



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Por

Sandra Pérez Briseño

Ingeniero Biotecnólogo

**Estudio de la acumulación microbiana de metales y formación de
nanopartículas con aplicación potencial en la industria minera**

Dirigida por

Dr. Luis Fernández Linares

México, D.F. 2011



SIP-14

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 13:00 horas del día 9 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

Estudio de la acumulación microbiana de metales y formación de nanopartículas con aplicación potencial en la industria minera.

Presentada por la alumna:

Pérez Briseño Sandra
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	5	1	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:


Maestría en Ciencias en Bioprocesos

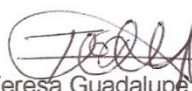
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que *satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.*

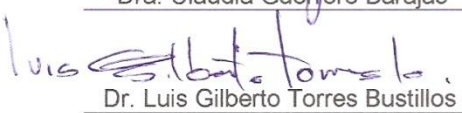
LA COMISIÓN REVISORA

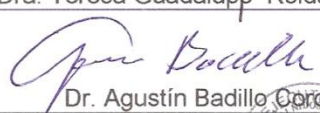
Director de tesis


Dr. Luis Carlos Fernández Linares


Dra. Claudia Guerrero Barajas


Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo


Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos


Dr. Agustín Badillo Corona

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dra. María Guadalupe Raimírez Sotelo



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 9 del mes de diciembre del año 2011, la que suscribe Sandra Pérez Briseño alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B091517, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Luis C. Fernández Linares y cede los derechos del trabajo intitulado Estudio de la acumulación microbiana de metales y formación de nanopartículas con aplicación potencial en la industria minera, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

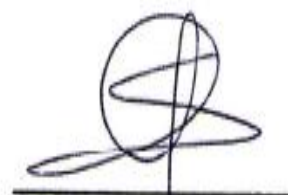
Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, las gráficas o los datos del trabajo sin el permiso expreso del autor o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección samperezbrise@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



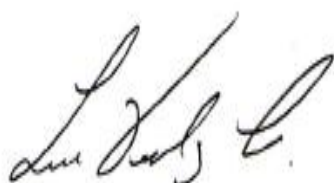
Sandra Pérez Briseño

Declaración de originalidad

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."



Sandra Pérez Briseño.



Vo. Bo. Dr. Luis Carlos Fernández Linares

Director de tesis.

Resumen

La minería es una actividad económica de gran importancia y tradición en México. En el caso particular de los metales de transición cobalto y cobre, su extracción y separación es un proceso complicado. Ya que las fuentes de cobalto se encuentran mezcladas con otros metales como el cobre. Algunas bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a concentraciones altas de cobalto y cobre, utilizando procesos que abarcan desde la difusión de iones en membrana, el uso de proteínas de transporte y quelación (producción de sideróforos) así como enzimas de óxido-reducción. A su vez algunos de estos procesos pueden derivar en la formación de nanopartículas metálicas.

En este trabajo se evaluaron procesos de producción de sideróforos, de acumulación y adsorción de cobalto y cobre, así como la capacidad de formación de nanopartículas de cobalto y cobre. Utilizando dos cepas bacterianas aisladas de residuos mineros (jales), ZnZac y OC4. Se obtuvieron los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para cobalto y cobre, ubicando ambas cepas como moderadamente resistentes. En los resultados de las pruebas de biocumulación de la cepa ZnZac fue capaz de acumular cobalto y no cobre, lo que sugiere una acumulación selectiva. La cepa OC4 produjo sideróforos del tipo carboxilatos en cultivos sólidos. Para analizar la formación de nanopartículas se utilizaron dos tipos de microscopia, Confocal de Barrido Laser (LSCM) y Electrónica de Transmisión (TEM). Las imágenes de LSCM muestran la presencia de cobre y cobalto en muestras de biomasa, de ambas cepas, sometidas a periodos de incubación en soluciones con cada metal. Sin embargo no se observó la formación de nanopartículas por TEM, en esta prueba se evaluó un metal testigo (plata). Ambas cepas fueron capaces de formar nanopartículas de plata. Las cinéticas de adsorción presentaron un comportamiento de pseudo segundo orden. Con valores de capacidad de adsorción (q_e) de 83.33mgCu/g y 61.34mgCo/g para la cepa OC4 mientras que la cepa ZnZac obtuvo 119mgCu/g y 81.96mgCo/g. El modelo de Freundlich fue el que presentó un mejor ajuste con los valores de adsorción para ambas cepas, OC4 obtuvo una capacidad de adsorción máxima (q_{max}) de 155.9 mg/g para cobre y 129.54mg/g para cobalto con valores de constantes de Freundlich (k) mayor para cobre que para cobalto 2.74 y 0.46 respectivamente valores que coinciden con la afinidad. La cepa ZnZac alcanzó una capacidad de adsorción máxima (q_{max}) calculada, mayor de cobalto que de cobre 537.55 mg/g y 174.29 mg/g respectivamente. La cepa, ZnZac fue identificada comparando la secuencia de gen 16S, ZnZac un 99% de homología con *Delftia tsuruhanensis*

Abstrac

The mining industry is an economic activity of great importance and tradition in Mexico. In the particular case of the metals of transition cobalt and copper, his extraction and separation is a complicated process. Since the sources of cobalt are mixed by other metals as the copper. Some bacteria have developed mechanisms that allow them to survive high concentrations of cobalt and copper, using processes that they include from the diffusion of ions in membrane, the use of proteins of transport and quelation (siderophores production) as well as redox enzymes. Some of these processes can derive in the formation of metallic nanoparticles.

In this work were evaluated processes of siderophores production of accumulation and adsorption of cobalt and copper. As well as the capacity of formation of nanoparticles of cobalt and copper. Using two bacterial strains named ZnZac and OC4, isolated of mining residues (tailings). There were obtained the values of minimal inhibitory concentration (CMI) for cobalt and copper, locating both strains as moderately resistant. In the results of the tests of bioaccumulation of the strains ZnZac it was capable of accumulating cobalt and not copper, which suggests a selective accumulation. The strains OC4 produced siderophores of the carboxylates type in solid cultures. To analyze the formation of nanoparticles were used two types of electron microscopy, confocal scanning laser (LSCM) and electronic transmission (TEM). The images of LSCM show the presence of copper and cobalt in samples from biomass, from both strains, subject to periods of incubation in solutions with each metal. However it was not observed the formation of nanoparticles by TEM, in this test was evaluated a metal witness (silver). Both strains were capable of forming nanoparticles of silver. The adsorption kinetics behaved pseudo-second-order. With values of adsorptive capacity (q_e) of 83.33mgCu/g and 61.34mgCo/g for OC4 strain and ZnZac strain 119mgCu/g y 81.96mgCo/g. Values higher than those reported with other bioadsorbentes. Freudlich model was presented a better fit with the values of adsorption OC4 strain obtained maximum adsorption capacity (q_{max}) of 155.9 mg/g for copper and 129.54mg/g for cobalt, Freudlich constant values (k) higher for copper than for cobalt 2.74 and 0.46 respectively, this values that match the affinity. The ZnZac strain reached a maximum adsorption capacity (q_{max}) calculated, most cobalt than copper 537.55 mg/g and 174.29 mg/g. The ZnZac strain was identified comparing the sequence of 16S, 99% homology with *Delftia tsuruhantensis*.

Contenido

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL	i
Declaración de originalidad	iii
Índice de figuras	1
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes	4
2.1. La minería y su impacto ambiental	4
2.1.1. Jales mineros.....	6
2.2. Microorganismos y metales	7
2.2.1. Mecanismos de interacción microorganismo-metal.....	7
2.2.2. Residuos de cobre y cobalto.....	16
2.2.3. Cobalto	18
2.3. Nanotecnología	19
2.3.1. Nanopartículas metálicas.....	20
2.3.2. Síntesis biológica de nanopartículas.....	22
2.3.3. Caracterización de nanopartículas por microscopia.....	25
3. Hipótesis	29
4. Justificación.....	30
5. Objetivos	31
5.1.1. General.....	31
5.1.2. Específicos	31
6. Materiales y métodos	32
6.1. Estrategia metodológica	32
6.2. Material biológico.....	33
6.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales (CMI).....	33
6.4. Prueba preliminar de acumulación de metales por revelado con H ₂ S.....	33
6.5. Prueba O-CAS para la detección de sideróforos	33
6.6. Formación nanopartículas metálicas	34
6.6.1. Microscopia de Escaneo Cofocal Laser (CLSM).....	34
6.6.2. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	35
6.7. Pruebas de bioadsorción de cobre(II) y cobalto(II).....	35
6.7.1. Obtención de biomasa seca.....	35
6.7.2. Cinética de adsorción de cobre y cobalto por la cepa OC4.....	36
6.7.3. Cinética de adsorción de cobre y cobalto de la cepa ZnZac	36
6.7.4. Isotermas de adsorción de cobre y cobalto.....	36
6.8. Identificación genética de las cepas ZnZac y OC4.....	37
6.8.1. Amplificación del gen 16S rDNA	37
6.8.2. Análisis filogenético	38
6.9. Amplificación de los genes copA y czcD.....	38
7. Resultados y discusión.....	40
7.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	40
7.2. Prueba de acumulación de metal en cultivo sólido de OC4 y ZnZac.....	41
7.3. Presencia de sideróforos en cultivos de ZnZac y OC4.....	42

7.4. Análisis de biomasa en contacto con metal por Microscopía Confocal de Escaneo Laser (CLSM)	44
7.4.1. Obtención de imágenes en 3D y espectros de emisión de la biomasa de cepas ZnZac y OC4 en contacto con cobre y cobalto	45
7.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	51
7.5.1. Análisis microscópico TEM de la Cepa ZnZac	52
7.5.2. Evaluación de ZnZac y OC4 con plata	56
7.6. Bioadsorción de cobre(II) y cobalto(II)	62
7.6.1. Cinéticas de adsorción.....	62
7.6.2. Isotermas de adsorción.....	71
7.7. Análisis filogenético	79
7.7.1. Amplificación del gen 16S rDNA	79
8. Conclusiones.....	84
9. Referencias.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Producción de metales y minerales	4
Figura 2 Mecanismos de Transporte e interacción de iones metálicos y bacterias	8
Figura 3 Mecanismos biológicos involucrados en la remoción de metales.	9
Figura 4 Proceso de intercambio de iones.....	11
Figura 5 Mecanismo de producción de sideróforos para una bacteria Gram-negativa.	15
Figura 6 Tipos de Sideróforos	16
Figura 7 Interacción entre la ATPasa CopA	18
Figura 8 Estrategia metodológica	32
Figura 9 Biomasa bacteriana en contacto con las solución de metal.....	37
Figura 10 Formación de halos en la prueba de acumulación por revelado con H ₂ S.....	42
Figura 11 Prueba O-CAS para sideróforos.....	44
Figura 12 Imágenes de CLSM	46
Figura 13 Imagen 3D de CLSM de la cepa ZnZac.....	47
Figura 14 Imagen 3D en CLSM de la cepa OC4	48
Figura 15 Espectro de emisión obtenidos por CLSM para la cepa ZnZac en contacto con cobre.	49
Figura 16 Espectro de emisión obtenidos por CLSM para la cepa ZnZac	49
Figura 17 Espectro de emisión obtenidos por CLSM para la cepa OC4	50
Figura 18 Espectro de emisión obtenidos por CLSM para la cepa OC4 en contacto con cobalto.	50
Figura 19. Micrografías de transmisión electrónica modo contraste Z. de la cepa ZnZac con 2mM de CuCl ₂	52
Figura 20 Micrografías de transmisión electronica modo contraste Z. cepa ZnZac con 2mM de CoCl ₂	53
Figura 21 Análisis de EDX sobre estructuras observadas en la superficie de la cepa ZnZac. ..	53
Figura 22 Micrografías de transmisión electronica modo contraste Z. Cepa OC4 con 2mM de CuCl ₂	54
Figura 23 Análisis de EDX sobre estructuras observadas en la superficie de la cepa OC4 con CuCl ₂	55
Figura 24 Micrografías de transmisión electronica modo contraste Z. cepa OC4 con 2mM de CoCl ₂	55
Figura 25 Micrografías de transmisión electronica modo contraste Z.	57
Figura 26 Análisis de composición e nanopartículas de Ag	58
Figura 27 Cinética de adsorción de cobre(II) de la cepa OC4.	62
Figura 28 Linealización de pseudo segundo orden para la cinética de adsorción de cobre(II) de la cepa OC4.	63

Figura 29 Cinética de adsorción de cobalto 2.5 mM de la cepa OC4.	65
Figura 30 Linealización de pseudo segundo orden para la cinética de adsorción de cobalto de la cepa OC4.	65
Figura 31 Cinéticas de adsorción de cobre(II) de la cepa ZnZac.....	67
Figura 32 Linealización de pseudo segundo orden para la cinética de adsorción de cobre(II) .	68
Figura 33 Cinéticas de adsorción de cobalto de la cepa ZnZac.....	68
Figura 34 Linealización de pseudo segundo orden para la cinética de adsorción de cobalto de la cepa ZnZac.	69
Figura 35 Isotherma de adsorción de cobre(II) utilizando la cepa OC4.	72
Figura 36 Isotherma de adsorción de cobalto(II) utilizando la cepa OC4.	73
Figura 37 Modelos de Isothermas en forma lineal para la adsorción de cobre y cobalto para la cepa OC4.....	74
Figura 38 Isotherma de adsorción de cobre(II) utilizando la cepa ZnZac..	75
Figura 39 Isotherma de adsorción de cobalto(II) utilizando la cepa ZnZac.	76
Figura 40 Modelos de Isothermas en forma lineal para la adsorción de cobre y cobalto para la cepa ZnZac.....	77
Figura 41 Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del gen 16s..	80
Figura 42 Árbol filogenético de la cepa ZnZac.....	81
Figura 43 Árbol filogenético de la cepa OC4.	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Relación de la actividad minera y su impacto al ambiente	5
Tabla 2 Principales Factores que afectan el proceso de bioadsorción.....	11
Tabla 3 Algunas características de la bioacumulación y otros mecanismos de soporte de los microorganismos en presencia de metales.....	14
Tabla 4 Microorganismos con capacidad de sintetizar nanopartículas.	22
Tabla 5 Fluorocromos comunmente utilizados en bacterias.	28
Tabla 6 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	38
Tabla 7 Concentración Mínima Inhibitoria cepas OC4 y ZnZac	41
Tabla 8 Evaluación de diferentes colorantes para CLSM	45
Tabla 9 Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo cinético de pseudo segundo orden. Cepa OC4	66
Tabla 10 Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo cinético de pseudo segundo orden. Cepa ZnZac	69
Tabla 11 Comparación de diferentes bioadsorbentes utilizados para la remoción de cobre(II).....	70
Tabla 12 Constantes de las Isothermas de adsorción de cobre(II) y cobalto(II).	78

1. INTRODUCCIÓN.

Los jales son residuos de los procesos de flotación que, generalmente, contienen metales en formas insolubles, sales básicas o ácidas y vestigios solubles de elementos derivados de la oxidación (Volke et al., 2005). Los microorganismos principalmente degradan compuestos orgánicos; sin embargo, también poseen procesos metabólicos relacionados con compuestos inorgánicos como los metales. Algunos de estos mecanismos modifican la solubilidad, movilidad y/o toxicidad de este tipo de contaminantes (Volke et al., 2005).

Los mecanismos de interacción entre microorganismos y metales se pueden dividir en dos. Los de inmovilización y los de movilización (Cruz, 2008). A nivel extracelular se ha determinado, por un lado, el papel de los microorganismos en la movilización e inmovilización de metales, así como la secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con alta afinidad llamados sideróforos.

Uno de los retos que enfrenta la industria minera, es la obtención de Cobalto y Cobre de alta pureza ya que las fuentes técnicamente más importantes del cobalto son los residuos llamados "speiss" (impurezas metálicas) que se obtienen al fundir los minerales arsenicales de níquel, cobre y plomo. La separación del cobalto al estado puro es un proceso complicado (Cotton, 1969). En el caso del cobre, su separación del cobalto es extremadamente cara (Thomas, 1996).

Este proyecto propone el estudio de mecanismos de inmovilización de cobre y cobalto, que pueden desarrollar microorganismos aislados de jales mineros. Como son la síntesis de nanopartículas metálicas, la producción de sideróforos y el uso de biomasa como bioadsorbentes, son procesos con gran potencial de aplicación. También se realizó un estudio filogenético para la identificación de las cepas aisladas.

2. ANTECEDENTES

2.1. La minería y su impacto ambiental

La minería ha tenido a lo largo de la historia de México una gran importancia socio-económica. Siendo el estudio, histórico, geográfico así como las técnicas de explotación y beneficio, fundamentales (Muñoz, 1986). Actualmente, la minería se ha convertido en un trabajo de alta especialización, sumamente mecanizado y computarizado, por lo que sólo pueden competir en la explotación, grandes empresas con capacidad para realizar enormes inversiones en exploración y explotación. La minería ha dejado de ser una actividad meramente extractiva, para convertirse en un actividad integrada verticalmente y se habla indistintamente de los minerales extraídos como de los productos (Coll-Hurtado, 2002). El sector minero aporta entre el 1.17% y 1.5% al producto interno bruto nacional, mantiene un saldo positivo en la balanza de pagos y contribuye con el 1.5% al empleo nacional. De manera estimada, la producción minera nacional representa el 2.4% de la producción minera mundial, México ocupa el 9º lugar en la producción minera mundial y el 4º lugar en Latinoamérica. En México se producen cerca de 30 millones de toneladas de metales y minerales anualmente (INEGI, 2009) siendo estados como Coahuila e Hidalgo los de mayor aportación (Figura 1).

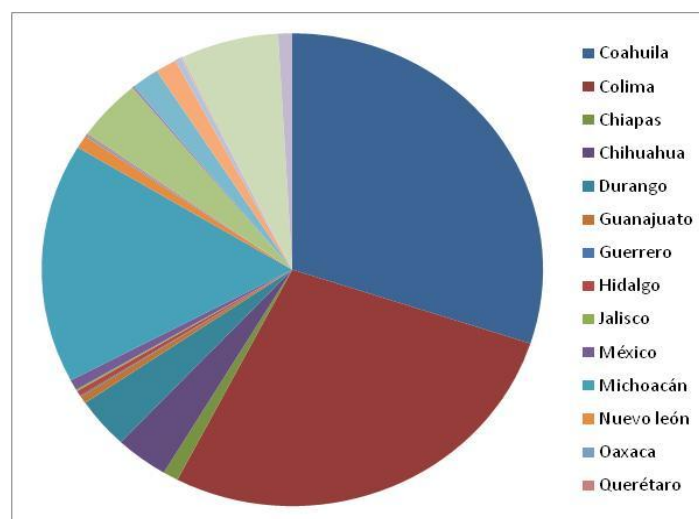


Figura 1 Producción de metales y minerales seleccionados por entidad federativa INEGI ,2009

Más de cuatrocientos años de actividades mineras, en muchos casos ininterrumpidas, han generado diversos materiales potencialmente tóxicos, a los cuales se expone a la población, flora y fauna, a través del suelo, aire o de aguas contaminadas. Así mismo, existe el riesgo de fenómenos de bioacumulación de metales en las distintas fases de las cadenas alimenticias

(Ross, 2002). Por otra parte la erosión de suelos tiene un impacto adverso sobre la tierra y sus habitantes; generando cambios dramáticos en la topografía, propiedades del suelo, productividad, infiltración de agua en el subsuelo, así como también efectos negativos en la salud pública, principalmente por partículas contaminantes como son metales pesados y radionucléidos (Larney *et al.*, 1999).

Durante todas las etapas de los procesos mineros (**Tabla 1**), se generan aguas residuales, residuos peligrosos y, en algunos casos, emisiones a la atmósfera. Siendo las etapas de explotación y fundición/refinación que producen más contaminantes (INE, 1994).

Tabla 1 Relación de la actividad minera y su impacto al ambiente (Sepúlveda, 2005)

Etapa	Descripción	Impacto al ambiente
Prospección	Estudios de gravimetría, geología superficial, densidad, etc.	Procedimientos que no generan impactos ambientales significativos
Exploración	Barrenación, obras y perforaciones, construcción de caminos, instalación de campamentos	Destrucción de la vegetación
Explotación y beneficio	Descapote: eliminación de suelo y vegetación Construcción y obras diversas (tiros, socavones, patios de depósito) Alto consumo de agua Acumulación de material sin valor en terreros, transporte del material con valor hacia molinos, extracción y concentración de minerales, reducción del tamaño del mineral por trituración y molienda. Tratamientos previos a una fusión primaria o electro-deposito	Destrucción de la capa del suelo y la vegetación Afectación a cuerpos de agua Generación de terreros inestables Generación de jales o colas residuos minerales sin valor Escurremientos y arrastres de residuos Oxidación de minerales insolubles y formación de sustancias solubles con alto contenido de metales (drenaje ácido) Descarga de lixiviados que contienen iones metálicos y reactivos tóxicos La trituración y molienda pueden provocar ruido, vibración y emisión de polvo (efectos de bajo impacto)
Fundición y refinación	Obtención de metales y sus aleaciones con el uso de hornos Industriales. Eliminación de impurezas en los metales para alcanzar una alta ley de contenido	Generación de aguas residuales, residuos peligrosos, emisiones a la atmósfera

Como en ningún proceso de concentración se logra una recuperación de 100%, los desechos mineros (colas o jales) siempre contienen residuos del mineral, permitiendo su eventual recuperación a futuro. Sin embargo, es común que muchas empresas descartaran sus desechos en ríos o los dispusieran en grandes pilas. La composición de estos residuos puede ser muy diversa en su naturaleza química y mineralógica (Sánchez, 1995)

2.1.1. Jales mineros

Los jales son residuos de los procesos de flotación que, generalmente, contienen metales en formas insolubles, sales básicas o ácidas y vestigios solubles de elementos derivados de la oxidación, por ejemplo de As y Se, entre otros. El ejemplo más común de la contaminación de suelos por actividades mineras en México es la generada durante el beneficio del oro y la plata, realizado comúnmente por amalgamación con Hg y por cianuración. En ninguno de los dos casos, es posible la recuperación total de los compuestos y/o elementos adicionados, por lo que es común encontrarlos en los residuos del proceso (jales) en forma soluble (Volke et al., 2005).

Desde la perspectiva geotécnica estos depósitos también representan un alto riesgo, ya que son materiales no consolidados cuyas partículas pueden moverse fácilmente tanto por la acción del viento como por el impacto de las aguas de lluvia, disgregándose muy fácilmente. Además al no presentar obras hidráulicas, para desviar el agua de escurrimiento de la cuenca de captación, tiene un alto riesgo de erosión hídrica. Cuando la lluvia ha caído varios días, los poros tienen un nivel de saturación cercano al 100% y los jales pueden llegar a fluir por efecto de su peso, resultando en pérdida de estabilidad y deslizamiento, esto debido principalmente a los grados de pendiente de los taludes (Terlien, 1998).

Cabe señalar que una actividad prioritaria para muchas instituciones es ubicar, cuantificar y caracterizar los residuos, tanto de las minas activas como las abandonadas, en los distritos mineros históricos de México, debido a los grandes problemas de contaminación que han surgido (O et al., 2009).

2.2. Microorganismos y metales

En el caso de sitios contaminados, los microorganismos pueden modificar la movilidad de los metales en el medio a través de cambios en sus características físicas o químicas (Lovley, 1997). Los microorganismos principalmente degradan compuestos orgánicos; sin embargo, existen procesos metabólicos relacionados con compuestos inorgánicos que involucran la biadsorción, la precipitación y la transformación enzimáticas de los metales (Valls and Lorenzo, 2002)

Cuando un microorganismo se encuentra en un medio que contiene concentraciones tóxicas de un metal, puede presentar tolerancia a estas concentraciones, lo cual se relaciona con las propiedades intrínsecas del microorganismo. Por otro lado la resistencia es la habilidad del microorganismo de sobrevivir al estrés, utilizando mecanismos de respuesta que son activados por la presencia del agente estresante (Gadd, 2000).

Los microorganismos pueden presentar diferentes niveles y mecanismos de tolerancia a los metales, en función del tipo de organismo, del metal y su concentración (Blindauer, 2001).

2.2.1. Mecanismos de interacción microorganismo-metal

Las interacciones entre microorganismos y metales pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie bacteriana o intracelularmente. A nivel extracelular se ha determinado, por un lado, el papel de los microorganismos en la movilización e inmovilización de metales, así como la secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con alta afinidad por estos elementos llamados sideróforos.

Las interacciones con la superficie celular dependen del tipo de bacteria, debido a que el metal interactúa con los grupos específicos que se encuentran en la membrana. Durante las interacciones intracelulares, como consecuencia de la acumulación del metal, pueden ocurrir transformaciones enzimáticas o la síntesis de proteínas específicas conocidas como metalotioninas (Suárez, 2002).

En procariontes, se ha observado la producción de metalotioninas (MTs) durante los procesos de regulación de la concentración intracelular de metales. Las metalotioninas son una familia de proteínas metalo-quelantes homólogas, funcionales, de cadenas cortas de

aproximadamente 60 aminoácidos ricos en cisteína; éstas también han sido reportadas en eucariontes (Blindauer, 2001).

La interacción iones metálicos - membrana celular, pueden ser de tipo pasiva, por adsorción o precipitación (**Figura 2**) ó activa, las cuales son reguladas por proteínas de unión y enzimas (Valls, 2002).

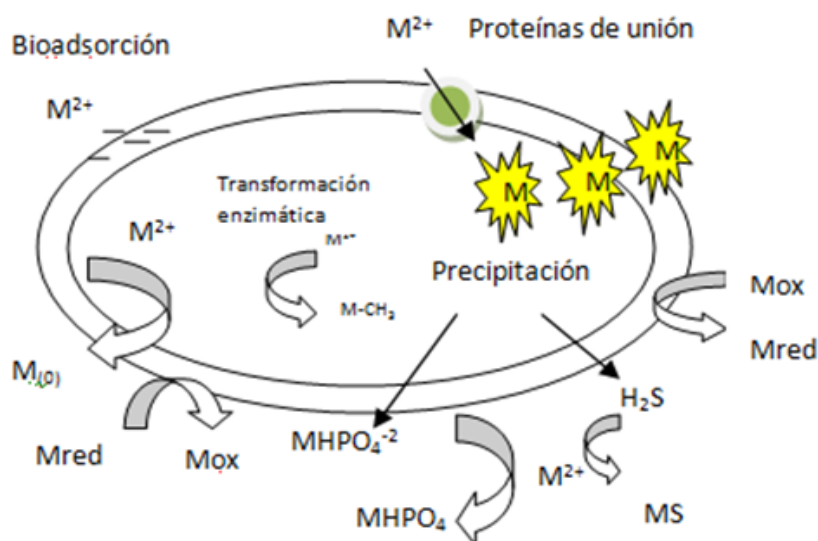


Figura 2 Mecanismos de Transporte e interacción de iones metálicos y bacterias (Adaptado de Valls (2002))

De manera general se pueden dividir los mecanismos de interacción entre los microorganismos y los metales (Figura 3) en aquellos que producen la movilidad del metal, es decir se lleva a cabo una lixiviación microbiana o inmovilizado lo cual puede ocurrir por diversos mecanismos (Figura 3) (Cruz, 2008).

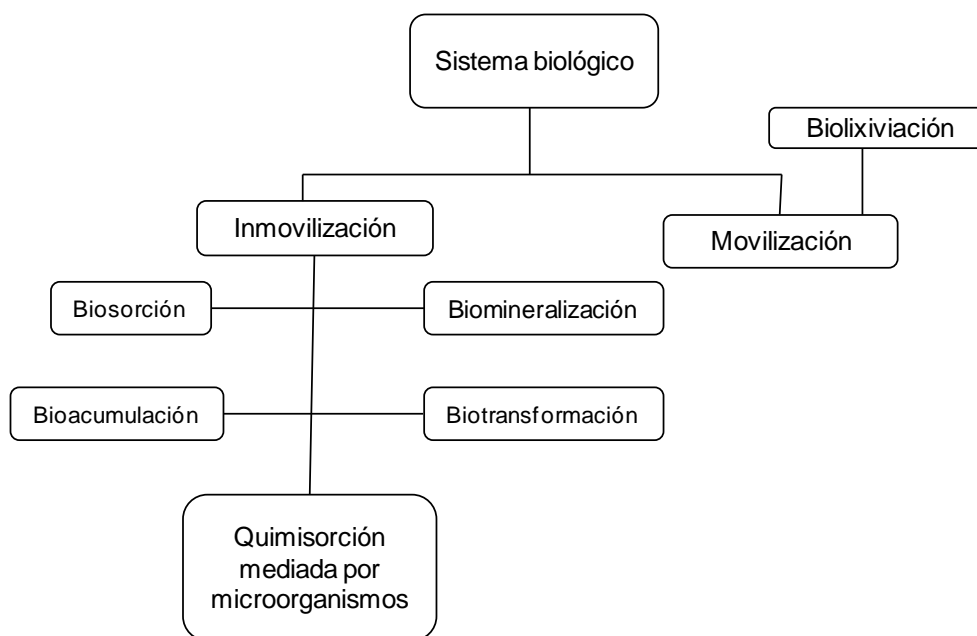


Figura 3 Mecanismos biológicos involucrados en la remoción de metales. Adaptado de Cruz (2008)

2.2.1.1. Movilización

La movilización es la capacidad bacteriana que se relaciona con la liberación de metales constitutivos de algunos compuestos químicos. El ejemplo más conocido es el de *Thiobacillus ferroxidans*, responsable de la lixiviación de Fe, Cu y Mo, razón por la cual se utiliza en la extracción industrial de estos metales (Unz, 1996).

Los factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo son:

- I. Características del suelo: pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de cambio, presencia de carbonatos, materia orgánica, textura, etc.
- II. Naturaleza de la contaminación: origen de los metales y forma de deposición.
- III. Condiciones medioambientales: acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad, etc.

La movilización es relativa a todos los factores mencionados, pero especialmente a aquellos que afectan a la transferencia desde la fase sólida a la líquida, como son la constitución química, responsable de intercambios catiónicos lo cual contribuye eficazmente a retener y dispersar de forma controlada entre fases (Solano, 2006).

