables, la muestra M1 presento el mayor número microorganismos moderadamente halófilos, la cual fue objeto de estudio para este procedimiento. Para ello, el método de dilución de agar se utilizó para determinar la tolerancia bacteriana a metales pesados. A partir de las soluciones

madre se prepararon las concentraciones de trabajo 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5mM de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$  y  $\text{CuSO}_4$  (Cuadro 7).

**Cuadro 2.2** Cantidad de la solución madre utilizada para preparar 250ml de medio de cultivo

| <b><math>\text{ZnSO}_4</math>, <math>\text{CuSO}_4</math> y <math>\text{Cd}(\text{NO}_3)_2</math></b> |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Concentración (mM)</b>                                                                             | <b>Cantidad de solución madre (ml)</b> |
| 0.05                                                                                                  | 2.5                                    |
| 0.1                                                                                                   | 5                                      |
| 0.5                                                                                                   | 25                                     |
| 1.0                                                                                                   | 50                                     |
| 1.5                                                                                                   | 75                                     |
| 2.0                                                                                                   | 100                                    |
| 2.0                                                                                                   | 125                                    |

Estas concentraciones fueron similares a las utilizadas en estudios anteriores sobre la tolerancia a metales de bacterias halófilas (Nieto 1991; Amoozegar et al., 2005). Posteriormente se agregaron las concentraciones apropiadas de metales como se muestra en la tabla para preparar 250ml de medio de cultivo con agar nutritivo al 5% (p/v) de NaCl. El pH de todos los medios se ajustó a  $7.2 \pm$ . Los medios se fraccionaron en 25 ml utilizando tubos de cultivo con capacidad de 75ml y se esterilizaron en autoclave a  $121^\circ\text{C}$ / 20lb / 15 min. Se inoculó 1000  $\mu\text{l}$  de la muestra M1, del primer tubo de ensayo ( $10^{-2}$ ) de las diluciones seriadas realizadas anteriormente en cajas Petri estériles. Posteriormente se agregaron los 25 ml de agar nutritivo al 5% (p/v) de NaCl suplementado con la primera concentración del metal (Se utiliza esta concentración de NaCl por ser donde obtuvo el mayor número de células viables). Cada dilución se inoculó por triplicado. Se realizó este procedimiento para demás concentraciones de cada metal. Por último, las placas inoculadas fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 72hrs. Se reportó como la concentración mínima inhibidora aquella en donde no se observó presencias de unidades formadoras de colonias.

## CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 3.1 pH DE LAS MUESTRAS

En el cuadro 8 podemos observar los resultados de los pH obtenidos de cada una de las muestras, en el cual todas son alcalinas, destacando la muestra M3 con un pH de 9.86. Estos resultados se deben por la cercanía del mar en los sitios donde se recolectaron las muestras.

**Cuadro 3.1** pH obtenido en los sitios de muestreo.

| Muestras | pH   |
|----------|------|
| M1       | 8.64 |
| M2       | 8.50 |
| M3       | 9.86 |
| M4       | 9.00 |

### 3.2 SECUENCIAS OBTENIDAS

El número de lecturas obtenidas en el análisis de secuenciación masiva se muestran en el cuadro 9. En dichos resultados se muestran un total de 387462 de lecturas denominadas crudas, siendo la M4 la de mayor número con 109992. En los resultados de recorte de datos ambiguos o de baja calidad (Trimmed seqs), no existe una disminución considerable de secuencias en cada una de las muestras, destacando nuevamente la M4 con menor recorte. Posteriormente, ya realizado el procesamiento de estas lecturas se obtuvieron un total de 156859 secuencias de buena calidad. En cuanto a las secuencias únicas (OTU) destacan las muestras M2 y M3 con 769 y 679 secuencias respectivamente. Por lo tanto, las muestras M2 y M3 contienen una mayor diversidad bacteriana.

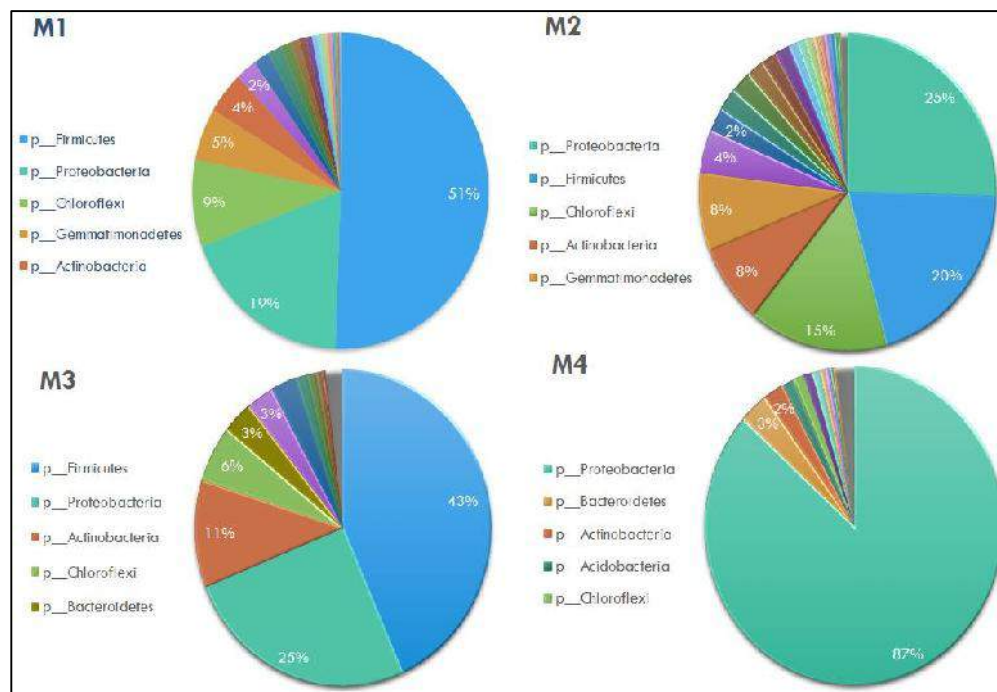


**Cuadro 3.2** Número de lecturas procesadas de cada muestra.

| Muestras | Rawseq | Trimmed seqs | Dada infered | Chimera free seqs | Seqs (after size filtration) | Unique seqs |
|----------|--------|--------------|--------------|-------------------|------------------------------|-------------|
| M1       | 73016  | 71516        | 31205        | 30934             | 29653                        | 427         |
| M2       | 102316 | 99368        | 43230        | 42517             | 40679                        | 769         |
| M3       | 102138 | 99932        | 43206        | 42065             | 40064                        | 679         |
| M4       | 109992 | 108550       | 48737        | 47626             | 46463                        | 405         |

