



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HIPERTOLERANTES A METALES
PESADOS PRESENTES EN LOS SUELOS DE UNA ZONA MINERA DEL
ESTADO DE GUERRERO”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

Con opción en **BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

Presenta

Q.F.B. Rocio Mora Antonio

Director

D. C. José Antonio Munive Hernández

Codirector

D.C. Verónica Liliana Ramírez Falcón

Agosto, 2024



BUAP

Puebla, Pue. a 15 de agosto 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría de la alumna **Rocío Mora Antonio**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Caracterización de bacterias hipertolerantes a metales pesados presentes en los suelos de una zona minera del estado de Guerrero”

A nuestro juicio, la alumna **Rocío Mora Antonio** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Antonino Baez Rogel

D.C. Verónica Quintero Hernández



D.C. Nora Hilda Rosas Murrieta

D.C. María del Rocio Bustillos Cristales

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTO

A mi director de tesis, el Dr. José Antonio Munive Hernández, por su confianza, apoyo y orientación en la realización de este proyecto de investigación.

A mi asesora de tesis, la Dra. Verónica Liliana Ramírez Falcón. Gracias por sus valiosas sugerencias, por su apoyo y por el tiempo que dedicó al desarrollo de este proyecto.

A los integrantes de mi comité tutorial, sus valiosos comentarios y observaciones fueron fundamentales para mejorar y afinar esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por concederme la beca para la realización de mis estudios de maestría.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por proporcionarme los recursos, el ambiente académico y la infraestructura necesaria para llevar a cabo mi tesis.

Finalmente, quiero agradecer a cada uno de mis profesores, quienes han compartido su conocimiento y experiencia, les agradezco por inspirarme y motivarme a alcanzar mis metas académicas.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes siempre me han dado su amor y apoyo incondicional. Gracias por haberme brindado todas las herramientas necesarias para alcanzar mis metas académicas. Su sacrificio y esfuerzo han sido la motivación que me ha impulsado hasta este momento. Esta tesis es tanto de ustedes como mía.

A mis queridos hermanos, que pese a la distancia siempre los tengo presentes en cada uno de mis logros y sé que puedo contar con su apoyo.

A mi novio, por su paciencia, comprensión y amor inquebrantable. Gracias por estar a mi lado en todo momento, por ser mi apoyo emocional y por celebrar cada pequeño logro.

A mis amigos y compañeros, con quienes eh compartido risas, desafíos y momentos de aprendizaje. Gracias por su colaboración y por ser parte de esta experiencia.

Contenido

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES	11
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. OBJETIVO	12
5.1 Objetivo general	12
5.2 Objetivos específicos.....	12
6. DIAGRAMA DE TRABAJO	13
7. METODOLOGÍA.....	14
7.1 Aislamiento de cepas asociadas a las raíces de la planta de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. 8025 a partir del suelo minero	14
7.1.1 Muestra de suelo minero	14
7.1.2 Método de trampeo	14
7.1.3 Aislamiento de cepas	15
7.2 Conservación de cepas aisladas.....	16
7.3 Análisis de tolerancia a diferentes concentraciones de metales pesados	16
7.4 Caracterización genotípica	17
7.4.1 Extracción de DNA.....	17
7.4.2 Ampliación del gen <i>16S rRNA</i>	17
7.4.4 Ampliación del gen <i>rpoB</i>	17
7.4.5 Análisis de las secuencias	18
8. RESULTADOS.....	19
8.1 Análisis de suelo	19
8.2 Obtención de cepas asociadas a las raíces de la planta de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. 8025 a partir del suelo minero.....	20
8.3 Análisis de tolerancia a diferentes concentraciones de metales pesados.	20

8.4 Amplificación del gen <i>16S rRNA</i> y análisis de ARDRA.....	23
8.5 Análisis de las secuencias del gen <i>16S rRNA</i> y <i>rpoB</i>	25
9. CONCLUSIONES.....	39
10. REFERENCIAS	40
11. ANEXOS.....	50
12. APÉNDICES	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Impacto de los metales pesados en el crecimiento de las plantas y sus efectos toxicológicos en los microorganismos.	3
Tabla 2 Sitios de obtención de los aislados.	15
Tabla 3 Concentración promedio de los metales/metaloideos encontrados en suelo.	19
Tabla 4 Conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (mL) de aislados de suelo minero en medio YMA en ausencia y presencia de Pb^{+2} a [1.0 g/L] y [0.8 g/L].	21
Tabla 5 Conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (mL) de aislados de suelo minero en medio YMA en ausencia y presencia de Cr^{+6} a [17 g/L] y [15 g/L].	22
Tabla 6 Conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (mL) de aislados de suelo minero en medio YMA en ausencia y presencia de Cu^{+2} a [0.1 g/L].	23
Tabla 7 Características generales de las cepas seleccionadas con mayor tolerancia a los metales de Cr^{+6} y Pb^{+2}	25

TABLA DE FIGURAS

Figura 1 Plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. a las 6 semanas de crecimiento en a) suelo minero, b) suelo minero + vermiculita + agrolita (3:5:2) y c) 1 g de suelo + tubos con medio Jensen libre de nitrógeno.....	20
Figura 2 Perfiles de restricción obtenidos con la enzima <i>Alu I</i> de regiones amplificadas de los genes ribosomales 16S rRNA de cepas tolerantes a Cr^{+6} y Pb^{+2}	24
Figura 3 Árbol filogenético de Evolución Mínima, para 52 secuencias del gen ribosomal 16S rRNA de <i>Pseudomonas</i> spp (2000 réplicas), dentro de las que agrupa la cepa LDEM077 tolerante a 1 g/L de Pb.....	28
Figura 4 Árbol filogenético de Evolución Mínima, para 35 secuencias del gen <i>rpoB</i> de <i>Pseudomonas</i> spp (2000 réplicas), dentro de las que agrupa la cepa LDEM077 tolerante a 1 g/L de Pb.	29
Figura 5 Árbol filogenético concatenado de Evolución Mínima, para 22 secuencias del gen 16S RNA y <i>rpoB</i> de <i>Pseudomonas</i> spp (2000 réplicas), dentro de las que agrupa la cepa LDEM077 tolerante a 1 g/L de Pb.....	30
Figura 6 Árbol filogenético de Evolución Mínima para 122 secuencias de especies de Bacillaceae basado en secuencias del gen ribosomal 16S rRNA (2000 réplicas). Rama abierta del grupo de <i>Bacillus subtilis</i> , en este grupo se clasificó la cepa LDEM064.	33
Figura 7 Árbol filogenético de Evolución Mínima para 122 secuencias de especies de Bacillaceae basado en secuencias del gen ribosomal 16S rRNA (2000 réplicas). Rama abierta del grupo de <i>B. safensis</i> & <i>B. australimaris</i> , en este grupo se clasificó la cepa LDEM027.....	34
Figura 8 Árbol filogenético de Evolución Mínima para 122 secuencias de especies de Bacillaceae basado en secuencias del gen ribosomal 16S rRNA (2000 réplicas). Rama abierta del grupo de <i>Bacillus cereus</i> , en este grupo se clasificó la cepa LDEM040.	35
Figura 9 Árbol filogenético de Evolución Mínima para 32 secuencias de especies de <i>Bacillus</i> basado en secuencias del gen <i>rpoB</i> (2000 réplicas). Este grupo se clasificó la cepa LDEM064.....	36
Figura 10 Árbol filogenético de Evolución Mínima para 46 secuencias de especies de del grupo de <i>Bacillus cereus</i> basado en secuencias del gen <i>rpoB</i> (2000 réplicas). Este grupo se clasificó la cepa LDEM040.....	37
Figura 11 Árbol filogenético de Evolución Mínima para 28 secuencias de especies de <i>Bacillus</i> basado en secuencias del gen <i>rpoB</i> (2000 réplicas). Este grupo se clasificó la cepa LDEM027.....	38

1. RESUMEN

Los metales pesados son elementos comunes en la corteza terrestre y desempeñan un papel esencial para el desarrollo humano. Se dividen en tóxicos, como el Pb, Hg, Cd y As, sin beneficios biológicos, y esenciales, como el Cu, Zn, Mn, Fe y Ni, que son beneficiosos en bajas concentraciones, pero tóxicos en altas. La contaminación de suelo por metales pesados proviene tanto de fuentes naturales como actividades humanas, siendo estas últimas las más significativas. La contaminación del suelo por estos metales es problemática debido a su toxicidad y bioacumulación. Los efectos adversos en la salud humana incluyen enfermedades cardiovasculares, neurológicas y cáncer, cuya gravedad depende del tipo de metal, su forma química, del tiempo de exposición y la dosis.

La remediación de sitios contaminados con metales pesados se ha convertido en una necesidad urgente, entre las estrategias existentes se encuentra la biorremediación, que utiliza microorganismos y plantas para eliminar o reducir la contaminación de metales pesados en el suelo. En este trabajo se realizó la búsqueda y caracterización de cepas tolerantes a los metales de cobre, níquel, cromo y plomo a partir de la planta de *Phaseolus vulgaris* L. 8025 sembrada en suelo cercano a una zona minera en el estado de Guerrero. Se encontraron cepas tolerantes a grandes cantidades de plomo y cromo, entre las cuales se destacaron las cepas LDEM027 (tolerante a 0.8 g/L de Pb⁺² y 17 g/L de Cr⁺⁶), LDEM040 (tolerante a 17 g/L de Cr⁺⁶), LDEM064 (tolerante a 1 g/L de Pb⁺² y 15 g/L de Cr⁺⁶) y LDEM077 (tolerante a 1 g/L de Pb⁺²).

El análisis filogenético de las secuencias de los genes *16S rRNA* y *rpoB* permitió identificar las cepas LDEM064 y LDEM027 como *Bacillus inaquosorum* y *Bacillus safensis*, mientras que las cepas LDEM040 y LDEM077 fueron clasificadas dentro del grupo de *Bacillus cereus* y *Pseudomonas putida*, respectivamente.

2. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados

El término "metal pesado" es un término común utilizado durante décadas en las ciencias, y aún más en las ciencias ambientales, particularmente en los estudios de impacto de contaminación (Pourret & Hursthouse, 2019). Los metales pesados son metales naturales que tienen un número atómico, superior a 20 y una densidad elemental superior a 5 g/cm³ (Ali & Khan, 2018), se encuentran naturalmente en toda la corteza terrestre y son de gran importancia para el desarrollo continuo de la civilización (Hernández Caricio et al., 2022).