Algunos de los mecanismos por los cuales los elementos traza de los suelos contaminados pueden ser movilizados pueden ser la acidificación, la cual es resultado de la oxidación de sulfuros minerales y precipitados y de fertilizantes de NH_4^+ . Así como por descomposición de materia orgánica, por agotamiento de bases por lixiviación y por vertidos de contaminantes ácidos. Los cambios en condiciones oxidantes del suelo pueden causar la oxidación y disolución de sulfuros insolubles; de manera inversa, las condiciones reductoras pueden conducir a la disolución de óxidos. También, la formación de complejos de especies metálicas con ligandos orgánicos y los cambios en la composición iónica de la solución del suelo pueden marcar un efecto en la adsorción de elementos traza y su incorporación a complejos inorgánicos solubles e insolubles. Por último, la metilación por la cual algunos metales son transformados en metil especies, las cuales pueden volatilizarse y perderse en la atmósfera o acumularse en materia orgánica (Alloway, 1995)

2.2.1.2. Inmovilización

La inmovilización se define como la capacidad que presenta la biomasa para atrapar metales, uniéndolos a sus componentes estructurales, la cual depende de las capacidades físicas, químicas y biológicas de la biomasa o células (Suárez, 2002). Los dos principales mecanismos son la bioadsorción y la bioacumulación.

Bioadsorción

Proceso independiente de energía (pasivo), el cual incluye mecanismos de intercambio de iones (Figura 4), quelación, adsorción y atrapamiento. Este concepto incluye una concentración de sorbato (la biomasa), la cual presenta la posibilidad de ser reutilizado. Algunos de los factores que influyen en la adsorción se presentan en la (**Tabla 2**). Estos factores puede ser el estado del microorganismos ya sea en suspensión o inmovilizados, la presencia de distintos cationes y aniones, lo cual afecta el pH durante el proceso (Katarzyna, 2010).

Recientes estudios en el área de adsorción se han enfocado en la selectividad de los adsorbentes microbianos en mezclas multimetálicas, así como en el potencial de adsorción de metales bajo condiciones ambientales naturales, estudiando los mecanismos de reacción entre el metal y el microorganismo (Unz, 1996).

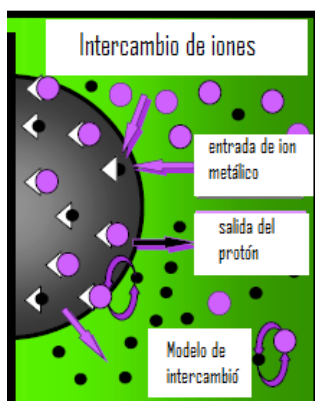


Figura 4 Proceso de intercambio de iones (Crist, 1994)

Tabla 2 Principales Factores que afectan el proceso de bioadsorción. Adaptado de (Katarzyna, 2010)

Factor	Efecto
Grupos funcionales	Depende del estado en el que se encuentre dicho grupo en la biomasa, la accesibilidad del grupo, su estado químico y la afinidad entre el metal y el grupo funcional.
pH	Afecta la protonación de los iones metálicos, así como el estado iónico del sorbato en la solución. Con pHs bajos se facilita la reutilización de la biomasa
Sorbato	Estos pueden ser catiónicos, como algunas levaduras o aniónicos, como algunos hongos.

Se ha propuesto que los sitios de unión de un metal con una proteína no son suficientemente selectivos, de manera que puedan elegir a un metal y excluir a los demás. A partir de observaciones empíricas de variaciones de divalencia en la unión de metales y proteínas (Pasternak *et al.*, 2001) proponen un modelo que sugiere la unión de proteínas a metales esenciales en el siguiente orden global: $Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+}(Cu^+) > Zn^{2+}$

El control de ligando es predominantemente determinado por la modulación de una proteína con funciones capaces de controlar los excedentes del ion metal, un ejemplo es la Ferritina para el hierro (Hintze, 2006).

Existen relaciones matemáticas que permiten calcular la cantidad de iones metálicos

$$q_e = \frac{v(C_i - C_f)}{m} \quad (\text{Ec. 1})$$

) (Grimm *et al.*, 2007). Estas relaciones tienen lugar en el equilibrio del proceso de adsorción, en el cual se establece la cantidad de metal unido a la biomasa.

$$q_e = \frac{v(C_i - C_f)}{m} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

q_e ; Cantidad de metal captado en el equilibrio en mg de metal/g del bioadsorbente (biomasa).

v ; volumen de la muestra en L.

C_i ; Concentración inicial del metal en la solución en mg/L.

C_e ; Concentración del metal en el equilibrio en la solución mg/L.

m ; Cantidad de bioadsorbente en la muestra en base seca g.

Se han propuestos diferentes modelos que permiten representar el fenómeno de adsorción

algunos de los más utilizados son el Langmuir ($q = q_{max} \left(\frac{bC_{eq}}{1+bC_{eq}} \right)$

(Ec 2)) y Freundlich (Ec. 3), los cuales ya han sido caracterizados utilizando la biomasa bacteriana como adsorbente (Bautista, 2008).

$$q = q_{max} \left(\frac{bC_{eq}}{1+bC_{eq}} \right) \quad (\text{Ec 2})$$

Donde:

q ; Capacidad del adsorbente (mg de metal/g de biomasa) en el equilibrio

C_{eq} ; concentración final o en equilibrio del sorbato

q_{max} ; es la máxima capacidad del adsorbente (mg de metal/g de biomasa)

b ; es un coeficiente relacionado a la afinidad entre el sorbente y el sorbato (l/mg).

Ecuación que considera a la adsorción como un fenómeno químico y asume que existen fuerzas que ejercen los átomos de la superficie (sitios de unión definidos) por lo cual no es posible excederse más allá del diámetro de la molécula restringiendo la adsorción a un proceso monocapa, con solo una especie de sorbato, con sitios de adsorción uniformes así como un sitio para cada sorbato y sin interacción entre sorbentes.

$$q = kC_{eq}^{\left(\frac{1}{n}\right)} \quad (Ec. 3)$$

Donde:

K y n ; son las constantes de Freundlich.

El modelo de Freundlich se basa principalmente en la adsorción definida por la distribución de los sitios de unión debidos a la afinidad. El cual asume que los sitios de unión más fuertes son ocupados al principio y que la adsorción disminuye con el grado de sitios ocupados. Lo que resulta en una distribución del tipo normal logarítmica del proceso (Smith, 1981).

Aun cuando los modelos anteriores son los más comúnmente utilizados, existen otros modelos que se han propuesto para describir el proceso de adsorción; sin embargo, no existe un modelo de carácter universal de ahí los grandes obstáculos para su aplicación práctica de procesos de adsorción.

El modelo de cinética de pseudo-segundo orden es el que tiene un mejor ajuste para metales divalentes (Ho and Mckay, 2000, Bautista, 2008, Chojnacka, 2010).

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_s} (q_e)^2 + t/q_e \quad (Ec 4)$$

Donde:

q_t : Cantidad de iones metálicos adsorbidos a cualquier tiempo t por unidad de masa del sorbato

q_e : Cantidad de iones adsorbidos en el equilibrio por unidad de masa del adsorbente

k_s : constante de adsorción.

Bioacumulación

Es un proceso dependiente de energía, está asociado con la resistencia microbiana y con la habilidad de repuesta del microorganismo al incremento en la concentración del metal. Durante este proceso el microorganismo es capaz encapsular el exceso de metal.

De manera contraria a la bioacumulación el microorganismo puede presentar una respuesta de resistencia, debido a que existe incapacidad para acumular, limitando así la disponibilidad del

metal, de manera que la movilidad del metal depende directamente de la fisiología de la célula (Ford, 1992). El proceso de bioacumulación está definido como una acumulación intracelular del sorbato, la cual ocurre principalmente en dos etapas: La primera es el transporte del sorbato al interior de la célula, que es rápido en un inicio y posteriormente disminuye. El aspecto principal de la bioacumulación es la existencia de un transporte activo, siendo un proceso no gobernado por el equilibrio. La bioacumulación es un proceso más complejo que la bioabsorción debido a que requiere de la actividad biológica de la célula. Este proceso puede presentarse durante el crecimiento bacteriano, lo cual es una evidencia del uso del sorbato en el metabolismo del microorganismo (Aksu and Dönmez, 2000).

La bioacumulación depende de los mismos factores que influyen el crecimiento microbiano; como son la composición del medio, el pH, la temperatura, la presencia de contaminantes y/o inhibidores, etc. (Chojnacka, 2010). A la par de la bioacumulación, pueden existir otros procesos de soporte para la supervivencia de los microorganismos a la presencia de metales (Tabla 3).

Tabla 3 Algunas características de la bioacumulación y otros mecanismos de soporte de los microorganismos en presencia de metales. Adaptado (Chojnacka, 2010)

Características de la Bioacumulación	Características de otros mecanismos de soporte para la bio-remoción de metales
Acumulación intracelular de metales	Precipitación de complejos MnO_2 por heterótrofos aerobios.
Procesos metabólicos dependientes de energía.	Descomposición bacteriana de materia orgánica con la formación de NH_3 y HCO_3^- lo que casusa incremento de pH.
Requiere respiración activa	Formación de H_2S bajo condiciones anóxicas.
Usualmente más lento que la adsorción	Producción alcalina
Excreción de productos	Degradación de materia orgánica, por medio de sulfato reducción, formación de hierro monosulfatado,
Altamente complejo	
Degradación de contaminantes orgánicos, sorción y transporte, complejos de transporte de metales.	

2.2.1.3. Sideróforos

Los microorganismos producen y secretan sideróforos, moléculas pequeñas menores a 1000Da, que son ligandos extremadamente rápidos con capacidad de secuestrar iones de hierro, con ayuda de cadenas laterales de grupos funcionales confiriéndoles una gran afinidad ($K_{\text{aff}} > 10^{30}$) (Pérez-Miranda *et al.*, 2007). El mecanismo de producción de sideróforos para una bacteria Gram-negativa, comienza con la síntesis y secreción del sideróforo en respuesta a las condiciones de privación o limitación de hierro. El sideróforo solubiliza el hierro y el complejo ferri-sideróforo es internalizado al citoplasma (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El hierro es frecuentemente liberado mediante reducción y el ion ferroso se incorpora a varias proteínas. En algunos casos el sideróforo es reciclado y secretado al exterior (URPÍ, 2004).

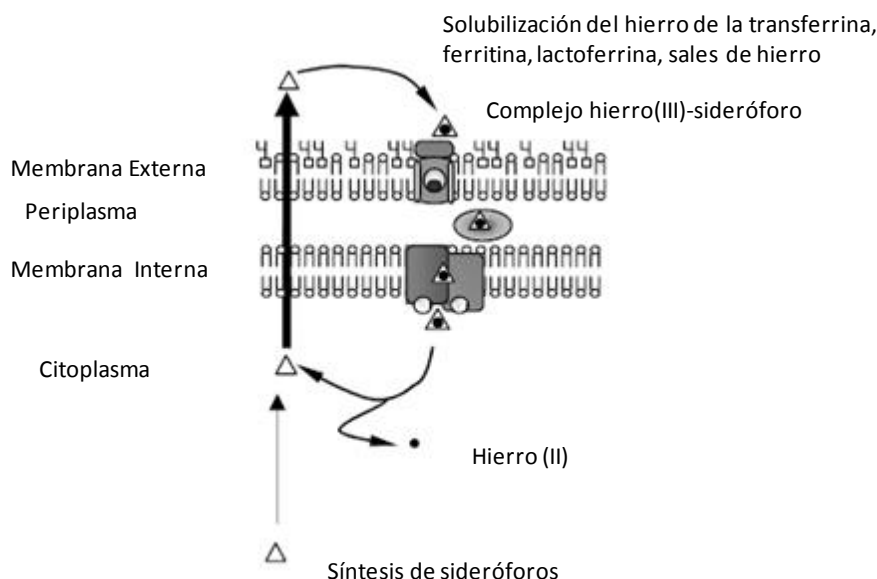


Figura 5 Mecanismo de producción de sideróforos para una bacteria Gram-negativa. Adaptada de (URPÍ, 2004)

Existen diferentes tipos de sideróforos de origen bacteriano (**Figura 6**) que se clasifican dependiendo de su naturaleza química y los sitios de coordinación de Fe (Winkelmann, 1990) en: Catecoles, Hidroximatos y Carboxilatos.

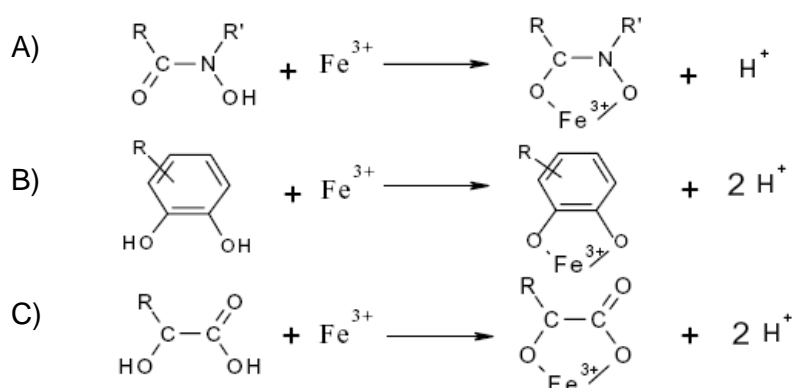


Figura 6 Tipos de Sideróforos. A) Hidroximatos. B) Catecol. C) Carboxilatos. Adaptado de (Wittenwiler, 2007)

Aun cuando los sideróforos son secretados principalmente para el secuestro de iones de Fe (III), se ha propuesto su uso para la interacción con otros metales tóxicos como el cromo, mercurio y plomo. Lo cual representa una opción de biorremediación; con el uso de bacterias como las de género *Pseudomonas*, que son buenas productoras de sideróforos (Braud *et al.*, 2007). Algunos datos sugieren que metales divalentes, como el cobre, pueden competir con el hierro en los sitios de unión a complejos realizando una interacción más débil. Un ejemplo es el sideróforo DFOE (sideróforo de desferrioxamina E) el cual es estudiado por su fuerte afinidad con diferentes metales (Dimkpa *et al.*, 2009). Recientemente se ha demostrado que los sideróforos puede formar complejos con Co(III) el cual forma parte esencial en el metabolismo de bacterias y animales (Bi *et al.*, 2010).

2.2.2. Residuos de cobre y cobalto

En la naturaleza, el cobalto siempre se encuentra asociado al níquel y generalmente también al arsénico, pero las fuentes más importantes del cobalto son los residuos llamados “speiss” (impurezas metálicas) que se obtienen al fundir los minerales arsenicales de níquel, cobre y plomo. La separación del cobalto al estado puro es un proceso complicado (Cotton, 1969). El cobalto puede ser separado del níquel y del hierro por sistemas de intercambio aniónico, así como con sustancias químicas como el hidróxido de amonio; sin embargo, en algunos casos es deficiente y la cantidad y pureza de cobalto recuperado es de baja. En el caso del cobre, su separación del cobalto es extremadamente cara (Thomas, 1996).

2.2.2.1. Cobre(II)

Comúnmente en el suelo el cobre se encuentra asociado con minerales sulfurosos simples y complejos. Especialmente en ambientes ácidos, el cobre tiene una gran habilidad para interactuar con compuestos minerales y orgánicos del suelo. Los niveles medios de cobre en el suelo varían de 6 a 60 mg/kg. La forma móvil del cobre es 2^+ , y puede ser retenida en los sitios de intercambio tanto orgánicos como inorgánicos. Los procesos que controlan la fijación de cobre son la adsorción, oclusión y precipitación, así como la formación de quelatos, complejos orgánicos y la fijación microbiana (Zuñiga, 1999).

Los efectos tóxicos del cobre han sido utilizados en la agricultura como bactericida y fungicida, lo que llevó finalmente al estudio de las capacidades de resistencia de algunos microorganismos. Tomando en cuenta que el cobre es un metal esencial y también tóxico, es necesaria la presencia de estrategias que permitan, por un lado el acceso del cobre a las células, restringido por el secuestro extracelular de iones, la relativa impermeabilidad de membranas internas y externas, la presencia de metalotioninas receptoras a cobre que permitan su transporte en el citoplasma y finalmente la extrusión activa de cobre de la célula (Cha and Cooksey, 1991).

Escherichia coli es uno de los microorganismos en los que han sido caracterizados los mecanismos de resistencia al cobre(II). *E. coli* contiene un transportador de cobre(II) del tipo-P ATPasa CopA (Figura 7) el cual es un componente integral de membrana que participa en la remoción del exceso de Cu(I) del citoplasma. También cuenta con un sistema de multi-cobre(II) oxidadas CueO y componentes de flujo de salida CusCFBA, ambos responsables de los niveles de cobre(II) en el espacio periplásmico. En cepas de *E. coli* aisladas de ambientes enriquecidos con cobre(II) se han encontrado plásmidos que contienen genes los cuales incrementan de manera considerable la tolerancia a cobre(II) (Magnani and Solioz, 2007).

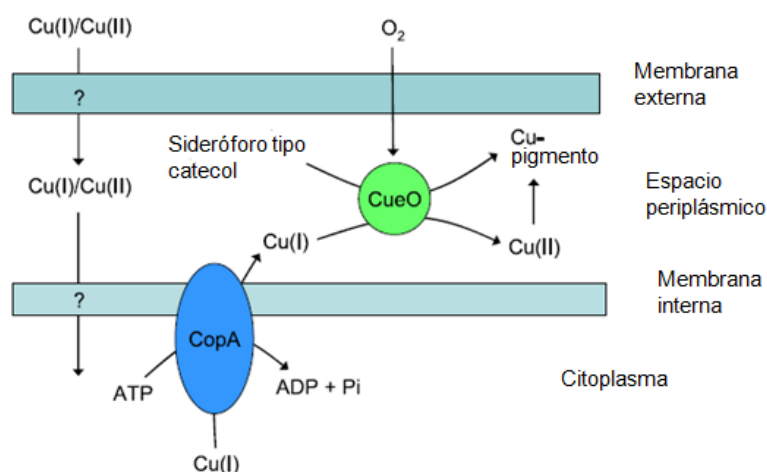


Figura 7 Interacción entre la ATPasa CopA y la oxidasa CueO en *E. coli*. CopA lleva el exceso de Cu(I) del citoplasma al periplasma, en el cual la enzima CueO genera pigmentos capaces de secuestrar al Cu (Magnani and Solioz, 2007).

2.2.3. Cobalto

El cobalto es un importante elemento magnético que se utiliza en distintas industrias. En áreas como en la producción y refinación de las aleaciones, motores de jets, turbinas de gas, materiales. Otras aplicaciones del cobalto son en la fabricación de barnices, pinturas, catalizadores, tintas pigmentos, cerámicas y en los implantes quirúrgicos (Petek-Cakara et al., 2009)

Por otro lado el cobalto se encuentra en la naturaleza en dos estados de oxidación Co^{2+} y Co^{3+} y posiblemente también formando complejos aniónicos $\text{Co}(\text{OH})_3^-$. Durante procesos de inundación, el cobalto es relativamente móvil en medios ácidos oxidados, pero debido a la alta afinidad con hierro y manganeso, así como arcillas, este elemento no puede migrar en una fase soluble. También forma parte de la vitamina B-12 jugando un papel importante en su síntesis (Bautista, 1999).

El cobalto es un micronutriente esencial para muchos microorganismos y sirve como cofactor de algunas enzimas en distintas reacciones. Sin embargo, cuando se presenta a altas concentraciones suele ser tóxico, generando que varios procariontes desarrollen sofisticados mecanismos para regular su captación y salida de la célula (Hausinger and Zamble, 2007). Normalmente las bacterias no toleran concentraciones mayores 50 μM de cobalto. A excepción

de aquellas que habitan en ambientes contaminados, las cuales toleran concentraciones entre 50 y 20 mM, utilizando mecanismos de flujo de iones con carácter quimiosmótico, destoxificación enzimática, bioacumulación, etc. (D'Angelo *et al.*, 2001). Cuando se encuentra el Co^{2+} en el medio, este es rápidamente acumulado por la célula bacteriana por medio de proteínas integrales de membrana como CorA que pertenece a la familia de las metalotioninas (Kammev *et al.*, 2004).

Uno de los microorganismos más estudiados, por su alta resistencia a distintos metales, es *Ralstonia eutropha* CH34 ya que contiene un plásmido (pMOL30) con un sistema de genes, llamado *czc*, lo cuales le confieren resistencia a cobalto zinc y cadmio (Hassan *et al.*, 1999). Este sistema codifica para una serie de péptidos (CzcABCDINR y S) que presentan bacterias adaptadas a ecosistemas contaminados con altos niveles de cobalto. Específicamente el gen *czcD* ha servido como sonda molecular para la identificación de este sistema de genes, debido a que participa en la regulación del sistema de flujo de salida de los iones metálicos de cobalto zinc y cadmio (Abou-Shanab *et al.*, 2007).

Este sistema pertenece a un grupo de proteínas denominadas de nodulación-división celular-resistencia (NDR) el cual pertenece a un enorme grupo de siete familias de proteínas que se han encontrado en todos los reinos de vida. Las NDR en procariotas están involucrados no solo en el transporte de metales pesados sino también en componentes hidrofóbicos, amfifílicos y en factores de nodulación (Nies, 2003).

Es sabido que las capacidades que presentan algunos microorganismos de reducir iones metálicos han sido explotadas con fines de remediación. Sin embargo, el interés en la síntesis de nanopartículas por medio de microorganismos surgió hace muy poco tiempo (Zhang *et al.*, 2011); así como en la valorización de residuos y la biominería.

2.3. Nanotecnología

En unos cuantos años la Nanotecnología se ha convertido en uno de los más importantes campos de vanguardia en Física, Química, Ingeniería y Biología. Este interés data entre los años 1996-1998 cuando el Centro de Evaluación de la tecnología Mundial (WTEC) realizó un estudio mundial sobre las investigaciones y desarrollo en el área de la Nanotecnología, con el propósito de valorar sus potencialidades en la innovación tecnológica. La nanotecnología se basa en reconocer que las partículas de tamaños inferiores a 100 nm confieren nuevas propiedades y nuevos compartimentos a las nanoestructuras que con ellas se construyan. Así

por ejemplo se ha observado que la estructura electrónica, la conductividad, la reactividad, la temperatura de fusión y las propiedades mecánicas varían cuando las partículas alcanzan tamaños inferiores a cierto valor crítico (Poole and Owens, 2007). Dentro de estas nanoestructuras se encuentran las nanopartículas. Las cuales tienen un tamaño entre 1-50 nm, y sus propiedades tanto físicas como químicas son diferentes a las que presenta el material en la escala de los centímetros.

Existen diferentes tipos de nanopartículas, en las cuales es posible distinguir el carácter organizacional de la materia. De acuerdo a su origen, las nanopartículas se pueden dividir en naturales y antropogénicas. Se subdividen en base a su composición química en nanopartículas inorgánicas y orgánicas o con base carbono. Las nanopartículas base-carbono se subdividen en biogénicas, geogénicas, atmosféricas y pirogénicas. Algunos ejemplos de nanopartículas de origen natural son; los fullerenos y los nanotubos de carbono (NTC) de origen geogénico o pirogénico; magnetita de origen biogénico o aerosol atmosférico (Quintana, 2008).

Las nanopartículas de origen antropogénico se pueden formar como subproductos de otros procesos, principalmente durante la combustión, o pueden ser formadas intencionalmente debido a sus propiedades físicas. En el último caso a este tipo de nanopartículas se les nombra de fabricación o de diseño. Ejemplos de nanopartículas de fabricación se encuentran las metálicas y óxidos de metal tales como TiO_2 y Ag (Martínez, 2008a)

2.3.1. Nanopartículas metálicas

Se tiene un interés especial en el uso de nanopartículas metálicas, ya que es relativamente fácil su síntesis y modificación química. Otra ventaja que presentan son sus propiedades ópticas y electrónicas las cuales son superiores con respecto a otros sistemas ya que éstas se mantienen constantes a escalas inferiores a 5 nm (Zhang et al., 2011).

En la primera mitad del siglo XX el interés por las nanopartículas no se limitó a sus propiedades ópticas. Se estudió también su capacidad de estabilidad coloidal y nucleación. Por otro lado fue tema de discusión la aplicación de coloides de nanopartículas de plata antes de la llegada de

las sulfamidas en 1930 (Feldheim, 2002). Algunas características que presentan las nanoestructuras metálicas (mejor conocidas como *nanoclusters*) de síntesis química son:

- Tamaño de 1-100nm
- Composición bien definida
- Dispersión $\leq 15\%$ (muy cerca a la monodispersión)
- Síntesis reproducible (tamaño, forma y composición)
- Actividad catalítica $\pm 15-20\%$ así como de otras propiedades físicas
- Soluble en solventes orgánicos
- Con superficies limpias de O^{2-} , OH^- , H_2O así como de polímeros

Estas nanoestructuras son los antecesores de las nanopartículas modernas, que hoy en día se sintetizan bajo los mismos principios, cuya diferencia principal es la estructura y número de átomos (Finke, 2002).

Existe una gran variedad de técnicas para la síntesis de nanopartículas. Las cuales se pueden resumir en tres categorías, por condensación de vapor, síntesis química y procesos mecánicos de molienda de sólidos a continuación se describen las características principales de cada uno (Holister *et al.*, 2003, Drexler, 1992).

Condensación de vapor

Se basa en la evaporación del metal en estado sólido seguido de una rápida condensación controlada para formar nanoestructuras. Un factor importante es el medio de vaporización el cual tiene efectos en el tamaño y naturaleza de las partículas. Los más utilizados son los gases inertes. Una de sus mayores ventajas son los bajos niveles de contaminación. Algunas variables a controlar son la temperatura, el tipo de gas y las tasas de evaporación. Algunas variaciones de esta técnica son la evaporación al vacío y la deposición química de vapor.

Síntesis química

Su principio es básicamente crecer nanopartículas sobre un medio líquido compuesto de distintos reactivos. Generalmente con mejores resultados que la condensación de vapor en cuanto a la forma de las nanopartículas. La formación se termina cuando se llega a una etapa de crecimiento estable, siendo su principal desventaja la contaminación con los reactivos utilizados durante el proceso (Holister *et al.*, 2003).

Trituración del estado sólido

Como su nombre lo indica, se lleva a cabo una trituración o molienda del metal en estado sólido hasta alcanzar tamaños nanométricos. Algunas de las variables más importantes son el tiempo de molienda y el medio atmosférico. Siendo específica para materiales que se prestan a este proceso. La principal desventaja de estos tipos de síntesis es la contaminación, no solo en las nanopartículas que se generan, sino también en los residuos peligrosos que surgen durante estos procesos. Los cuales limitan las aplicaciones de las nanopartículas en algunas áreas como el área de la biomedicina. De ahí surge la necesidad de utilizar métodos de síntesis biológica utilizando las propiedades de algunos microorganismos.

2.3.2. Síntesis biológica de nanopartículas

Una de los principales retos para la nanotecnología es el uso de técnicas denominadas “verdes”. Raveendra *et al* en el 2003 desarrollaron este concepto a partir de la necesidad de sintetizar nanopartículas metálicas sin el uso de reactivos tóxicos que pudieran afectar en aplicaciones medicas (Philip, 2010).

Algunos microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, actinomicetos y levaduras, presentan la capacidad de sintetizar nanopartículas. Este proceso puede ser intra o extracelular. Siendo más común la síntesis con bacterias y hongos debido a todo el conocimiento y tecnologías que se tiene de estos microorganismos (Zhang and Yan, 2011). Existen varios reportes del uso de microorganismos en la síntesis de nanopartículas (**Tabla 4**).

Tabla 4 Microorganismos con capacidad de sintetizar nanopartículas. Adaptado de (Zhang and Yan, 2011)

Microorganismo	Producto	Tamaño (nm)
Bacterias		
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Ag(0)	5–32
<i>Enterobacteria</i>	Ag(0)	28.2–122

<i>E. coli</i>	Au(0)	20
<i>Plectonema boryanum</i>	Pd(0)	1–20
<i>Shewanella algae</i>	Pt(0)	Cerca de 5
<i>Lactobacillus</i>	TiO ₂	15–35
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ag(0)	160–180
Hongos		
<i>Helminthosporium solani</i>	Au(0)	2–70
<i>Penicillium</i>	Au(0)	<135
<i>Penicillium fellutanum</i>	Ag(0)	5–25
<i>Hormoconis resinae</i>	Ag(0)	20–80
<i>Fusarium oxysporium</i>	Ag	5–15
Levaduras		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Au(0)	15

Los mecanismos intracelulares para la formación de nanopartículas involucran el transporte de iones dentro de la célula bacteriana en forma de nanopartículas, lo que significa que la síntesis se realiza por una condensación de iones hasta formar una nanopartícula. Estos mecanismos están regulados por distintas enzimas y proteínas. Mientras que la síntesis extracelular de nanopartículas involucra el atrapamiento de los iones en la superficie bacteriana y la reducción de éstos en presencia de enzimas (Ahmad *et al.*, 2003, Ahmad *et al.*, 2003a).

2.3.2.1. Mecanismos de biosíntesis

Existen diferentes teorías acerca de cómo los microorganismos con capaces de sintetizar nanopartículas metálicas. Estudios con nanopartículas de plata sugieren que la plata es unida a la superficie de la membrana del citoplasma (Priyabrata *et al.*, 2001). Algunos autores especulan que los iones de plata son atrapados en la superficie celular a través de

interacciones electrostáticas en un principio la plata se reduce en forma de núcleo en la pared celular debido a la presencia de enzimas, hasta el momento desconocidas, de manera que eventualmente las nanopartículas son capaces de formar un micelio acumulándose sobre el núcleo inicial (Ahmad *et al.*, 2003)

En ocasiones las cavidades formadas por las proteínas sirven de cámara para la formación de nanopartículas ya que algunas de sus estructuras sirven como moldes para contener el crecimiento de la nanopartícula, generando un revestimiento que impide la unión entre la proteína y la nanopartícula. Un ejemplo es la ferritina, una proteína de 12 subunidades producida por *Listeria innocua*, utilizada en la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro y cobalto. La ferritina es también conocida por formar núcleos de otros metales como el manganeso, sulfuros de cadmio, plata, sulfuros de zinc y níquel (Yoshimura, 2006).