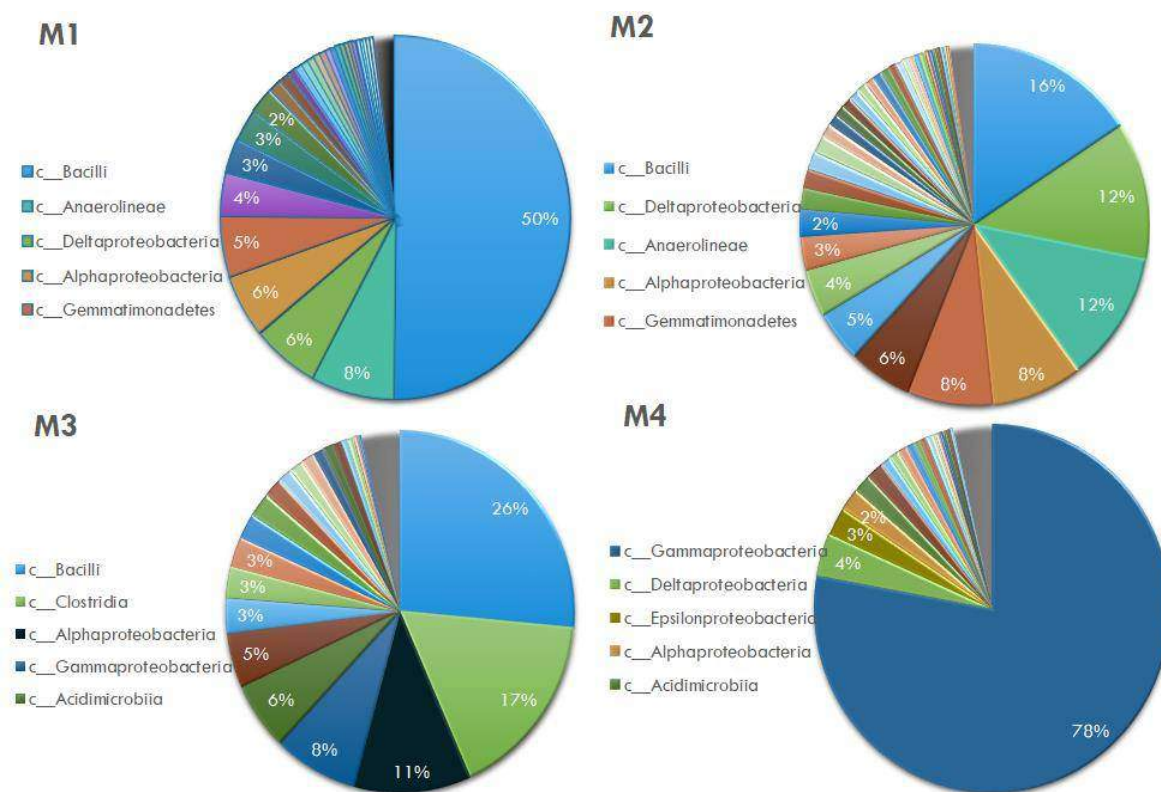
### 3.3 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA

La asignación taxonómica a nivel de filos bacterianos (Figura 10) de cada una de las muestras, revelaron la presencia de 5 de ellos superiores al 5 % en abundancia relativa; siendo los más representativos *Firmicutes* (18% en M1, 51% en M2, 20% en M3 y 43% en M4), *Proteobacteria* (19% en M1, 25% en M2, 25% en M3 y 87% en M4) y *Chloroflexi* (9% en M1, 15% en M2 y 6% en M3). En el caso de Actinobacteria se encontraron en mayor abundancia en las muestras M2 y M3 con un 8% y 11% respectivamente. Por último, el filo *Gemmatimonadetes* el cual esta mayormente representado en la muestra M2 con un 8%.



**Figura 3.1** Graficas de abundancia relativa nivel Filo

En cuanto a la asignación correspondiente a la categoría de clases (Figura 11), los pertenecientes a *Firmicutes* los más representativos en relación a su abundancia fueron *Bacilli* (50% en M1, 16% en M2 y 26% en M3) y *Clostridia* (17% en M3). En el caso de *Proteobacteria* fueron *Deltaproteobacteria* (6% en M1, 12% en M2 y 4% en M4), *Alphaproteobacteria* (6% en M1, 8% en M2 y 11% en M3) y *Gammaproteobacteria* (8% en M3 y 78% en M4). Por último, el filo *Cloroflexi* fue mayormente representado con el género *Anaerolineae* (8% en M1 y 12% en M2).



**Figura 3.2** Graficas de abundancia relativa nivel Clase

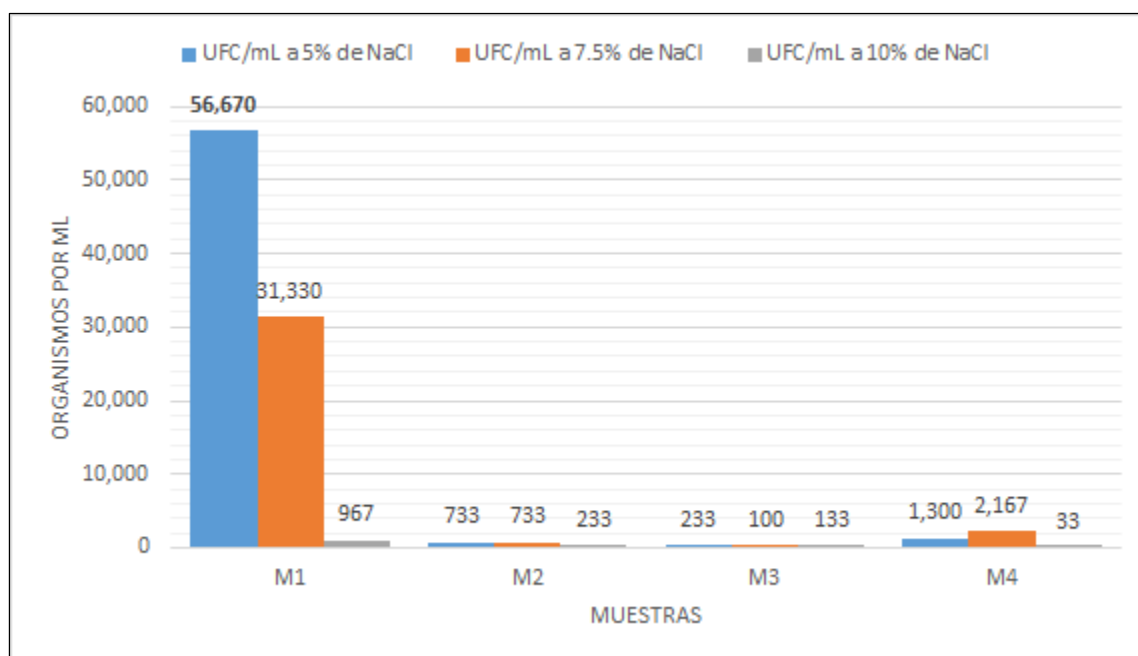
Con los resultados obtenidos, la abundancia de los filos más representativos en este tipo de entornos, coincide con lo informado anteriormente, los cuales lo conforman principalmente: *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (Irshad et al. 2014). En cuanto a las bacterias halófilas, según lo reportado por Ventosa et al. (2012), la mayoría de las especies y géneros de este tipo bacterias se agrupan en *Proteobacteria* (*Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*), *Firmicutes* y *Actinobacteria*. La clase

*Gammaproteobacteria* contiene el mayor número de géneros moderadamente halófilos (un total de 51) y especies (De La Haba et al., 2011). De la clase *Gammaproteobacterias*, pertenece el género *Halomonas* el cual cuenta con 58 nombres de especies halofílicas válidamente publicados, lo que lo convierte en el género con el mayor número de bacterias halofílicas dentro de las *Proteobacterias* (De La Haba et al., 2011).

En cuanto a la clase *Bacilli* pertenece la familia *Bacillaceae*, considerada la más prominente con 21 géneros que incluyen especies obligatoriamente halófilas (Ventosa et al., 2012). De estos, el género *Bacillus* se ha aislado de casi todos los hábitats naturales y de muchas otras fuentes, debido a la capacidad de transporte de sus esporas y su notable capacidad de resistencia y latencia, lo que les permite sobrevivir en hábitats desfavorables durante largos períodos (Claus y Berkeley 1986). Por otro lado, el filo *Actinobacteria* constituye uno de los principales phyla dentro de las bacterias (Ludwig y Klenk 2001) sobre la base de su posición de ramificación en los árboles filogenéticos de rRNA 16S, los cuales apoyan la distinción de miembros de la clase de todas las demás bacterias. De este filo solo la subclase *Actinobacteridae* incluye bacterias halófilas (Ventosa et al., 2012). Por ultimo las bacterias pertenecientes al filo *Chloroflexi* han sido reconocidas como un típico grupo de bacterias “no cultivables” (Hugenholtz et al., 1998).