Los metales pesados pueden clasificarse por su toxicidad en dos grupos: 1) metales tóxicos como el Pb, Hg, Cd y As que son indeseables, no tienen beneficios biológicos para la salud humana y son tóxicos en cualquier concentración; 2) metales esenciales como el Cu, Zn, Mn, Fe, Ni y Cr, que son deseables y tienen beneficios biológicos para la salud humana en bajas concentraciones, pero se vuelven tóxicos en altas concentraciones (Abdel-rahman, 2022; J. P. Chen, 2012). Sin embargo, las listas de metales pesados esenciales pueden ser diferentes para distintos grupos de organismos como plantas, animales y microorganismos lo que significa que un metal pesado puede ser esencial para un grupo dado de organismos, pero no esencial para otro. Además, se sabe que algunas especies son más sensibles a los metales pesados que otras. Los mecanismos por los cuales los metales pesados afectan a diferentes órganos, tejidos y sistemas en diferentes organismos son muy complejos, y hasta ahora algunos de ellos no están completamente explorados (Ali et al., 2019).

La contaminación del suelo por metales pesados es un problema grave debido a su toxicidad y su capacidad de bioacumulación que es muy peligrosa por sus efectos en la cadena alimentaria. Además, la presencia de metales en concentraciones por encima de ciertos umbrales afecta el equilibrio microbiológico de los suelos y puede disminuir su fertilidad (Barbieri, 2016), en la tabla 1, se presentan algunos de los efectos de toxicidad que los metales pesados pueden causar en las plantas y microorganismos (Joshi et al., 2023).

Tabla 1

Impacto de los metales pesados en el crecimiento de las plantas y sus efectos toxicológicos en los microorganismos.

Metal	Distribución	Rol en plantas	Efecto de toxicidad en las plantas	Efecto tóxico sobre los microorganismos
Cu	Lagos, corteza terrestre, ríos y océanos	Fotosíntesis; síntesis de ATP y CO ₂ ; parte esencial de algunas proteínas como citocromo oxidasa y plastocianina; cofactor de varias enzimas como la superóxido dismutasa, la dioxigenasa y la ascorbato oxidasa.	El Cu provoca efectos citotóxicos, induce estrés, reduce el crecimiento de las plantas, genera especies reactivas de oxígeno, clorosis en las hojas.	Inhibición de diversas actividades enzimáticas y funciones celulares.
As	Suelo y erupciones volcánicas	No esencial	As(V) compite con la absorción de PO ₄ ³⁺ lo que además tiene efectos negativos sobre la producción de ATP, la fosforilación oxidativa y el sistema de transporte; La toxicidad del As puede causar inhibición del crecimiento, bajo rendimiento, formación de radicales libres y ROS, inhibición de la actividad de las proteínas y deficiencia de otros elementos esenciales.	Inhibición de actividad enzimática.

Metal	Distribución	Rol en plantas	Efecto de toxicidad en las plantas	Efecto tóxico sobre los microorganismos
Ni	Aire, suelo, sedimentos y agua.	Parte esencial de diferentes metaloenzimas tales como ureasa, hidrogenasas, superóxido dismutasas, metil coenzima M reductasa, RNasa-A, deshidrogenasas, acetil Co-A sintasa.	Altas concentraciones de Ni pueden causar clorosis, necrosis y marchitez; deterioro de la fotosíntesis, el transporte de azúcar y el equilibrio hídrico, efectos negativos sobre el equilibrio de nutrientes y la actividad de la ATPasa que conducen a funciones deterioradas de la membrana celular.	Efectos negativos en la membrana celular, estrés oxidativo y desactivación de varias enzimas.
Cr	Todos los ambientes	No esencial	La toxicidad del Cr puede provocar clorosis, inhibición del crecimiento y baja síntesis de pigmentos fotosintéticos; baja absorción de elementos importantes como Fe, P, Ca, Mg, K; inhibición de la fotofosforilación de la ETC (cadena de transporte de electrones) y algunas actividades enzimáticas; desorganización de los cloroplastos.	Inhibición del crecimiento, absorción de oxígeno; extensión de la fase de retraso.
Pb	Suelo	No esencial	La acumulación de Pb puede causar varios efectos nocivos directos e indirectos sobre la fisiología, morfología y funciones bioquímicas de las plantas; efectos negativos sobre la permeabilidad de la membrana, actividades enzimáticas, nutrición, síntesis de ATP, peroxidación lipídica, síntesis de ROS en grandes cantidades que conducen a daños en el ADN.	Desnaturalización de proteínas y DNA, terminación de la transcripción y detener la regulación enzimática.

Tabla extraída de (Joshi et al., 2023)

Los metales pesados se transfieren del ambiente abiótico (agua, sedimentos, suelos) a los organismos vivos, acumulándose en la biota, lo que da como resultado la contaminación de las cadenas alimentarias con estos elementos. La transmisión trófica de estos componentes en las cadenas alimentarias tiene un impacto significativo tanto

en la vida silvestre como en la salud pública. Tanto los animales acuáticos como los terrestres acumulan metales pesados del ambiente abiótico y de sus alimentos (Ali & Khan, 2019; Gall et al., 2015). Este incremento de metales pesados en los animales puede inducir funciones mitocondriales anormales, lo que resulta en un retraso en el crecimiento y el desarrollo, cambios fisiológicos y bioquímicos anormales, sobreexpresión de genes, comportamiento alterado y una serie de efectos toxicológicos, incluido un metabolismo inadecuado (Sun et al., 2022).

Metales pesados como el arsénico, cadmio, el cromo, el plomo y el mercurio son metales tóxicos sistémicos conocidos por inducir efectos adversos para la salud en los seres humanos, incluyendo enfermedades cardiovasculares, anomalías del desarrollo, trastornos neurológicos y neuroconductuales, diabetes, pérdida de audición, trastornos hematológicos e inmunológicos, y varios tipos de cáncer. Las principales vías de exposición incluyen la ingestión, la inhalación y el contacto dérmico. La gravedad de los efectos adversos para la salud está relacionada con el tipo de metal pesado y su forma química, y también depende del tiempo de exposición y la dosis. Entre muchos otros factores, la especiación juega un papel clave en la toxicocinética y toxicodinámica de metales, y está altamente influenciada por factores como el estado de valencia, el tamaño de partícula, la solubilidad, la biotransformación y la forma química (Tchounwou et al., 2014). La contaminación de suelo por metales pesados se produce a partir de fuentes naturales y fuentes antropogénicas. Las fuentes naturales más importantes incluyen la meteorización de minerales, la erosión del suelo y la actividad volcánica, mientras que las fuentes antropogénicas incluyen la aplicación de fertilizantes y pesticidas, el riego con aguas residuales y la minería (Dixit et al., 2015). Se estima que la contribución de metales de fuentes antropogénicas en los suelos y agua es mayor que la contribución de los naturales (Nriagu & Pacyna, 1988; Roozbahani et al., 2015; Varela et al., 2019).

Mecanismos de tolerancia

A pesar de la aparente toxicidad, muchos microorganismos crecen y/o prosperan en lugares aparentemente contaminados por metales, y una variedad de mecanismos, tanto activos como incidentales, contribuyen a la resistencia (Gadd, 2010), entre estos mecanismos se encuentran biosorción, sistemas de eflujo, producción de exopolisacáridos, síntesis de metalotioneínas y producción de sideróforos.

Biosorción

La biosorción es una interacción fisicoquímica entre bacterias y metales pesados en la cual, las bacterias adaptan varias formas para absorber estos metales y pueden ser clasificados según diversos criterios. Dependiendo del metabolismo celular, la biosorción se clasifica en dependiente del metabolismo e independiente del metabolismo. Según el lugar de absorción/acumulación del metal, la biosorción se puede clasificar en precipitación extracelular, sorción en la superficie celular y acumulación intracelular. En la biosorción dependiente del metabolismo, los metales se acumulan intracelularmente mediante el transporte a través de la membrana celular, proceso que realizan exclusivamente las células viables. La absorción de metales en la biosorción independiente del metabolismo se produce mediante la interacción fisicoquímica entre los grupos funcionales de la superficie de las bacterias y los iones metálicos. La unión de iones metálicos a la superficie celular de una bacteria en la biosorción independiente del metabolismo implica varios mecanismos, tales como interacción física (interacción electrostática o de Van der Waals) o interacción química (desplazamiento de cationes metálicos unidos mediante intercambio iónico), complejación, difusión o por precipitación (Priyadarshane & Das, 2021).

La interacción física a través de fuerzas electrostáticas o de van der Waals puede retener iones metálicos en las superficies externas de las células bacterianas y, posteriormente, hacer que los iones metálicos adsorbidos se unan a grupos funcionales de biomoléculas en la superficie celular y dentro de la estructura celular a través de interacciones químicas (Sahmoune, 2018).

La complejación implica asociar dos o más especies, es decir, iones metálicos y los grupos funcionales presentes en la superficie de la célula bacteriana. Se categoriza en

dos tipos diferentes: complejo monodentado y polidentado. En los complejos monodentados solo un átomo en el ligando se une al metal y en los complejos polidentados, el ligando se une con dos o más átomos al metal. En el mecanismo de intercambio iónico, el intercambio de cationes metálicos binarios se produce con el contraión que reside en la superficie del biosorbente. El mecanismo de unión del metal por precipitación se produce mediante la reacción de los iones metálicos con los grupos funcionales presentes en la superficie bacteriana, lo que da como resultado precipitados metálicos orgánicos insolubles que permanecen adheridos a las células microbianas (Priyadarshane & Das, 2021).

Los factores que influyen en el mecanismo de biosorción son I) propiedades de los biosorbentes (es decir, vivos o no vivos), II) características del metal objetivo, III) tipo de sitios de unión involucrados para el secuestro del metal (ligando biológico), IV) parámetros involucrados en la biosorción (temperatura, pH, tiempo de contacto, cantidad de sorbente y sorbato) y V) las características de la solución metálica y la presencia de iones competitivos (Priyadarshane & Das, 2021).

Sistemas de eflujo

El sistema de transporte activo o eflujo es el mecanismo fundamental contra la toxicidad de los metales pesados en bacterias, el cual da como resultado una disminución de los potenciales de acumulación y concentración para la desintoxicación celular, aumentando así, la supervivencia de las células bacterianas en condiciones de exceso de metal (Mathivanan et al., 2021). Las proteínas de transporte son cruciales para facilitar la transferencia de sustratos hidrofílicos a través de membranas hidrofóbicas, constituyendo una variada gama de proteínas con distinciones en topología, especificidad de sustrato, mecanismos de acoplamiento de energía y similitud de secuencia. Esta categoría de proteínas transportadoras abarca las ATPasas de tipo P, las RND (resistencia, nodulación, división celular), la CDF (facilitador de la difusión catiónica), los transportadores de casetes de unión a ATP (ABC), las proteínas HoxN, CHR, de la familia MIT y más (Adhikary et al., 2024).