En la reducción de los metales intervienen agentes que son producidos por los microorganismos. En una suspensión de AgNO_3 con *F. oxysporum*, después de cierto tiempo se observó un cambio de color en el medio, lo cual se considera como evidencia de la reducción de la plata hasta su estado elemental. Aunque aún no se conocen las proteínas y enzimas que intervienen en la formación de las nanopartículas, estudios anteriores señalan la presencia de reductasas específicas dependientes de NADH, así como otras enzimas básicas para el crecimiento bacteriano (Zhang *et al.*, 2011).

Algunos investigadores sugieren que las bacterias desarrollan la capacidad de formar nanopartículas metálicas, como un mecanismo de resistencia ante niveles de toxicidad. De manera que los iones son atrapados por las células. Se han propuestos dos vías principalmente. Una involucra interacciones electrostáticas, ya que se ha demostrado que la mayoría de las bacterias están cargadas negativamente. Y la otra la secreción de sustancias (tal vez poliméricas) que son capaces de adherir los iones a la superficie bacteriana (Manti *et al.*, 2008).

2.3.2.2. Control de síntesis

Los estudios han demostrado que el tamaño, la morfología, estabilidad y las propiedades (físicas y químicas) de las nanopartículas metálicas están fuertemente influenciados por las condiciones de experimentación, la cinética de interacción entre los iones metálicos y los agentes de reducción y procesos de adsorción entre los agentes de estabilización y las nanopartículas metálicas (Sharma *et al.*, 2009)

La biosíntesis de nanopartículas se considera como un proceso seguro y rentable, amigable con el medio ambiente y sustentable. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes, entre ellos el poco control que se tiene sobre la distribución de tamaños, la forma y la cristalinidad. La mayoría de las nanopartículas de origen microbiano presentan polidispersibilidad y tasa de producción lenta. Sin embargo, los conocimientos adquiridos en la selección de cepas, la optimización de las condiciones, como el pH, la temperatura y el tiempo de incubación, la concentración de iones metálicos, así como la cantidad de material biológico, pueden potencializar la aplicación de estos métodos a mayor escala y aplicaciones comerciales (Narayanan and Sakthivel, 2011).

El efecto del pH en la formación de nanopartículas ha sido evaluado por distintos autores. En el caso de la formación de nanopartículas de oro por medio de *V. luteoalbum*, la variación del pH tuvo efecto en el tamaño, forma y cantidad de nanopartículas producidas por el microorganismo. Algunos resultados muestran que las partículas formadas a pH 3 presentaron en promedio una forma esférica y tamaño uniforme de aproximadamente 10 nm; mientras que aquellas sintetizadas a pH 5 además de formas esféricas incluyeron formas triangulares, hexagonales y hasta en barras. Con valores de pH de 7 y 9 se obtuvieron partículas pequeñas esféricas, así como grandes sin forma definida, mientras que el número de partículas obtenidas por célula disminuyó considerablemente (Gericke and Pinches, 2006).

Otro de los factores que intervienen en la producción de nanopartículas, es la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo. Cosechas de *V. luteoalbum* en diferentes fases de crecimiento mostraron diferencias en las nanopartículas, diferencias en tamaño, forma y número de partículas. Así mismo se observó que durante la fase exponencial tardía se produjo menos de la quinta parte que la obtenida en la fase exponencial temprana (Zhang *et al.*, 2011). Por otro lado, la composición del medio de crecimiento y los buffers en los que se encuentran los microorganismos son factores que se relacionan con el tamaño y el control de monodispersión (Holmes, 1995).

2.3.3. Caracterización de nanopartículas por microscopia

La caracterización de nanomateriales incluye la determinación de sus formas, tamaños y distribución. Estos factores son importantes para entender sus propiedades. Existe una variedad de técnicas, como la microscopia electrónica de transmisión (TEM), la microscopia de barrido túnel (SEM), microscopia de fuerza atómica (AFM), espectroscopia fotoelectrónica de

rayos-X de ángulo corto (SAXS) y espectroscopia de neutrones ángulo corto (SANS). Cada técnica presenta ventajas y desventajas (Puri, 2004).

La microscopia electrónica informa acerca de las características superficiales de las partículas (esfericidad, textura etc.); sin embargo, no permite saber cuál es su composición superficial, sin realizar otros procedimientos, sin dar información relativa a la estructura interna de las partículas. Por otro lado, la microscopia Confocal de barrido laser (CLSM) se pueden observar interacciones biológicas entre los microorganismos y los metales, utilizando elementos que proporcionen fluorescencia y contraste (Mountiho, 2007).

2.3.3.1. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

La caracterización analítica y de imágenes de nanopartículas por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión es comúnmente una herramienta que sirve para evaluar la forma de las nanopartículas, tamaño, morfología y distribución elemental.

Los haces electrónicos no sólo son capaces de proporcionar información cristalográfica sobre las superficies de las nanopartículas, también se pueden utilizar para producir imágenes de las superficies, las cuales son el principio de los microscopios electrónicos. En el Microscopio Electrónico de Transmisión los electrones de una fuente, como la de un cañón de electrones, entran en las muestras, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un lente de objetivo, se amplifican y finalmente se obtiene una imagen. Las imágenes se forman debido a que los átomos interactúan y absorben electrones en diferente extensión. La técnica TEM permite resolver la separación entre átomos individuales de elementos pesados (Poole and Owens, 2007)

Cuando se utiliza la Microscopia Electrónica de Transmisión, la muestra debe ser muy delgada y la energía del haz de electrones muy alta. Para examinar las nanopartículas deben estar propagadas de forma dispersa y extendida sobre una superficie de manera que puedan ser analizadas de forma individual. Con ayuda de la alta resolución se pueden observar las estructuras de las nanopartículas. Particularmente los planos atómicos de núcleos cristalizados pueden ser diferenciados de redes irregulares y de una capa amorfa a través de la disposición regular de los átomos en los planos atómicos.

El análisis de rayos-X energía dispersa (EDX) es realizado como un suplemento del TEM. Este análisis se realiza sobre superficies de los sólidos. En esta técnica con ayuda de los rayos-X se irradia con electrones de alta energía primaria. Los electrones primarios emiten electrones de los orbitales cercanos al núcleo atómico de la muestra, posteriormente los electrones provenientes de los orbitales son sacados más allá del núcleo lo cual resulta en ondas. La energía emitida por los rayos-X resulta en energía característica para cada elemento, debido a la diferencia de energía de los electrones orbitales. Con esta técnica se obtiene información más profunda (μm) que con la espectrometría de masas (nm) (Sepeur, 2008).

2.3.3.2. Microscopía Confocal de Barrido Laser (CLSM)

El principio de la microscopía Confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores.

Su éxito se debe a la obtención de imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal y a la posibilidad de obtener “secciones ópticas” de la muestra, permitiendo su estudio tridimensional. Básicamente existen las siguientes técnicas de microscopía confocal:

- 1) De un único haz o punto de iluminación, que requieren un sistema de barrido de la preparación. Existen dos modalidades: la Microscopía Confocal de Barrido Laser (CLSM) y el Stage Scanning Confocal Microscopy (SSCM) (de “escaneo de platina”);
- 2) Multi-haz, que incluye Disc Scanning Confocal Microscopy (DSCM) (de “Escaneo de disco”).

En la técnica CLSM El barrido de la muestra se realiza moviendo el haz de láser, gracias a unos espejos galvanométricos que permiten modificar el punto de incidencia del haz de láser en la preparación. De esta manera se pueden alcanzar velocidades de adquisición entorno a 5 imágenes/segundo. Además, el espécimen no necesita ser movido durante el barrido por lo que se hace especialmente interesante para el estudio de muestras vivas (Sánchez, 2006).

Para el análisis de muestras por microscopía confocal de escaneo laser es necesario el uso de un fluorocromo que sea capaz de teñir las muestras permitiendo la emisión de luz, la cual puede ser detectada por el equipo.

Entre las ventajas que se tienen al usar CLSM es el uso de diferentes longitudes de onda para la excitación de las muestras lo que permite obtener imágenes de contraste, así como la obtención de estructuras en 3D. Algunos fluorocromos utilizados en muestras biológicas así como sus propiedades se presentan en la (

Tabla 5), los cuales fueron utilizados para la evaluación de la distribución de bacterias en suelos (Li *et al.*, 2003).

Tabla 5 Fluorocromos comunmente utilizados en bacterias.

Propiedad	Fluorocromo						
	CFW	DAPI	DTAF	Eosina Y	Bromuro de Etidio	FITC	Amarillo G tiazhol
Excitación (nm)	365	358	492	515-518	518	490	402
Emisión (nm)	435	461	516	545	605	523	ND
Afinidad	Polisacáridos	Doble cadena de ADN	Proteínas, carbohidratos y polisacáridos	ND	Ac. nucléicos	Proteínas	ND

CFW: Calcofluor blanco. DAPI: 4',6-Diamino-2-phenylindole. FITC: Fluoresceína isocianato. DTAF:5-(4,6-Diclorotriacilil) fluoresceína.

El uso de CLSM para la caracterización de nanopartículas metálicas aun no es una herramienta muy utilizada; sin embargo, presenta múltiples ventajas; por ejemplo, en el análisis del crecimiento y formación de nanopartículas de plata y oro de origen químico, obteniendo propiedades de tamaño y densidad, así como parámetros del proceso de electrocristalización, obtenidos en conjunto con la espectroscopia Ramman (Plieth *et al.*, 2005).

Por otro lado se han podido observar diferencias en las longitudes de onda de los espectros de emisión y excitación entre muestras de cepas de *Fusarium sp.* sometidas a un solución de ZnSO₄ 10mM y controles sin metal, además de que las cepas presentaron resistencia a cadmio y zinc, fue posible observar la formación de nanopartículas de ZnS (Botello *et al.*, 2007).

3. HIPÓTESIS

Las cepas aisladas de jales mineros presentan la capacidad de acumular Cobre o Cobalto de forma selectiva o con diferente afinidad.

4. Justificación

La explotación de las capacidades microbianas como la acumulación y adsorción de cobre y cobalto así como la formación de nanopartículas metálicas, son herramientas que puede ser aplicadas en diferentes áreas de desarrollo tecnológico como la nanotecnología y la protección al medio ambiente.

En el caso específico de cobalto que está contaminado con cobre la obtención de mayor pureza, superior a la que se encuentra hoy en día en el mercado, incrementaría considerablemente su valor económico.

Por otro lado, aun cuando existen hoy en día la síntesis de nanopartículas metálicas, en su mayoría por procesos químicos, el uso de microorganismos reduce costos en su obtención y disminución en la generación de residuos peligrosos.

5. OBJETIVOS

5.1.1. General

Determinar la capacidad y selectividad de bioacumulación de Cobre y Cobalto por las cepas ZnZac y OC4 aisladas de un jal minero, así como la formación de Nanopartículas.

5.1.2. Específicos

1. Establecer la selectividad y capacidad de las cepas ZnZac y OC4 de acumular los metales Cobre y Cobalto.
2. Determinar la presencia de sideróforos en los cultivos de ZnZac y OC4.
3. Determinar la formación de Nanopartículas metálicas.
4. Establecer los parámetros cinéticos de adsorción de cobre y cobalto de la biomasa seca de ZnZac y OC4.
5. Identificación filogenética de las cepas ZnZac y OC4.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estrategia metodológica

La estrategia metodológica se dividió en cuatro bloques generales: pruebas de resistencia y producción de sideróforos, Formación de nanopartículas, Cinéticas de adsorción y la identificación filogenética. Éstos a su vez involucran la realización de una serie de pruebas realizadas con cultivos de las cepas ZnZac y OC4 (Figura 8).

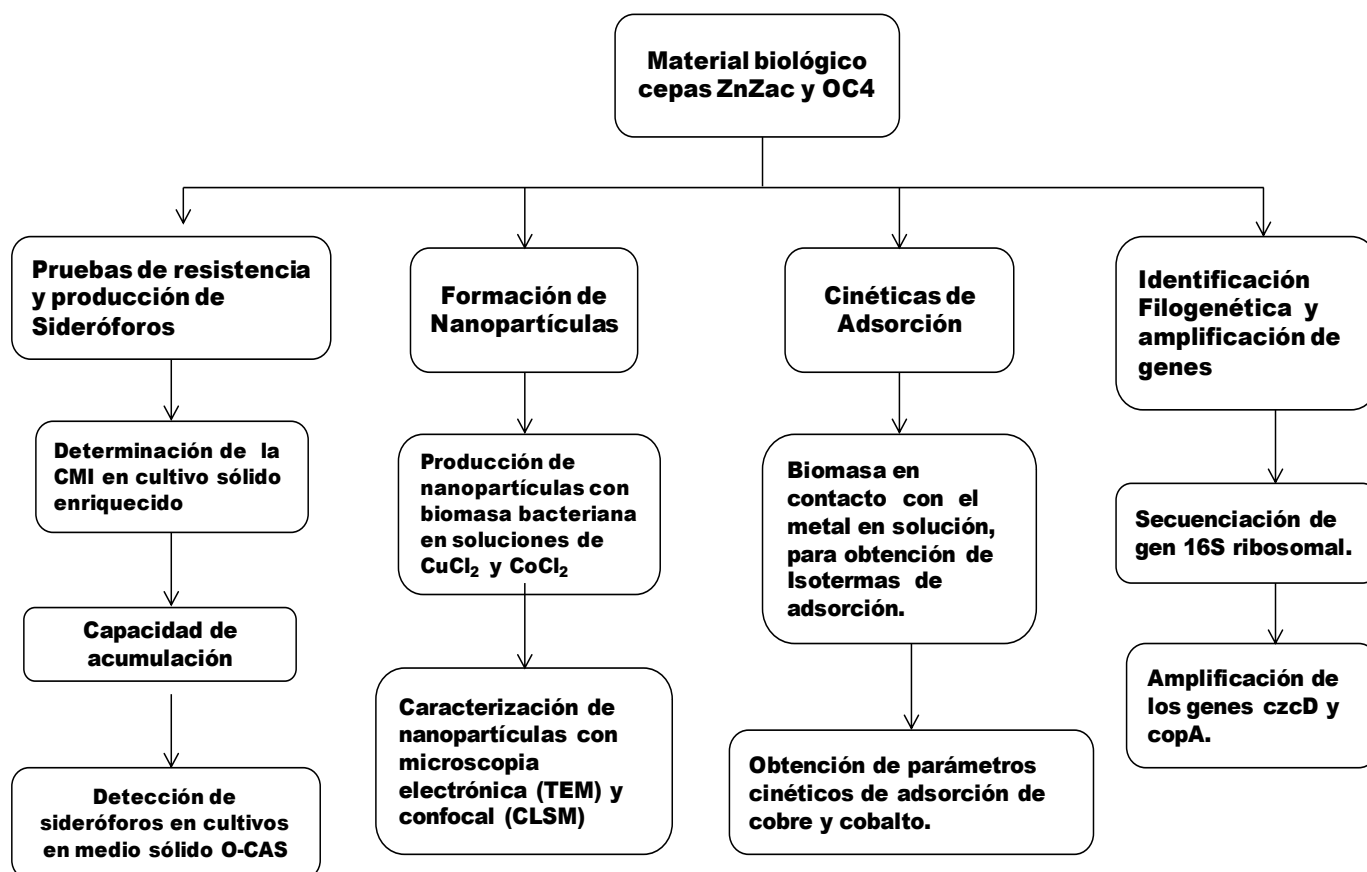


Figura 8 Estrategia metodológica

6.2. Material biológico

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron aisladas de dos jales mineros. ZnZac fue aislada de Zacualpan, Veracruz (Bautista, 2008) mientras que OC4 se aisló de un jal ubicado en Ocotlán, Oaxaca (Martínez, 2008) ambos presentan una morfología de bacilos y son Gram negativos. Ambas cepas presentan capacidad de adsorción de metales y formación de nanopartículas. OC4 para oro y plata y ZnZac para zinc y plomo (Martínez, 2008b, Bautista, 2008).

6.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales (CMI)

A partir de alícuotas crioconservadas en glicerol de las cepas ZnZac y OC4, se inocularon por picadura en cajas Petri con placas de agar nutritivo enriquecido con diferentes concentraciones de CuCl_2 y CoCl_2 (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mM), posteriormente los cultivos fueron incubados a 28°C (Riossa digital modelo 330) y el crecimiento bacteriano se evaluó a las 24, 48 y 72 h.

6.4. Prueba preliminar de acumulación de metales por revelado con H_2S

Las cepas ZnZac y OC4 se inocularon por picadura en cajas Petri con agar nutritivo, enriquecido con CuCl_2 o CoCl_2 1 mM, posteriormente los cultivos fueron incubados a 28°C durante 72 h. Posteriormente se realizó la prueba de bioacumulación basada en (Pumpel et al., 1995); en un campana de extracción, se abrieron las cajas y se adicionaron en la tapa 3 mL de la HCl 2 M y 2 mL de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.5 M, se colocó inmediatamente la base con el cultivo para que se impregnara del gas (H_2S). Una vez en contacto los vapores y las colonias bacterianas se dejaron durante 30 min. Posteriormente se evaluó la aparición halos alrededor de las colonias bacterianas en el medio sólido.

6.5. Prueba O-CAS para la detección de sideróforos

Para evaluar la presencia de sideróforos, se realizó un cultivo en caja Petri de 8 cm de diámetro de las cepas ZnZac y OC4 sembrado por picadura en agar nutritivo se dejó incubar a una temperatura de 30°C durante 72 h. Posteriormente y en condiciones de esterilidad fueron adicionados 15 mL medio O-CAS (Pérez-Miranda *et al.*, 2007) sobre las colonias bacterianas.

Una vez que gelificó el medio O-CAS sobre el agar nutritivo y las colonias, se evaluó la presencia de sideróforos por el cambio de color azul del medio alrededor de las colonias bacterianas.

6.6. Formación nanopartículas metálicas

Se obtuvo biomasa a partir de cultivos de *ZnZac* o *OC4*, las cuales fueron cultivadas en 50 mL de caldo nutritivo a 28°C durante 48h. La biomasa fue separada del medio por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min. Para retirar los residuos de caldo nutritivo de la biomasa fue lavada tres veces con 5 mL de solución salina 0.85% estéril. Posteriormente se colocaron 300 µL en un tubo Eppendorf y se agregó 1 mL de solución de CuCl_2 o CoCl_2 , 2 mM. Los tubos se colocaron en agitación a 300 rpm con una temperatura de 37°C durante 72 h. Posteriormente se realizaron tres lavados, centrifugando a 6000 rpm durante 5 min, para retirar el exceso de metal con 1 mL agua Milli-Q estéril. Después de los lavados las muestras se fijaron adicionando 1 mL de glutaraldehído al 2.5% dejando incubar a 37°C por 1h. Al término se retiró el glutaraldehído, centrifugando la muestra a 6000 rpm durante 5 min desechando el sobrenadante. El lavado se realizó dos veces con 1 mL agua Milli-Q estéril. La pastilla final de biomasa fue resuspendida en 500 µL de agua Milli-Q estéril. En este punto las muestras fueron divididas para ser analizadas por diferentes microscopías, confocal y de transmisión electrónica, a la par se trabajó con un control negativo el cual consistió en biomasa de ambas cepas en contacto solo con agua estéril (sin metales).

6.6.1. Microscopia de Escaneo Cofocal Laser (CLSM)

Para el análisis por microscopia confocal laser se realizaron pruebas de tinción con 4 colorantes diferentes, glutaraldehído, 0.1%, reactivo de Bradford, 1X, Naranja de acridina y Safranina, 2.5mg/mL. Para preparar cada muestra en un tubo Eppendorf se colocaron 300 µL de biomasa húmeda de cada una de las cepas y se añadió 1 mL de cada uno de los colorantes los tubos fueron incubados a 37°C en agitación 130rpm durante 2h. Para retirar el exceso de colorante se realizó un lavado con 1 mL agua Milli-Q, centrifugando la muestra a 600 rpm durante 5min desechando el sobrenadante. Finalmente la pastilla obtenida se resuspendió en un volumen final de 1 mL de agua Milli-Q colocando una gota de la suspensión celular homogenizada en un portaobjetos limpio y desengrasado y se colocó encima un cubreobjetos perfectamente limpio. Las muestras fueron analizadas en un microscopio Microscopio Confocal de Barrido Laser, LSM 710 (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes se analizaron con el software

ZEN 2009. Modo de escaneo: plano/spectral para el caso de imágenes 2D, y para imágenes en 3D es stack/spectral.

6.6.2. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

De cada suspensión celular sin teñir, se realizó una dilución 10^{-3} . Posteriormente se colocó una gota sobre rejillas de Lacey-carbón de 200 mesh y se dejó secar durante 20min, las muestras se observaron y analizaron en un microscopio Tecnai F30 a 300 kV de aceleración, en el modo de operación STEM contraste Z, utilizando el detector HAADF (High Annular Angle Dark Field) y para hacer los análisis químicos y los mapeos se utilizó un detector marca EDAX.

Tanto las observaciones de microscopia Confocal y de barrido fueron realizadas en el Centro de Nanociencias y Micro-Nanotecnología del IPN. En los departamentos de Microscopia Confocal y Electrónica.

6.7. Pruebas de bioadsorción de cobre(II) y cobalto(II)

6.7.1. Obtención de biomasa seca

Se preparó un preinoculó de las cepas OC4 y ZnZac en caldo nutritivo, se trabajo en matraces Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de medio de 50mL (tres matraces en total), los cuales se incubaron a 28°C durante 48 h. Posteriormente, a partir de éstos se inocularon al 5% dos matraces de 1500 mL con 750 ml de medio para cada cepa, se incubaron a 28°C durante 72 h, posteriormente se separó la biomasa del medio por centrifugación 6000 rpm x 10 min, en tubos Falcon de 50mL, la pastilla celular se lavó tres veces con solución salina 0.85% y un lavado final con agua Milli-Q. La biomasa húmeda se resuspendió en buffer de fosfatos pH 7.4 y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para la obtención de biomasa seca la pastilla final se secó a 60°C por 12 h en una estufa marca Riossa digital 330. Posteriormente fue triturada en un mortero). Se almacenó un matraz aforado previamente lavado con HCl 6 M para eliminar residuos de metales.

6.7.2. Cinética de adsorción de cobre y cobalto por la cepa OC4

En un matraz ErlenMeyer de 150 mL con 50 mL de solución de CuCl_2 , o CoCl_2 2.5 mM (178.57 y 156.25 mg/L, respectivamente) ambas a pH 6, se adicionaron 50 mg de biomasa seca (para un concentración final de 1mg/mL). Posteriormente, el matraz se colocó en agitación en una incubadora orbital, Shaker Ser INO-650 M, a temperatura ambiente y se tomaron muestras de 3mL a 30, 60, 120, 180, y 240 min. Cada muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se le determinó la concentración de cobre remanente por espectrometría de adsorción atómica. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado.

6.7.3. Cinética de adsorción de cobre y cobalto de la cepa ZnZac

La prueba se realizó como en el punto anterior (6.6.2.) pero en este caso las soluciones de CuCl_2 y CoCl_2 fueron 5 mM (357.14 y 312.5 mg/L, respectivamente) y los tiempos de toma de muestra o contacto de la biomasa con el metal de 30, 60, 120, 180, y 240 min. La prueba se llevó a cabo por triplicado.

6.7.4. Isotermas de adsorción de cobre y cobalto

Para la obtención de las isotermas de adsorción de la cepa ZnZac, se prepararon soluciones de CoCl_2 y CuCl_2 1, 2, 5, 7, 10, 12 y 15 mM pH 6. En tubos de vidrio se agregaron 10 mg de biomasa seca obtenida de acuerdo a 6.6.1, la biomasa se puso en contacto con 10 mL de cada solución de metal (concentración final de biomasa 1 mg/mL). Los tubos se dejaron en agitación a temperatura ambiente en una incubadora orbital (Shaker Ser INO-650M) durante 6 h (Figura 9). Posteriormente se separó la biomasa por centrifugación a 6000 rpm por 10 min, se midió la concentración de metal en el sobrenadante, por espectrometría de adsorción atómica (espectrómetro GBC 932 plus). El procedimiento fue el mismo para OC4. Las pruebas se realizaron por triplicado.



Figura 9 Biomasa bacteriana en contacto con las solución de metal

6.8. Identificación genética de las cepas ZnZac y OC4

6.8.1. Amplificación del gen 16S rDNA

Se obtuvo ADNg de las cepas ZnZac y OC4 a partir de cultivos puros crecidos en medio sólido agar nutritivo sin metal. Se evaluó la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con Gel Red nucleic acid stain (Biotium). El ADNg se utilizó como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa PCR, con el kit Taq DNA polymerase, recombinant (Invitrogen n. de cat. Y02028), para lo cual se utilizaron los iniciadores universales para la región 800-1400 del gen 16S de bacterias. 16S-1400 RV (reverse) (5'-G CCGTGTGTACAAGGCCCG) y 16S-800 FW (forward) (5'-CGTGGACTACCAGGGTATCTA). También se utilizaron iniciadores para la región 1-900 Bac1F (forward) (5'-AGAGTTTGATCVTGGCTCAG), Bac50F (forward) (5'-TAAYACATGCAATCGARCGR), Bac910R (reverse) (5'-CCTGGGGAGTACGGYCGCAAG), y Bac938R (reverse) (5'-AACTCAAAGAATTGACGGGG) (Ríos, 2010). Las concentraciones finales de reacción fueron buffer mix sin Mg^{+} 1X, dNTPs 0.2mM cada uno, $MgCl_2$ 1.5 mM, 0.5 μ M de cada iniciador, con 2.5 U de enzima, en un volumen final de 50 μ L. La reacción se llevó a cabo utilizando las condiciones de reacción indicadas por Ríos, (2010) (Tabla 6).

Posteriormente se evaluaron los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red nucleic acid stain (Biotium). Los productos de PCR fueron purificados con el kit ExoSapIT (Maraca usb) y secuenciados por secuenciación capilar por la compañía MacroGen (Corea del sur).

6.8.2. Análisis filogenético

Las secuencias fueron analizadas con el software CodonCode Aligner V.3.0 las secuencias completas se compararon con secuencias depositadas en el NCBI (EUA) utilizando la herramienta BLAST. También se obtuvieron secuencias de las relaciones taxonómicas bacterianas de las secuencias de ZnZac y OC4 para la construcción de los árboles filogenéticos de cada cepa, utilizando los programas: seaview4, ClustalX2 y MEGA4.

6.9. Amplificación de los genes *copA* y *czcD*

Se enviaron a sintetizar los primers *copA*, forward y reverse (5´GGsAbTACTGGTRBCAC y 5´TGNGHCATCATSGTRTCRTT) que amplifican para un fragmento entre 1000-1200 pb aproximadamente y *czcD*, forward y reverse (5´ATGGGCGCAGGTCACACTCACACGACC y 5´ATGCTGATGAGATTGATGATC) para un fragmento de 599 pb aproximadamente (Lejon *et al.*, 2007, Nies *et al.*, 1989) y utilizando el ADNg como molde se realizó la amplificación de los fragmentos correspondientes por medios de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando las condiciones de amplificación indicadas en las referencias (Tabla 6).

Tabla 6 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, para la amplificación de los genes, 16s, *copA* y *czcD*

Genes	Etapa de PCR				
	Inicio	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Elongación final
16s	94°C 1 min 1 ciclo	94°C 30 s 30 ciclos	57°C 30 s 30 ciclos	72°C 30 s 30 ciclos	72°C 2 min 1 ciclo
<i>copA</i>	94°C 1 min 1 ciclo	94°C 1 min 35 ciclos	55°C 1 min 35 ciclos	72°C 1 min 35 ciclos	72°C 1 min 1 ciclo
<i>czcD</i>	94°C 1 min 1 ciclo	94°C 1 min 35 ciclos	57°C 1 min 35 ciclos	72°C 1.5 min 35 ciclos	72°C 3 min 1 ciclo

Los fragmentos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% Posteriormente fueron purificados utilizando el kit ExoSapIT (Marca usb) y enviados a secuenciar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración mínima de un compuesto a la que se inhibe el crecimiento de un microorganismo en condiciones ambientales adecuadas. En el caso de un cultivo bacteriano en placa, la inhibición se observa con la ausencia de colonias, mientras que para cultivos líquidos en la turbidez del medio. Su uso es común para la medición de la actividad de algunos antibióticos (Mayer, 2010). Ciertos metales de transición como el cobre, el cobalto, el níquel y el zinc a concentraciones traza de orden de 10^{-1} mmol/L son utilizados como micronutrientes o cofactores enzimáticos; sin embargo, a elevadas concentraciones son tóxicos e inhiben el crecimiento microbiano (D'Angelo *et al.*, 2001).

Las concentraciones máximas en las que la cepa OC4 presentó crecimiento en ambos metales, CoCl_2 y CuCl_2 , fue de 1 mM (Tabla 7). La concentración mínima inhibitoria establecida fue de 1.2 mM. ZnZac presentó crecimiento hasta 1.5 mM de CoCl_2 y en presencia de CuCl_2 hasta 2 mM (Tabla 7). Esta diferencia de resistencia puede relacionarse con el sitio del que fueron aisladas las cepas, debido a que son distintos yales mineros, los cuales presentan diferentes condiciones y contaminantes. Las concentraciones de los metales en los sitios, determinan la capacidad de resistencia y por lo tanto las concentraciones de adaptación al metal (Valls and Lorenzo, 2002); otro factor que determina la resistencia a concentraciones altas de metal son los mecanismos que algunos procariontes presentan. En el caso del cobre existen reportes de bacterias como *Pseudomonas sp* NA que resisten concentraciones de hasta 10 mM, a través de mecanismos que permiten la biotransformación del metal mediante la acción de reductasas sobre el Cu (II) a Cu (I) (Andreazza *et al.*, 2010).

El género *Enterobacter* se han clasificado o ubicado como bacterias súper-resistentes, con CMI de hasta 200 mM de cobalto (D'Angelo *et al.*, 2001). Así mismo, las bacterias Gram-negativas del género *Pseudomonas* presentan concentraciones mínimas inhibitorias de Co^{2+} de 2 hasta 8 mM (Ivanov *et al.*, 1998).