### 3.4 RECuento DE CÉLULAS VIABLES DE BACTERIAS MODERADAMENTE HALÓFILAS

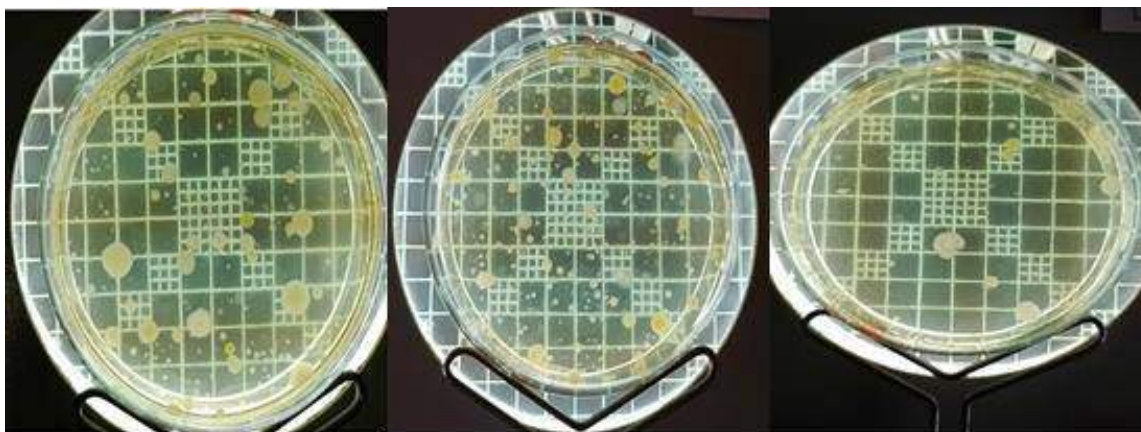
Para el recuento de células viables de bacterias moderadamente halófila se utilizó agar nutritivo suplementado con 5%, 7.5% y 10% de cloruro de sodio. Se observó un número máximo de colonias bacterianas halófilas utilizando el medio suplementado con 5% de NaCl. Los recuentos de UFC más altos fueron de  $5.67 \times 10^4$  y de  $1.3 \times 10^3$  pertenecientes a las muestras M1 y M4 respectivamente. Con 7.5% y 10% se obtuvo menor crecimiento de bacterias halófilas (Figura 12). En placas de medio con NaCl al 10% las muestras M2 y M3 prácticamente inhibieron su crecimiento. Estos resultados mostraron que la muestra M1 cuenta con la mayor cantidad microorganismos resistentes al NaCl.



**Figura 3.3** Grafica comparativa de células viables en cada muestra con 5%, 7.5% y 10% de NaCl (p/v)

Las colonias cultivadas en la muestra M1 algunas eran de características grandes (2-5mm) y presentaban predominantemente una pigmentación color naranja y gris. Su forma era mayormente circular y los bordes eran enteros. En otras colonias las formas de los bordes

eran almenados o en algunos casos fimbriados (Figura 13). Estas descripciones coinciden con las colonias formadas por las especies *Bacillus* (Schleifer, 2009).



**Figura 3.4** Colonias formadas por la muestra M1 con concentraciones de 5%, 7.5% y 10% de NaCl (p/v).

De acuerdo con lo reportado por Can-Herrera et al. (2021), con muestras obtenidas del mismo sitio de la muestra M1, se encontró que predomina el filo Firmicutes con más del 50%, en casi la misma proporción de la clase Bacilos y con casi el 41% de abundancia relativa del orden *Bacillales*. Los resultados de la secuenciación mostraron la muestra presentó un alto porcentaje de similitud (99,75%) utilizando el programa Nucleotide BLAST con un microorganismo peculiar: *Bacillus subtilis*. Estos microorganismos son bacilos grampositivos formadores de esporas moderadamente halófilos o halotolerantes son un grupo diverso de bacterias filogenéticas que se han adaptado a la vida en el rango más bajo de salinidades y con la posibilidad de un ajuste rápido a los cambios en la concentración extrema de sal (Ventosa et al. 1998). Por otra parte, el género *Bacillus* es considerado en su mayoría halotolerante, ya que la única especie del género *Bacillus* que muestra un requerimiento específico de sal es *Bacillus marinus*, una bacteria marina aislada por Ruger y Richter (1979) que puede crecer en medios con 1-5% de sales.

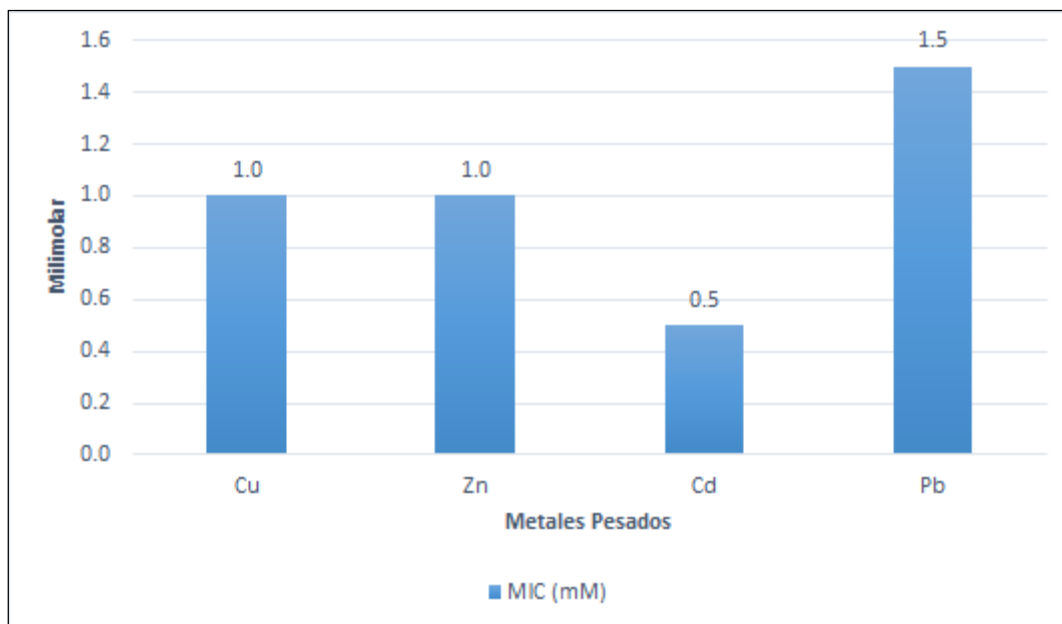
El lugar donde se obtuvo la muestra M1 coincide con la descripción de un ambiente salino, un cuerpo de agua poco profundo y cerrado, donde las sales que se precipitan provenientes del mar se concentran en el sitio, además el espacio de alojamiento del entorno salino esta sobre una depresión sedimentaria que no está completamente llena o cubierta por otros sedimentos y el suelo se mantiene compacto para que la sal que se precipita no pase al

subsuelo, y solo por los pequeños poros disponibles el agua se escurre, lo que permite una mayor concentración salina (Warren, 2016).

La halotolerancia de estos microorganismos se debe a la heterogeneidad del suelo donde habitan, ya que los organismos excesivamente especializados pueden ser eliminados periódicamente y los tipos de euryhaline se favorecen más consistentemente. Este fenómeno fue observado en Quesada et al. (1982) que estudiaron un suelo hipersalino ubicado en una salina abandonada de varios estanques, cerca de la costa mediterránea en Alicante, España. En donde este tipo de salina proporcionaba una gama de estanques de sal con diferentes salinidades, que van desde un contenido de sal equivalente al del agua de mar hasta la saturación de cloruro de sodio, y la evaporación del agua en los estanques produce suelos con una amplia gama de concentraciones de sal. El suelo estudiado tenía concentraciones de NaCl que oscilaban entre 5.0 y 10.7%; La mayoría de los microorganismos aislados de este suelo eran bacterias halófilas con un crecimiento óptimo a una concentración de sal entre 5 y 15%, curiosamente, la mayoría de ellos pudieron crecer a 0.9% de sal. Este hecho contrasta con la dependencia del halo que muestra la mayoría de las bacterias halófilas aisladas de aguas hipersalinas o alimentos salados, que en general tienen requisitos mínimos de sal más altos.