Producción de exopolisacáridos (EPS)

Las bacterias secretan exopolisacáridos (EPS) como mecanismo de protección contra condiciones extremas presentes en el ambiente circundante. El exopolisacárido se compone principalmente de proteínas y carbohidratos, que representan entre el 75% y el 90% de su composición total. Los otros componentes menores de los EPS incluyen ácidos nucleicos, lípidos, lipoproteínas, glicoproteínas, lipopolisacáridos, fosfolípidos, ácido urónico y ácido húmico (Pushkar et al., 2021). El exopolisacárido producido por bacterias puede unirse a iones metálicos tóxicos y mejorar el crecimiento bacteriano incluso con una alta concentración de iones metálicos. Los exopolisacáridos producidos por las bacterias desempeñan afinidades críticas de biosorción y unión a metales pesados debido a sus grupos funcionales aniónicos como los grupos carboxilo, fosfórico, amina e hidroxilo para el intercambio iónico y la complejación con grupos funcionales catiónicos (Mathivanan et al., 2021). El mecanismo de adsorción de EPS para metales pesados incluye principalmente la complejación de superficies, el intercambio iónico, reacciones redox, la adsorción electrostática y la microprecipitación inorgánica. Generalmente, la adsorción de metales pesados por EPS implica interacciones complejas de dos o más mecanismos (Li et al., 2022).

Síntesis de metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT) son pequeñas metaloproteínas que contienen residuos de cisteína y proporcionan una excelente viabilidad para la unión de metales. Tienen una masa molecular baja y se sabe que llevan a cabo una gran cantidad de funciones, incluida la homeostasis de los metales, la eliminación de radicales libres y la protección contra los metales pesados (Samuel et al., 2021). La característica principal de estas proteínas es un alto porcentaje de cisteína de aproximadamente 15-33% por proteína, mientras que en el caso de una proteína general solo está presente un 2% de residuo de cisteína, esta condición, le da la capacidad de absorber y acumular cationes metálicas dentro de una célula mediante la formación de enlaces con los grupos tiol presentes en sus abundantes residuos de cisteína (Chatterjee et al., 2020).

Producción de sideróforos

La producción de sideróforos representa otra estrategia de desintoxicación de iones metálicos. Si bien la función canónica de los sideróforos es la quelación y transporte de Fe (III), las bacterias también usan estas moléculas secretadas para unirse a otros metales. La producción de sideróforos puede ser inducida por la presencia de metales no férricos, a los que se unen con diversas afinidades. La formación de los complejos sideróforo-metal reduce la concentración de metales y metaloides libres en el medio ambiente y evita su difusión a través de la membrana bacteriana, reduciendo así la toxicidad de los metales y metaloides (Hesse et al., 2018).

Biorremediación como herramienta para la recuperación de suelos contaminados por metales pesados.

La biorremediación se refiere a la aplicación de sistemas biológicos para la eliminación y/o disminución de la contaminación orgánica e inorgánica, siendo las bacterias y los hongos organismos muy importantes en este contexto para la recuperación, inmovilización o desintoxicación de contaminantes metálicos (Gadd, 2010).

Se sabe que los microorganismos tienen un gran potencial para la biorremediación de los contaminantes del suelo y también aumentan la producción de cultivos agrícolas con bajos insumos. Los microorganismos desempeñan un papel esencial en la eliminación de metales pesados de suelos contaminados, utilizando como principal mecanismo la bioadsorción, sin embargo, existen otros mecanismos menos frecuentes de biorremediación como la biolixiviación, biomineralización y reacciones oxido-reducción que también son desarrolladas por los microorganismos (Verma & Kuila, 2019) & (Jin et al., 2018). Aunado a esto, la estrategia de remediación microbiana podría combinarse con métodos de fitorremediación, en este caso se busca que las plantas que acumulan metales pueden ser beneficiadas por bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB) resistentes a los metales, que pueden aumentar la eficiencia de la biorremediación. Las capacidades que promueven las PGPB en los procesos de fitorremediación incluyen el alivio de los efectos nocivos causados por la contaminación por metales pesados (por ejemplo, la reducción del nivel de clorofila y el estrés oxidativo),

el aumento de la tolerancia a los metales pesados de las plantas y el aumento de la acumulación de metales pesados en los tejidos vegetales (Wróbel et al., 2023).

***Phaseolus vulgaris* L como planta trampa para el aislamiento de bacterias tolerantes a metales pesados.**

La técnica de trapeo de plantas es una estrategia útil para el aislamiento y caracterización de comunidades microbianas asociadas a las plantas. Este método consiste en la recolección de suelos del hábitat natural y su transferencia al entorno de laboratorio, donde pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento de cultivos en condiciones controladas (Amenta et al., 2024). *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común) es una leguminosa comúnmente utilizada como planta trampa, la cual suele estar asociada con bacterias que presentan características de promoción de crecimiento vegetal (Ismail et al., 2021; Meza et al., 2022; Tapia-García et al., 2020), además de que tiene la capacidad de absorber metales pesados (Eid et al., 2020), lo que podría ser un excelente modelo de estudio para la selección de bacterias tolerantes a metales pesados.

3. ANTECEDENTES

Ramírez et al., (2019) demostraron que *Prosopis laevigata*, una planta nativa de ecosistemas con déficit hídrico tiene la capacidad de hiperacumular metales como Al, Fe, Zn y Ti en asociación con bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. A partir de nódulos de árboles jóvenes de esta población de *Prosopis laevigata*, se aisló una colección de cepas, entre las cuales *Bacillus sp.* MH778713 se destacó por su alta tolerancia a los metales cromo (VI) (15 g/L), aluminio (10 g/L), hierro (1.0 g/L) y zinc (2.0 g/L). Además, la cepa *Bacillus sp.* MH778713 mostró una alta capacidad para remover cromo (VI) de medios acuosos, lo cual podría beneficiar el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con metales pesados.

4. JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas ambientales más graves que sufre el país es la contaminación de los suelos y aguas por sustancias tóxicas. Entre las sustancias tóxicas que encontramos frecuentemente en los suelos se encuentran los metales pesados y su presencia representa un grave riesgo para la salud humana. El proyecto se enfoca en la búsqueda de bacterias hipertolerantes a los metales pesados presentes en los suelos cercanos a una zona minera del estado de Guerrero, que pueden ser utilizadas como herramientas para la biorremediación de suelos contaminados con metales tóxicos.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Caracterizar a las cepas bacterianas hipertolerantes a los metales pesados de plomo, cromo, cobre y níquel presentes en los suelos de una zona minera del estado de Guerrero.

5.2 Objetivos específicos

1. Aislar una colección de cepas bacterianas a partir de suelos de una zona minera, contaminados con metales pesados, en el estado de Guerrero.
2. Caracterizar la tolerancia de estas cepas a la presencia de los metales pesados plomo, cromo, cobre y níquel.
3. Seleccionar a las cepas que presenten hipertolerancia a los metales pesados de cromo y plomo.
4. Identificar a nivel de género a los aislados hipertolerantes mediante el análisis de secuencias de los genes *16S rRNA* y *rpoB*.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO

Aislamiento de cepas a partir de suelos cercanos a una mina, por trampeo, utilizando *Phaseolus vulgaris* L. 8025 como planta trampa.



Análisis a la tolerancia de las cepas aisladas a diferentes concentraciones de metales pesados (Cr, Cu, Pb y Ni).



Selección de las cepas que presenten hipertolerancia a los metales.



Identificación de las cepas hipertolerantes a nivel de género mediante el análisis de secuencias del gen *16S rRNA* y *rpoB*.

7. METODOLOGÍA

7.1 Aislamiento de cepas asociadas a las raíces de la planta de *Phaseolus vulgaris* L. 8025 a partir del suelo minero

7.1.1 Muestra de suelo minero

Se utilizó una muestra de suelo cercano a una zona minera en el estado de Guerrero el cual fue analizado por WDXRF (Espectrometría de fluorescencia de rayos-x secuencial de longitud de onda dispersiva), en el Centro de Investigaciones en Dispositivos Semiconductores del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El análisis del suelo se realizó por triplicado, para esto, la muestra se trituró y se tamizó usando una malla de 0.0029 pulgadas (serie 200), posteriormente la muestra se pesó y mezcló con cera en una relación de 9:1 para formar un pellet de 6 gramos. El pellet fue analizado en un espectrómetro de fluorescencia de rayos-x secuencial de longitud de onda dispersiva de marca Bruker, modelo S8 TIGER.

7.1.2 Método de trampeo

Se utilizó a *Phaseolus vulgaris* L. 8025 como planta trampa para el aislamiento de bacterias asociadas a las raíces.

Las semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 5 %, durante 10 min, se enjuagaron seis veces en agua destilada estéril y se germinaron bajo condiciones de esterilidad en placas de agar agua al 1% de 24 a 48 horas a 30°C.

Posteriormente, se sembraron en los siguientes medios:

- a) Directamente en una maceta con el suelo minero.
- b) Macetas con suelo minero, vermiculita estéril y agrolita estéril (3:5:2).
- c) Tubos con medio Jenssen libre de nitrógeno (Somasegaran & Hoben, 1994) (Anexo 1) (20 ml medio liquido /55 ml agar) con 1g de suelo.

La finalidad de usar los tres medios de cultivo fue para asegurar un óptimo crecimiento de las plantas. Se utilizó agua desmineralizada estéril para riego, las plantas se dejaron crecer por un periodo de 6 semanas.

7.1.3 Aislamiento de cepas

Se obtuvieron aislados de bacterias asociadas a las raíces de las plantas que se desarrollaron en los tres medios empleados (Tabla 2), procedentes tanto de la endosfera, el rizoplano y la rizosfera, así como también de manera directa del suelo.

Tabla 2

Sitios de obtención de los aislados.

	Endosfera	Endosfera/ rizoplano	Rizosfera	Suelo
Suelo minero	X	X	X	X
Suelo minero/ vermiculita/ agrolita (3:5:2)	X	X	X	
Medio Jensen libre de nitrógeno/ suelo	X			

AISLADOS DE BACTERIAS ENDOFITAS

Para obtener los aislados de las bacterias endófitas, se empleó la siguiente metodología. En primer lugar, se procedió a desinfectar las raíces de la planta de *Phaseolus vulgaris* L. mediante la exposición al alcohol etílico, agitándola en el vórtex y manteniéndola en contacto con el desinfectante durante 30 segundos; este proceso se repitió en tres ocasiones. Posteriormente, se realizaron dos enjuagues con agua desmineralizada estéril, seguidos de la maceración con 100 microlitros de agua destilada estéril. Acto seguido, se extrajeron 50 microlitros del macerado y se sembraron en placas con medio de agar de extracto de levadura-manitol (YMA) (Anexo 1), el cual es un medio utilizado para el aislamiento de rizobacterias (Vincent, 1970). Las placas se incubaron a una temperatura de 29°C durante un periodo de 24 a 48 horas. Finalmente, se seleccionó una colonia representativa de cada morfología diferente, la cual fue sembrada mediante estría cruzada en nuevas placas de agar YMA.