Tabla 7 Concentración Mínima Inhibitoria cepas OC4 y ZnZac

Compuesto	Concentración [mM]	OC4	ZnZac
CoCl ₂	0.5	++	+++
	1	+	+++
	1.2	-	++
	1.5	-	+
	2	-	-
	4	-	-
CuCl ₂	0.5	++	+++
	1	+	+++
	1.2	-	++
	2	-	+
	4	-	-

+ Con crecimiento
-Sin crecimiento

7.2. Prueba de acumulación de metal en cultivo sólido de OC4 y ZnZac

La prueba de bioacumulación por revelado con ácido sulfhídrico es de carácter cualitativo. Las colonias crecidas en un medio con metales, son sometidas a una atmósfera de ácido sulfhídrico; el cual reacciona con el metal presente en el medio sólido generando un color café oscuro. Cuando el microorganismo acumula el metal de su entorno, generalmente, se forma un halo incoloro o transparente, indicativo de acumulación de metales (Pumpel *et al.*, 1995). La cepa ZnZac crecida en medio con 1 mM de CoCl₂ dio positivo a la prueba, formándose halos (Figura 10), lo que indica una ausencia del metal en el medio; así mismo, se observó un cambio de color en las colonias, debido a la acumulación del cobalto. El cultivo de la cepa ZnZac en medio con CuCl₂ no presentó formación de halos; sin embargo, las colonias se tornaron de un color azul, característico de este metal. En el caso de las pruebas realizadas con la cepa OC4, en ningún caso se presentó la formación de halos alrededor de las colonias, ni se observaron cambios en la coloración de las mismas. No obstante que este tipo de pruebas es cualitativa y presuntiva, los resultados indican diferencias de interacción de la cepa ZnZac con los dos metales estudiados, cobalto y cobre. Esto, posiblemente debido a algún mecanismo que permite la acumulación de cobalto por el microorganismo, hasta el punto de observar una disminución de metal en el medio, a diferencia del cobre en el cual la cantidad que puede

interactuar con el microorganismo puede estar restringida por alguna proteína de modulación o por otro lado que no exista dicha interacción. Existen microorganismos como *Rhodococcus rhodochrous* que presentan enzimas dependientes de cobalto, lo que les confieren una mayor preferencia por transportar este metal (Komeda *et al.*, 1997).

Un ejemplo de captación y modulación de cobre es el sistema *cop*, el cual lo presentan algunas *Pseudomonas*. El sistema consiste en cuatro complejos polipeptídicos, una proteína de membrana interna, una externa y dos periplásmicas de unión a cobre. Lo que resulta en el secuestro de los iones de Cu^{2+} , así como resistencia debido a ATPasas que provocan un flujo se salida de iones (Silver, 1996). OC4 posiblemente no cuenta con dichas proteínas, lo que explicaría la baja CMI que presentó al ión cobre.

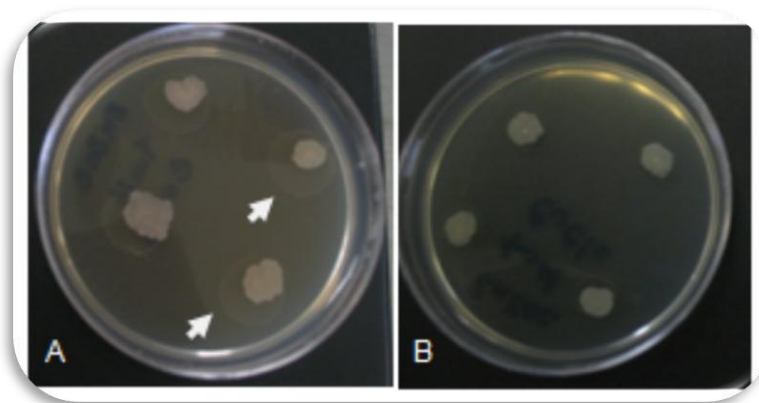


Figura 10 Formación de halos en la prueba de acumulación por revelado con H_2S . Cepa ZnZac
A) Con medio enriquecido 1mM de CoCl_2 . B) Con medio enriquecido con 1mM CuCl_2 . Las flechas en blanco señalan la presencia de halos alrededor de las colonias

7.3. Presencia de sideróforos en cultivos de ZnZac y OC4

La prueba O-CAS para determinar la presencia de sideróforos en cultivos en agar nutritivo dio negativa en la cepa ZnZac, mientras que para la cepa la OC4 fue positiva; el medio presentó un cambio coloración en el medio de color azul a amarillo (Figura 11) característico de sideróforos del tipo carboxilatos también llamados del grupo ácidos hidroxí-carboxilo (Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

El control negativo permaneció sin cambios, lo que descarta algún tipo de reacción entre el medio O-CAS y el agar nutritivo en el cual se llevó a cabo el crecimiento bacteriano. Pérez-

Miranda *et al* (2007) reportaron que algunas cepas aisladas de suelos alcalinos y aguas con alto contenido de fierro sometidas a la prueba O-CAS presentaron un cambio de coloración en el medio de azul a amarillo, resultado nunca antes observado en la prueba tradicional CAS. A diferencia de la prueba CAS la prueba O-CAS permite el crecimiento de bacterias Gram negativas y hongos en medio nutritivo, superando así la inhibición que causa el medio CAS, debido a la presencia del hexadeciltrimetiril bromuro de amonio (HDTMA) el cual es tóxico para estos microorganismos, otra ventaja del medio O-CAS, es la posibilidad de identificar más de un tipo de sideróforo (Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

La prueba O-CAS revela la capacidad de las bacterias de producir sideróforos que secuestran iones de fierro. Sin embargo, existen diferentes estudios que han comprobado la capacidad de algunos metales de transición, como el cobalto, zinc y cobre de sustituir iones de fierro en complejos proteínicos. Particularmente algunos de los efectos del incremento de cobalto en el medio genera una competición entre este y el fierro ocurriendo cambios adaptativos en distintas vías metabólicas (Majtan *et al.*, 2011). Debido a este tipo de interacciones la producción de sideróforos deja de ser exclusiva para el secuestro de iones de fierro.

Los sideróforos de tipo carboxilatos son de las formas menos estables, mientras que las formas con mayor estabilidad son las del tipo tri-hodroximatos. Se ha encontrado que algunas bacterias como *Pseudomonas putida* producen pioverdina, un tipo de sideróforo que presenta tres grupos funcionales, permitiendo a la bacteria crecer en condiciones de hierro limitantes.

Por otro lado, condiciones ambientales, como el pH, intervienen también en la activación y funcionamiento de la pioverdina, la cual a pH entre 9 y 11 tiene una conformación de hexadentados conjugados, los cuales son muy estables, mientras que a pH menores sus grupos hidroxicarboxilos comienzan a disolverse y por lo tanto pierden estabilidad (Wittenwiler, 2007).

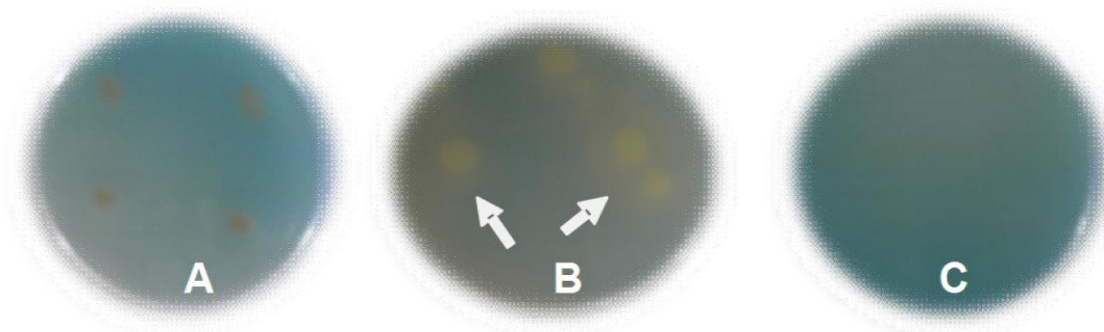


Figura 11 Prueba O-CAS para sideróforos, cepa ZnZac, A, . cepa OC4, B, y Control negativo. Las cepas fueron crecidas en agar nutritivo. Las flechas blancas indican la presencia de cambios de coloración en el medio alrededor del las colonias.

7.4. Análisis de biomasa en contacto con metal por Microscopía Confocal de Escaneo Laser (CLSM)

Uno de los mayores problemas de las técnicas que implican el uso de fluoróforos son efectos tales como el “fotobloqueo” y “extinción”. Estos fenómenos tienen como consecuencia la disminución de la fluorescencia con el tiempo, sobre todo durante el proceso de excitación del fluoróforo debido a la intensidad de la luz de excitación y el tiempo de exposición del campo de observación a dicha fuente de luz (Sánchez, 2009).

Para la observación de las cepas y la acumulación de metales por Microscopía Confocal de Escaneo Laser (LSCM); fue necesario evaluar distintos colorantes para la tinción de biomasa sometida, se evaluaron 4: naranja de acridina, Bradford, safranina y glutaraldehído. Los dos criterios evaluados fueron la fluorescencia y su estabilidad, lo que se refiere a que tan intensa es la fluorescencia en la biomasa y la capacidad que tiene de mantenerse durante el escaneo laser. El segundo criterio fue el contraste o diferencia entre la fluorescencia de la biomasa teñida y la del metal en el medio (Tabla 8). El reactivo que cumplió con estos dos criterios fue el reactivo de Bradford, colorante utilizado en la cuantificación de proteínas, por lo tanto solo es capaz de teñir la biomasa creando así el contraste entre ésta y el metal.

Hoy en día existe un gran interés en encontrar compuestos químicos que sean capaces de provocar la emisión de luz y que a la vez sean sensibles, simples y con un rango de longitud de onda de carácter lineal (Yu and Wang, 2011).

Tabla 8 Evaluación de diferentes colorantes para CLSM

Tinción	Fluorescencia y estabilidad	Contraste de emisión
Naranja de acridina	++++	-
Safranina	-	-
Reactivo de Bradford	+++	+++
Glutaraldehído	+	+

+ Mayor

- Menor

7.4.1. Obtención de imágenes en 3D y espectros de emisión de la biomasa de cepas ZnZac y OC4 en contacto con cobre y cobalto

Una vez realizadas las tinciones de la biomasa de cada una de las cepas, se obtuvieron las imágenes a distintas profundidades de barrido de la cepa ZnZac (Figura 12) con una excitación simultanea de láseres a 405 nm al 4%, 488 nm al 2%, 561 nm al 2% y 633 nm al 2%. Posteriormente con ayuda del software ZEN 2009 se unieron para formar imágenes en 3D de microscopia confocal de la cepa ZnZac sin metal, con 2mM de CuCl₂ y con 2mM de CoCl₂ (Figura 13).

Para hacer reconstrucciones en 3D es necesario realizar un gran número de secciones de un mismo campo, para la obtención adecuada conviene respetar el criterio de número de pixeles/dimensiones. Debido a este tipo de barridos sucesivos puede producirse la degradación de la fluorescencia (Sánchez, 2009).

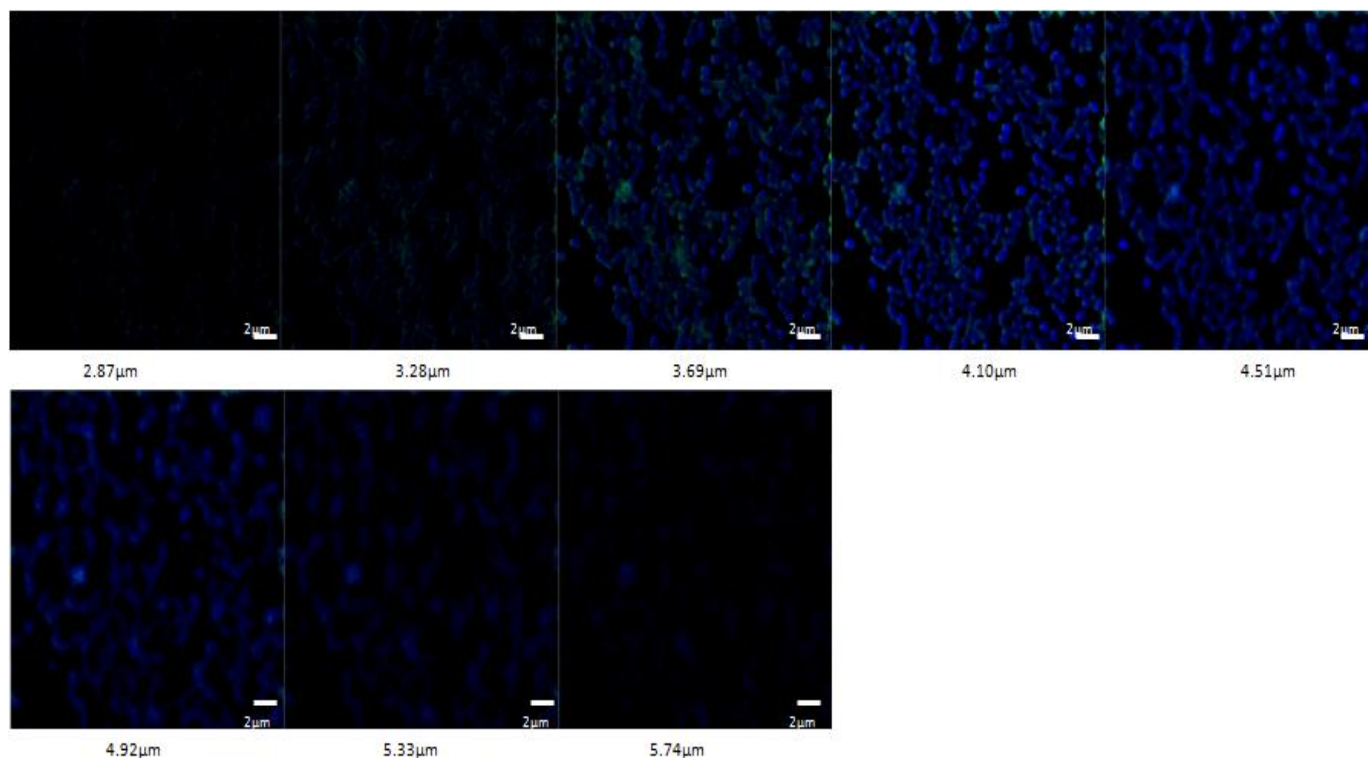


Figura 12 Imágenes de CLSM de la cepa ZnZac con 2 mm de CuCl_2 . Cada cuadro presenta las distancias recorridas por el laser durante el escaneo y las emisiones presentes en cada plano (azul, biomasa y verde, metal). Las emisiones más fuertes aparecieron en las distancias entre 3.69 μm y 4.51 μm .

La cepa ZnZac sin metal (Figura 13A) presentó una fluorescencia homogénea emitida por la biomasa bacteriana (en color verde). A diferencia de las emisiones de la biomasa que estuvo en contacto con soluciones de cobre y cobalto (Figura 13 B y C). En ambos casos fue posible detectar una emisión de fluorescencia sobre la superficie bacteriana (en color azul) diferente a la presentada por la biomasa sin metal. Lo cual puede relacionarse con la capacidad de interacción entre las proteínas de membrana con los iones metálicos.

La emisión de fluorescencia se relaciona principalmente con la estructura molecular de los compuestos y su respuesta a la cantidad de energía que les confiere la excitación de los electrones. De manera que el estado fluorescente de una entidad molecular es el estado excitado más bajo desde el cual tiene lugar la transición al estado fundamental de un compuesto determinado (Bourdelande *et al.*, 1996).

Las mejores medidas de fluorescencia se obtiene con compuestos que tengan grandes diferencias entre la longitud de onda de excitación y de emisión. El tiempo transurre entre la absorción de la radiación electromagnética y la emisión de fluorescencia es muy pequeño del orden de 10^{-8} s (Buitrago, 2010).

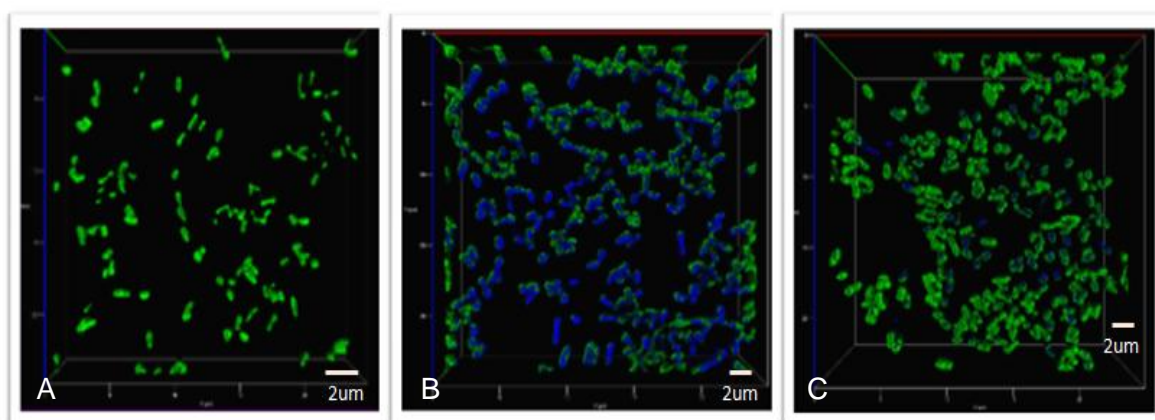


Figura 13 Imagen 3D de CLSM de la cepa ZnZac. A) sin metal. B) ZnZac con 2mM de CuCl_2 C) ZnZac con 2mM de CoCl_2 .

Al igual que la cepa ZnZac la cepa OC4 presentó una fluorescencia (biomasa color verde) homogénea para el caso de la biomasa sin metal (Figura 14A) a diferencia de las imágenes de biomasa en contacto con cobre y cobalto (color azul) (Figura 14 B y C).

La capacidad microbiana de modificar el pH del medio, la presentan bacterias sulfato reductoras, algunas presentes en sedimentos de río que bajo condiciones anaerobias oxidan compuestos orgánicos con el sulfato, generando sulfuro de hidrógeno (H_2S) y iones bicarbonato (HCO_3^-). El H_2S generado reacciona con los iones metálicos eliminándolos de la solución como sulfuros metálicos, que son altamente insolubles. Esta secuencia de reacciones da como resultado una disminución de la concentración de metales y de sulfatos disueltos, así como un incremento de la alcalinidad (Gilbert, 2001).

Al existir cambios en el pH pueden presentarse diferentes especies químicas del metal. Lo que puede derivar en cambios de carga y habilidad de interacción en interfaces sólido-líquido. En algunos casos durante los experimentos de bioadsorción conducen a un incremento de pH de manera que se torna un medio alcalino y ocasionando una precipitación del metal (Yun *et al.*, 2011). En el caso del cobre, valores por encima de pH 7 favorecen la formación de hidróxidos de cobre insolubles, reduciendo la cantidad de cobre que el microorganismo puede utilizar en procesos metabólicos (Hasman *et al.*, 2006).

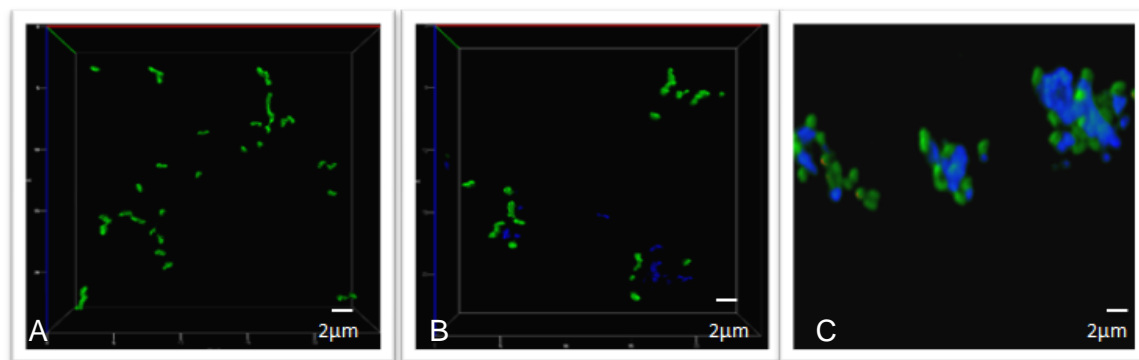


Figura 14 Imagen 3D en CLSM de la cepa OC4 teñida con reactivo de Bradford A) sin metal. B) con CuCl_2 2mM. C) con 2mM de CoCl_2

Además de las imágenes de microscopía confocal de barrido láser (CLSM) se obtuvieron los espectros de emisión sobre distintas áreas de la muestra correspondientes a los elementos que la componen. El espectro de fluorescencia se obtiene con la excitación a una longitud de onda fija mientras se registra la emisión en función de la longitud de onda. Con los datos de longitud de onda de emisión de cada elemento es posible su identificación.

En el caso de la cepa ZnZac se observó la presencia de complejos de cobre (Figura 15) y cobalto (Figura 16) formados en la superficie bacteriana, lo cual se confirmó con los espectros de emisión correspondientes a las longitudes de onda entre 500 y hasta 539 nm correspondiente al cobre (Dai et al., 2009, Yu and Wang, 2011) y de 676 y 695 nm a cobalto (Williams, 2007, Li *et al.*, 2008), estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados para complejos proteína-metal. La emisión de la biomasa teñida fueron de 676, 695 y 715 nm.

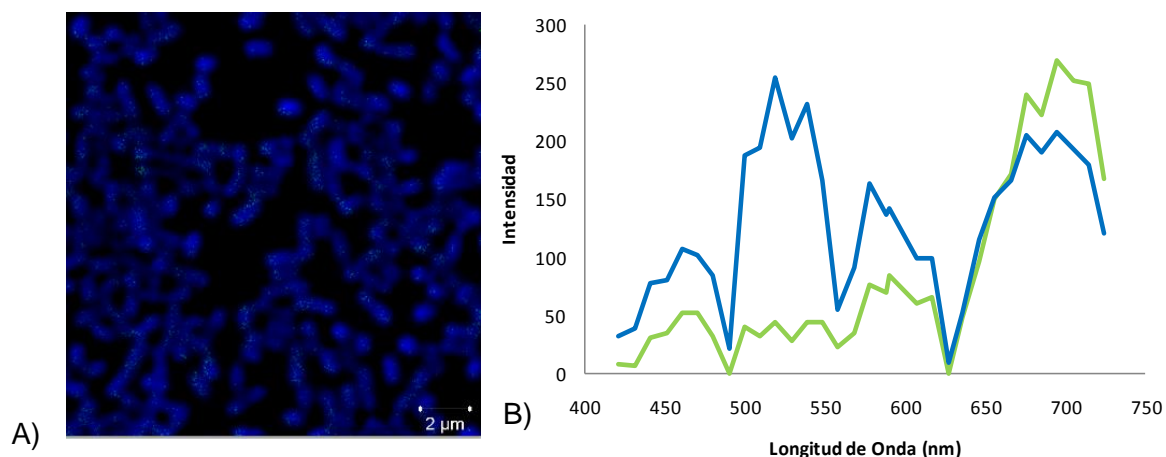


Figura 15 Espectro de emisión obtenidos por CLSM para la cepa ZnZac en contacto con cobre. A) Imagen de microscopia confocal. B) Espectros de emisión obtenidos, azul complejos de cobre y verde biomasa teñida con reactivo de Branford.

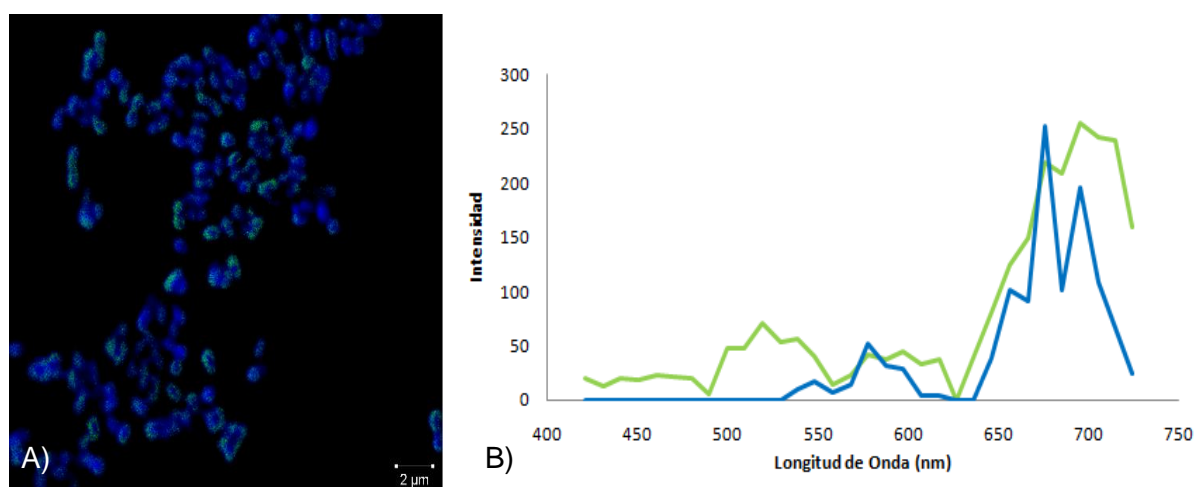


Figura 16 Espectro de emisión obtenidos por CLSM para la cepa ZnZac en contacto con cobalto. A) Imagen de microscopia confocal. B) Espectros de emisión obtenidos, azul complejos de cobre y verde biomasa teñida con reactivo de Branford.

Los espectros presentes en las muestras de la cepa OC4 con metal presentaron longitudes de 441 nm y 578 nm correspondiente al cobre (Figura 17) y 578 nm para y cobalto (Figura 18). Ambas emisiones fueron detectadas a longitudes de onda menores que con la cepa ZnZac utilizando las mismas condiciones de barrido para la excitación.

La diferencia de emisiones para cada uno de los metales entre cepas, puede deberse al estado químico del metal, la cepa OC4 formó agregados de metal después de estar en contacto con la solución, indicativo de un cambio en el estado químico del metal. Mientras que

ZnZac no se observaron estos agredados. Es importante mencionar que la producción de algunos metabolitos y subproductos celulares, como polisacáridos y agentes quelantes como los sideróforos, pueden afectar a la solubilidad del los metales (Bose *et al.*, 2002). Siendo su presencia propia de cada especie y afectando a procesos de adsorción de los metales. Por ejemplo se tienen datos que sugieren que las algas cafées son especies con mayores capacidades de adsorción que hongos y levaduras debido a su capacidad de conservar un pH que permite mantener la solubilidad del cobre (Naja *et al.*, 2007)

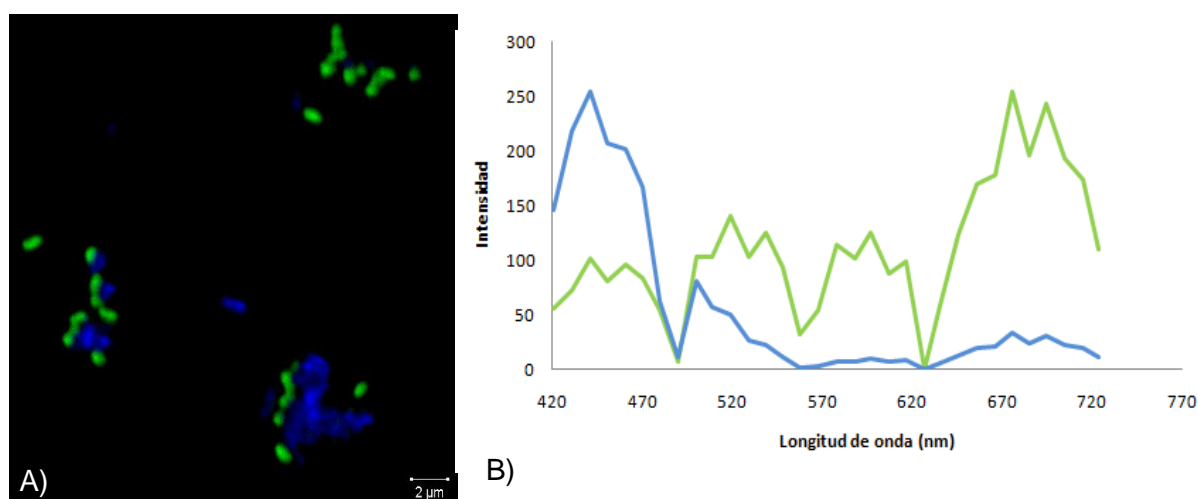


Figura 17 Espectro de emisión obtenidos por CLSM para la cepa OC4 en contacto con cobre. A) Imagen de microscopia confocal. B) Espectros de emisión obtenidos, azul complejos de cobre y verde biomasa teñida con reactivo de Branford.

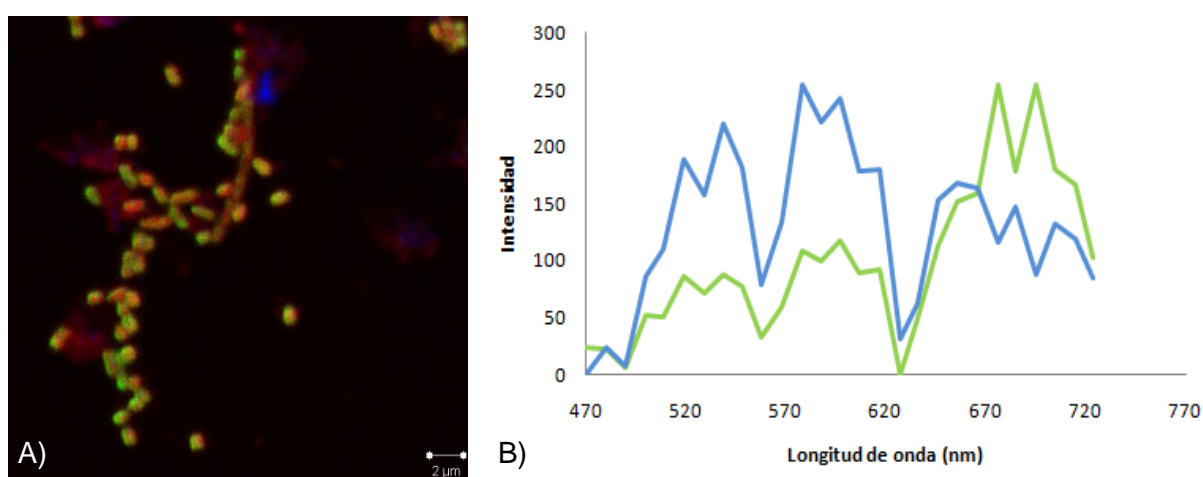


Figura 18 Espectro de emisión obtenidos por CLSM para la cepa OC4 en contacto con cobalto. A) Imagen de microscopia confocal. B) Espectros de emisión obtenidos, azul complejos de cobre y verde biomasa teñida con reactivo de Branford.