### 3.5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBIDORA DE METALES TÓXICOS

La concentración mínima inhibidora de los metales en agar nutritivo suplementado con NaCl al 5% (p/v), para los microorganismos contenidos en la muestra M1 se muestran en la Figura 14. Los microorganismos fueron mayormente resistente al Pb con 1.5mM, en comparación con el cadmio donde fueron inhibidos a una concentración de 0.5mM.



**Figura 3.5** Concentración inhibidora de metales Cu, Zn, Cd y Pb de las bacterias modernamente halófilas de la muestra M1

De acuerdo a lo observado, el número de colonias fue disminuyendo según aumentaba la concentración de cada metal, conservando siempre su morfología (Figura 15). Estos resultados coinciden con los reportados por amoozegar et al. (2005), en donde varias cepas de microorganismos pertenecientes al género *bacillus* fueron inhibidas a las concentraciones obtenidas. Además, en dicho estudio se determinó que la concentración inhibidora de las bacterias del genero *bacillus* aumentaba conforme la concentración de NaCl era mayor, esto propondría que las células estudiadas en este trabajo podrían aumentar su concentración mínima inhibidora.



En el caso de metales como el Cu y el Zn, su importancia es fundamental en los sistemas biológicos, ya que cumple un papel importante como micronutriente en varios procesos biológicos, tanto en organismos procarióticos como eucarióticos. Esto conlleva que su resistencia se vea observada en este tipo de microorganismos, tales como especies como *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. sphaericus* que están involucradas en la remoción de Cu, cuando sus concentraciones exceden el límite requerido (Oves et al., 2013; Rohini y Jayalakshmi, 2015; Costa y Duta; 2001). En el caso de Zn, la acción de *Bacillus spp.* en la eliminación de elemento en ambientes contaminados se ha destacado en muchos estudios de biorremediación; como el caso reportado por Khan et al. (2021), donde obtuvieron una remoción de Zn (87 mg/L) por *B. altitudinis* aislado de aguas residuales industriales. Esta capacidad de *Bacillus spp.* se regula adquiriendo resistencia a través de plásmidos o mediante mecanismos de resistencia en evolución (Silver, 1992; Krishna et al., 2012).



**Figura 3.6** Colonias formadas de muestra M1 con diferentes concentraciones de Cu

Por otra parte, a pesar de la baja tolerancia al cadmio por estos microorganismos esta puede ser mejorada por una modificación genética (Wang y Sun, 2013), debido a los genes para la resistencia a  $Cd^{2+}$  son en su mayoría mediados por plásmidos (Chen et al., 2015). Esto



se muestra en las especies bacterianas Gram positivas, su resistencia a  $\text{Cd}^{2+}$  se logra mediante el sistema del operon *cadA* que es transmitido por plásmidos (Alotaibi et al., 2021). Esta transmisión es factible por la existencia de bacterias del género *Bacillus* que además de ser tolerantes al cadmio, también son biosorbentes, como lo reportado por Basha y Rajaganesh (2014), informaron que *B. licheniformis* es un buen biosorbente para  $\text{Cd}^{2+}$ , esto debe a la eliminación de más del 98% de  $\text{Cd}^{2+}$ . También se ha informado de otras especies como *B. catenulatus* y *B. safensis* son efectivas para eliminar  $\text{Cd}^{2+}$  (Rajesh et al., 2014; Kim et al., 2015).

Por último, tenemos al Pb cuyo resultado fue la mayor concentración inhibidora obtenida en este estudio. El género *Bacillus* utiliza el operón *pbr* (Hynninen et al., 2009) y el transporte activo (Silver y Ji, 1994) como posibles estrategias para combatir los efectos tóxicos del Pb. Se han reportado especies como *B. cereus* y *B. pumilus* de tener una alta tolerancia al Pb, además de contar con una capacidad de adsorción de 22.1 mg/g y 28.06 mg/g respectivamente (Çolak et al., 2011). También de la especie *B. cereus*, Sharma y Shukla (2021), reportaron una cepa perteneciente a dicha especie con la posibilidad de acumular 79.26 % de Pb y una capacidad de bioadsorción de 193.93 mg/g. Por otra parte, del género *Bacillus* se han elaborado biosorbentes para el plomo, tal es el caso de la bacteria endógena *Bacillus licheniformis*, en donde con alcohol polivinílico magnético (PVA) se logró inmovilizar la bacteria y con alginato de sodio se pudo obtener un nuevo biosorbente. El biosorbente obtenido en condiciones óptimas, logró alcanzar una tasa de eliminación de iones de plomo en aguas residuales del 98 % y su capacidad de adsorción máxima pudo ser de hasta 113.84  $\text{mg g}^{-1}$  (Wen et al., 2018).

## **CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES**

El aumento de las actividades industriales y agropecuarias causan la contaminación del suelo, el agua y la atmósfera por el uso de productos químicos que contienen metales pesados. Las bacterias estudiadas en este trabajo pudieran sugerir un posible uso en la biorremediación de zonas contaminadas por estos metales tóxicos que contengan menos de 80 mg/L de iones metálicos disueltos. Estas concentraciones se ven reflejadas en sitios con actividades primarias como la ganadería y agricultura, así como también en aguas residuales urbanas. Esta posible aplicación beneficiaría a la zona de la Península de Yucatán, debido a que sus actividades económicas radican principalmente en estas actividades primarias, como por ejemplo la industria porcina que además de producir contaminantes orgánicos, produce concentraciones de metales pesados en las aguas residuales generadas, ocasionando una gran contaminación al suelo y al agua subterránea de la región. Por último, nuestros resultados indican que los microorganismos del genero *bacillus* son potenciales candidatos para ser empleados en remediación de sitios contaminados, ya que poseen la capacidad de tolerar concentraciones de metales pesados superiores a lo permisible y en condiciones ambientales severas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., & El-Sersy, N. A. (2011). Cadmium resisting bacteria in Alexandria Eastern Harbor (Egypt) and optimization of cadmium bioaccumulation by *Vibrio harveyi*. *African Journal of biotechnology*, 10(17), 3412-3423.

Adriano, D. C. (2001). Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals (Vol. 860). New York: Springer.

Agwa, A., Leheta, H., Salem, A., & Sadiq, R. (2013). Fate of drilling waste discharges and ecological risk assessment in the Egyptian Red Sea: an equivalence-based fuzzy analysis. *Stochastic environmental research and risk assessment*, 27(1), 169-181.

Ahalya, N., Ramachandra, T. V., & Kanamadi, R. D. (2003). Biosorption of heavy metals. *Res. J. Chem. Environ*, 7(4), 71-79.

Alencar, F. L. S., Navoni, J. A., & do Amaral, V. S. (2017). The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review. *Environmental science and pollution research*, 24(20), 16545-16559.

Al-Muzaini, S., Beg, M., Muslamani, K., & Al-Mutairi, M. (1999). The quality of marine water around a sewage outfall. *Water Science and Technology*, 40(7), 11-15.

Alotaibi, B. S., Khan, M., & Shamim, S. (2021). Unraveling the underlying heavy metal detoxification mechanisms of bacillus species. *Microorganisms*, 9(8), 1628.

Alvarado-Flores, J., Andrade-Canto, S. B., Caballero-Vázquez, J. A., & Almazán-Becerril, A. (2019). X-ray microanalysis of northeastern Quintana Roo aquatic biota, Mexico: evidence of hazard metals presence. *Latin american journal of aquatic research*, 47(4), 654-664.