AISLADO DE BACTERIAS DE LA ENDOSFERA Y RIZOPLANO

Se realizaron lavados con agua destilada estéril a las raíces *Phaseolus vulgaris* L. para eliminar el suelo rizosférico, posteriormente se realizó la maceración con 100 microlitros de agua destilada estéril, se sembraron en placas de YMA las cuales se incubaron a 29°C de 24 a 48 horas. Finalmente se seleccionaron colonias individuales.

AISLADO DE BACTERIAS DE SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO.

Se tomaron muestras de suelo rizosférico (suelo asociado a la raíz) y suelo no rizosférico. Las muestras de suelo rizosférico se recolectaron desarraigando suavemente las plantas y recolectando el suelo adherido a las raíces. Para las muestras de suelo no rizosférico, se recolectó el suelo que se encontraba a una distancia de 2 a 3 cm posteriores a la raíz. Posteriormente las muestras se pesaron, se realizaron 3 diluciones 1:10, se sembraron en placas de YMA y se incubaron siguiendo la metodología descrita para los aislados endosfera.

7.2 Conservación de cepas aisladas

A partir de cultivos aislados y purificados en placas de medio YMA, se inocularon tubos con caldo Luria-Bertani (LB) (Anexo 1) (Somasegaran & Hoben, 1994). Los cultivos se incubaron a 120 rpm a 30°C por 20 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó en un criovial 0.5 mL del cultivo y 0.5 mL de glicerol estéril, posteriormente, se llevó a agitación a un vórtex y se colocaron en un ultracongelador a -70°C.

7.3 Análisis de tolerancia a diferentes concentraciones de metales pesados

Se evaluó la tolerancia de las cepas a diferentes concentraciones de los metales de cromo (15000-17000 mg/L), plomo (800-1500 mg/L), cobre (100- 25000 mg/L) y níquel (100-1500 mg/L). Para esto, se utilizaron cultivos de las cepas en caldo de LB de 20 horas, los cuales se inocularon por duplicado utilizando el método de goteo en placa de 6x6 (C. Y. Chen et al., 2003) en placas de YMA y YMA adicionadas con las diferentes concentraciones de los metales mencionados anteriormente. La incubación se realizó a 29°C de 1 a 14 días. Posteriormente, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Para ello, se contó el número de colonias de la dilución contable, se multiplicó por 100 (considerando que cada gota fue de 10 µL) y el resultado se multiplicó por el factor de dilución en la cual se contaron las colonias. Finalmente, se seleccionaron las cepas con mayor tolerancia a los metales. Se incluyó a la cepa *Bacillus* sp. MH778713 como control ya que ha sido previamente reportada como tolerante a 15 g/L de Cr (VI) (Ramírez et al., 2019).

7.4 Caracterización genotípica

Se realizó la caracterización genotípica de las cepas con mayor tolerancia a los metales pesados, para ello se siguió la siguiente metodología:

7.4.1 Extracción de DNA

Se cultivaron las cepas bacterianas en medio YM durante 24 horas a 28°C en condiciones de agitación. La extracción del DNA se llevó a cabo mediante la utilización de “Wizard Genomic DNA Purification Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.4.2 Ampliación del gen 16S rRNA

El gen 16S rRNA se amplificó utilizando la DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Thermo scientific) y los primers UN27F (5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'); UN1392(5'-CAGGGCGGTGTGTACA-3') (Morales et al., 2011), las condiciones de PCR fueron las siguientes: una activación a 95°C por 3 min, desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 57°C por 1 min, primera extensión a 72°C por 70 s y una extensión a 72°C por 1 min en 26 ciclos. Posteriormente se realizó la purificación mediante el kit comercial QIAquick y los productos se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7.4.3 Análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA)

Se realizó un análisis de ARDRA utilizando la enzima de restricción *AluI* Thermo scientific, para el cual se utilizó el protocolo recomendado para la digestión de productos de PCR directamente después de la amplificación descrito por el fabricante, los geles fueron analizados mediante el programa GelAnalyzer 23.1.1.

7.4.4 Ampliación del gen rpoB

La amplificación del gen *rpoB* se realizó utilizando los oligonucleótidos rpoB1206 (5'-ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAAACAT-3') y rpoBR3202 (5'-ACACCCTTGTTACCGTGACGACC-3'), las condiciones de PCR fueron las siguientes: una activación a 95°C por 3 min, 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 20 s,

alineamiento a 55°C por 30 s, primera extensión a 72°C por 90 s y una extensión a 72°C por 5 min (Ki et al., 2009).

7.4.5 Análisis de las secuencias

Se utilizaron secuencias de referencia obtenidas de la base de datos del Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para la elaboración de un árbol base. El alineamiento se realizó mediante el programa Clustal X (<http://www.clustal.org/>); para la edición de este, se utilizó el software BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com/>) y finalmente para la edición de árboles filogenéticos se utilizó el software MegaX (<https://www.megasoftware.net/>) (Kumar *et al.*, 2018).

8. RESULTADOS

8.1 Análisis de suelo

Entre los elementos identificados en el análisis de suelo por espectrometría de fluorescencia de rayos-x secuencial de longitud de onda dispersiva (WDXRF) (Apéndice A), se encontraron los elementos de As, Cr y Cu, los cuales, junto con Cd, Hg y Pb, son considerados como los metales más contaminantes del suelo (Weissmannová & Pavlovský, 2017). Además, se detectó la presencia de Ni, Al, Fe, Ti, Zr y Zn, las concentraciones promedio de estos metales en el suelo (Tabla 3) son mayores en comparación con las muestras de suelo agrícola evaluadas por Cota-Ruiz et al., (2019), provenientes de diferentes sitios agrícolas de Ciudad Juárez, México, por otro lado, las concentraciones de Al, Fe, Ti, Cr y Zn son menores con respecto a las muestras de suelo no rizosférico reportadas por Ramírez y col., (2019), quienes analizaron muestras de suelo en un área contaminada con metales pesados cerca del río Nexapa en la localidad de Chietla, Puebla, México.

Tabla 3

Concentración promedio de los metales/metaloides encontrados en suelo.

Metal/ Metaloides	Promedio suelo minero (mg/Kg)	Suelo agrícola (mg/Kg) (Cota-Ruiz et al., 2019)	Suelo contaminado (mg/Kg) (Ramírez et al., 2019)
Al	43 700 ± 346	12 828	44 300
Fe	40 300 ± 115	14	43 600
Ti	4 600 ± 0	ND	4 900
Zr	276 ± 148	ND	<20
Cr	90 ± 80	ND	435
Zn	97 ± 6	6	108
Cu	73 ± 21	22.2	<20
Ni	41 ± 36	ND	<20
As	38 ± 7	ND	-

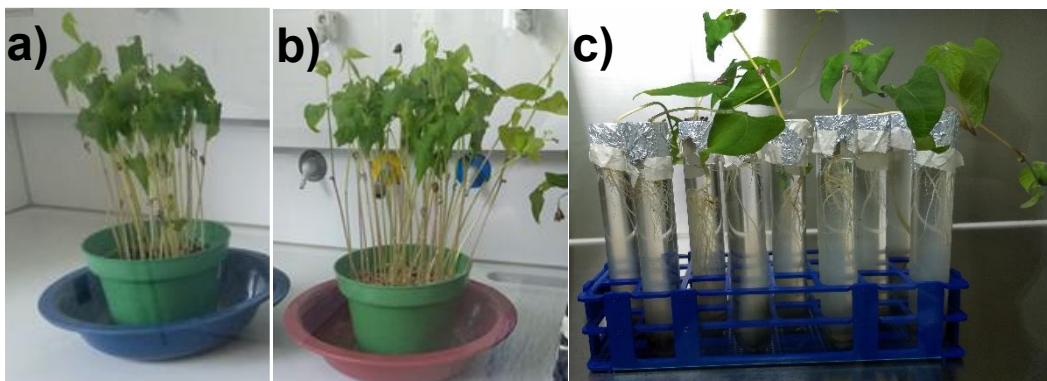
ND: No detectado

8.2 Obtención de cepas asociadas a las raíces de la planta de *Phaseolus vulgaris* L. 8025 a partir del suelo minero.

La planta de *Phaseolus vulgaris* L. 8025 creció en los tres medios utilizados (Figura 1), lo que nos permitió aislar cepas de los tres medios conforme lo descrito en la metodología, teniendo un total de 84 aislados, 22 procedentes de las plantas sembradas en medio Jensen libre de nitrógeno, 25 aislados de las plantas sembradas en suelo minero + vermiculita + agrolita (3:5:2) y 37 de las plantas sembradas directamente en suelo minero. Todos los aislados fueron preservados en glicerol al 50% a -70°C . La codificación, morfología y procedencia de cada uno de los aislados se presentan en el Apéndice B.

Figura 1

Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a las 6 semanas de crecimiento en a) suelo minero, b) suelo minero + vermiculita + agrolita (3:5:2) y c) 1 g de suelo + tubos con medio Jensen libre de nitrógeno.



8.3 Análisis de tolerancia a diferentes concentraciones de metales pesados.

En los resultados de las pruebas de tolerancia a los metales pesados de los aislados seleccionados, se encontraron 14 cepas tolerantes a 0.8 g/L de Pb^{+2} . De estas, 8 también crecieron a 1 g/L de Pb^{+2} , sin embargo, a esta concentración se observó una disminución significativa de las UFC/mL en relación con las cepas sembradas en las placas sin el metal (Tabla 4), al comparar nuestros resultados con la bibliografía, encontramos que, si bien existen cepas capaces de crecer a mayores concentraciones de Pb^{+2} , como es el

caso de *Enterobacter aerogenes* MCC 3092, que mostró una tolerancia de 3.8 g/L (Pramanik et al., 2018), también hay cepas, como *Pseudomonas aeruginosa* SN4 y SN5, con tolerancia de 0.17 g/L, que han demostrado ser de gran utilidad para la remediación de campos de cultivo contaminados con Pb⁺² (Nath et al., 2018).

Tabla 4

Conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (mL) de aislados de suelo minero en medio YMA en ausencia y presencia de Pb⁺² a [1.0 g/L] y [0.8 g/L].