Sin embargo existen diferentes factores que intervienen en la detección de este tipo de complejo, así como la ubicación en los espectros de emisión, como son la cantidad del elemento, el pH, cambios en la estructura química (tipo de enlaces) y efecto de componentes ambientales como la cantidad del oxígeno en el momento de la excitación (Williams, 2007).

Existen datos sobre las longitudes de onda de emisión de compuestos formados con proteínas e iones de cobre. Un estudio con iones metálicos y moléculas β -amiloideas, simuló estados de agregación del complejos proteína-metal, como los que se forman en casos de patológicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer's. Como resultado se obtuvieron longitudes de onda de excitación cercanas a los 450 nm y emisiones cercanas a los 480 nm de los complejos formados (Dai *et al.*, 2009).

El cobre puede también interactuar con nanoestructuras de plata, que sirven como colorantes fluorescentes de alta eficiencia, formando complejos que pueden ser detectados por quimioluminiscencia, con reportes de longitudes de onda de emisión de 550 nm. Esta propiedad puede ser explotada para la detección de cobre en distintos tipos de muestras (Yu and Wang, 2011).

Por otro lado se han realizado estudios con microscopia confocal de barrido laser (CLSM) acoplado a un detector espectrofluorométrico, observando la interacción de células vivas de *Microcoleus sp*, una cianobacteria fototrófica; utilizando la autofluorescencia de la cianobacteria fue posible trabajar con distintas concentraciones de cobre y plomo. Con la finalidad de conocer los sitios de acumulación del metal, en este estudio fue posible observar la formación de cúmulos de plomo, más no de cobre, externos e internos (Burnat *et al.*, 2010).

Los datos de emisión, los espectros obtenidos y la construcción de imágenes en 3D permitieron identificar la presencia de cobre y cobalto en las muestras de biomasa de ZnZac y OC4. Las uniones de cobre y cobalto con distintos grupos químicos, como los carboxilos, presentes en la biomasa bacteriana, generan emisiones capaces de detectarse, probablemente debido a la formación de complejos proteína-metal.

7.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM) es la herramienta más utilizada para observar la presencia de nanopartículas. Debido a los alcances de resolución del TEM, permite

observar estructuras de tamaños entre 1-50 nm; proporcionando datos de tamaño, forma, distribución y composición química: de hecho es posible trabajar en la escala de Armstrong. El TEM por medio de patrones de difracción, permite distinguir entre áreas amorfas y cristalinas de la muestra. Además que se puede utilizar la espectrometría de rayos-X (EDX), función presente utilizando la espectroscopia de energía electrónica baja (EELS). La cual se utiliza para elementos ligeros (D. Sommer and Golla-Schindler, 2008).

7.5.1. Análisis microscópico TEM de la Cepa ZnZac

Para analizar la biomasa de la cepa ZnZac, que estuvo en contacto con la solución 2mM de CuCl_2 . Ésta fue colocada en rejillas de Lacey-Carbon de 200 mesh marca EMS (N. de catálogo LC200-Cu-25) Una vez seca la muestra se observó por TEM (Figura 19) a diferentes resoluciones y abarcando distintas zonas de los mesh sin observar la formación de nanopartículas de cobre.

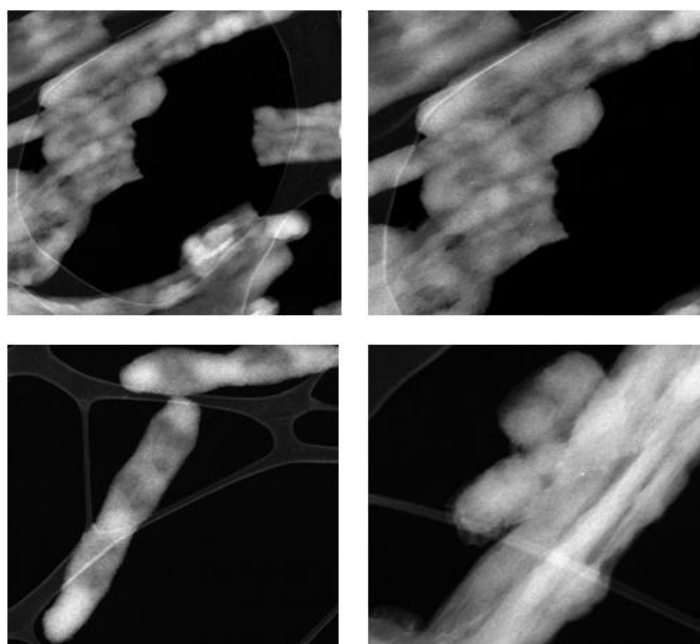


Figura 19. Micrografías de transmisión electrónica modo contraste Z. de la cepa ZnZac con 2mM de CuCl_2

De la misma manera se prepararon las muestras de biomasa de ZnZac con solución de CoCl_2 y fueron observadas con TEM se obtuvieron imágenes de diferentes áreas de la rejillas y utilizando distintos campos de aumento (Figura 20).

Aunque se observaron zonas densas sobre la superficie de algunas bacterias, estos precipitados presentaron formas variadas y al realizar análisis de espectroscopía de rayos-X (EDX) (Figura 20).

Se identificó presencia de Hierro, Calcio, Sodio, Cloro, Fósforo y Azufre. Posiblemente residuos del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las bacterias. El pico máximo de Cobre presente en el análisis de EDX (Figura 21) corresponde a la composición de la rejilla de Lacey-Carbón. Tampoco se formaron nanopartículas de cobalto con esta cepa.

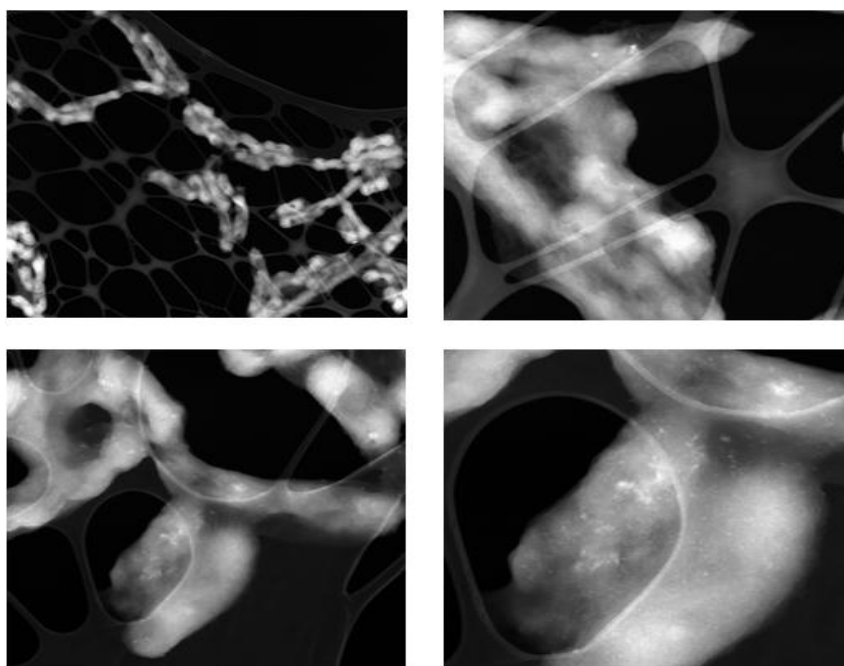


Figura 20 Micrografías de transmisión electronica modo contraste Z. cepa ZnZac con 2 mM de CoCl_2

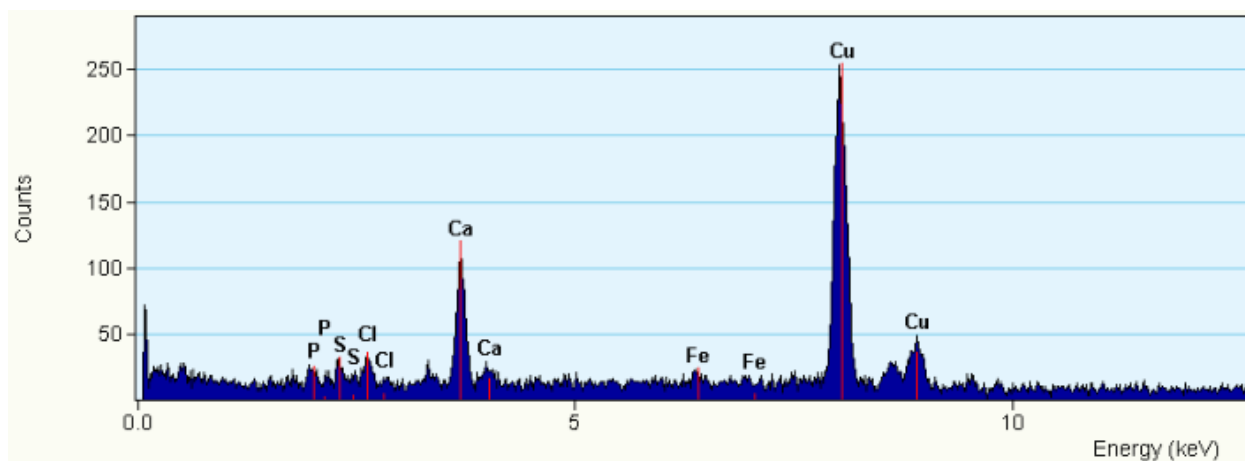


Figura 21 Análisis de EDX sobre estructuras observadas en la superficie de la cepa ZnZac.

En el caso de la cepa OC4 tampoco se observó la formación de nanopartículas con ambos metales (Figura 22 y Figura 24)

Sin embargo también se presentaron estructuras densas sobre algunas bacterias, de tamaño menor que las observadas con la cepa ZnZac en presencia de CoCl_2 . Al realizar el análisis de EDX (Figura 23) se identificó presencia de Calcio y Hierro.

La composición de estas estructuras fue la misma para ambos metales con la cepa OC4. Estos compuestos pueden ser residuos del medio de cultivo. La aparición de un pico de cobre en el espectro de EDX se debe a la composición de la rejilla en la cual se depositan las muestras para el análisis.

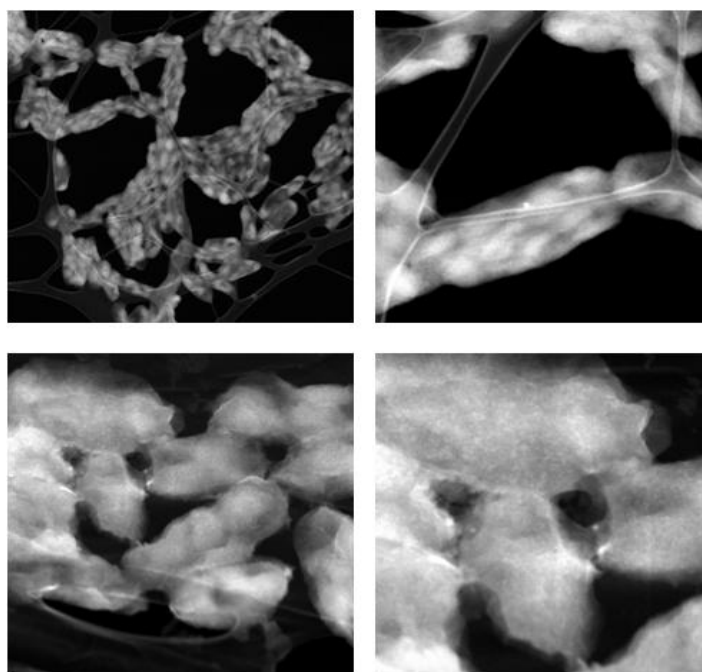


Figura 22 Micrografías de transmisión electronica modo contraste Z.Cepa OC4 con 2mM de CuCl_2 .

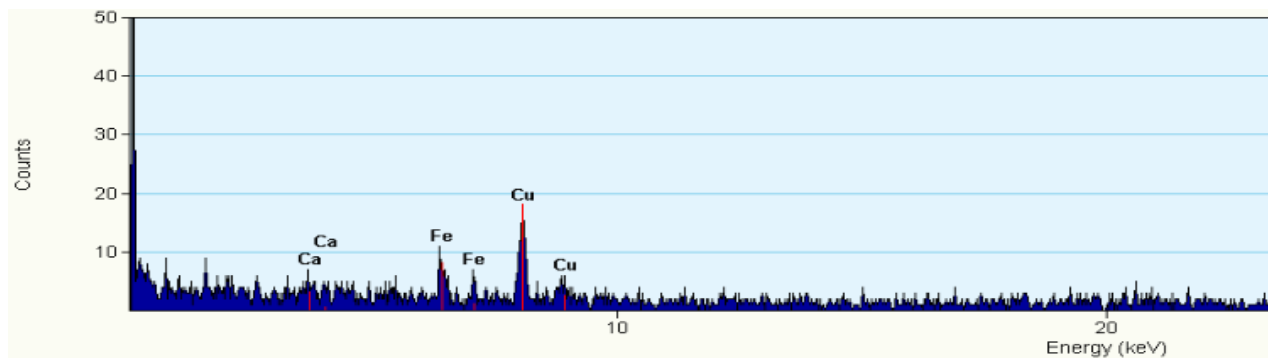


Figura 23 Análisis de EDX sobre estructuras observadas en la superficie de la cepa OC4 con CuCl_2 .

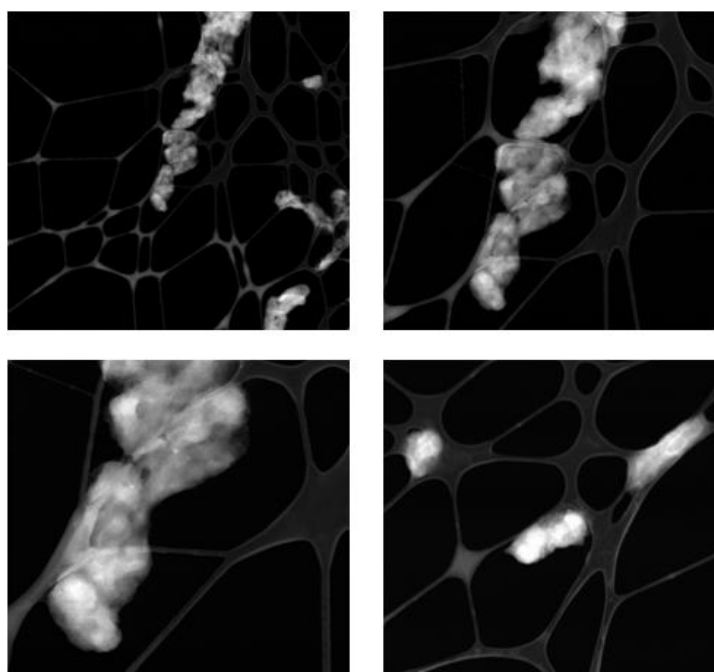


Figura 24 Micrografías de transmisión electronica modo contraste Z. cepa OC4 con 2 mM de CoCl_2

Los análisis por TEM y EDX, indican que ambas cepas no forman nanopartículas de cobre y cobalto bajo las condiciones de estudio. Como ya se mencionó la síntesis de nanopartículas es un proceso que depende de distintas variables, es probable que bajo algunas otras condiciones la forme o que estas cepas solo tengan la capacidad de absorber estos dos metales con diferente afinidad, lo que se demostró con las prueba de absorción y el análisis por microscopia confocal.

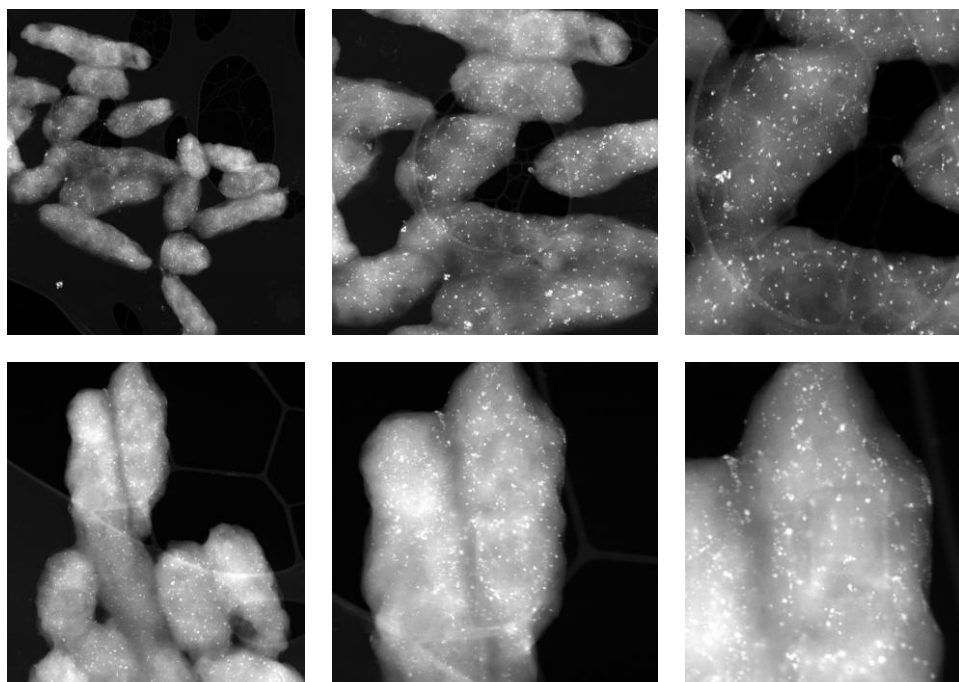
7.5.2. Evaluación de ZnZac y OC4 con plata

Para validar la metodología utilizada para la formación de nanopartículas de cobre y cobalto, se propuso la utilización de un “metal testigo”, llamado así por que se tiene antecedentes de obtención de nanopartículas. En experimentos anteriores con la cepa OC4 en presencia de Plata fue posible la obtención de nanopartículas (Martínez, 2008b).

Bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores se obtuvieron imágenes de las cepas ZnZac y OC4 (Figura 25) después de 72 h en contacto con una solución de AgNO_3 . La presencia de nanopartículas de plata es evidente en ambas cepas, con tamaños entre 10 y 50 nm distribuidas sobre la superficie bacteriana. Por medio de análisis de EDX se identificó la composición de las nanopartículas y también se realizó un mapeo elemental sobre una zona específica de la muestra, los resultados de ambas pruebas confirman la síntesis de nanopartículas de plata en ambas cepas (Figura 26). Estos resultados indican que las cepas ZnZac y OC4 presentan una selectividad en los procesos de la formación de nanopartículas.

Se han reportado la biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando distintos microorganismos, siendo éstas junto con las de oro las de mayor aplicación en el mercado. Debido a que son metales nobles y pueden ser utilizados en distintas áreas como la biomedicina, farmacéutica y ambiental (Philip, 2009).

A)



B)

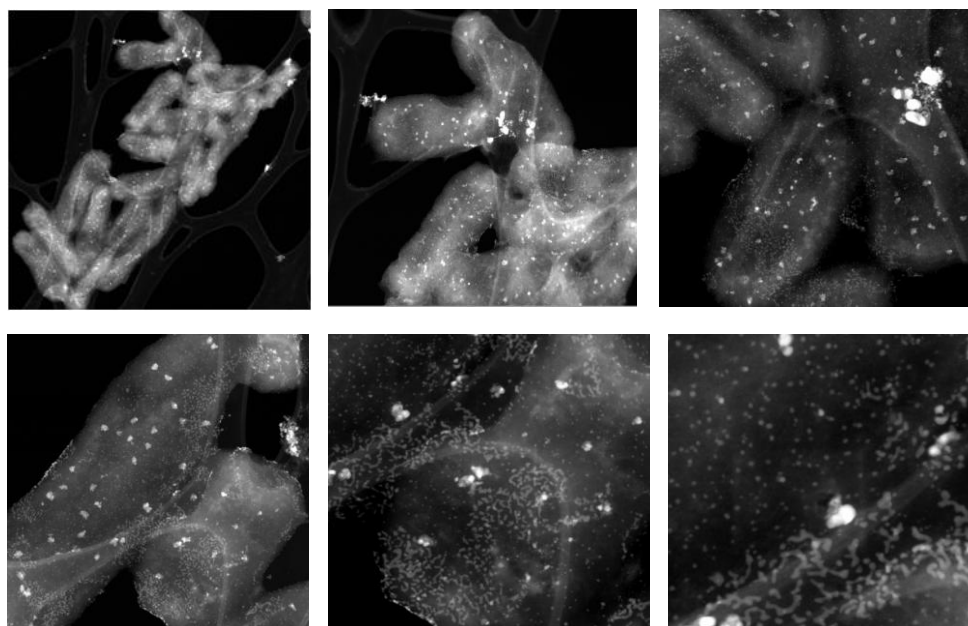


Figura 25 Micrografías de transmisión electrónica modo contraste Z. A) cepa OC4 y B) cepa ZnZac con 2 mM de AgNO_3

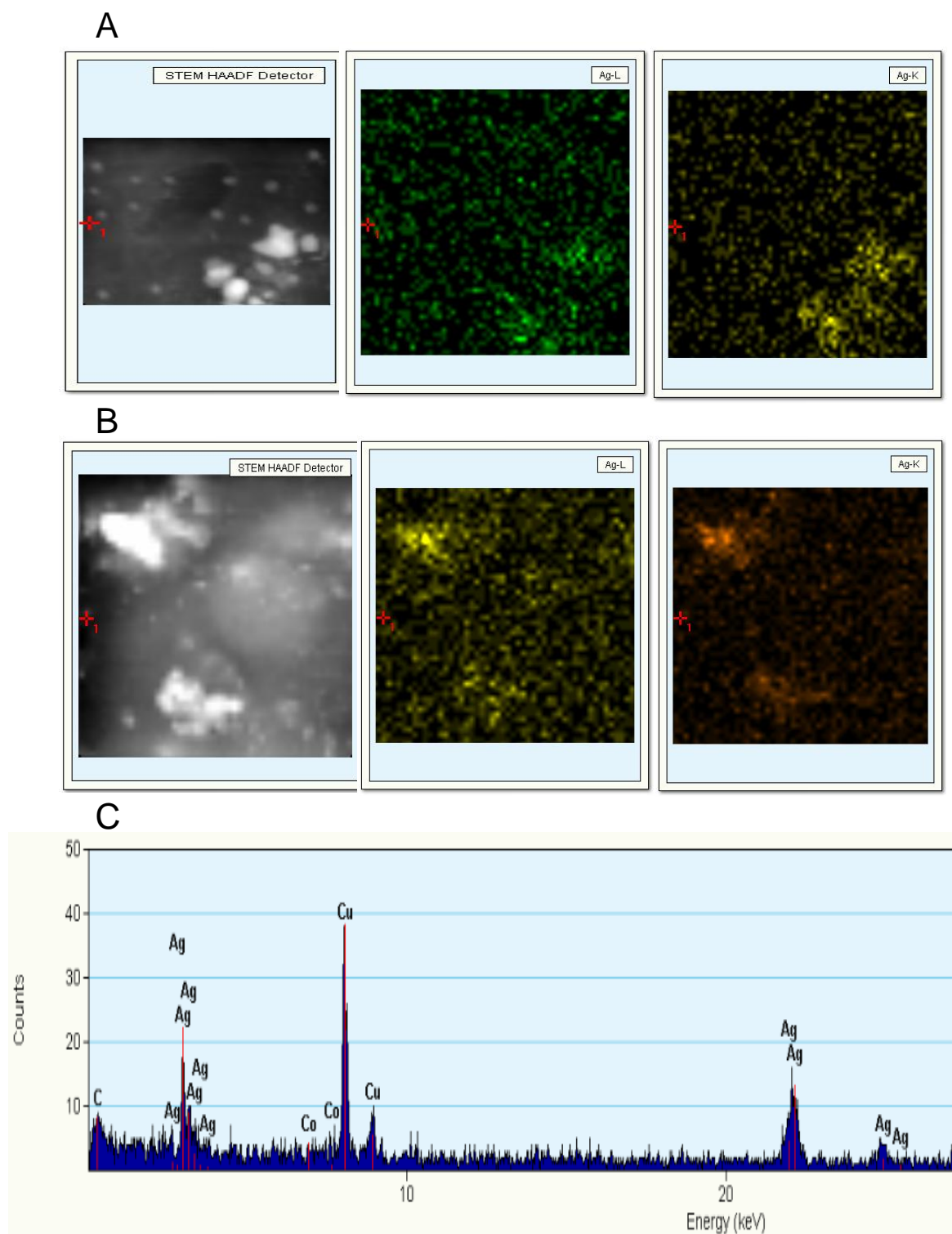


Figura 26 Análisis de composición e nanopartículas de Ag A) Mapeo químico de la cepa ZnZac. B) Mapeo Químico de la cepa OC4. B) EDX de la cepa ZnZac.

Existen factores que intervienen en la biosíntesis de nanopartículas metálicas. Como son la presencia de enzimas o proteínas, por menciona algunos. El hecho de que un microorganismo pueda llevar a cabo estos procesos de manera diferenciada depende de la presencia o ausencia de dicha maquinaria.

La biosíntesis de nanopartículas de plata involucra la reducción de iones Ag^+ mediante el uso de biomoléculas como enzimas, proteínas, aminoácidos, polisacáridos y vitaminas. *Chlorella vulgaris* fue utilizada para la síntesis de nanoplacas de plata, en dicho proceso las proteínas presentes desempeñan una doble función llevando a cabo la reducción de Ag^+ y el control de de las nanoformas. Por otro lado, los grupos carboxilo de algunos aminoácidos como el aspartato y la glutamina así como los grupos hidroxilo de la glutamina posiblemente son los responsables en los procesos de reducción de Ag^+ (Xie *et al.*, 2007).

También se han utilizado distintos compuestos de origen biológico para la síntesis de nanopartículas de plata entre ellos el glutatión que actúa como un agente reductor-limitante (Chen *et al.*, 2007).

El uso de vitamina E utilizando la técnica Langmuir-Blodgett resultó ser un proceso exitoso. La L-valina se sabe que interviene en procesos que le confieren la forma a las nanopartículas. Algunos microorganismos como *Pseudomonas stutzeri*, *Fusarium oxysporum*, *Phanerochaete chrisospyrum*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* entre otras son capaces de producir nanopartículas de plata utilizando enzimas y proteínas de manera particular se ha identificado del la familia de las reductasas NADH-dependientes (Sharma *et al.*, 2009).

En cuanto a la biosíntesis de nanopartículas de cobre y cobalto son pocos los reportes. Ya que la mayoría de las nanopartículas de estos metales son de origen químico. Procesos como la reducción química con agentes como la sulfobetaína han resultado exitosos para la síntesis de nanopartículas de cobalto y cobre. Utilizando una reacción de microemulsión posteriormente se eleva la temperatura resultando en una reacción de transmetalación. Se logró obtener núcleos nanométricos de cobre rodeados de nanopartículas de cobalto (Gou *et al.*, 2007).

Otros procesos para la formación de nanopartículas de cobalto involucran el uso de métodos hidrotérmicos utilizando peróxido de hidrógeno como oxidante. Esta técnica, a diferencia de otras, permite tener un control sobre el tamaño de la partícula, además de trabajar con bajas temperaturas, lo que reduce tiempos y costos de fabricación (Song *et al.*, 2010).

Son pocos los microorganismos que han sido utilizados para la síntesis de nanopartículas de cobalto. Entre ellos se encuentra *Thermoanaerobacter ethanolicus* conocida como TOR-39, una bacteria termofílica capaz de reducir iones de cobalto bajo una atmósfera de N₂ obteniendo formas de cobalto de tamaño nanométrico (Roh and Moon, 2001)

Después del proceso de reducción de cobalto pueden utilizarse agentes como el aceite vegetal y la sucrosa los cuales permiten mantener la estabilidad de las nanopartículas de cobalto, ya que éstas pueden ser muy reactivas causando daños a su estructura. Este tipo de emulsiones ayuda a la sustentabilidad del proceso (Raj *et al.*, 2011).

Los mecanismos que intervienen en la síntesis de nanopartículas se relacionan directamente con el tipo de interacciones que pueden llevarse a cabo entre los microorganismos y el metal (Gericke and Pinches, 2006).

El cobalto es considerado un metal esencial debido a que interviene en reacciones del metabolismo de los microorganismos, se encuentra principalmente en el anillo de corrina de la coenzima B₁₂. Siendo un metal esencial su rol bioquímico comprende catálisis de reacciones bioquímicas, estabilización de proteínas, regulación y expresión de genes así como control de los gradientes de presión osmótica a través de diversas membranas microbianas (Gikas, 2008).

La regulación de cobalto implica el uso de proteínas de membrana con dominios en el periplasma. Entre estas proteínas se encuentran la perteneciente a familia NiCoT están involucradas en el transporte y regulación de níquel y cobalto. En ensayos sobre la acumulación de metales en *Escherichia coli* se observó la producción de diversas proteínas heterólogas de NiCoT. Algunos de estos con preferencia estricta y selectiva a iones de níquel, otras con fuerte preferencia a cobalto y finalmente aquellas que presentaron preferencia para ambos metales (Eitinger *et al.*, 2005).

Por otro lado debido el incremento en la concentración de cobalto algunos microorganismos son capaces de modificar rutas metabólicas. En *E. coli* como resultado de la exposición a cobalto se induce hacia una vía metabólica fermentativa, cambiando grupos hemo en complejos de proteínas por complejos de protoporfirinas IX de cobalto (CoIXP). Lo que demuestra la capacidad de sustituir iones de hierro por metales de transición (Majtan *et al.*, 2011). Majtan *et al.* superaron la inhibición del crecimiento bacteriano por el aumento de concentración de cobalto a través de pases secuenciales.

Hoy en día las nanopartículas de cobre se sintetizan por métodos químicos como la reducción química en medio líquido con solventes orgánicos, la fotoreducción, la sonoquímica, la reducción por vías radiolíticas y máquinas químicas y la deposición con electrodos metálicos. El proceso en general inicia con el enlace químico de un número limitado de átomos de cobre agrupados en un núcleo y estabilizados por una capa externa de otras sustancias (Kumar, 2009).

Algunos de los agentes reductores que se encuentran en el citoplasma celular son el glutatión (GSH), el cual es probablemente el mayor agente reductor en células procariotas y eucariotas. Otros componentes reductores de cobre contienen cisteína y ascorbato, éstos son capaces de reducir el cobre(II) a cobre(I) siendo propensos a unirse al cobre (McLaggan D, 1990).