American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. (2005). Lead exposure in children: prevention, detection, and management. *Pediatrics*, 116(4), 1036-1046.

Amoozegar, M. A., Ghazanfari, N., & Didari, M. (2012). Lead and cadmium bioremoval by *Halomonas* sp., an exopolysaccharide-producing halophilic bacterium. *Progress in Biological Sciences*, 2(1), 1-11.

Arcega-Cabrera, F., & Fargher, L. F. (2016). Education, fish consumption, well water, chicken coops, and cooking fires: Using biogeochemistry and ethnography to study exposure of children from Yucatan, Mexico to metals and arsenic. *Science of the Total Environment*, 568, 75-82.

Arcega-Cabrera, F., Velázquez-Tavera, N., Fargher, L., Derrien, M., & Noreña-Barroso, E. (2014). Fecal sterols, seasonal variability, and probable sources along the ring of cenotes, Yucatan, Mexico. *Journal of contaminant hydrology*, 168, 41-49.

Arcega-Cabrera, F., Velázquez-Tavera, N., Fargher, L., Derrien, M., & Noreña-Barroso, E. (2014). Fecal sterols, seasonal variability, and probable sources along the ring of cenotes, Yucatan, Mexico. *Journal of contaminant hydrology*, 168, 41-49.

Aryal, M., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2015). Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. *Environmental monitoring and assessment*, 187(1), 1-26.

Auge, M. (2007). *Agua fuente de vida*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 31.

Ávila, J. P., Sansores, A. C., & Ceballos, R. P. (2004). Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el Estado de Yucatán, México. *Ingeniería*, 8(2), 165-179.

Ávila, J. P., Sansores, A. C., & Ceballos, R. P. (2004). Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el Estado de Yucatán, México. *Ingeniería*, 8(2), 165-179.

Azarbad, H., Niklińska, M., van Gestel, C. A., van Straalen, N. M., Röling, W. F., & Laskowski, R. (2013). Microbial community structure and functioning along metal pollution gradients. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9), 1992-2002.

Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., ... & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS one*, 3(10), e3376.

Banjerdkij, P., Vattanaviboon, P., & Mongkolsuk, S. (2005). Exposure to cadmium elevates expression of genes in the OxyR and OhrR regulons and induces cross-resistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris*. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1843-1849.

Barceló, J., & Poschenrieder, C. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2(2), 345-361.

Batllore-Sampedro, E. (2016). Condiciones actuales del agua subterránea en la península de Yucatán. *El manejo del agua a través del tiempo en la península de Yucatán*. Chávez-Guzmán, M.(ed.) *Universidad Autónoma de Yucatán Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi Fundación Gonzalo Río Arronte IAP Consejo de Cuenca de la Península de Yucatán. México*.

Becker, E. A., Seitzer, P. M., Tritt, A., Larsen, D., Krusor, M., Yao, A. I., ... & Facciotti, M. T. (2014). Phylogenetically driven sequencing of extremely halophilic archaea reveals strategies for static and dynamic osmo-response. *PLoS Genet*, 10(11), e1004784.

Bhakta, J. N., Muneke, Y., Ohnishi, K., & Jana, B. B. (2012). Isolation and identification of cadmium-and lead-resistant lactic acid bacteria for application as metal removing probiotic. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 9(3), 433-440.

Biswas, J., Bose, P., Mandal, S., & Paul, A. K. (2018). Reduction of hexavalent chromium by a moderately halophilic bacterium, *Halomonas smyrnensis* KS802 under saline environment. *Environmental Sustainability*, 1(4), 411-423.

BREMER, E. (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Bacterial stress responses*, 79-97.

Breuer, E., Stevenson, A. G., Howe, J. A., Carroll, J., & Shimmield, G. B. (2004). Drill cutting accumulations in the Northern and Central North Sea: a review of environmental interactions and chemical fate. *Marine pollution bulletin*, 48(1-2), 12-25.

Brown, A. D. (1964). Aspects of bacterial response to the ionic environment. *Bacteriological Reviews*, 28(3), 296.

Brown, A. D., & Shorey, C. D. (1963). The cell envelopes of two extremely halophilic bacteria. *The Journal of cell biology*, 18(3), 681-689.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643.

Cang, L., Wang, Y. J., Zhou, D. M., & Dong, Y. H. (2004). Heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu Province, China. *Journal of Environmental Sciences*, 16(3), 371-374.

Can-Herrera, L. A., Gutierrez-Canul, C. D., Dzul-Cervantes, M. A. A., Pacheco-Salazar, O. F., Chi-Cortez, J. D., & Carbonell, L. S. (2021). Identification by molecular techniques of halophilic bacteria producing important enzymes from pristine area in Campeche, Mexico. *Brazilian Journal of Biology*, 83.

Chaudhary, A., Pasha, M. I., Salgaonkar, B. B., & Braganca, J. M. (2014). Cadmium tolerance by haloarchaeal strains isolated from solar salterns of Goa, India. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform*, 1.

Chen, M., Li, Y., Zhang, L., Wang, J., Zheng, C., & Zhang, X. (2015). Analysis of gene expression provides insights into the mechanism of cadmium tolerance in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Current microbiology*, 70(2), 290-297.

Chen, W., Tan, S. K., & Tay, J. H. (1996). Distribution, fractional composition and release of sediment-bound heavy metals in tropical reservoirs. *Water, air, and soil pollution*, 92(3-4), 273-287.

Claus, B., & Berkeley, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872 (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. Sneath, PHA, McNair, NS, Sharpe, ME,. Baltimore, Williams & Wilkins Co, 1105-1140.

Çolak, F., Atar, N., Yazıcıoğlu, D., & Olgun, A. (2011). Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance. *Chemical Engineering Journal*, 173(2), 422-428.

Comerio, R. M., Tarapow, M., Vázquez, S. C., & Mac Cormack, W. P. (2007). Bacterias adaptadas al frío. *Ciencia hoy*, 17(99), 10-21.

Cortes-Esquivel, J. A., Giacomán-Vallejos, G., Barceló-Quintal, I. D., Méndez-Novelo, R., & Ponce-Caballero, M. C. (2012). Heavy metals removal from swine wastewater using constructed wetlands with horizontal sub-surface flow. *Journal of Environmental Protection*, 3, 871.

Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1150-1173.

Costa, A. C. A. D., & Duta, F. P. (2001). Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 1-5.

Covarrubias, S. A., & Cabriaes, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y Estrategias de Fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7-21.

Covarrubias, S. A., Berumen, J. A. G., & Cabriaes, J. J. P. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, 25, 40-45.

- Cukrov, N., Frančišković-Bilinski, S., Hlača, B., & Barišić, D. (2011). A recent history of metal accumulation in the sediments of Rijeka harbor, Adriatic Sea, Croatia. *Marine pollution bulletin*, 62(1), 154-167.
- Czech, L., & Bremer, E. (2018). With a pinch of extra salt—Did predatory protists steal genes from their food?. *PLoS biology*, 16(2), e2005163.
- D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Schirmer, M., Kenny, J. G., Gregory, R., Darby, A. C., ... & Hall, N. (2016). A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC genomics*, 17(1), 1-20.
- Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., & Das, S. (2013). Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 561-571.
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12(7), 499-510.
- De Fernícola, N. A. (1983). Aspecto toxicológico de la contaminación ambiental causada por accidentes. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 95 (4), oct. 1983.
- De La Cruz-Landero, N., Chávez, Á. A., & Leal, S. L. (2013). Acumulación de metales pesados en sedimentos del ecosistema manglar en Laguna de Términos, Campeche, México. *Foresta Veracruzana*, 15(1), 25-30.
- De la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A (2011) Taxonomy of halophiles. In:Horikoshi K (ed) *Extremophiles handbook*. Springer, Tokyo, p 255–308
- Dundas, I. D., Srinivasan, V. R., & Halvorson, H. O. (1963). A chemically defined medium for *Halobacterium salinarum* strain 1. *Canadian Journal of Microbiology*, 9(4), 619-624.
- Edwards, J. R., & Prozialeck, W. C. (2009). Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 289-293.



Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de Leon, A., & Sanchez-Flores, A. (2015). The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in genetics*, 6, 348.

FAO, M. I., & INTA, I. (2012). Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar. Recuperado el día 5 de agosto de 2018.

Fergusson, J. E., & Stewart, C. (1992). The transport of airborne trace elements copper, lead, cadmium, zinc and manganese from a city into rural areas. *Science of the total environment*, 121, 247-269.

Flora, S. J. S., Mittal, M., & Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 501.

Fourest, E., & Roux, J. C. (1992). Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. *Applied microbiology and biotechnology*, 37(3), 399-403.

Freije, A. M. (2015). Heavy metal, trace element and petroleum hydrocarbon pollution in the Arabian Gulf. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 17, 90-100.

Gabr, R. M., Hassan, S. H. A., & Shoreit, A. A. M. (2008). Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(2), 195-203.

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

Galinski, E. A. (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia*, 49(6-7), 487-496.

González, J., & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii*. *Revista Latinoamericana Microbiología*, 3(44), 137-156.

González, R. M., Moguel, C. Z., Bolio, M. C., & Canul, R. P. (2004). Concentración de Cd, Cr, Cu y Pb en sedimentos y en tres especies de pepino de mar (clase holothuroidea) de las costas del Estado de Yucatán, México. *Ingeniería*, 8(2), 7-19.

Gonzalez-Chavez, M. C., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S. F., & Nichols, K. A. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental pollution*, 130(3), 317-323.

Guerra, R., Pasteris, A., & Ponti, M. (2009). Impacts of maintenance channel dredging in a northern Adriatic coastal lagoon. I: Effects on sediment properties, contamination and toxicity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85(1), 134-142.

Guo, X., Gu, J., Gao, H., Qin, Q., Chen, Z., Shao, L., ... & Liu, J. (2012). Effects of Cu on metabolisms and enzyme activities of microbial communities in the process of composting. *Bioresource technology*, 108, 140-148.

Hamaide, F. R. A. N. C. E. T. T. E., Kushner, D. J., & Sprott, G. D. (1983). Proton motive force and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in a moderate halophile. *Journal of bacteriology*, 156(2), 537-544.

Harrison, J. P., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D., & Cockell, C. S. (2013). The limits for life under multiple extremes. *Trends in microbiology*, 21(4), 204-212.

Hedge, L. H., Knott, N. A., & Johnston, E. L. (2009). Dredging related metal bioaccumulation in oysters. *Marine Pollution Bulletin*, 58(6), 832-840.

Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista argentina de microbiología*, 52(2), 150-161.

Hill, G. M., Cromwell, G. L., Crenshaw, T. D., Dove, C. R., Ewan, R. C., Knabe, D. A., ... & Southern, L. L. (2000). Growth promotion effects and plasma changes from feeding high dietary concentrations of zinc and copper to weanling pigs (regional study). *Journal of animal science*, 78(4), 1010-1016.

Huang, F., Guo, C. L., Lu, G. N., Yi, X. Y., Zhu, L. D., & Dang, Z. (2014). Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere*, 109, 134-142.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology*, 180(18), 4765-4774.

Hutton, M., & Symon, C. (1986). The quantities of cadmium, lead, mercury and arsenic entering the UK environment from human activities. *Science of the total environment*, 57, 129-150.

Hynninen, A., Touzé, T., Pitkänen, L., Mengin-Lecreulx, D., & Virta, M. (2009). An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. *Molecular microbiology*, 74(2), 384-394.

Incharoensakdi, A., & Kitjahn, P. (2002). Zinc biosorption from aqueous solution by a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Current Microbiology*, 45(4), 261-264.

Iqbal, S., Muntner, P., Batuman, V., & Rabito, F. A. (2008). Estimated burden of blood lead levels  $\geq 5$   $\mu\text{g/dl}$  in 1999–2002 and declines from 1988 to 1994. *Environmental research*, 107(3), 305-311.

Irshad, A., Ahmad, I., & Kim, S. B. (2014). Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 563-572.

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68(1), 167-182.

Jauk, F. (2019, October). Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. In *Hematología: Volumen 23-Extraordinario XXIV Congreso Argentino* (Vol. 4, p. 21). Sociedad Argentina de Hematología.

Jiménez, B. E. (2001). *La contaminación ambiental en México*. Editorial Limusa.

Kargi, F. (2002). Enhanced biological treatment of saline wastewater by using halophilic bacteria. *Biotechnology letters*, 24(19), 1569-1572.

Karvelas, M., Katsoyiannis, A., & Samara, C. (2003). Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process. *Chemosphere*, 53(10), 1201-1210.

Kempf, B., & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of microbiology*, 170(5), 319-330.

Khan, M., Ijaz, M., Chotana, G. A., Murtaza, G., Malik, A., & Shamim, S. (2021). *Bacillus altitudinis* MT422188: A potential agent for zinc bioremediation. *Bioremediation Journal*, 1-21.

Khan, Z., Rehman, A., Hussain, S. Z., Nisar, M. A., Zulfiqar, S., & Shakoori, A. R. (2016). Cadmium resistance and uptake by bacterium, *Salmonella enterica* 43C, isolated from industrial effluent. *Amb Express*, 6(1), 1-16.

Kim, S. Y., Jin, M. R., Chung, C. H., Yun, Y. S., Jahng, K. Y., & Yu, K. Y. (2015). Biosorption of cationic basic dye and cadmium by the novel biosorbent *Bacillus catenulatus* JB-022 strain. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(4), 433-439.

Kordialik-Bogacka, E., & Diowks, A. (2014). Metal uptake capacity of modified *Saccharomyces pastorianus* biomass from different types of solution. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(3), 2223-2229.

Krishna, M. P., Varghese, R., Babu, V. A., Jyothy, S., & Hatha, A. A. (2012). Bioremediation of zinc using *Bacillus* sp. isolated from metal-contaminated industrial zone. In *Prospects in bioscience: addressing the issues* (pp. 11-18). Springer, India.

Kushner, D. J. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. *Halophilic bacteria*, 109-138.

Langworthy, T. A., Mayberry, W. R., & Smith, P. F. (1974). Long-chain glycerol diether and polyol dialkyl glycerol triether lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology*, 119(1), 106-116.

Liang, S., Guo, X., Lautner, S., & Saake, B. (2014). Removal of hexavalent chromium by different modified spruce bark adsorbents. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 34(4), 273-290.

LONDOÑO-FRANCO, L. F., LONDOÑO-MUÑOZ, P. T., & MUÑOZ-GARCÍA, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153.

López De Heredia Larrea, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64, 7-31.

MacElroy, R. D. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6(1), 74-75.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2003). *Brock biology of microorganisms: international edition*.

Marshall, C. L., & Brown, A. D. (1968). The membrane lipids of *Halobacterium halobium*. *Biochemical Journal*, 110(3), 441-448.

Martin, S., & Griswold, W. (2009). Human health effects of heavy metals. *Environmental Science and Technology briefs for citizens*, 15, 1-6.

Mashiatullah, A., Chaudhary, M. Z., Ahmad, N., Javed, T., & Ghaffar, A. (2013). Metal pollution and ecological risk assessment in marine sediments of Karachi Coast, Pakistan. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(2), 1555-1565.

Massadeh, A. M., Al-Momani, F. A., & Haddad, H. I. (2005). Removal of lead and cadmium by halophilic bacteria isolated from the Dead Sea shore, Jordan. *Biological trace element research*, 108(1-3), 259-269.

Mathivanan, K., & Rajaram, R. (2014a). Tolerance and biosorption of cadmium (II) ions by highly cadmium resistant bacteria isolated from industrially polluted estuarine environment.