Aislado	YMA	Crecimiento UFC/mL		
		YMA + Pb ⁺² [1.0 g/L]	YMA	YMA + Pb ⁺² [0.8 g/L]
LDEM021	6.5E+07	1.0E+03	2.8E+08	1.0E+07
LDEM027	7.5E+07	0	2.1E+08	4.5E+07
LDEM033	2.5E+07	0	4.0E+07	5.0E+05
LDEM039	3.0E+07	5.0E+01	5.0E+07	2.0E+07
LDEM041	1.1E+08	5.0E+03	2.5E+07	1.0E+07
LDEM064	2.5E+07	1.0E+02	4.5E+07	2.0E+07
LDEM065	6.0E+07	1.0E+02	6.0E+07	5.0E+07
LDEM066	8.0E+07	1.0E+03	1.2E+08	4.0E+07
LDEM075	3.5E+07	1.7E+04	4.0E+07	5.0E+06
LDEM077	4.4E+08	1.8E+05	5.0E+07	1.2E+06
LDEM081	3.0E+06	0	3.0E+06	1.0E+05
LDEM082	5.0E+05	0	5.0E+05	2.0E+05
LDEM083	5.0E+05	0	5.0E+05	1.0E+05
LDEM084	1.0E+06	0	1.0E+06	1.0E+05

En el caso del cromo, 19 cepas presentaron tolerancia a una concentración de 15 g/L y 9 cepas mostraron tolerancia a 17 g/L (Tabla 5). Dentro de estas cepas tolerantes a cromo, se destacó a la cepa LDEM027, que también exhibió crecimiento en presencia de 0.8 g/L de plomo y a las cepas LDEM017 y LDEM040 que tuvieron una mejor tolerancia a 17 g/L de cromo. También se observó crecimiento de la cepa *Bacillus sp.* MH778713 en ambas concentraciones de cromo, la cual funcionó como control y punto de comparación ya que ha sido previamente reportada como tolerante a 15 g/L de Cr (VI) (Ramírez et al., 2019).

Tabla 5

Conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (mL) de aislados de suelo minero en medio YMA en ausencia y presencia de Cr⁺⁶ a [17 g/L] y [15 g/L].

Aislado	YMA	Crecimiento (UFC/mL)		
		YMA + Cr ⁺⁶ [15 g/L]	YMA	YMA + Cr ⁺⁶ [17 g/L]
LDEM001	3.5E+07	5.0E+06	3.5E+07	0
LDEM003	4.0E+07	1.6E+07	4.0E+07	0
LDEM008	4.5E+07	1.4E+07	7.0E+07	0
LDEM009	4.0E+07	1.4E+07	1.5E+08	0
LDEM014	5.0E+07	3.5E+06	1.4E+08	4.00E+04
LDEM017	3.0E+07	1.0E+07	8.0E+06	1.50E+05
LDEM018	9.0E+07	4.5E+06	1.6E+08	0
LDEM019	5.5E+07	1.5E+07	1.0E+08	3.50E+04
LDEM021	2.5E+07	8.0E+04	6.5E+07	0
LDEM025	8.0E+07	1.0E+05	1.1E+08	7.00E+04
LDEM027	9.0E+07	6.5E+07	7.5E+07	3.00E+07
LDEM029	1.0E+07	3.5E+06	6.0E+07	0
LDEM031	4.5E+07	2.5E+07	1.3E+08	0
LDEM032	7.5E+07	3.5E+07	1.6E+07	5.0E+03
LDEM040	1.0E+08	8.0E+06	1.5E+08	2.0E+07
LDEM042	2.4E+08	4.5E+07	1.7E+08	0
LDEM055	1.2E+08	5.5E+06	1.6E+08	4.00E+05
LDEM064	2.0E+07	5.0E+04	2.5E+07	0
LDEM067	1.7E+08	2.0E+07	3.5E+07	1.0E+02
MH778713*	2.0E+07	1.5E+06	1.2E+07	2.00E+05

* *Bacillus* sp. MH778713

En las pruebas de tolerancia de cobre solo se observó crecimiento de 4 cepas a la concentración de 0.1 g/L (Tabla 6), respecto al níquel, tras evaluar diversas concentraciones (que oscilaron entre 0.1 y 1.5 g/L), no se observó la presencia de bacterias capaces de tolerar dichas concentraciones.

Tabla 6

Conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (mL) de aislados de suelo minero en medio YMA en ausencia y presencia de Cu^{+2} a [0.1 g/L].

AISLADO	Crecimiento (UFC/mL)	
	YMA	YMA + Cu [0.1 g/L]
LDEM001	4.5E+07	1300
LDEM014	2.0E+07	30000
LDEM017	3.0E+07	500
LDEM018	5.0E+06	2150
MH778713*	3.0E+07	3600

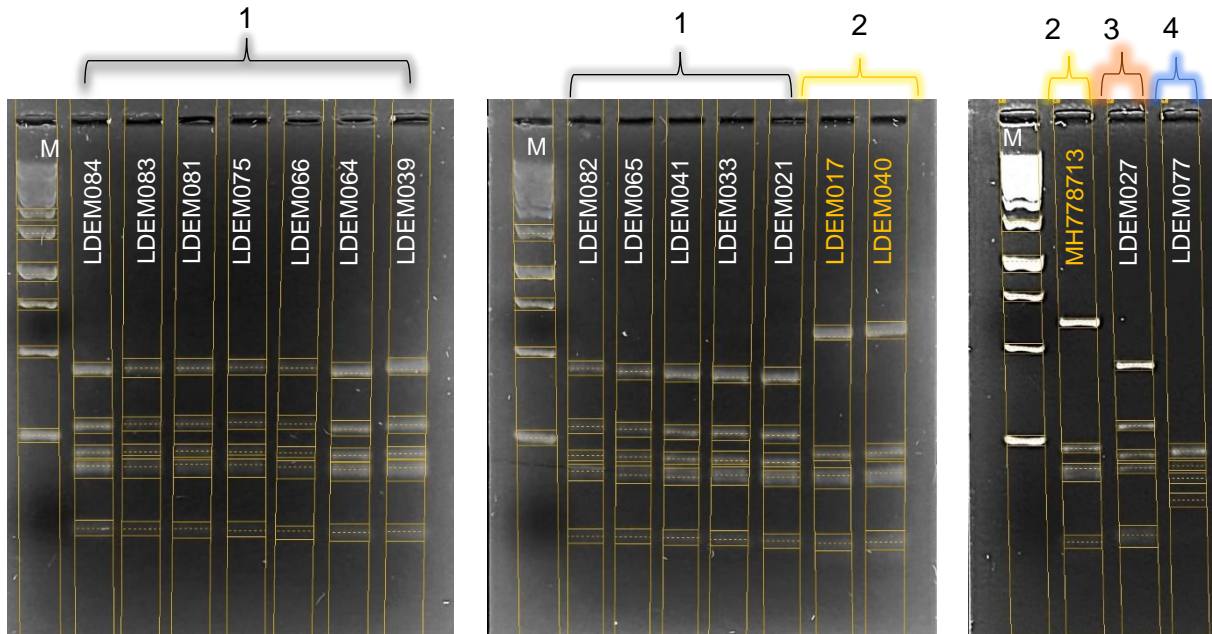
* *Bacillus* sp. MH778713

8.4 Amplificación del gen *16S rRNA* y análisis de ARDRA

Se realizó una tinción de Gram para elegir el protocolo de extracción del DNA, en el cual se encontraron que las cepas tolerantes seleccionadas son bacilos Gram positivos, excepto la cepa LDEM077 que se trata de un bacilo Gram negativo, posteriormente se realizó la extracción de DNA y se amplificó el gen *16S rRNA*, los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%, en el cual se observaron bandas de ~1400 pb (Apéndice C), posteriormente se realizó el análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado (ARDRA), este análisis utiliza variaciones de secuencia en el gen *16S rRNA* para generar patrones específicos entre especies, resultado de la digestión mediante las enzimas de restricción, lo que permite evaluar la diversidad bacteriana, en este trabajo se utilizó la enzima *Alu I*, la cual reconoce y corta en medio de la secuencia AG[^]CT (Cihan et al., 2012; X.-Y. Wu et al., 2006; Zeng et al., 2007). Los productos fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3% (Figura 2), en que se observaron 4 patrones ARDRA distintos después de la restricción con *Alu I* del gen *16S rRNA* amplificado, lo que podría ser indicativo de que tenemos al menos 4 especies diferentes en las cepas evaluadas.

Figura 2

Perfiles de restricción obtenidos con la enzima *Alu I* de regiones amplificadas de los genes ribosomales 16S rRNA de cepas tolerantes a Cr^{+6} y Pb^{+2} .



Nota. Los productos fueron visualizados en el transiluminador con luz UV en un gel de agarosa al 3% teñido con el colorante de ácidos nucleicos RedGel. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Los gels fueron analizados mediante el programa GelAnalyzer 23.1.1 (<http://www.gelanalyzer.com/?i=1>).

Se seleccionó a las cepas con mayor tolerancia a los metales de Cr^{+6} y Pb^{+2} , se les realizó la purificación del gen 16S rRNA y *rpoB*, posteriormente se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM y finalmente se realizó el análisis de las secuencias para la elaboración de los árboles filogenéticos. La codificación y características de las cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Características generales de las cepas seleccionadas con mayor tolerancia a los metales de Cr^{+6} y Pb^{+2} .

PERFIL ARDRA	CODIFICACIÓN DE LA CEPA	PROCEDENCIA DE LA CEPA	TINCIÓN DE GRAM	TOLERANCIA
1	LDEM064	Endosfera	Bacilo Gram +	Pb^{+2} [1 g/L] y Cr^{+6} [15 g/L]
2	LDEM040	Endosfera	Bacilo Gram +	Cr^{+6} [17 g/L]
3	LDEM027	Rizoplano /Endosfera	Bacilo Gram +	Pb^{+2} [0.8 g/L] y Cr^{+6} [17 g/L]
4	LDEM077	Rizoplano /Endosfera	Bacilo Gram -	Pb^{+2} [1 g/L]

8.5 Análisis de las secuencias del gen *16S rRNA* y *rpoB*.

El árbol filogenético basado en la secuencia del gen *16S rRNA* (Figura 3) mostró que la cepa LDEM077 se agrupa con especies del género *Pseudomonas*. En particular, se observa que la cepa LDEM077 forma una rama separada junto con las cepas *Pseudomonas sp.* NCCP-245 y *Pseudomonas sp.* FMZR9, las cuales fueron aisladas de la rizosfera de *Vigna mungo* L (frijol negro) y de la raíz de *Zea Mays* (maíz) respectivamente. Ambas cepas están reportadas como productoras de ácido indolacético y solubilizadoras de fosfatos, además, la cepa FMZR9 está reportada como tolerante a la sequía y productora de sideróforos (Ehsan et al., 2016; Sandhya et al., 2017). Estas cepas se encuentran estrechamente relacionadas con 21 especies del género de *Pseudomonas*, con las que comparte al menos un 98.7% de identidad.