Cuando el cobre se encuentra en fluidos extracelulares o en un medio bacteriano normalmente se crean complejos con moléculas inorgánicas. La reducción de complejos de cobre(II) facilita fuertemente el desplazamiento de ligandos a los iones metálicos los cuales se unen en el medio, volviéndolo un metal biodisponible. Este aspecto fisicoquímico dificulta la experimentación de cobre con sistemas biológicos que podrían dilucidar procesos de biológicos de homeostasis de este metal (Magnani and Solioz, 2007).

Actualmente, algunas de las existen distintas bacterias utilizadas para la síntesis de nanopartículas. *Pseudomonas stutzeri* aislada de suelos y utilizada como inóculo sobre aguas residuales contaminadas con cobre fue capaz de sintetizar nanopartículas de cobre de tamaños entre 50-150 nm, de forma cubica y esférica. Las nanopartículas obtenidas se encontraban dispersas sin formar aglomerados los que indica que la superficie bacteriana actúa como reductor y agente limitante (Varshey *et al.*, 2011) . Otros estudios utilizan a la cepa *P. stutzeri* AG259 para la síntesis de nanopartículas de plata las cuales fueron acumuladas en el espacio periplásmico celular (Jeorger *et al.*, 2000).

La síntesis diferenciada de nanopartículas metálicas puede relacionarse con el tipo de interacción entre la nanopartícula y la superficie bacteriana. Debido a que las nanopartículas metálicas pueden presentar propiedades antibacteriales. Lou *et al.* Utilizaron a *Pseudomonas aeruginosa* para estudiar las interacciones interfaciales con nanopartículas de plata y oro. Los resultados mostraron que pueden existir relaciones hidrofílicas e hidrofóbicas en la superficie bacteriana lo que permite la adhesión de las nanopartículas metálicas. Esta adhesión promueve la actividad antibacterial (Luo *et al.*, 2010).

7.6. Bioadsorción de cobre(II) y cobalto(II)

7.6.1. Cinéticas de adsorción

7.6.1.1. Bioadsorbente Cepas OC4 cobre(II) y cobalto(II)

En los primeros 30 minutos de la cinética la adsorción fue lineal alcanzando una tasa de adsorción de 57.9mgCu/g de biomasa. Posteriormente la adsorción fue mas lenta y casi constante alcanzando un valores de adsorción de 68.87mgCu/g de biomasa, entre el minuto 60 y hasta el minuto 180. En el minuto 180 incrementó la adsorción hasta 94.9mgCu/g de biomasa con una disminución del metal en solución del 40% (Figura 27).

Se han reportado que bioadsorbentes como las algas *Fucus vesiculosus* presentan adsorción entre 4 y 16 mgCu/g de biomasa, mientras que bacterias como *Bacillus subtullis* 16 mgCu/g de biomasa y hongos como *Pseudovernia furfuracea* hasta 60.8 mgCu/g de biomasa (Naja *et al.*, 2007, Grimm *et al.*, 2007).

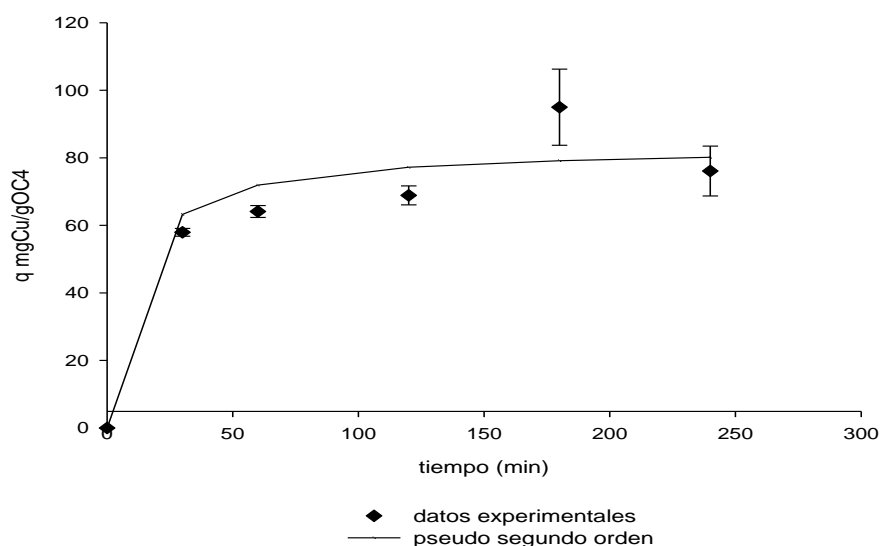


Figura 27 Cinética de adsorción de cobre(II) de la cepa OC4. Comparación con datos experimentales y modelo de cinético de pseudo segundo orden. pH de 6.5 en agitación temperatura ambiente.

Para la obtención de los parámetros cinéticos de adsorción de cobre(II) por la cepa OC4, se utilizó un modelo de cinético de pseudo segundo orden (Ec. 4) reportada para el estudio de la adsorción de metales divalentes como el cobre, níquel, plomo y cobalto (Bautista, 2008, Ho and Mckay, 2000). Este modelo permite obtener las constantes cinéticas de capacidad de adsorción en el equilibrio (q_e), la tasa constante de velocidad de pseudo segundo orden (k_s) y la velocidad inicial de adsorción (h) realizando una linealización con t/q vs el tiempo (Figura 28).

Con la ecuación de la gráfica:

$$y = Ax + B \quad (Ec.5)$$

Se obtuvo

$$q_e = \frac{1}{A} \quad ; \quad k_s = \frac{1}{q_e^2} \quad h = k_s \times q_e^2 \quad (Ec.6)$$

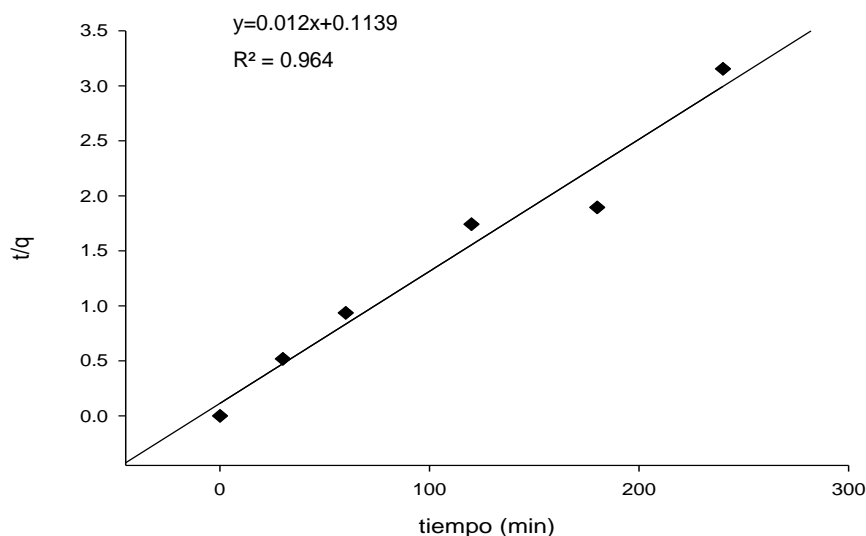


Figura 28 Linealización de pseudo segundo orden para la cinética de adsorción de cobre(II) de la cepa OC4.

Con estos valores es posible obtener la capacidad de adsorción teórica y comparar con los datos experimentales (Figura 27). La tendencia de los puntos teóricos y los experimentales es muy similar lo que indica que este tipo de cinética tiene un buen ajuste con el modelo de pseudo segundo orden con un valor de $r^2=0.964$ (

Tabla 10). Sin embargo, los valores de capacidad de adsorción teóricos (q) son superiores por alrededor del 9% (21mgCu/g) con una capacidad de adsorción en el equilibrio $q_e= 83.3\text{mgCu/g}$

de biomasa seca, una tasa de adsorción $k_s=0.00126$ g/mg min y una velocidad inicial de adsorción $h=8.749$.

El modelo de pseudo segundo orden asume que existe un paso limitante en la tasa de adsorción, esta limitante puede ser de origen químico, lo cual involucra fuerzas de valencia durante el intercambio o cambio de electrones entre las fuerzas covalentes de la biomasa y el metal. Existen otros factores que influyen en el proceso de adsorción, el modelo cinético se enfoca únicamente al efecto de parámetros observables durante una tasa global. Esto incluye la concentración inicial de iones metálicos, la temperatura, la dosis de biomasa y naturaleza del soluto (Ho and Mckay, 2000).

En la cinética de adsorción de cobalto(II) realizada con una concentración inicial de 151.4 mg de Co/L, la disminución de concentración de cobalto a los 20 min fue del 11.62% alcanzado su máxima disminución del 35.4% alrededor de los 300 min.

Se obtuvo la capacidad de adsorción de cobalto(II) en distintos periodos de tiempo de contacto con el metal (Figura 29). La tendencia sugiere que la capacidad de adsorción cobalto aumenta conforme al tiempo de contacto.

A partir de la ecuación (Ec.5) y graficando los valores experimentales t/q contra t (Figura 30) fue posible obtener los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando el modelo de pseudo segundo orden de la misma manera descrita para el caso del cobre(II) (Tabla 9).

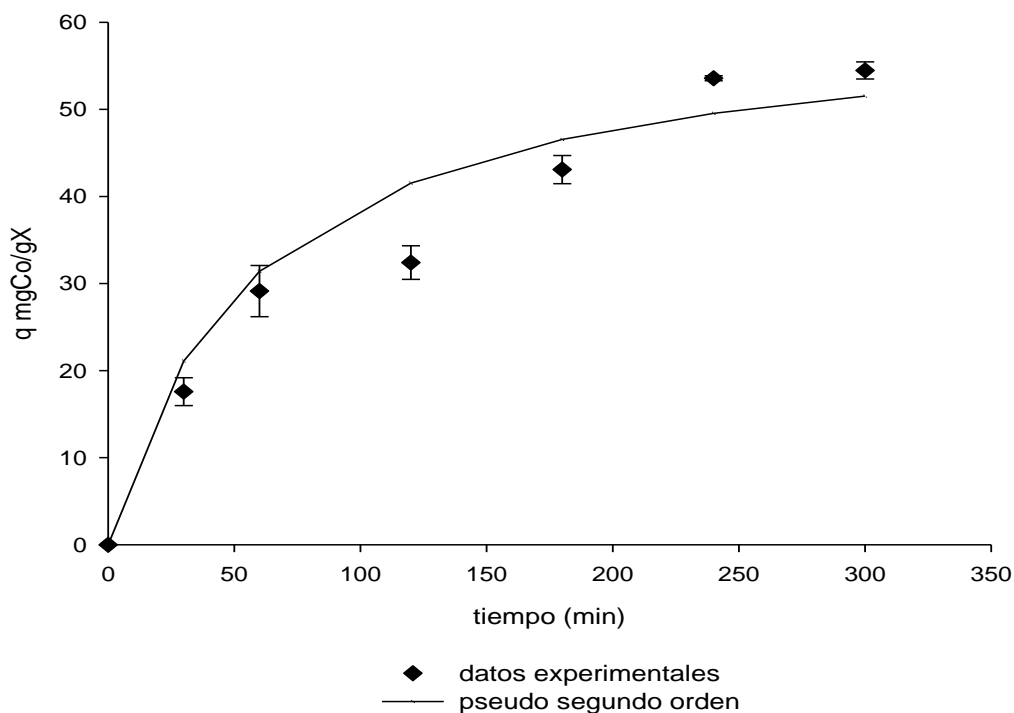


Figura 29 Cinética de adsorción de cobalto 2.5 mM de la cepa OC4. Comparación con datos experimentales y modelo de cinético de pseudo segundo orden. pH de 6.5 en agitación temperatura ambiente

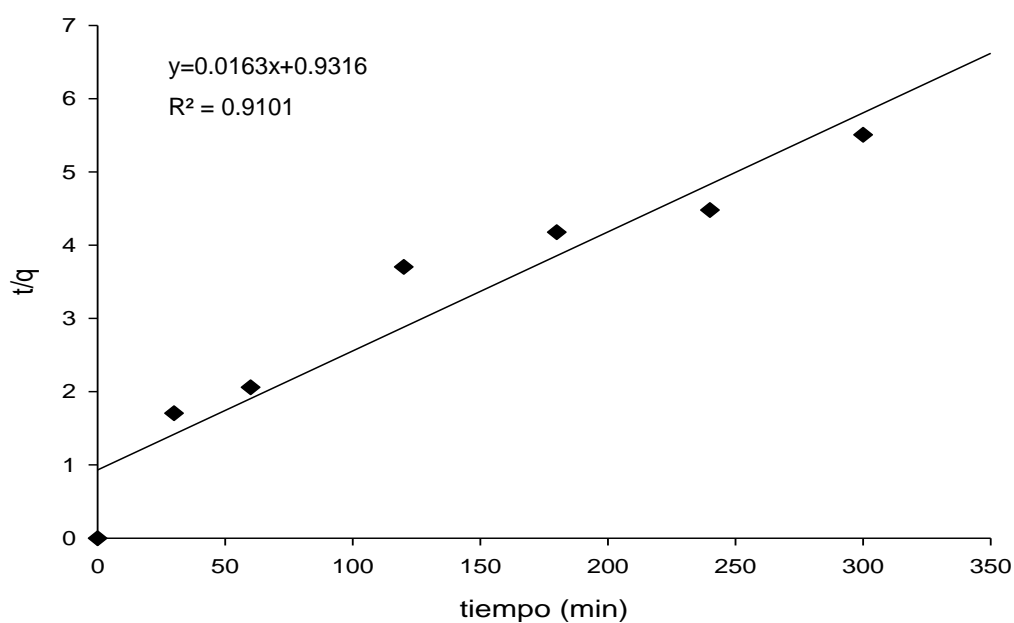


Figura 30 Linealización de pseudo segundo orden para la cinética de adsorción de cobalto de la cepa OC4.

Tabla 9 Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo cinético de pseudo segundo orden. Cepa OC4 cobre y cobalto.

Cepa (metal)	q_e (mg/g)	k_s (g/mg min)	h (mg/g min)	r^2
OC4 Cu(II)	83.33	0.00126	8.749	0.964
OC4 Co(II)	61.349	0.000285	1.0726	0.9101

q_e : Capacidad de adsorción en el equilibrio. k_s : Tasa de adsorción. h : velocidad de adsorción. r^2 : coeficiente de relación

Posterior a la linealización se obtuvo el coeficiente de correlación, el más alto lo presentó la adsorción de cobre(II) con una $r^2=0.964$, al igual que una mayor capacidad de adsorción de cobre en el equilibrio (q_e) de 83.33 mgCu/g de biomasa, mientras que con cobalto(II) la adsorción fue de 61.34 mgCo/g de biomasa. De igual forma s la tasa de adsorción (k_s cantidad de biomasa utilizada por mg de Cu por minuto) y la velocidad de adsorción (h cantidad de Cu por g de biomasa por minuto) fueron mayores para cobre que para cobalto.

Los puntos experimentales fueron cercanos a las curvas teóricas para ambos metales (Figura 27 y Figura 29). Siendo un comportamiento típico para la bioadsorción de metales (Ho and Mckay, 2000). Siendo acertada el uso de cinética de pseudo-segundo orden.

7.6.1.2. Bioadsorbente Cepa ZnZac cobre(II) y cobalto(II)

Los datos obtenidos con los experimentos cinéticos de cobre(II) con la cepa ZnZac fueron tratados de la misma forma que con la cepa OC4. Al obtener las cantidades de adsorción se graficaron contra en tiempo (Figura 31). La máxima adsorción, de 124.8 mgCu/g de biomasa, se presentó antes de los 50 min. Alcanzando el equilibrio después del minuto 100 con cantidades de adsorción superiores a los 100 mgCu/g de biomasa.

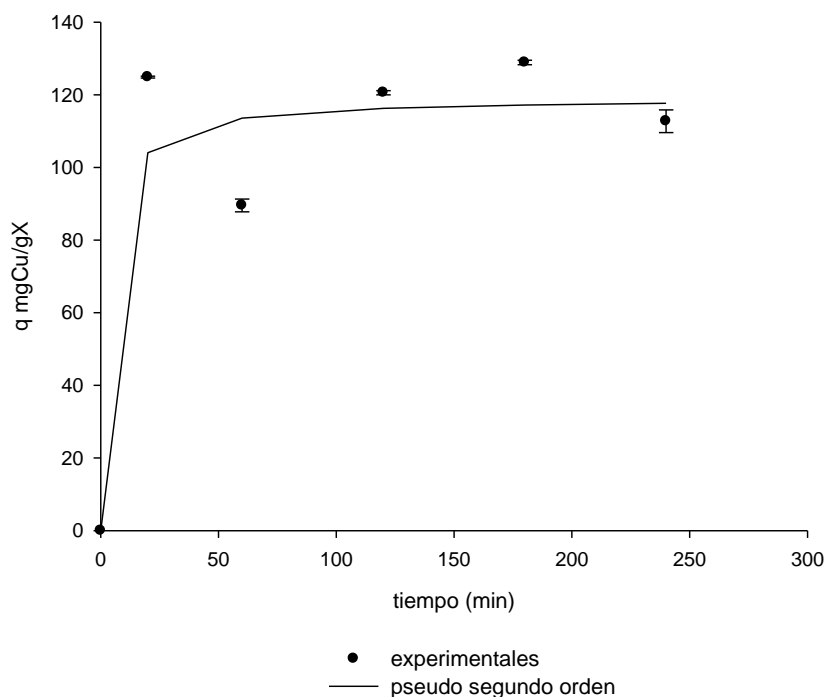


Figura 31 Cinéticas de adsorción de cobre(II) de la cepa ZnZac pH 6.5, temperatura ambiente con agitación y concentración inicial 5mM

Los datos fueron linealizados al modelo de pseudo segundo orden, anteriormente descrito. Con los resultados se graficó t/q vs t (Figura 32). De igual forma, que con la cepa OC4, se obtuvieron los parámetros de tasa de adsorción (k_s) y la velocidad inicial de adsorción (h) (Tabla 10).

Se obtuvieron los valores de adsorción en el equilibrio (q_e) y fueron comparados con los experimentales (Figura 31). El coeficiente de correlación obtenido fue de $r^2= 0.9841$ (Figura 32). Los valores experimentales y la curva obtenida teóricamente presentan un comportamiento similar.

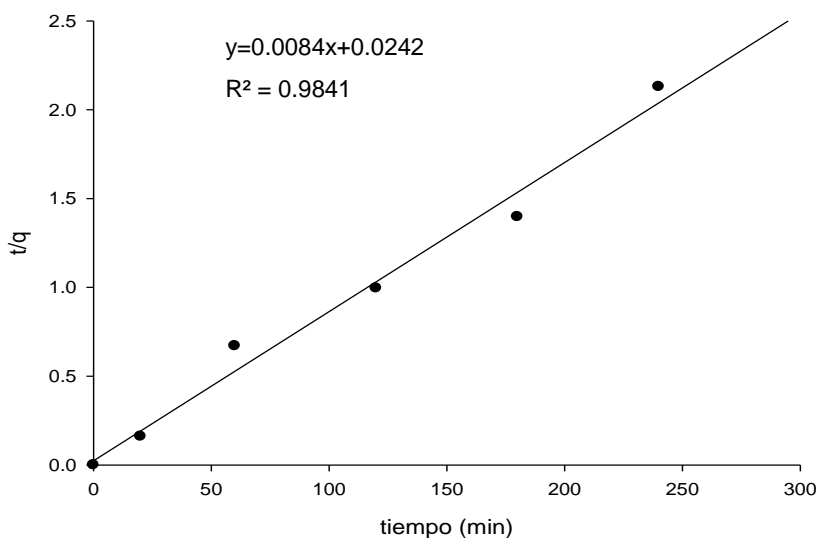


Figura 32 Linealización de pseudo segundo orden para la cinética de adsorción de cobre(II) de la cepa ZnZac. Concentración inicial 5 mM, pH= 6.5, T=22°C con agitación.

Para la obtención de los parámetros cinéticos de la cepa ZnZac con cobalto(II) se llevó a cabo el mismo procedimiento que en los casos anteriores. Los valores de adsorción fueron desde 66.7 hasta 84 mgCo/g (Figura 33). Con la linealización de los datos siguiendo el modelo de pseudo segundo orden (Figura 34) y con las relaciones del modelo (Ec. 6). Se calculó la cantidad de adsorción teórica (q_e) y fue comparada con los datos experimentales (Figura 33).

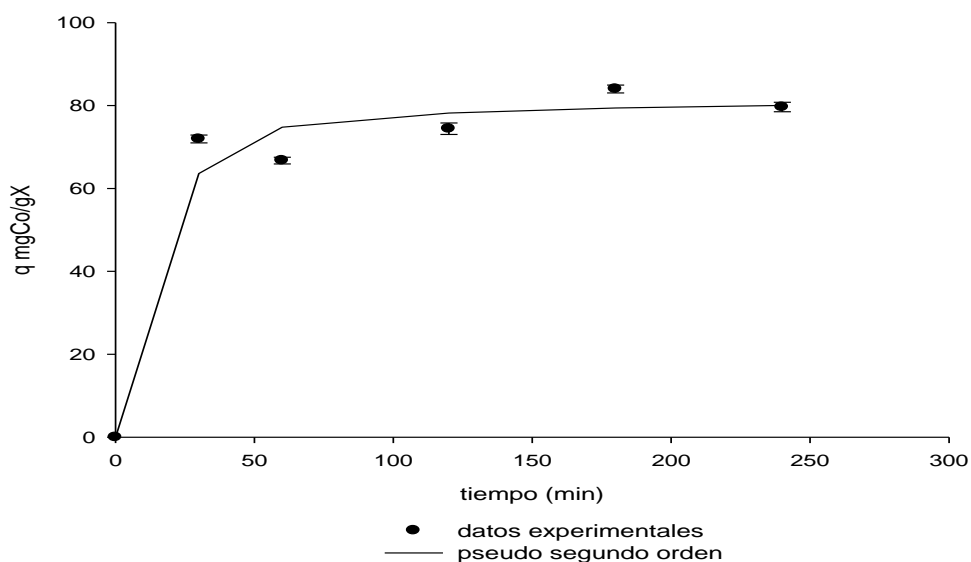


Figura 33 Cinéticas de adsorción de cobalto de la cepa ZnZac pH 6.5, T=22°C con agitación. Concentración inicial 5 mM.

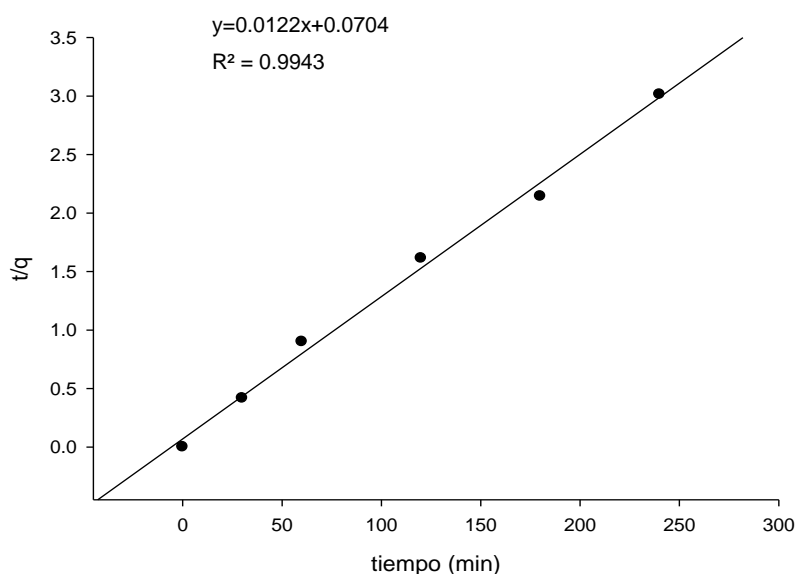


Figura 34 Linealización de pseudo segundo orden para la cinética de adsorción de cobalto de la cepa ZnZac. Concentración inicial 5 mM. pH= 6.5, T=22°C.

Tabla 10 Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo cinético de pseudo segundo orden. Cepa ZnZac cobre y cobalto

Cepa (Concentración del metal)	q_e (mg/g)	K_s (g/mg min)	h (mg/g min)	R^2
ZnZac (Cu(II) 5mM)	119.04	0.002915	41.30	0.9841
ZnZac (Co(II) 5mM)	81.967	0.002114	14.20	0.9943

q_e : Capacidad de adsorción en el equilibrio. k_s : Tasa de adsorción. h : velocidad de adsorción. r^2 : coeficiente de relación

El coeficiente de correlación que presentaron los datos linealizados, utilizando el modelo de pseudo-segundo orden fue mayor para cobalto (II) $r^2 = 0.9943$, mientras que la adsorción (q_e) fue mayor para cobre(II), 119.04 mgCu/g contra 81.96 mgCo/g, mientras que la tasa constante de velocidad de adsorción (K_s) fue similar para ambos metales. La tasa inicial de adsorción (h) fue superior para cobre(II) 41.30 contra 14.20 mg/g min correspondiente a cobalto(II) este valor coincide con los valores de adsorción posiblemente esta diferencia radica en la interacción inicial entre los metales y la biomasa de la cepa ZnZac.

La adsorción de cobre(II) y cobalto(II) ha sido estudiada utilizando distintas variedades de bioadsorbentes. Microorganismos como algas, partes de plantas, y así como biomasa fúngica y

bacteriana han sido utilizados como materia prima ya que son capaces de realizar la sorción de diferentes especies de iones metálicos en soluciones acuosas (Tabla 11) (Naja *et al.*, 2007).

Tabla 11 Comparación de diferentes bioadsorbentes utilizados para la remoción de cobre(II). Modificado de (Naja *et al.*, 2007).

Metal	Bioadsorbente	Condiciones de Operación		Capacidad de bioadsorción q (mg/g)
		Concentración inicial (mM)	pH	
Cu	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1.56	6	60.94
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	0.78	4.5	7.32
	<i>Chlorella vulgaris</i>	1.57	4.5	40.0
	<i>Synechocystis sp.</i>	1.57	4.5	23.40
	<i>Bacillus sp.</i>	3.14	5	16.25
	<i>Sargassum vulgare</i>	0.16-3.9	4.5	59.1
	Cepa ZnZac	5	6.5	119.04
	Cepa OC4	2.5	6.5	83.33

Las cepas ZnZac y OC4 obtuvieron un capacidad de adsorción de cobre superior comparada con los valores reportados utilizando otros bioadsorbentes (Tabla 11).

En cuanto a valores reportados de adsorción de cobalto bioadsorbentes como *Ascophyllum nodosum*, una microalga café, alcanzó 100 mg/g y *Saccharomyces cerevisiae* 4.7 mg/g (Volesky and Holant, 1995).

7.6.2. Isotermas de adsorción

7.6.2.1. Capacidad de bioadsorción de cobre(II) y cobalto(II) de la biomasa de la Cepa OC4 .

En la Isoterma de equilibrio de absorción de cobre(II) por la biomasa de OC4 la cantidad de cobre(II) adsorbido por unidad de masa de OC4 (mg/g) aumentó de manera lineal con respecto al incremento en la concentración inicial de cobre(II) en solución (Figura 35). La biomasa presentó porcentajes de adsorción entre 60.9% y 88.6%. La tendencia de la capacidad de adsorción aumentó de manera proporcional a la concentración inicial del metal (Figura 35).

Para ayudar a describir el sistema de adsorción en el equilibrio se utilizaron los modelos de Langmuir, Freudlich y Dubinin-Radushkevich en su forma lineal (Ec. 7, 8 y 9). También se obtuvo la constante R_L (Ec. 10), constante adimensional que representa la reversibilidad del proceso de adsorción (Es la ordenada en el origen, b, del modelo de langmuir).

$$\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{bq_m}\right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\ln q = \ln k_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (\text{Ec. 8})$$

$$\ln q_e = \ln q_m - B \varepsilon^2 \quad (\text{Ec. 9})$$

$$R_L = \frac{1}{1+bC_i} \quad (\text{Ec. 10})$$

Para obtener las constantes de adsorción de cada ecuación se graficaron los datos experimentales (Figura 37). Con la ecuación de cada gráfica fue posible obtener cada uno de las constantes de adsorción (**Tabla 12**).

Con los valores de las constantes de adsorción de cobre(II) se determinó la capacidad de adsorción teórica (q), la cual se graficó y comparó con los valores experimentales (Figura 35). Al comparar la tendencia de los modelos con los datos experimentales los primeros cuatro puntos presentan un comportamiento similar, sin embargo a partir del quinto punto, aproximadamente 600 mgcu/L, los valores se separan. Los valores de adsorción tanto Langmuir y Freundlich están por debajo de los valores experimentales, conforme aumenta la concentración inicial de cobre en el medio. Sin embargo, con el modelo de Freundlich se obtuvieron valores más cercanos a los valores experimentales.

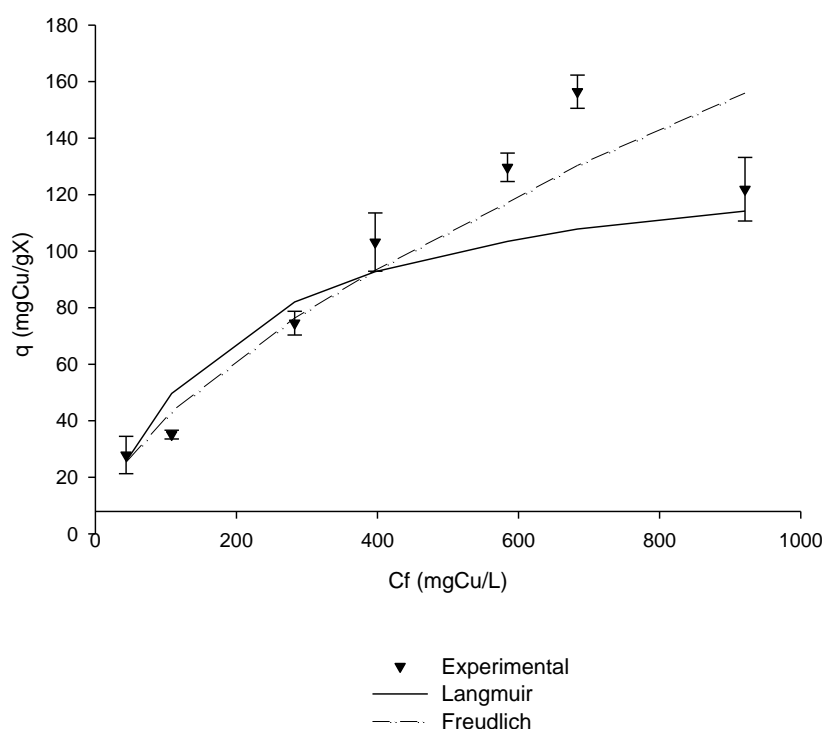


Figura 35 Isoterma de adsorción de cobre(II) utilizando la cepa OC4. T=22°C, pH= 6.5.