- Mathivanan, K., & Rajaram, R. (2014b). Isolation and characterisation of cadmium-resistant bacteria from an industrially polluted coastal ecosystem on the southeast coast of India. *Chemistry and Ecology*, 30(7), 622-635.
- Mishra, A., & Malik, A. (2013). Recent advances in microbial metal bioaccumulation. *Critical reviews in environmental science and technology*, 43(11), 1162-1222.
- Mithöfer, A., Schulze, B., & Boland, W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS letters*, 566(1-3), 1-5.
- Mohapatra, R. K., Pandey, S., Thatoi, H., & Panda, C. R. (2017). Reduction of chromium (VI) by marine bacterium *Brevibacillus laterosporus* under varying saline and pH conditions. *Environmental Engineering Science*, 34(9), 617-626.
- MONTEOLIVA-SANCHEZ, M. E. R. C. E. D. E. S., FERRER, M. R., RAMOS-CORMENZANA, A. L. B. E. R. T. O., QUESADA, E., & MONTEOLIVA, M. (1988). Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. *Microbiology*, 134(1), 199-203.
- Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., & Russell, N. J. (1993). The effect of salinity and compatible solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica*. *Microbiology*, 139(8), 1877-1884.
- Moreno Grau, M. D. (2003). *Toxicología Ambiental: Evaluación de riesgo para la salud humana* (No. 615.902 M843t). Madrid, ES: McGraw-Hill Interamericana.
- Mudiaga, O. C., Nicolas, O. C., & Leo, O. C. (2011). Trace metals geochemistry of crude oils from Umutu/Bomu fields in south west Niger Delta Nigeria. *Energy and Environment Research*, 1(1), 139.
- Muñoz, A. J., Espínola, F., Moya, M., & Ruiz, E. (2015). Biosorption of Pb (II) ions by *Klebsiella* sp. 3S1 isolated from a wastewater treatment plant: kinetics and mechanisms studies. *BioMed research international*, 2015.

Naik, M. M., Pandey, A., & Dubey, S. K. (2012). Bioremediation of metals mediated by marine bacteria. In *Microorganisms in Environmental Management* (pp. 665-682). Springer, Dordrecht.

Naser, H. A. (2013). Assessment and management of heavy metal pollution in the marine environment of the Arabian Gulf: a review. *Marine pollution bulletin*, 72(1), 6-13.

Navas-Acien, A., Guallar, E., Silbergeld, E. K., & Rothenberg, S. J. (2007). Lead exposure and cardiovascular disease—a systematic review. *Environmental health perspectives*, 115(3), 472-482.

Newbury, T. K. (1979). Possible accumulation of heavy metals around offshore oil production facilities in the Beaufort Sea. *Arctic*, 42-45.

Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 730-750.

Nieto, J. J. (1991). The response of halophilic bacteria to heavy metals. In *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms* (pp. 173-179). Springer, Boston, MA.

Nieto, J. J., Fernandez-Castillo, R., Marquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E., & Ruiz-Berraquero, F. (1989). Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2385-2390.

Nobi, E. P., Dilipan, E., Thangaradjou, T., Sivakumar, K., & Kannan, L. (2010). Geochemical and geo-statistical assessment of heavy metal concentration in the sediments of different coastal ecosystems of Andaman Islands, India. *Estuarine, coastal and shelf science*, 87(2), 253-264.

Obuekwe, I. S., & Semple, K. T. (2013). Impact of Zn and Cu on the development of phenanthrene catabolism in soil. *Environmental monitoring and assessment*, 185(12), 10039-10047.

Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á., & Sánchez-Otero, M. G. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 11(1), 79-90.

Onojake, M. C., & Frank, O. (2013). Assessment of heavy metals in a soil contaminated by oil spill: a case study in Nigeria. *Chemistry and Ecology*, 29(3), 246-254.

Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56-63.

Oren, A. (2002). Taxonomy of halophilic microorganisms: archaea, bacteria, and eucarya. *Halophilic Microorganisms and their Environments*, 23-68.

Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology*, 13(8), 1908-1923.

Oren, A. (2013). Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Frontiers in microbiology*, 4, 315.

Osman, O., Tanguichi, H., Ikeda, K., Park, P., Tanabe-Hosoi, S., & Nagata, S. (2010). Copper-resistant halophilic bacterium isolated from the polluted Maruit Lake, Egypt. *Journal of applied microbiology*, 108(4), 1459-1470.

Oves, M., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2013). Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi journal of biological sciences*, 20(2), 121-129.

Pacheco-Arjona, J. R., & Sandoval-Castro, C. A. (2018). Tecnologías de secuenciación del metagenoma del rumen. *Trop Subtrop Agroecosyt*, 21, 587-598.

Pan, K., & Wang, W. X. (2012). Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China. *Science of the total environment*, 421, 3-16.

Pérez, R. (2001). Porcicultura y contaminación del agua en la Piedad, Michoacán, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 17(1), 5-13.



Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

Quesada, E., Ventosa, A., Rodriguez-Valera, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *Journal of Applied Bacteriology*, 53(2), 155-161.

Ra, K., Kim, J. K., Hong, S. H., Yim, U. H., Shim, W. J., Lee, S. Y., ... & Kim, K. T. (2014). Assessment of pollution and ecological risk of heavy metals in the surface sediments of Ulsan Bay, Korea. *Ocean Science Journal*, 49(3), 279-289.

Ra, K., Kim, J. K., Hong, S. H., Yim, U. H., Shim, W. J., Lee, S. Y., ... & Kim, K. T. (2014). Assessment of pollution and ecological risk of heavy metals in the surface sediments of Ulsan Bay, Korea. *Ocean Science Journal*, 49(3), 279-289.

Rajendran, P., Muthukrishnan, J., & Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation.

Rajesh, P., Athiappan, M., Paul, R., & Raj, K. D. (2014). Bioremediation of cadmium by *Bacillus safensis* (JX126862), a marine bacterium isolated from mangrove sediments. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(12), 326-335.

Ramírez, N., Sandoval, A. H., & Serrano, J. A. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 12-23.

Ren, G., Jin, Y., Zhang, C., Gu, H., & Qu, J. (2015). Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb (II). *Ecotoxicology and environmental safety*, 117, 141-148.

Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M. D., & Jimenez, E. E. G. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo: I2+ D*, 16(2), 66-77.

Rodríguez, B. E. S. (2009). *La contaminación ambiental y sus consecuencias Toxicológicas*. Lulu. com.

Rodríguez-Valera, F. (1993). The biology of halophilic bacteria. *Introduction to saline environments*, 1-23.

Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbial Ecology*, 7(3), 235-243.

Roeßler, M., & Müller, V. (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental microbiology*, 3(12), 743-754.

Rohini, B., & Jayalakshmi, S. (2015). Bioremediation potential of *Bacillus cereus* against copper and other heavy metals. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 2(2), 200-209.

Rojas, E. R., & Huang, K. C. (2018). Regulation of microbial growth by turgor pressure. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 62-70.

Rojas-Mingüer, A., & Morales-Vela, B. (2002) "Metales en hueso y sangre de manatíes de (*Trichechus manatus manatus*) de la Bahía de Chetumal, Quintana Roo, México" En: F.J. Rosado-May, R. Romero Mayo, A. De Jesús Navarrete, eds. *Contribuciones de la ciencia al manejo costero integrado de la Bahía de Chetumal y su área de influencia*. Universidad de Quintana Roo, Chetumal, Q. Roo, México, pp.133-142.

Rossi, M., Ciaramella, M., Cannio, R., Pisani, F. M., Moracci, M., & Bartolucci, S. (2003). Extremophiles 2002. *Journal of bacteriology*, 185(13), 3683-3689.

Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101.

Rüger, H. J., & Richter, G. (1979). *Bacillus globisporus* subsp. *marinus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 29(3), 196-203.