Se llevó a cabo el árbol filogenético de la cepa *Pseudomonas sp.* LDEM077 utilizando una parte del gen *rpoB* (1406 posiciones en el conjunto de datos final), que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa (Figura 4), en este árbol, se define mejor la posición filogenética de las cepas, agrupando las especies en ramas bien definidas. Se observa *Pseudomonas sp.* LDEM077 se agrupa junto con *Pseudomonas anuradhapurensis* RD8MR3; sin embargo, la distancia entre ambas cepas podría indicar que son especies diferentes. Por lo tanto, se realizó un tercer árbol que incluyó ambos genes (*16S rRNA* y *rpoB*), con un total de 2684 posiciones en el conjunto de datos final

(Figura 5). En este árbol concatenado, *Pseudomonas sp.* LDEM077 quedó en la misma rama que *Pseudomonas anuradhasurensis* y *Pseudomonas asiática*, la distancia entre estas especies, podría nuevamente estar indicando que son especies diferentes, sin embargo, se requieren más estudios para confirmarlo.

El nombre de la especie de *Pseudomonas anuradhasurensis* fue publicada en 2021, la cual fue aislada de la endorhizosfera del arroz (Girard et al., 2021), sin embargo, al tratarse de una especie nombrada recientemente, no hay información registrada sobre características de dicha especie que pudieran usarse en la biorremediación de sitios contaminados con metales pesados, por lo que podría ser un área importante que abordar para futuros proyectos.

El género *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos gramnegativos más complejos y diversos, actualmente este género cuenta con 335 especies válidamente nombradas (de acuerdo con la Lista de nombres procariotas con posición en la nomenclatura (LPSN), <https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>, consultado el 20 de junio del 2024) (Parte et al., 2020). Las especies de *Pseudomonas* son capaces de colonizar y prosperar en diversos nichos ecológicos (suelo, agua y plantas, asociados con organismos superiores). Aunque se ha demostrado que algunas especies o cepas son patógenas para los seres humanos, los animales o las plantas, la mayoría de los genotipos de *Pseudomonas* son inofensivos como miembros comensales presentes en la microbiota o incluso beneficiosos para sus huéspedes eucariotas (por ejemplo, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal). El género *Pseudomonas* se divide en tres linajes principales, cada uno subdividido en varios grupos filogenéticos: el linaje *P. fluorescens* está constituido por 7 grupos, el linaje *P. aeruginosa* 3 grupos y el linaje *P. pertucinogena* 1 grupo, dentro del linaje de *P. fluorescens*, se encuentra el grupo de *P. putida* cuyas especies se estudian principalmente por su potencial biotecnológico, en relación con la producción de determinados productos químicos o propiedades fitobeneficiosas (Keshavarz-Tohid et al., 2019).

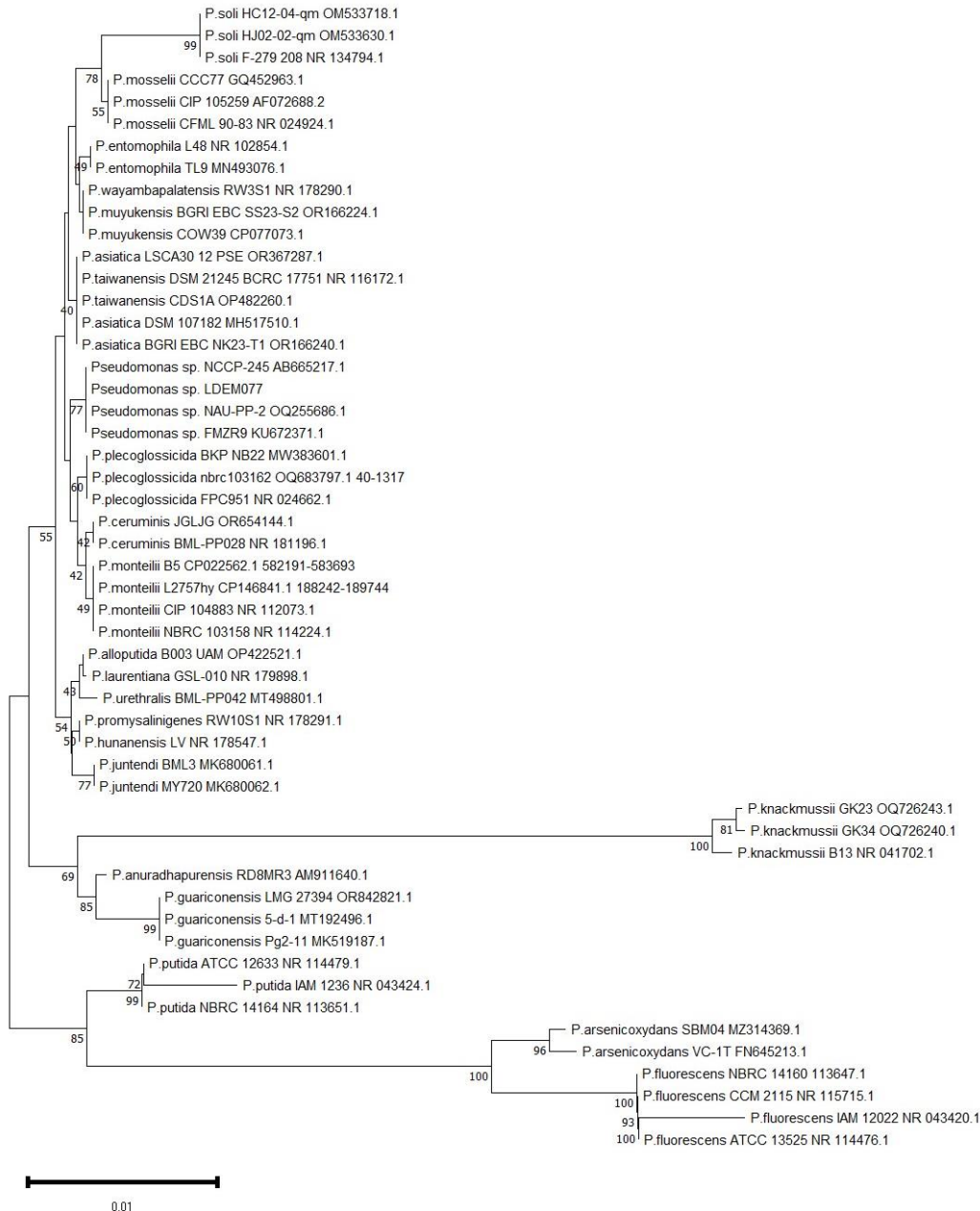
Se han estudiado cepas de *Pseudomonas putida* tolerantes al plomo como posibles biorremediadores de sitios contaminados, tal es el caso de *Pseudomonas putida* B6 formadora de biopelículas, la cual, mejoró el crecimiento de plantas de colza y trébol bajo estrés por plomo (400, 800 y 1200 mg/kg) (Shah et al., 2020) y *Pseudomonas putida*

KNP9 que mejoró significativamente los parámetros agronómicos del frijol mungo en presencia de plomo (125 mg/L) (Tripathi et al., 2005). En cuanto a los mecanismos de tolerancia al plomo en *Pseudomonas putida*, se ha observado que los grupos funcionales sulfhidrilo, fosfodiéster y los grupos carboxílicos presentes en las células bacterianas y sustancias poliméricas extracelulares tienen la capacidad de promover la adsorción del Pb (Qu et al., 2022).

Otra cepa del grupo de *Pseudomonas putida* que ha sido estudiada para la biorremediación de sitios contaminados con plomo es *Pseudomonas taiwanensis* WRS8, esta cepa, tolerante a plomo (2 g/L) y cadmio (0.9 g/L), mostró un aumento en la biomasa de dos cultivares de cilantro en un 25-48% y disminuyó las concentraciones de Cd y Pb en los tejidos comestibles en un 40-59% y los contenidos de Cd y Pb disponibles en los suelos de la rizosfera en un 11.1-15.2%, las concentraciones de los metales en el suelo fueron Cd total 2.23 mg/kg y Pb total 337 mg/kg (Ge et al., 2023).

Figura 3

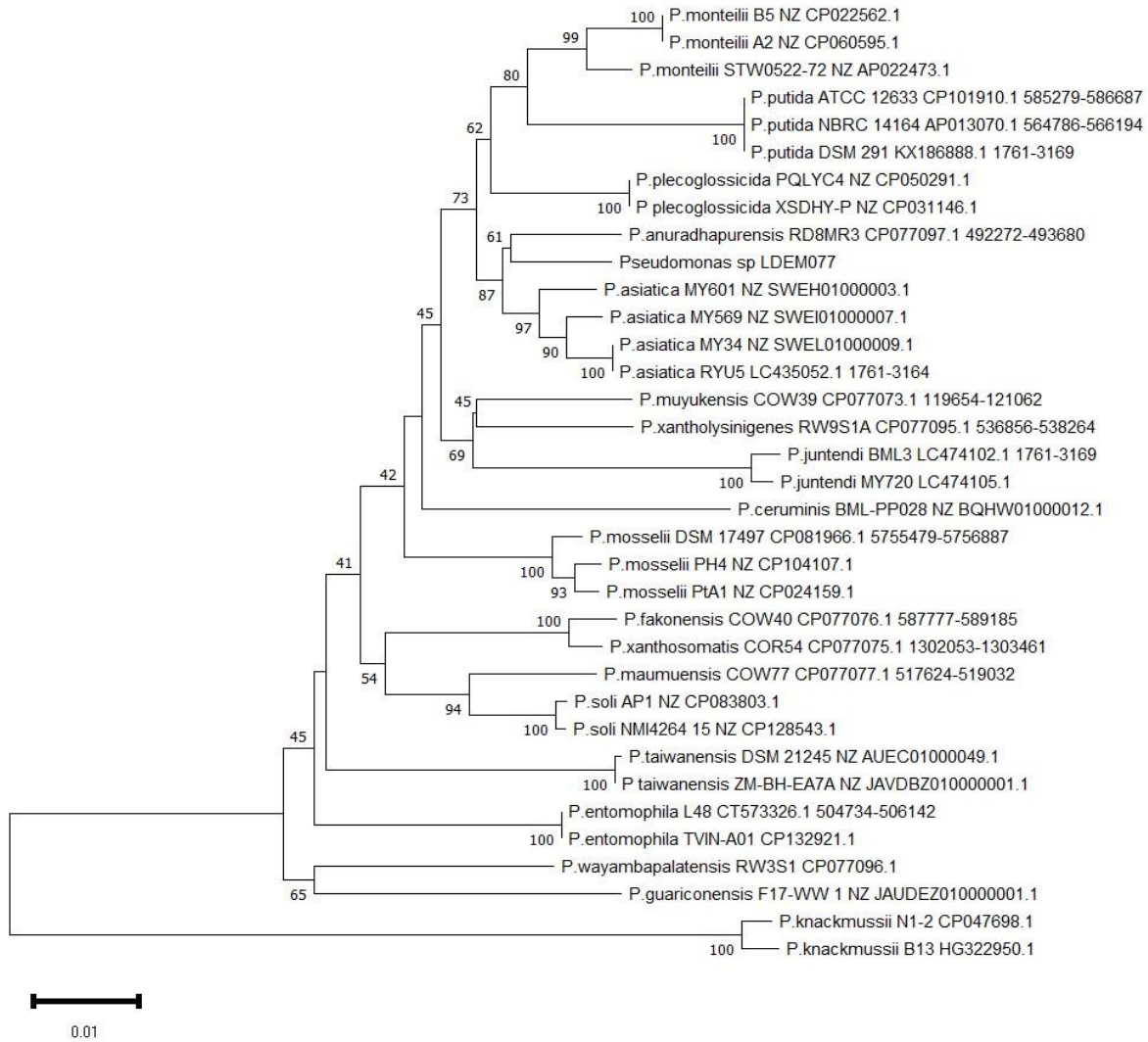
Árbol filogenético de Evolución Mínima, para 52 secuencias del gen ribosomal 16S rRNA de *Pseudomonas* spp (2000 réplicas), dentro de las que agrupa la cepa LDEM077 tolerante a 1 g/L de Pb.