Para la cepa OC4 con cobalto(II) se utilizaron concentraciones desde 1mM (62.5 mgCo/L) hasta 15 mM (937.5 mgCo/L). Obteniendo una disminución de concentración de cobalto de 69% hasta 90% (Figura 36). La capacidad de adsorción aumentó al incrementar la concentración inicial. Sin embargo no linealmente, entre las concentraciones de 200 y 400 mgCo/L se observó una variación en la capacidad de adsorción fuera de la tendencia, que muestran las otras concentraciones, sin embargo la tendencia indica la correlación directa entre la capacidad de adsorción y la concentración inicial de cobalto en el medio. Los valores calculados del modelo de Freundlich presentan una predicción más cercana a los valores experimentales.

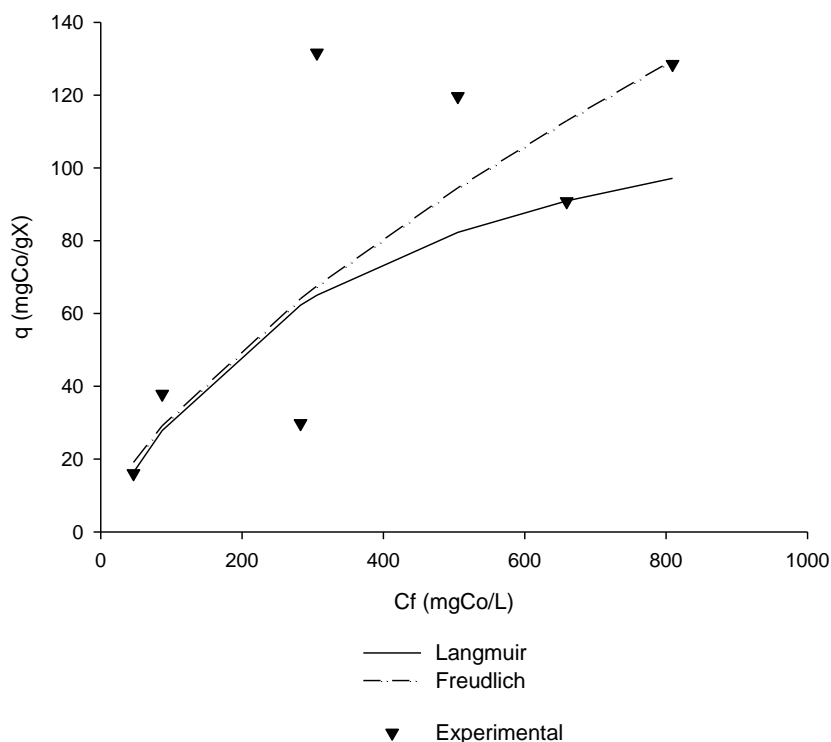


Figura 36 Isoterma de adsorción de cobalto(II) utilizando la cepa OC4. T=22°C, pH= 6.5

Con la finalidad de obtener los parámetros de las Isotermas de adsorción de cobre y cobalto de la cepa OC4 se emplearon los modelos de Langmuir y Freundlich (Figura 37). El ajuste de los valores experimentales de adsorción de cobre(II) por la Cepa OC4 al modelo de Freundlich, $r^2=0.9385$ fue mejor que el obtenido con el modelo de Langmuir $r^2=0.8844$. Sin embargo la tendencia en ambos modelos es muy similar.

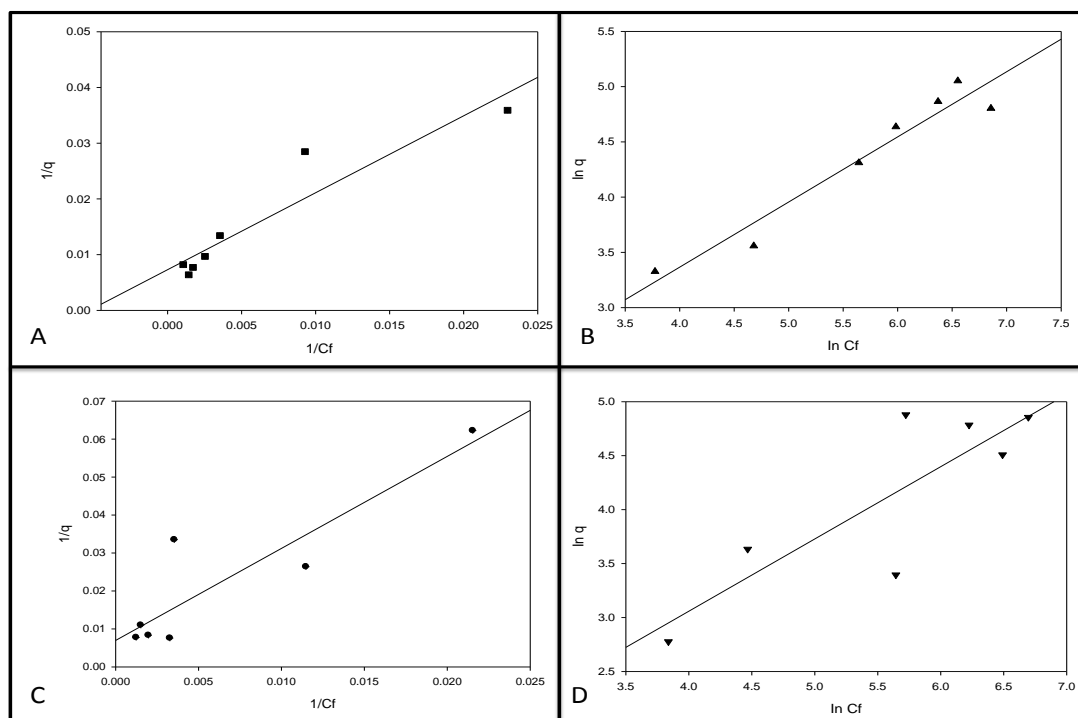


Figura 37 Modelos de Isotermas en forma lineal para la adsorción de cobre y cobalto para la cepa OC4. A)Langmuir-Cu. B)Freudlich-Cu.C)Langmuir-Co.D)Freudlich-Co.

Con los valores de las constantes de adsorción (Tabla 12) fue posible obtener una capacidad de adsorción (q) teórica la cual se graficó y comparó con los valores experimentales (Figura 35 y Figura 36).

Utilizando el modelo de Langmuir se obtuvo un coeficiente de afinidad (b) al cobre de 0.00528 mientras que para cobalto fue de 0.00288, así como una capacidad de adsorción máxima (q_{mx}) de 136.98 mg/g para cobre, ligeramente menor que la obtenida para cobalto de 142.8 mg/g. Estos datos sugieren que aun cuando la afinidad entre la biomasa de OC4 y el cobalto es mayor, la capacidad de adsorción máxima calculada mediante el modelo de Langmuir es cercana para ambos metales.

El modelo de Freundlich, con el que se obtuvo un mejor ajuste, proporcionó una capacidad de adsorción máxima (q_{mx}) de 155.9 para cobre y 129.54 para cobalto, a diferencia de los valores obtenidos por el modelo de Langmuir, en este caso la capacidad máxima de adsorción calculada fue ligeramente mayor para cobre. Las constantes de Freundlich de unión (k) fue mayor para cobre que para cobalto 2.74 y 0.46 respectivamente valores que coinciden con la afinidad obtenida ($1/n$) fue menor para cobre, 0.5895 y 0.6697 para cobalto.

7.6.2.1. Capacidad de bioadsorción de cobre(II) y cobalto(II) de la biomasa de la Cepa ZnZac.

La adsorción de cobre(II) es mejor representada por el modelo de Freundlich linealizado (EC. 8) , con un coeficiente de correlación $r^2=0.9782$ mientras que con Langmuir fue de $r^2= 0.9077$. Los valores obtenidos a partir de la linealización de los datos experimentales (Figura 40).

Con cobalto(II) los valores de correlación entre los modelos de Langmuir y Freundlich fueron $r^2=0.994$ y $r^2=0.990$ respectivamente. Al graficar los valores calculados de capacidad de adsorción para ambos modelos, el modelo de Langmuir se acerca más a los valores experimentales. (Figura 38 y 39).

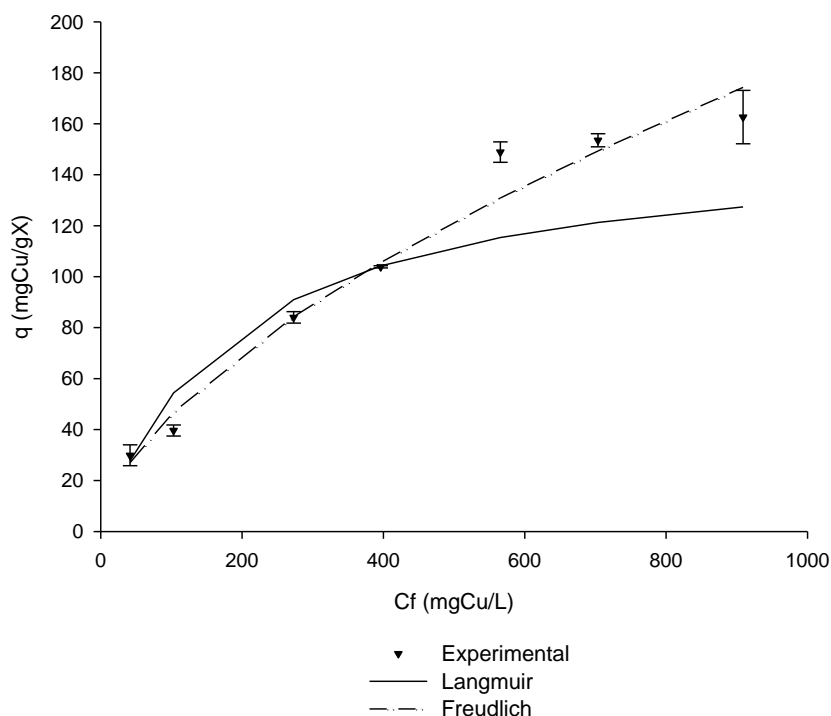


Figura 38 Isooterma de adsorción de cobre(II) utilizando la cepa ZnZAc. T=22°C, pH= 6.5.

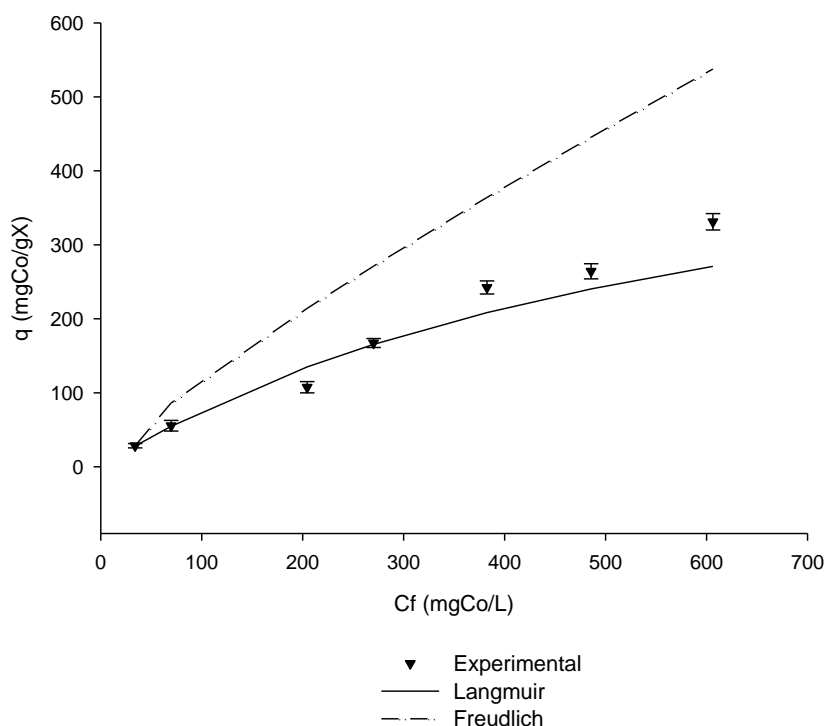


Figura 39 Isoterma de adsorción de cobalto(II) utilizando la cepa ZnZac. T=22°C, pH= 6.5

Los parámetros de adsorción de ZnZac indican que para cobre(II), utilizando el modelo de Langmuir, se obtuvo una capacidad máxima (q_{max}) de adsorción de 153.84mg/g, mientras que para cobalto la adsorción máxima calculada fue de 555.5mg/g, este valor superior de adsorción indica que la cepa ZnZac tiene un límite mayor de sitios de unión a cobalto que a cobre. Con valores de afinidad (b) de 0.0053 para cobre y 0.00157 para cobalto (Tabla 12).

De igual manera, utilizando el modelo de Freudlich se obtuvo una capacidad máxima (q_{max}) calculada, mayor para cobalto que para cobre, 537.55 mg/g y 174.29 mg/g respectivamente. La constante de unión de metal y biomasa (k) fue mayor para cobre 2.845 contra 1.433 de cobalto, en cuanto a la constante de afinidad (1/n) fue menor para cobre que para cobalto 0.6041 y 0.8464 respectivamente (Tabla 12).

De acuerdo a estos valores el cobalto(II), ocupa los mayores sitios de unión en la cepa ZnZac que de cobre(II) a demás de que es un proceso restringido en monocapa sugiere el modelo de Langmuir y que a su vez estos sitios son ocupados con una distribución de afinidad, siendo ocupados primero los de mayor afinidad sugiere el modelo de Freundlich.

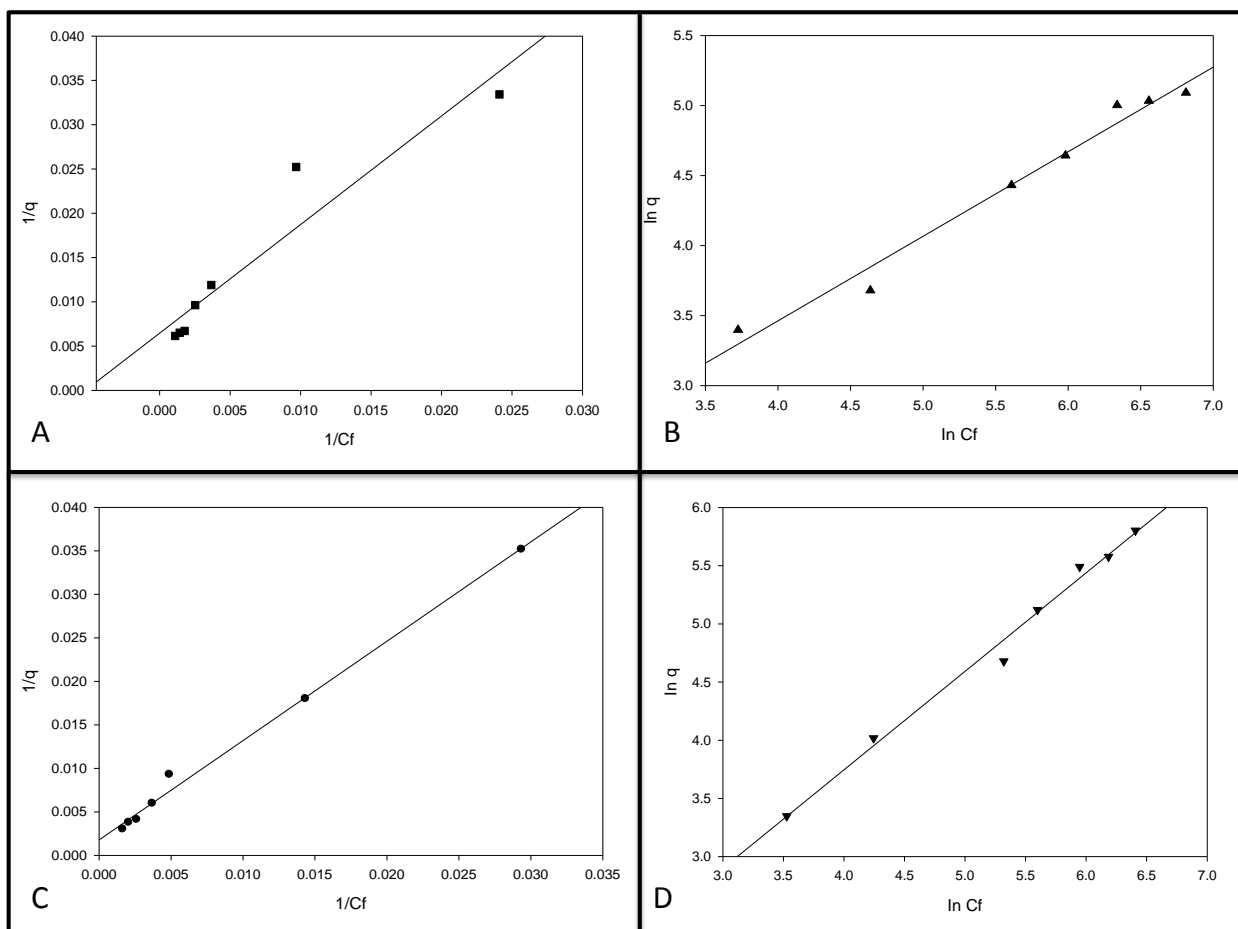


Figura 40 Modelos de Isotermas en forma lineal para la adsorción de cobre y cobalto para la cepa ZnZac. A)Langmuir-Cu. B)Freudlich-Cu.C)Langmuir-Co.D)Freudlich-Co.

Las adsorciones más altas calculadas con el modelo de Dubinin-Radushkevich fueron 375.44 y 363.21 mg/g para cobre(II) y cobalto(II) utilizando la cepa OC4. 481 y 1316.19 mg/g para cobre(II) y cobalto(II) con la cepa ZnZac (tabla 12). Sin embargo, estos valores sobre estiman los obtenidos experimentalmente, posiblemente se deba a que este modelo, relativamente simple, se fundamenta en la teoría del potencial de Polanyi la cual considera que existe un campo de potencial en la superficie de un sólido, en la cual las moléculas del adsorbato “caerían” desde un punto dado situado a una distancia b hasta la superficie. Las capas adsorbidas se asemejarían ala atmosfera de un planeta en el sentido de que las capas mas comprimidas serían las más cercanas a la superficie. Al igual que el proceso de llenado de un líquido en una botella, por lo que se desecha el concepto de superficie específica por carecer de sentido físico (Martínez, 1990).

Tabla 12 Constantes de las Isotermas de adsorción de cobre(II) y cobalto(II). Con las cepas OC4 y ZnZac.

Modelo	OC4-Cu	OC4-Co	ZnZac-Cu	ZnZac-Co
Langmuir				
q _{max}	136.98	142.8	153.84	555.5
b	0.00528	0.00288	0.0053	0.00157
r ²	0.8844	0.8099	0.9077	0.994
Freudlich				
q _{max}	155.9	129.54	174.29	537.55
1/n	0.5895	0.6697	0.6041	0.8464
K _f	2.740	0.4621	2.845	1.433
r ²	0.9385	0.712	0.9782	0.990
Dubinin-Radushkevich				
q _{max}	375.440	363.21	418.844	1316.19
B	8x10 ⁻⁹	1x10 ⁻⁸	9x10 ⁻⁹	1x10 ⁻⁸
r ²	0.934	0.9338	0.9657	0.9824
Reversibilidad del proceso				
R _L	0.813	0.880	0.819	0.949

Por otro lado con el modelo de Langmuir se obtuvieron capacidades de adsorción máxima en el equilibrio de de 136 y 142.8 mg/g de cobre(II) y cobalto(II) respectivamente, para la cepa OC4 y 153.84 y 555.5 mg/g de cobre(II) y cobalto(II) utilizando la cepa ZnZac. Este modelo asume que la superficie del sólido presenta un número finito de sitios idénticos y con una energía uniforme, además de que no existe interacción entre los adsorbentes, lo cual implica que la cantidad de bioadsorbente no es un parámetro significativo en la tasa de adsorción, y también plantea la formación de una monocapa cuando la superficie del sólido está saturada (Naja *et al.*, 2007).

Utilizando el modelo de Freundlich la adsorción en el equilibrio calculada para la cepa OC4 fue de 155.9 y 129.54 mg/g para cobre(II) y cobalto(II) respectivamente. La cepa ZnZac presentó una adsorción de 174.29 para cobre(II) y 537.55 para cobalto(II), similar a la calculada con el modelo de Langmuir.

A diferencia de los otros dos modelos, Freundlich tiene un origen de naturaleza empírica, posteriormente interpretado como una distribución basada en la afinidad por sitios de unión del adsorbato al sorbente, asumiendo que los sitios con mayor afinidad serán ocupados primero y que la adsorción disminuye de manera que estos sitios son ocupados. Sugiriendo una distribución de tipo normal $\text{Log}(K)$ en la cual la constante k se relaciona con la máxima capacidad de unión y n con la afinidad o fuerza vinculante. Al comparar los valores de k para ambos metales con la cepa OC4, esta fue 5 veces mayor para el cobre(II) que para el cobalto(II) Mientras que para la cepa ZnZac la k para el cobre(II) fue el doble respecto a la de cobalto(II) (Tabla 12).

Los valores de las constantes de reversibilidad del proceso (R_L) permiten saber si los procesos de adsorción son favorables o desfavorables de acuerdo a la siguiente clasificación:

- $R_L > 1$ Desfavorables
- $R_L = 1$ Lineal
- $0 < R_L < 1$ Favorable
- $R_L = 0$ Irreversible

Todos los valores de R_L obtenidos caen sobre los procesos de adsorción favorables, además como se mencionó anteriormente R_L también da información sobre la reversibilidad del proceso. Una alta afinidad entre el sorbato y el adsorbente presenta valores bajos de R_L mientras que valores altos de R_L indican que el proceso puede ser reversible (Jong and Parry, 2004).

7.7. Análisis filogenético

7.7.1. Amplificación del gen 16S rDNA

Para identificar las cepas ZnZac y OC4 se amplificó el gen 16S ribosomal. La amplificación del gen, de un tamaño aproximado de 1500 pb, se realizó mediante la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) utilizando iniciadores (oligonucleótidos) específicos. Los productos obtenidos se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa, obteniendo los fragmentos correspondientes al gen 16S de tamaño aproximado de 1500 pb (Figura 41A).

Las reacciones de secuenciación suelen ser poco eficaces para fragmentos superiores a 1000 pb (Müller-Esterl, 2008), por lo que fue necesario, para la obtención de la secuencia completa del gen 16S, amplificar fragmentos internos del gen de menor tamaño (Figura 41 B), utilizando iniciadores correspondientes a dos regiones internas, de un tamaño de 900 y 600 pb (Ríos, 2010) Se utilizó como control positivo una cepa de *E. coli*. Los productos obtenidos, presentaron los tamaños esperados para cada cepa incluyendo el control positivo, dichos fragmentos fueron purificados y secuenciados.

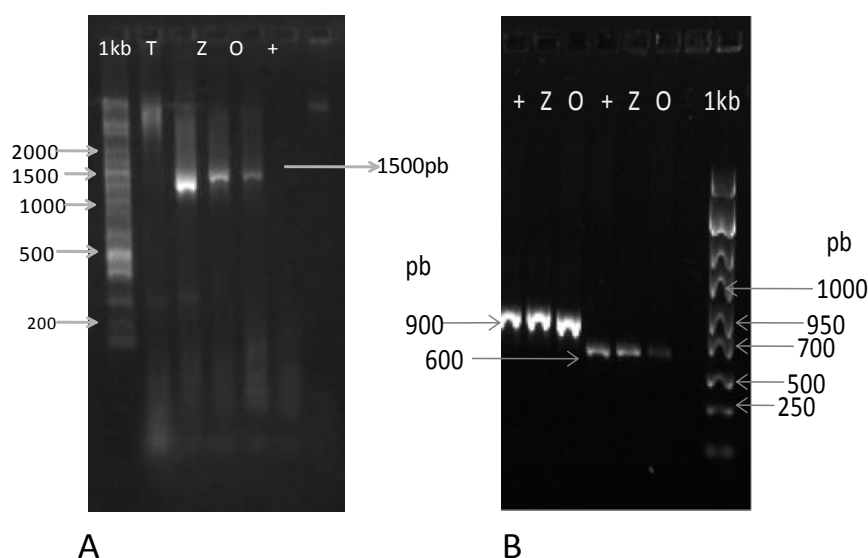


Figura 41 Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del gen 16s. A) fragmento de 1500pb. (izq. A der.)1Kb; marcador de peso molecular . T ; ADN molde Znzac. Z; cepa Znzac. O; cepa oc4. +; control positivo .b) fragmentos internos de 900 y 600 pb (izq. A der.) Z, cepa Znzac; o; cepa OC4.

7.7.1.1. Relación filogenética de la Cepa ZnZac

Con las secuencia completa del gen 16S la cepa ZnZac se analizó por similitud por medio del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information). Con la comparación obtenida fue posible construir el árbol filogenético de la cepa ZnZac (Figura 42), utilizando el software MEGA 4 y ClustalX2 (Li,

2011) Por otro lado la cepa ZnZac obtuvo una homología del 99% con *Delftia tsuruhanensis* (Número de acceso EF421404.1).

El género *Delftia* es una β -proteobacteria perteneciente al género *Pseudomonas* (Chuang *et al.*, 2007). Son bacterias Gram-negativas no esporuladas, positivas a la reducción de nitrato, citocromo oxidasa y catalasa (Hongpattarakere *et al.*, 2005).

En particular las cepas de *Delftia tsuruhanensis* han sido aisladas de ambientes extremos como suelos industriales contaminados de residuos textiles, siendo utilizadas para la degradación de compuestos como anilina, debido a la presencia de genes que codifican enzimas utilizadas en rutas como la de catecol (Yong and Zhong, 2010). También ha sido utilizada en la producción de enzimas amidasas las cuales son de interés industrial (Zheng *et al.*, 2007).

Distintos autores señalan la cercanía entre *Delftia tsuruhanensis* y *Delftia acidovorans*, motivo por el cual anteriormente *Delftia tsuruhanensis* fue identificada como *Delftia acidovorans*. sin embargo, Shigematsu *et al.*, 2007 identificaron a *Delftia tsuruhanensis* como otra especie, señalando diferencias entre ambas (Liang *et al.*, 2005).

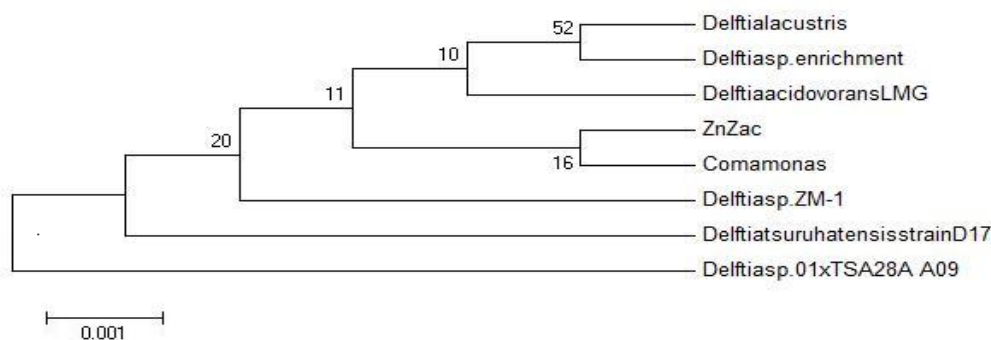


Figura 42 Árbol filogenético de la cepa ZnZac, utilizando secuencias del gen 16S con base a la taxonomía del GenBank. (NCBI). Utilizando el método neighbor joining (NJ). Con valores de Bootstrap de 500 replicaciones.

Existen datos de cepas del género *Delftia*, que en presencia de metales presentan inhibición de algunas reacciones enzimáticas. Por ejemplo en *Delftia acidovorans* la amidasa (enzima intracelular constitutiva) reduce notablemente su actividad, entre 42 y 97%, en la presencia de CoCl_2 y CuCl_2 (Hongpattarakere *et al.*, 2005) No existen reportes de especies resistentes a cobre y cobalto del género *Delftia sp.*

7.7.1.2. Relación filogenética de la Cepa Cepa OC4

Siguiendo el mismo procedimiento fue analizada la secuencia del gen 16S correspondiente a la cepa OC4 y se construyó un árbol filogenético comparando con la taxonomía del GenBank de la NCBI (Figura 43). La cepa OC4 fue identificada como perteneciente al género de *Microbacterium* de la clase *Actinobacterium*. Algunas de las características de estas bacterias es que pueden presentar o no micelio así como un contenido de G+C en ADN menor a 55%. Por otro lado basandose en el análisis filogenéticos del gen 16S se han logrado identificar 110 géneros de Actinobacterias. La identificación del género *Micobacterium* puede basarse en la morfología celular, combinada con características quimiotaxonómicas principalmente a la composición de aminiácidos de peptidoclicana, una forma de distinguir el género *Micobacterium* es la presencia de ornitina en la pared celular. La variación de la composición de elementos de pared celular varía entre cada especie de este género lo que puede ser de utilidad para distinguir a cada especie, sin embargo no es fácil seleccionar la características de crecimiento y mantener las características fisiológicas que permitan obtener un resultado sin ambigüedad. El actual género de *Microbacterium* alberga 33 especies (Dworkin *et al.*, 2006).