- Sabdon, A. (2011). Cadmium removal by a bioeducpiun coral bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CD15 isolated from the tissue of coral *Goniastrea aspera*, jepara waters. *Journal of Coastal Zone Management*, 13(2), 81-91.
- Salgaonkar, B. B., Das, D., & Bragança, J. M. (2016). Resistance of extremely halophilic archaea to zinc and zinc oxide nanoparticles. *Applied Nanoscience*, 6(2), 251-258.
- Sandoval, G. M. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-99.
- Sany, S. B. T., Salleh, A., Sulaiman, A. H., Sasekumar, A., Rezayi, M., & Tehrani, G. M. (2013). Heavy metal contamination in water and sediment of the Port Klang coastal area, Selangor, Malaysia. *Environmental earth sciences*, 69(6).
- Schippers, A., & Sand, W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and environmental microbiology*, 65(1), 319-321.
- Schleifer, K. H. (2009). Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 19-1317). Springer, New York, NY.
- Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1351-1365.
- Seckbach, J., Oren, A., & Stan-Lotter, H. (2013). Polyextremophiles. *Dordrecht: Springer. doi, 10*, 978-94.
- Semerjian, L. (2010). Equilibrium and kinetics of cadmium adsorption from aqueous solutions using untreated *Pinus halepensis* sawdust. *Journal of hazardous materials*, 173(1-3), 236-242.

- Shamim, S., & Rehman, A. (2012). Cadmium resistance and accumulation potential of *Klebsiella pneumoniae* strain CBL-1 isolated from industrial wastewater. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(1).
- Sharma, B., & Shukla, P. (2021). Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123285.
- Silver, S. (1992). Plasmid-determined metal resistance mechanisms: range and overview. *Plasmid*, 27(1), 1-3.
- Silver, S., & Ji, G. (1994). Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environmental health perspectives*, 102(suppl 3), 107-113.
- Singh, K. P., Mohan, D., Sinha, S., & Dalwani, R. (2004). Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*, 55(2), 227-255.
- Siripongvutikorn, S., Asksonthong, R., & Usawakesmanee, W. (2016). Evaluation of harmful heavy metal (Hg, Pb and Cd) reduction using *Halomonas elongata* and *Tetragenococcus halophilus* for protein hydrolysate product. *Functional Foods in Health and Disease*, 6(4), 195-205.
- Smith, S. D., & Rule, M. J. (2001). The effects of dredge-spoil dumping on a shallow water soft-sediment community in the Solitary Islands Marine Park, NSW, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 42(11), 1040-1048.
- Snyder, F. (1972). The enzymic pathways of ether-linked lipids and their precursors. In *Ether Lipids Chemistry and Biology* (pp. 121-156). Academic Press.
- Soria, I. M. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e investigación*, 7(2), 13-17.

- Sowmya, M., Rejula, M. P., Rejith, P. G., Mohan, M., Karuppiyah, M., & Hatha, A. M. (2014). Heavy metal tolerant halophilic bacteria from Vembanad Lake as possible source for bioremediation of lead and cadmium. *Journal of Environmental Biology*, 35(4), 655.
- Stadtmiller, S. S., Gorenssek-Benitez, A. H., Guseman, A. J., & Pielak, G. J. (2017). Osmotic shock induced protein destabilization in living cells and its reversal by glycine betaine. *Journal of molecular biology*, 429(8), 1155-1161.
- Street, T. O., Bolen, D. W., & Rose, G. D. (2006). A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(38), 13997-14002.
- Talon, R., Coquelle, N., Madern, D., & Girard, E. (2014). An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins. *Frontiers in microbiology*, 5, 66.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics*, 14(2), 178-192.
- Trejo, J. A. V., & David, A. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología.
- Trüper, H. G., Severin, J., Wohlfarth, A., Müller, E., & Galinski, E. A. (1991). Halophily, taxonomy, phylogeny and nomenclature. In *General and applied aspects of halophilic microorganisms* (pp. 3-7). Springer, Boston, MA.
- Tunali, S., Çabuk, A., & Akar, T. (2006). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal*, 115(3), 203-211.
- Uauy, R., Maass, A., & Araya, M. (2008). Estimating risk from copper excess in human populations. *The American journal of clinical nutrition*, 88(3), 867S-871S.

UNEP, UN-HABITAT (2005) Coastal area pollution – the role of cities. [http://www.unep.org/urban\\_environment/PDFs/Coastal\\_Pollution\\_Role\\_of\\_Cities.pdf](http://www.unep.org/urban_environment/PDFs/Coastal_Pollution_Role_of_Cities.pdf).

Accessed 01 Jan 2015

Valderrama, M. J., Monteoliva-Sanchez, M., Quesada, E., & Ramos-Cormenzana, A. (1998). Influence of salt concentration on the cellular fatty acid composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Research in microbiology*, 149(9), 675-679.

Valls, M., & De Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS microbiology Reviews*, 26(4), 327-338.

Van Den Berg, J., Boersma, A. J., & Poolman, B. (2017). Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 309-318.

Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 213-218.

Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., ... & Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *science*.

Ventosa, A. (2006, January). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In *Symposia-society for general microbiology* (Vol. 66, p. 223). Cambridge; Cambridge University Press; 1999.

Ventosa, A., Márquez, M. C., Sánchez-Porro, C., & Rafael, R. (2012). Taxonomy of halophilic archaea and bacteria. In *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms* (pp. 59-80). Springer, Dordrecht.

Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 504-544.

- Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(3), 93-104.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., & Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2-3), 95-117.
- Wang, S. L., Xu, X. R., Sun, Y. X., Liu, J. L., & Li, H. B. (2013). Heavy metal pollution in coastal areas of South China: a review. *Marine pollution bulletin*, 76(1-2), 7-15.
- Wang, T., & Sun, H. (2013). Biosorption of heavy metals from aqueous solution by UV-mutant *Bacillus subtilis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(10), 7450-7463.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.
- Warren, J. K. (2016). *Evaporites: A geological compendium*. Springer.
- Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environmental monitoring and assessment*, 185(10), 8147-8155.
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 237-241.
- Wen, X., Du, C., Zeng, G., Huang, D., Zhang, J., Yin, L., ... & Wan, J. (2018). A novel biosorbent prepared by immobilized *Bacillus licheniformis* for lead removal from wastewater. *Chemosphere*, 200, 173-179.
- Whelan Iii, T., Van Tussenbroek, B. I., & Santos, M. B. (2011). Changes in trace metals in *Thalassia testudinum* after hurricane impacts. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2797-2802.
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 15(3), 1-12.
- Wood, J. M. (2011). Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual review of microbiology*, 65, 215-238.

Woodruff, T. J., Carlson, A., Schwartz, J. M., & Giudice, L. C. (2008). Proceedings of the Summit on Environmental Challenges to Reproductive Health and Fertility: executive summary. *Fertility and sterility*, 89(2), 281-300.

Xu, L., Xu, X. W., Meng, F. X., Huo, Y. Y., Oren, A., Yang, J. Y., & Wang, C. S. (2013). *Halomonas zincidurans* sp. nov., a heavy-metal-tolerant bacterium isolated from the deep-sea environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(11), 4230-4236.

YAÑEZ, D. P. (2020). Bioacumulación del cadmio y plomo en cuatro grupos de zooplancton del noreste de Quintana Roo, México.

Youssef, D. H., & El-Said, G. F. (2011). Assessment of some heavy metals in surface sediments of the Aqaba Gulf, Egypt. *Environmental Monitoring and Assessment*, 180(1), 229-242.

Youssef, N. H., Savage-Ashlock, K. N., McCully, A. L., Luedtke, B., Shaw, E. I., Hoff, W. D., & Elshahed, M. S. (2014). Trehalose/2-sulfotrehalose biosynthesis and glycine-betaine uptake are widely spread mechanisms for osmoadaptation in the Halobacteriales. *The ISME journal*, 8(3), 636-649.