Nota. Hubo un total de 1278 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

Figura 4

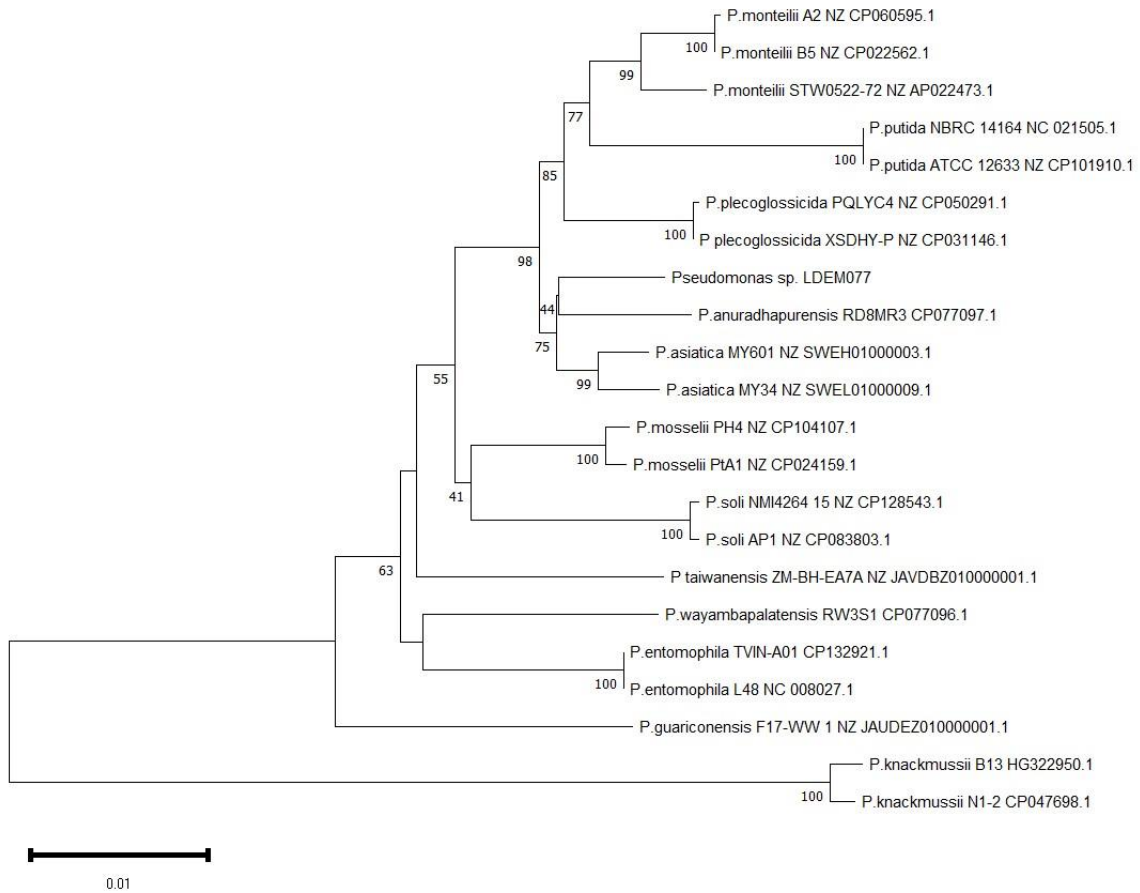
Árbol filogenético de Evolución Mínima, para 35 secuencias del gen *rpoB* de *Pseudomonas* spp (2000 réplicas), dentro de las que agrupa la cepa LDEM077 tolerante a 1 g/L de Pb.



Nota. Hubo un total de 1406 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

Figura 5

Árbol filogenético concatenado de Evolución Mínima, para 22 secuencias del gen 16S rRNA y rpoB de *Pseudomonas* spp (2000 réplicas), dentro de las que agrupa la cepa LDEM077 tolerante a 1 g/L de Pb⁺².



Nota. Hubo un total de 2684 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

El árbol filogenético basado en la secuencia del gen *16S rRNA* (con 1275 posiciones en el conjunto de datos final) de las cepas LDEM064, LDEM040 y LDEM027 mostró que las tres cepas se agrupan con miembros del género *Bacillus*. La cepa LDEM064 se ubicó en el grupo *Bacillus subtilis*, en la rama junto a *Bacillus inaquosorum* y *Bacillus cabrialesii* (Figura 6). Por otro lado, la cepa LDEM040 (tolerante a 17 g/L de Cr⁺⁶) se agrupó en la rama del grupo de *Bacillus cereus* junto a 15 especies estrechamente relacionadas (Figura 7). Finalmente, la cepa LDEM027 (tolerante a 0.8 g/L de Pb⁺² y 17 g/L de Cr⁺⁶) se ubicó en la rama de *Bacillus safensis* y *Bacillus australimaris* (Figura 8).

El árbol generado a partir del gen *rpoB* formó ramas bien definidas entre las especies relacionadas con la cepa LDEM064 (tolerante a 1 g/L de Pb⁺² y 15 g/L de Cr⁺⁶) (Figura 9). Esto nos permitió confirmar que la cepa pertenece a *Bacillus inaquosorum*, ya que se agrupó en una rama junto con varias cepas de esa misma especie.

Bacillus inaquosorum, anteriormente nombrada como *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*, es una especie que fue aislada y caracterizada por primera vez en 2009 a partir de suelos áridos en California (Dunlap et al., 2020; Rooney et al., 2009). Se ha investigado su actividad protectora contra patógenos de plantas y su capacidad de promover el crecimiento en plantas (Kamali et al., 2022). Además, se ha estudiado su uso en la biorremediación. Por ejemplo, la cepa *Bacillus inaquosorum* EC30O5B-F5, aislada de la rizosfera de *Opuntia basilaris*, mostró capacidad para oxidar plásticos de poliestireno como única fuente de carbono (Olabemiwo et al., 2024). Otra cepa, *Bacillus inaquosorum* LC1, aislada de la superficie de la uva, demostró un buen potencial de biodegradación del plaguicida cihalotrina lambda en caldo líquido, uvas y suelo (Ranade et al., 2024).

Aunque se han registrado cepas de *Bacillus inaquosorum* tolerantes a 10 g/L de Cr⁺⁶ (Chumacero, 2019; Ramírez et al., 2019), no había evidencia de cepas tolerantes a Pb, tampoco hay estudios sobre los posibles mecanismos de tolerancia que esta especie podría utilizar para tolerar estos metales o su aplicación para la remediación de sitios contaminados con metales pesados.

En el caso de la cepa LDEM040, el árbol generado a partir del gen *rpoB* (Figura 10) no permitió distinguir la especie a la que pertenece, esto debido a la gran similitud entre las secuencias de las especies pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus*.

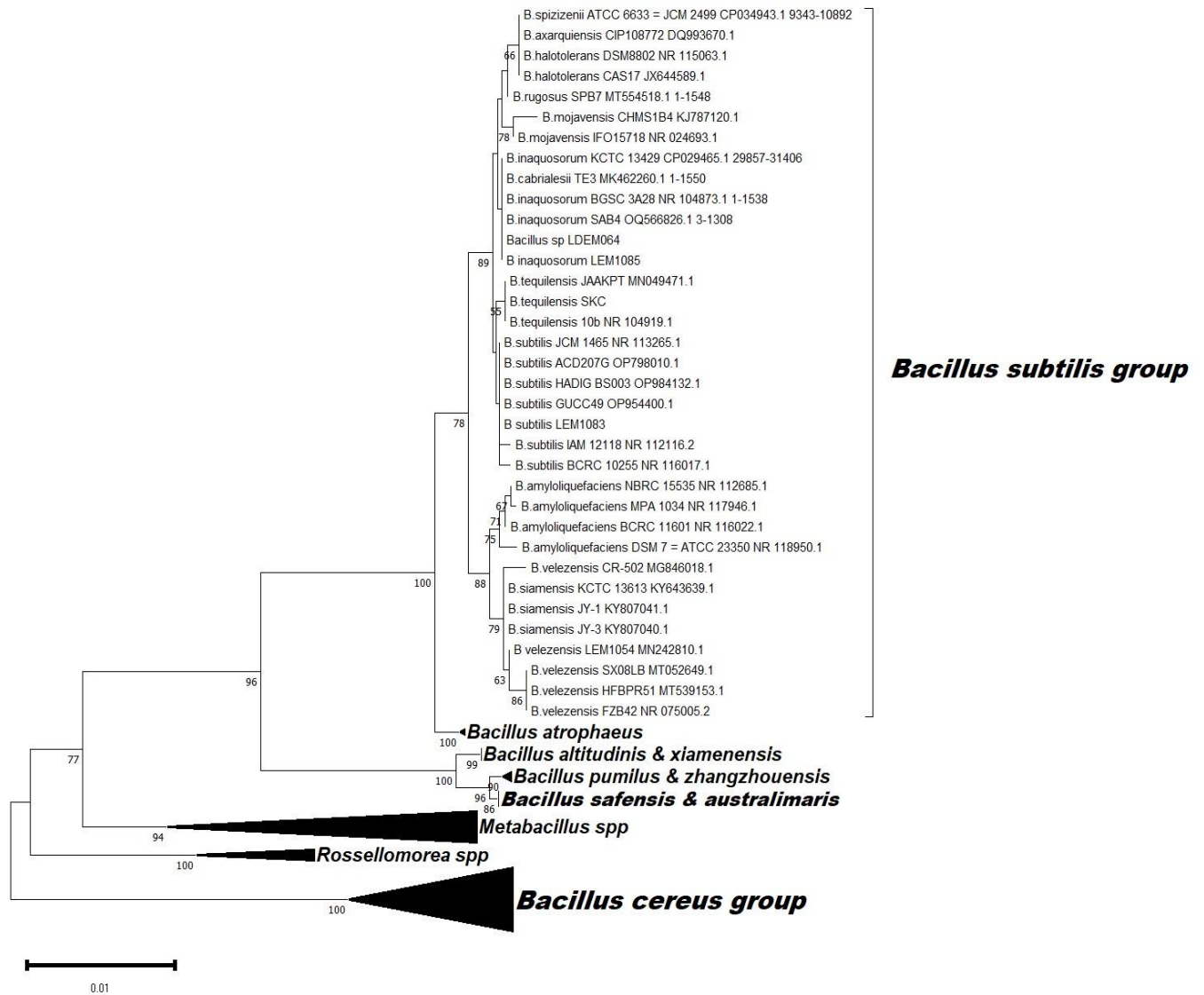
Finalmente, en el árbol basado en el gen *rpoB* de la cepa LDEM027 (Figura 11), se observaron ramas bien definidas para las especies relacionadas a esta cepa, con lo cual se pudo comprobar que la cepa LDEM027 se trata de *Bacillus safensis*.