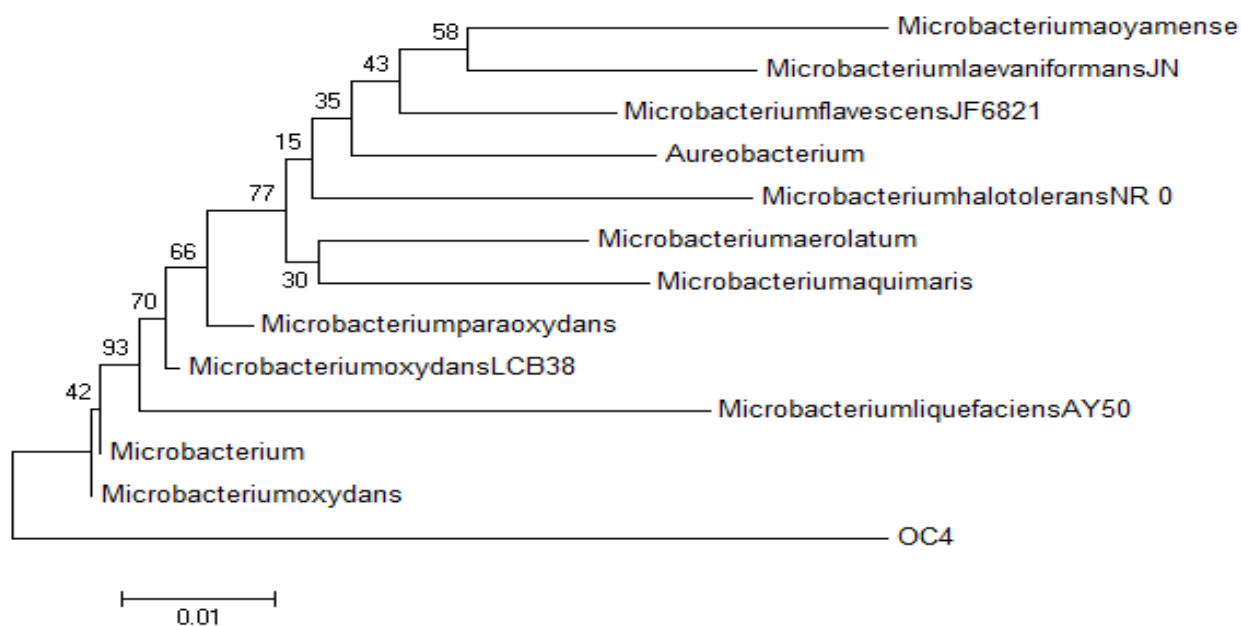


Figura 43 Árbol filogenético de la cepa OC4, utilizando secuencias del gen 16S con base a la taxonomía del GenBank. (NCBI). Utilizando el método neighbor joining (NJ). Con valores de Bootstrap de 500 replicaciones.

Schumann *et al.*, en 1999 realizaron una investigación quimio-taxonómica y filogenética utilizando el gen 16S de *Brevibacterium oxydans*. Los estudios revelaron la cercanía de esta cepa con diferentes tipos de *Microbacterium*, ocasionando una reclasificación de *Brevibacterium oxydans* como *Microbacterium oxydans*. *Microbacterium* ha sido aislada de

distintos ambientes los cuales incluyen aire, suelos, agua, plantas e insectos por mencionar algunos. Entre estos hábitats se encuentran ambientes extremos que presentan concentraciones altas de metales. *Microbacterium profundum* fue aislada de sedimentos de aguas profundas situadas en nódulos polimetálicos (Wu *et al.*, 2008)

Por otro lado cepas de *Microbacterium oxydans* son capaces de interactuar con metales como el níquel. Ya que intervienen en la captación de este metal y su solubilización en suelos enriquecidos con níquel. Esta cepa fue aislada de la rizosfera de *Alyssum murale*, una planta hiperacumuladora de níquel. Esta bacteria puede ser utilizada en procesos de fitorremediación (Abou-Shanaba *et al.*, 2006).

Existen distintos estudios que tratan de relacionar los mecanismos de resistencia bacteriana con genes que regulan la producción de proteínas y enzimas que intervienen en estos procesos. Los genes *copA* y *czcD* han sido amplificados en distintas cepas bacterianas que presentan propiedades de resistencia a cobre y cobalto respectivamente (Nies, 2003, Rensing *et al.*, 2000).

Se mandaron sintetizar oligonucleótidos para la amplificación de los genes *copA* y *czcD*, de tamaños esperados entre 1200 y 599 respectivamente (Lejon *et al.*, 2007, Nies *et al.*, 1989). Después de la amplificación se evaluaron los fragmentos obtenidos. Los productos amplificados presentaron distintos tamaños con productos inespecíficos, posiblemente debido al origen degenerado de los iniciadores y algunos factores como la cantidad de magnesio o variaciones en la temperatura de alineamiento pueden intervenir en la amplificación de fragmentos inespecíficos.

8. CONCLUSIONES

La cepa ZnZac presentó una CMI de 1.5 mM de CoCl_2 . Este valor la ubica como una bacteria moderadamente resistente. y de 2 mM para cobre. La cepa OC4 presentó una CMI de 1 mM para ambos metales.

La cepa ZnZac dio positivo en la prueba de acumulación de cobalto y negativo para cobre en resultado que se evaluó por la aparición de halos alrededor en un cultivo sólido enriquecido con metal y sometido a una atmosfera de H_2S . Este resultado indica que ZnZac bajo las mismas condiciones presenta un comportamiento diferente con cada metal estudiado. OC4 dio negativo para ambos metales en la misma prueba.

ZnZac dio negativo en la prueba de O-CAS para la detección de producción de sideróforos. En los cultivos de OC4 la prueba fue positiva para sideróforos del tipo carboxilato.

Ninguna de las dos cepas formó nanopartículas de cobre ni cobalto. Sin embargo, ambas cepas formaron nanopartículas de plata con distribución uniforme sobre la superficie bacteriana y tamaños entre 10-50 nm. Sin embargo la microscopía electrónica demostró la existencia de una interacción entre la cepa ZnZac y ambos metales. Del a cepa OC4 presentó agregados, identificados como de cobre y cobalto.

La Cepa OC4 adsorbió una mayor cantidad de cobre en el equilibrio que de cobalto. Alcanzado una disminución del 40% de cobre n después de 180 min de contacto y en cobalto 34.5% en 300 min. El modelos de la cinética tuvo un comportamiento de pseudo segundo orden con una correlación de $r^2 = 0.964$ para la adsorción de cobre y de $r^2 = 0.9101$ para cobalto. Utilizando el modelo de pseudo segundo orden ZnZac obtuvo una capacidad de adsorción en el equilibrio mayor de cobre que de cobalto 119.04 y 81.96 mg/g respectivamente las tasas de adsorción fueron similares con ambos metales; sin embargo la velocidad de adsorción (h) fue mayor para el cobre 41.30 mg/g min contra 14.20 mg/g min para cobalto. Ambas cepas son candidatas para su utilización en procesos remediación o recuperación de cobre ya que superan los valores reportados de capacidad de adsorción con otros bioadsorbentes (Volesky and Holant, 1995, Naja et al., 2007).

Los resultados de las Isotermas de adsorción de cobre y cobalto utilizando cada cepa, mostraron que existe una tendencia de incremento de la capacidad de adsorción al incrementar la concentración inicial.

La adsorción en el equilibrio de cobre y cobalto por las cepas OC4 y ZnZac puede representarse bajo el modelo de Freundlich, sugiriendo que los sitios de mayor afinidad en la biomasa son los primeros en ocuparse.

OC4 presentó una mayor afinidad por cobre que por cobalto; mientras que ZnZac obtuvo mayor afinidad para cobalto que para cobre. Ambos valores coinciden con las capacidades de adsorción máximas calculadas q_{max} .

Los valores de la constante de reversibilidad (R_L) sugieren que se puede recuperar el metal adsorbido en la biomasa y que esta puede ser reutilizada. Factor que favorece el uso de este tipo de biadsorbentes.

Se construyó el árbol filogenético de la cepa ZnZac. La cepa se ubicó como parte del género *Delfia* sp. Con un 99% de homología con *Delftia tsuruhanensis*. En el caso de la cepa OC4 se encontró una filogenia relacionada con el género de *Microbacterium* sp. con 100% de homología con *Microbacterium oxydans*. En esta última se han identificado los genes copA y czcD relacionados con la resistencia a altas concentraciones de cobre y cobalto. Aun cuando la identificación filogenética proporciona gran información sobre la identidad de los microorganismos es necesaria la realización de pruebas bioquímicas que acompañen estos resultados.

9. REFERENCIAS

- ABOU-SHANAB, R. A. I., BERKUM, P. V. & ANGLE, J. S. 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, 68, 360-367.
- ABOU-SHANABA, R. A. I., ANGLEB, J. S. & CHANEYC, R. L. 2006. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2882-2889.
- AHMAD, A., MUKHERJEE, P., SENAPATI, S., MANDAL, S., KHAN, D. & KUMAR, M. I. 2003a. Extracellular biosynthesis of nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surfaces B*, 28, 313-318.
- AHMAD, A., SATYAJYOTI, S., KHAN, M. I., RAJJV, K., RAMANI, R., SRIVNIVAS, V. & MURALI, S. 2003. Intracellular synthesis of gold nanoparticles by novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species *Nanotechnology*, 14, 824-828.
- AKSU, Z. & DÖNMEZ, G. 2000. The use of molasses in copper(II) containing wastewaters: effects on growth and copper(II) bioaccumulation properties of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochem* 36., 451-8.
- ANDREAZZA, R., PIENIZ, S., WOLF, L., LEE, M.-K., CAMARGO, F. A. O. & OKEKE, B. C. 2010. Characterization of copper biosorption and bioreduction by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. *Science of the Total Environment*, 408, 1501-1507.
- BAUTISTA, D. A. 2008. *bioadsorción de Zinc y Plomo mediante el uso de Biomasa bacteriana aislada de jales mineros*. Maestro en ciencias en desarrollo sostenible, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey Campus Estado de México.
- BAUTISTA, F. 1999. Formas químicas de algunos metales en el suelo. In: YUCATÁN, U. A. D. (ed.) *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados*. Mérida Yucatán, México.
- BI, Y., HESTERBERGA, D. L. & DUCKWORTH, O. W. 2010. Siderophore-promoted dissolution of cobalt from hydroxide minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74, 2915-2925
- BLINDAUER, C. A., HARRISON, M.D., PARKINSON, J.A., ROBINSON, A.K., CAVET, J.S., ROBINSON, N.J. AND SADLER, P.J. . PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (200 2001. A metallothionein containing a zinc A. niger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9593-9598.
- BOSE, P., BOSE, M. A. & KUMAR, S. 2002. Critical evaluation of treatment strategies involving adsorption and chelation for wastewater containing copper, zinc and cyanide. *Advances in Environmental Research*, 7, 179-195.
- BOTELLO, L., GARZA, T., GÓMEZ, I. & HINOJOSA, M. 2007. Biosíntesis de nanopartículas de Zns utilizando cepas de hongos. *Ingenierías*, 10, 16-22.
- BOURDELANDE, J. L., NOELL, S. & ACUÑA, U. 1996. *Glosario de términos usados en fotoquímica: recomendaciones IUPAC*.
- BRAUD, A., J'EZ'QUEL, K. & LEBEAU, T. 2007. Impact of substrates and cell immobilization on siderophore activity by *Pseudomonads* in a Fe and/or Cr, Hg, Pb containing-medium. *Journal of Hazardous Materials*, 144, 229-239.
- BUITRAGO, J. M. G. D. 2010. Técnicas espectrocópicas. Métodos de cuantificación In: MASSON, E. (ed.) *Técnicas y métodos de laboratorio clínico* 3er ed.
- BURNAT, M., DIESTRA, E., ESTEVE, I. & SOLE', A. 2010. Confocal Laser Scanning Microscopy Coupled to a Spectrofluorometric Detector as a Rapid Tool for Determining the In Vivo Effect of Metals on Phototrophic Bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84, 55-60.
- COLL-HURTADO, M. T. S. S., JOSEFINA MORALES 2002. *La minería en México*, México ISBN: UNAM 970320137, Instituto de Geografía UNAM.
- COTTON, A. 1969. Cobalt. *Química inorganica avanzada*. México: Limusa-Wiley.

- CRIST, R. H., MARTIN, J.R., CARR, D., WATSON, J.R., CLARKE, H.J. AND CRIST 1994. Ion exchange vs adsorption models and a reassessment of Scatchard plots. *Envir. Sci. Technol.* 28, 1859-1866.
- CRUZ, G. 2008. *Remoción de metales por microorganismos productores de polisacáridos*. Maestría en tecnología avanzada, CICATA.
- CHA, J. & COOKSEY, D. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 8915–8919.
- CHEN, P., WU, Q.-S. & DING, Y.-P. 2007. Facile synthesis of monodisperse silver nanoparticles by bio-template of squama inner coat of onion *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 207-213.
- CHOJNACKA, K. 2010. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environment International*, 36, 299–307.
- CHUANG, H.-P., IMACHI, H., TANDUKAR, M., KAWAKAMI, S., HARADA, H. & OHASHI, A. 2007. Microbial Community that Catalyzes Partial Nitrification at Low Oxygen Atmosphere as Revealed by 16S rRNA and amoA Genes. *Bioscience and bioengineering* 104, 525-528.
- D. SOMMER & GOLLA-SCHINDLER, U. 2008. Electron microscopy for the characterization of nanoparticles. *Materials Science*, 2, 265–266.
- D'ANGELO, Y. T. G., PÉREZ, O. C., VÁZQUEZ, L. A. & FERNÁNDEZ, C. M. H. 2001. Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. *CENIC Ciencias biológicas*, 33, 27-31.
- DAI, X., SUN, Y., GAO, Z. & JIANG, Z. 2009. Copper Enhances Amyloid- β Peptide Neurotoxicity and non β -Aggregation: A Series of Experiments Conducted upon Copper-Bound and Copper-Free Amyloid- β Peptide. *Journal Molecular Neuroscience*
- DIMKPA, C. O., MERTEN, D., SVATOS, A., CHEL, G. B. & KOTHE, E. 2009. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology & Biochemistry*, 41, 154-162.
- DREXLER, K. E. 1992. *Nanosystems, molecular machinery, manufacturing and computation*, New York.
- DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H. & STACKEBRANDT, E. 2006. Firmicutes with high GC content of DNA. In: SPRINGER (ed.) *the Prokaryotes*. New York.
- EITINGER, T., SUHR, J., MOORE, L., ANDREW, J. & SMITH, C. 2005. Secondary transporters for nickel and cobalt ions: Theme and variations *BioMetals*, 18, 399-405.
- FELDHEIM, D. L. 2002. Optical Properties of metal particles. In: INC., M. D. (ed.) *Metal Nanoparticles. Synthesis, Characterization and applications*. New York.
- FINKE, R. G. 2002. Transition-Metal Nanoclusters: solution-phase synthesis, the characterization and mechanism of formation, of polyoxoanion-and tetrabutylammonium-stabilized nanoclusters. *Metal nanoparticles, synthesis, characterization and applications*. New York.
- FORD, R. Y. M., T. 1992. Microbial transport of toxic metals. *Environmental Microbiology*, 84-85.
- GADD, G. M. 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 271-279.
- GERICKE, M. & PINCHES, A. 2006. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*, 83, 132-140.
- GIKAS, P. 2008. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 159, 187–203.
- GILBERT, O. 2001. Evaluación de materia orgánica como material para la utilización en barreras permeables reactivas In: ESPAÑA, I. G. Y. M. D. (ed.) *Las caras del agua subterránea*. Madrid.
- GOU, Z., HENRY, L. L. & PODLAHA, E. J. 2007. CoFe, Fe and Co displacement with Cu Ions. In: SOCIETY, E. (ed.) *Magnetic materials, Processes and devices 9*. New Jersey, USA.

- GRIMM, A., ZANZI, R., BJORNBOM, E. & B, A. L. C. 2007. Comparison of different types of biomasses for copper biosorption. *Bioresource Technology*, 99, 2559-2565.
- HASMAN, H., FRANKE, S. & RENSING, C. 2006. Resistance to metals used agricultural production *In: ASM-PRESS (ed.) Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* Washington.
- HASSAN, M.-E.-T., LELIE, D. V. D., SPRINGAEL, D., ROMLING, U., AHMED, N. & MERGEAY, M. 1999. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 238, 417-425.
- HAUSINGER, R. P. & ZAMBLE, D. B. 2007. Microbial Physiology of Nickel and Cobalt. *In: SPRINGER-VERLAG (ed.) Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Berlin.
- HINTZE, K. J. Y. T., E.C. 2006. Cellular regulation and molecular interactions on ferritins. *Cellular and molecular life science*, 5, 591-600.
- HO, Y. S. & MCKAY, G. 2000. The kinetics of sorption of divalent metal ions onto phagnum moss peat. *Water Resources*, 34, 735-742.
- HOLISTER, P., WEENER, J.-W., VAS, C. R. & HARPER, T. 2003. Nanoparticles. *Científica*, 3, 2-11.
- HOLMES, J. D., SMITH, P.R., EVANS-GOWING, R., RICHARDSON, D.J., RUSSELL, D.A., SODEAU, J.R., 1995. Energy-dispersive X-ray analysis of the extracellular cadmium sulfide crystallites of *Klebsiella aerogenes*. *Archives Microbiology*, 163, 143-147.
- HONGPATTARAKERE, T., KOMEDA, H. & ASANO, Y. 2005. Purification, characterization, gene cloning and nucleotide sequencing of D-stereospecific amino acid amidase from soil bacterium: *Delftia acidovorans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32, 567-576.
- INE, I. N. D. E. 1994. Importancia de la industria minería en México. México.
- IVANOV, A., GAVRJUSHKIN, A., KHASSANOVA, L., SIUNOVA, T. & KHASSANOVA, Z. 1998. Mechanism of resistance to cobalt in some *Pseudomonas* strains. *Metal Ions in Biology and Medicine*, 5, 172-178.
- JEORGER, R., KLAUS, T. & 2000. Biologically produced silver carbon composite materials for optically functional thin-film coatings *Advanced Materials*, 12, 407-409.
- JONG, T. & PARRY, D. L. 2004. Adsorption of Pb(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II), Fe(II), and As(V) on bacterially produced metal sulfides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 61-71.
- KAMMEV, A. A., ANTONNYUK, L. P., KULIKOV, L. A. & PERFILIEV, Y. D. 2004. Monitoring of cobalt(II) uptake and transformation in cells of the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* using emission Mössbauer spectroscopy. *BioMetals*, 17, 457-466.
- KATARZYNA, C. 2010. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environment International*, 299-307.
- KOMEDA, H., KOBAYASHI, M. & SHIMIZU, S. 1997. A novel transporter involved in cobalt transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 36-41.
- KUMAR, C. S. S. R. 2009. Metallic nanomaterials *In: -VCH, W. (ed.) Nanomaterials for the life sciences*.
- LARNEY, F. J., CESSA, A. J. & BULLOCK, M. S. 1999. Herbicide transport on wind-eroded sediment. *Environ. Qual.*, 28, 1412-1421.
- LEJON, D. P. H., NOWAK, V., BOUKO, S., PASCAULT, N. E., MOUGEL, C., MARTINS, J. M. F. & RANJARD, L. 2007. Fingerprinting and diversity of bacterial *copA* genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination. *FEMS Microbiol Ecology*, 61, 424-437.
- LI, R., HUANG, X.-L. & JIANG, Z.-T. 2008. Determination of trace amounts of cobalt in foods by polymer-phase fluorophotometry with thiamine. *Eur Food Res Technol*, 227, 111-116.
- LI, Y. 2011. *How to Build a Phylogenetic Tree* [Online]. Urbana-Champaign. Available: http://guava.physics.uiuc.edu/~nigel/courses/598BIO/498BIOonline-essays/hw2/files/hw2_li.pdf [Accessed 2011].
- LI, Y., A.DICK, W. & TUOVIEN, O. H. 2003. Evaluation of fluorochromes for imaging bacteria soil *Soil Biology & Biochemistry*, 35, 737-744.

- LIANG, Q., TAKEO, M., CHEN, M., ZHANG, W., XU, Y. & LIN, M. 2005. Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9. *Microbiology*, 151, 3435-3446.
- LOVLEY, D. R. Y. J. D. C. 1997. Bioremediation of metal contamination. *Current Opinion in Biotechnology* 285-289.
- LUO, J., CHAN, W.-B., WANG, L. & ZHONG, C.-J. 2010. Probing interfacial interactions of bacteria on metal nanoparticles and substrates with different surface properties. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, 549-556.
- MAGNANI, D. & SOLIOZ, M. 2007. How Bacteria Handle Copper. In: SPRINGER-VERLAG (ed.) *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Berlin
- MAJTAN, T., FRERMAN, F. E. & KRAUS, J. P. 2011. Effect of cobalt on *Escherichia coli* metabolism and metalloporphyrin formation. *BioMetals*, 24, 335-347.
- MANTI, A., BOI, P., FALCIONI, T., CANONICO, B., VENTURA, A., SISTI, D., PIANETTI, A., BALSAMO, M. & PAPA, S. 2008. Bacterial cell monitoring in wastewater treatment plants by flow cytometry *Water Environmental Resource*, 80, 346-354.
- MARTÍNEZ, B. I. 2008a. ADSORCIÓN Y FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y PLATA EN MICROORGANISMOS AISLADOS DE RESIDUOS MINEROS. México: Tecnológico de Monterrey.
- MARTÍNEZ, B. I. 2008b. *Adsorción y formación de nanopartículas de oro y plata en microorganismos aislados de residuos mineros* Maestro en Ciencias en desarrollo sostenible, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey
- MARTÍNEZ, J.-M. M. 1990. Teoría de Polanyi-Dibinin. In: ALICANTE, U. D. (ed.) *Adsorción física de gases y vapores por carbones*. Alicante.
- MAYER, G. 2010. *Antibiotics -Protein synthesis, nucleic acid synthesis and metabolism* [Online]. South Carolina. Available: <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/antibiot.htm> [Accessed].
- MCLAGGAN D, L. T., LYNN DG, EPSTEIN W 1990. Involvement of gamma-glutamyl peptides in osmoadaptation of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 172, 3631-3636
- MOUNTIHO, A. M. 2007. *microencapsulación de nanopartículas de quitosano para la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas*. Da doctorado Santiago Compostela.
- MÜLLER-ESTERL, W. 2008. Almacenamiento y expresión de la información hereditaria. In: REVERTÉ (ed.) *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida* Barcelona, España.
- MUÑOZ, J. 1986. *La minería en México. bosquejo histórico*, México, universidad Autónoma de México.
- NAJA, G., MURPHY, V. & VOLESKY, B. 2007. Biosorption Metals. *Wiley Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 35, 7-14.
- NARAYANAN, K. B. & SAKTHIVEL, N. 2011. Facile green synthesis of gold nanostructures by NADPH-dependent enzyme from the extract of *Sclerotium rolfsii*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 380, 156-161.
- NIES, D. H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 313-339.
- NIES, D. H., NIES, A., CHU, L. & SILVER, S. 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7351-7355.
- O, M. D. L., MEZA-FIGUEROA, D., MORENO, S. A., RIVERA-CASTELO, J. & CAMPILLO-RIVERA, J. A. 2009. Efectos de la erosión en la restauración de una zona minera con un clima semiárido caso particular Nacozari de García, Sonora, México XXVIII *Convención minera internacional Versión 28*, 515-525.
- PASTERNAK, A., KAPLAN, J., LEAR, J. D. & DEGRADO, W. F. 2001. Proton and metal ion-dependent assembly of a model diiron protein. *Protein science*, 10, 958-969.

- PÉREZ-MIRANDA, S., CABIROL, N., GEORGE-TÉLLEZ, R., ZAMUDIO-RIVERA, L. S. & FERNÁNDEZ, F. J. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 127-131.
- PETEK-CAKARA, Z., ALKİMA, C., TURANLI, B., TOKMANC, N., SÜLEYMAN AKMANC, SARIKAYA, M., TAMERLER, C., BENBADISE, L. & FRANCOIS, J. M. 2009. Isolation of cobalt hyper-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo evolutionary engineering approach. *Journal of Biotechnology*, 143, 130-138.
- PHILIP, D. 2009. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosasinensis*. *Physica E*, 42, 1417-1424.
- PHILIP, D. 2010. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. *Physica E*, 42, 1417-1424.
- PLIETH, W., DIETZ, H., ANDERS, A., SANDMANN, G., A. MEIXNER B, WEBER, M. & B, H. K. 2005. Electrochemical preparation of silver and gold nanoparticles: Characterization by confocal and surface enhanced Raman microscopy. *Surface Science*, 597, 119–126.
- POOLE, C. P. & OWENS, F. J. 2007. *Introducción a la Nanotecnología*
- PRIYRABRATA, M., AHMAD, A., DEENDAYAL, M., SATYAJYOTI, S. & SUDDHAKAR, R. S. 2001. Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis *Nano letters*, 1, 515-519.
- PUMPEL, T., PERNUF, B., PIGHER, B., DIELS, L. & SCHINNER, F. 1995. A rapid screening method for the isolation of metal-accumulating microorganisms. *Journal of Industry Microbiology*, 14, 213-217.
- PURI, S. 2004. Techniques for nanoparticles characterization *In: SCIENCE, A. (ed.) Modern physics: concepts and applications* Longowal.
- QUINTANA, R. M. 2008. Nanopartículas: principios y aplicaciones. *Ciencia y Desarrollo*, 34, 62-67.
- RAJ, J., VISWANATHAN, B. & 2011. Synthesis of cobalt nanoparticles with vegetable oil as the stabilizing agent. *Bulletin of the Catalysis Society of India*, 9, 6-12.
- RENSING, C., FAN, B., SHARMA, R., MITRA, B. & ROSEN, B. 2000. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 652–656.
- RÍOS, M. 2010. *Producción de inóculos para incrementar la producción de cultivos de Carica Papaya* Master Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
- ROH, Y. & MOON, H.-S. 2001. Microbial synthesis cobalt- substituted magnetite nanoparticles by iron reducing bacteria *Journal Miner. Soc. Korea*, 14, 111-118.
- ROSS, J. A. M. 2002. Minería. *Elementos a considerar para integrar la base política para la prevención de la contaminación del suelo y su remediación*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- SÁNCHEZ 1995. Manejo de residuos sólidos en minería. Aspectos Geológicos. UNESCO, 239-250.
- SÁNCHEZ, C. 2006. Microscopia confocal. *Servicio de Microscopía Óptica y Confocal*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- SEPEUR, S. 2008. *Nanotechnology: technical basics and applications*, Hannover.
- SHARMA, V. K., RIA A. YNGARD & LIN, Y. 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145, 83-96.
- SILVER, S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions-. *Gene*, 179, 9-19.
- SMITH, J. M. 1981. *Chemical engineering kinetics*, New York.
- SOLANO, A. 2006. *Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del cinc*. Universidad de Murcia.
- SONG, X. C., WANG, X., ZHENG, Y. F., MA, R. & YIN, H. Y. 2010. Synthesis and electrocatalytic activities of Co₃O₄ nanocubes. *Journal Nanoparticle Research*.
- SUÁREZ, P. Y. R. R. 2002. La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 27, 160-164.
- TERLIEN, M. T. 1998. The determination of statistical and deterministic hydrological landslide-triggering thresholds. *Environmental Geology*, 35, 124-130.

- THOMAS, D. 1996. the separation of the elements. *A manual for the chemical analysis of metals*. Ann Harbor, MI: American Society of Testing Materials.
- UNZ, R. Y. S. 1996 Microbial mobilization and immobilization of heavy metals *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 307-310
- URPÍ, C. U. 2004. *Análisis genómico y proetómico de los mecanismos de captación de hierro en Aeromonas mesófilas*. Doctorado, Universidad de Barcelona.
- VALLS, M. & LORENZO, V. D. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 327-338.
- VALLS, M. V. D. L. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution *FEMS Microbiology Reviews* 26, 327-338
- VARSHEY, R., BHADAHURIA, S., GAUR, M. S. & PASRICHA, R. 2011. Copper nanoparticles synthesis from electroplating industry effluent *Nano Biomedical Engineering*, 3, 115-119.
- VOLESKY, B. & HOLANT, Z. R. 1995. Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnology Progress*, 11, 235-250.
- VOLKE, T., VELASCO, J. A. & ROSA, D. D. L. 2005. La contaminación de suelos por metales y metaloides. In: NATURALES, S. D. M. A. Y. R. (ed.) *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación* México D.F. .
- WILLIAMS, F. 2007. Espectrometría de luminiscencia molecular.
- WINKELMANN, G. 1990. Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi *Biotechnology Advances*, 8, 207-231.
- WITTENWILER, M. 2007. *Mechanisms of Iron Mobilization by Siderophores*. Master Studies in Environmental Sciences Master, ETH Zürich.
- WU, Y.-H., MIN WU, WANG, C.-S., WANG, X.-G., YANG, J.-Y., OREN, A. & XU, X.-W. 2008. Microbacterium profundus sp. nov., isolated from deep-sea sediment of polymetallic nodule environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2930-2934.
- XIE, J., LEE, J. Y., WANG, D. I. C. & TING, Y. P. 2007. Silver Nanoplates: From Biological to Biomimetic Synthesis. *American Chemical Society*, 1 (5), 429-439.
- YONG, Y.-C. & ZHONG, J.-J. 2010. Recent advances in biodegradation in China: New microorganisms and pathways, biodegradation engineering, and bioenergy from pollutant biodegradation. *Process Biochem*
- YOSHIMURA, H. 2006. Protein-assisted nanoparticle synthesis. *Colloids Surfaces A*, 282-283, 464-479.
- YU, X. & WANG, Q. 2011. The determination of copper ions based on sensitized chemiluminescence of silver nanoclusters. *Microchim Acta*, 173, 293-298.
- YUN, Y.-S., VIJAYARGHAVAN, K. & WON, S. W. 2011. Bacterial biosorption and biosorbents. In: SPRINGER (ed.) *Microbial biosorption of metals*. London-New York.
- ZHANG, X. & YAN, S. 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application. *Chemosphere*, 489-494.
- ZHANG, X., YAN, S., TYAGI, R. D. & SURAMPALLI, R. Y. 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*, 82, 489-494.
- ZHENG, R.-C., WANG, Y.-S., LIU, Z.-Q., XING, L.-Y., ZHENG, Y.-G. & SHEN, Y.-C. 2007. Isolation and characterization of Delftia tsuruhatensis ZJB-05174, capable of R-enantioselective degradation of 2,2-dimethylcyclopropanecarboxamide. *Research in Microbiology*, 158, 258-264.
- ZUÑIGA, F. B. 1999. Formas químicas de algunos metales en el suelo. In: YUCATÁN, U. A. D. (ed.) *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados*. Mérida Yucatán, México.