La especie de *Bacillus safensis* fue aislado por primera vez de las de las superficies de las naves espaciales (Mars Odyssey Orbiter) y de las superficies de las instalaciones de ensamblaje en el Jet Propulsion Laboratory en California y el Centro Espacial Kennedy en Florida, estos entornos se caracterizan por sus condiciones extremadamente oligotróficas y de baja humedad (Satomi et al., 2006). La capacidad de *Bacillus safensis* para sobrevivir en ambientes extremos escasos de nutrientes ha sido un blanco importante de estudio y ha dado apertura a su aplicación en la biorremediación. Se han realizado investigaciones de la cepa de *Bacillus safensis* CFA-06 aislada del petróleo brasileño en la Cuenca de Campos por su capacidad de degradación de las fracciones aromáticas del petróleo (Fonseca et al., 2015). *Bacillus safensis* ZY16 una bacteria endófito aislada de la raíz de *Chloris virgata* Sw., una planta halotolerante recolectada en el delta del río Amarillo en China demostró capacidad de degradar hidrocarburos, producir biosurfactantes, tolerar altas cantidades de sal y promover el crecimiento de plantas (T. Wu et al., 2019). Además de poseer algunos rasgos promotores del crecimiento de las plantas *Bacillus safensis* también tiene aplicaciones biotecnológicas prometedoras debido a su capacidad para producir diversas enzimas industriales y metabolitos secundarios aplicables industrialmente (Lateef et al., 2015).

Relacionado a los metales pesados, se han reportado cepas de *Bacillus safensis* multirresistentes a metales pesados con un alto potencial de reducción de cromo hexavalente (Cr^{6+}) (Harboul et al., 2023; Kalaimurugan et al., 2020; Shafique et al., 2017). *Bacillus safensis* CCMM B629, la cual es una cepa que presentó una tolerancia a múltiples metales, entre ellos cromo (0.7 g/L) y plomo (1.6 g/L), eliminó completamente 100 y 200 mg/L de Cr^{6+} después de 48 y 120 h, respectivamente, también se demostró que el mecanismo de desintoxicación de Cr^{6+} por *Bacillus safensis* CCMM B629, comienza con su adsorción y luego sigue su reducción en la membrana, en donde están involucrados los grupos funcionales hidroxilo, carboxilo, amida y fosforilo (Harboul et al., 2023).

Figura 6

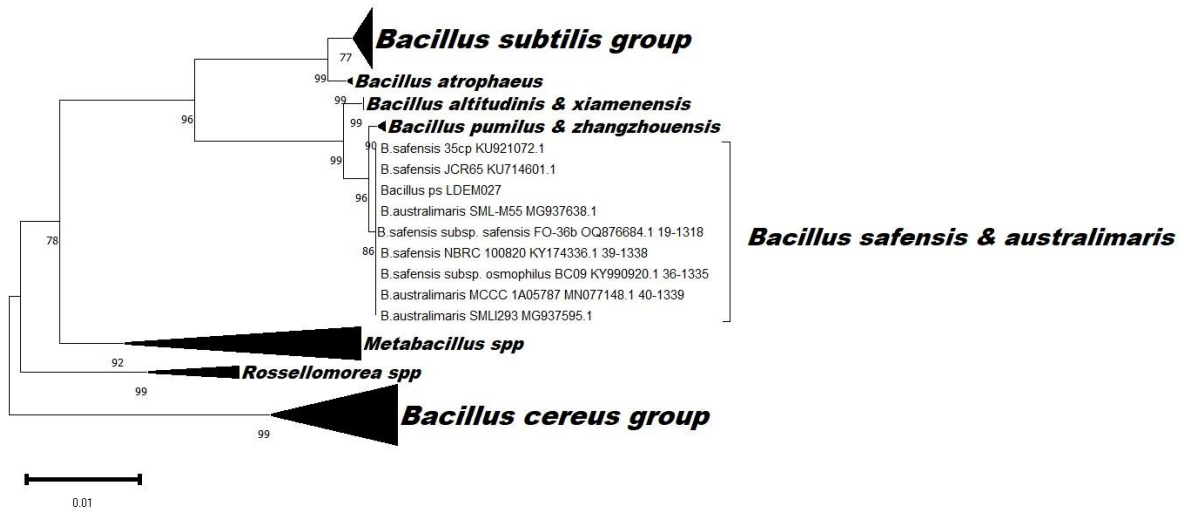
Árbol filogenético de Evolución Mínima para 122 secuencias de especies de Bacillaceae basado en secuencias del gen ribosomal 16S rRNA (2000 réplicas). Rama abierta del grupo de *Bacillus subtilis*, en este grupo se clasificó la cepa LDEM064.



Nota. La cepa LDEM064, creció a 1 g/L de Pb^{+2} y 15 g/L de Cr^{+6} . Los demás clados fueron comprimidos para una mejor visualización. Hubo un total de 1275 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

Figura 7

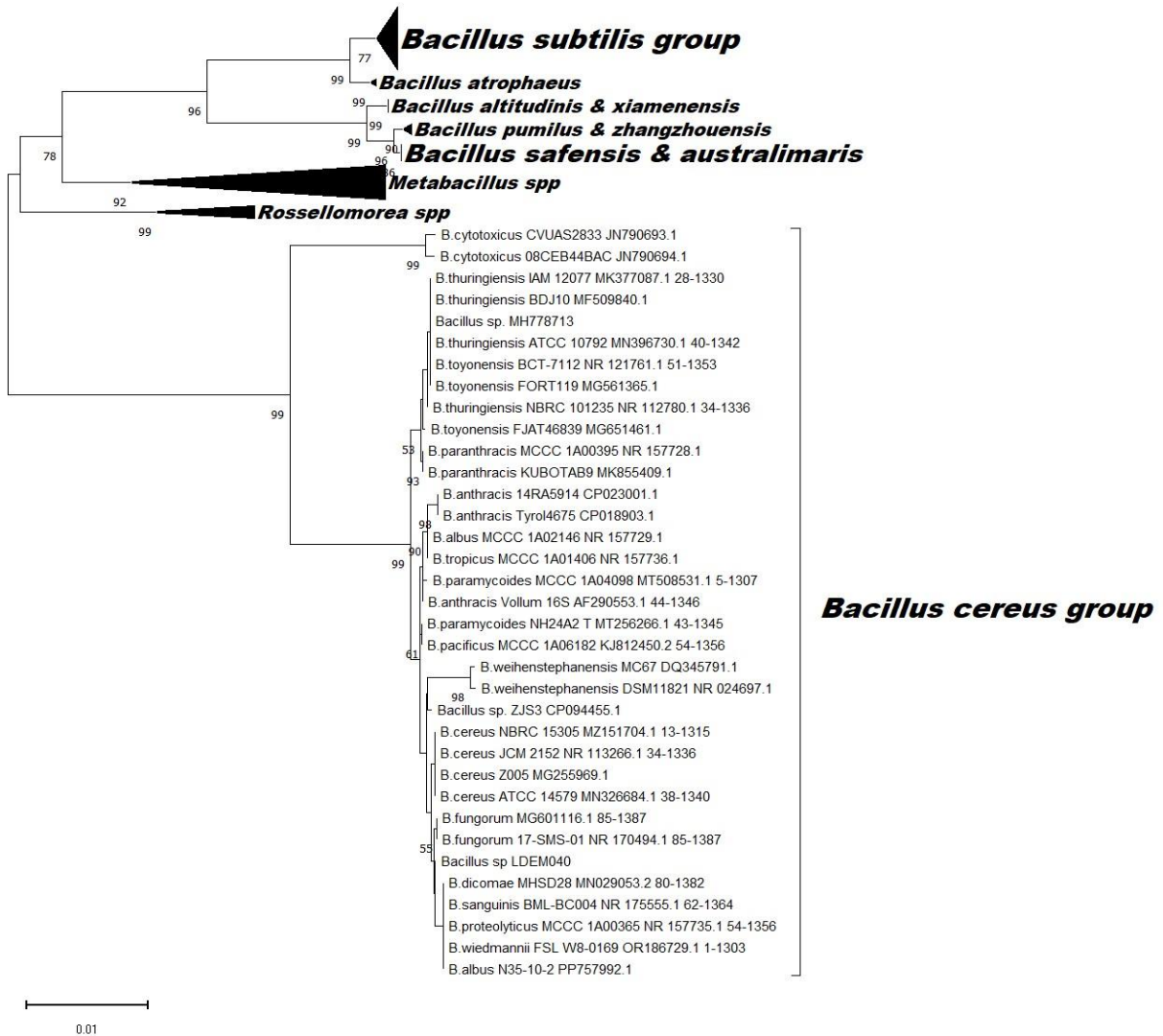
Árbol filogenético de Evolución Mínima para 122 secuencias de especies de Bacillaceae basado en secuencias del gen ribosomal 16S rRNA (2000 réplicas). Rama abierta del grupo de *B. safensis* & *B. australimaris*, en este grupo se clasificó la cepa LDEM027.



Nota. La cepa LDEM027 presentó tolerancia a 0.8 g/L de Pb^{+2} y 17 g/L de Cr^{+6} . Los demás clados fueron comprimidos para una mejor visualización. Hubo un total de 1275 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

Figura 8

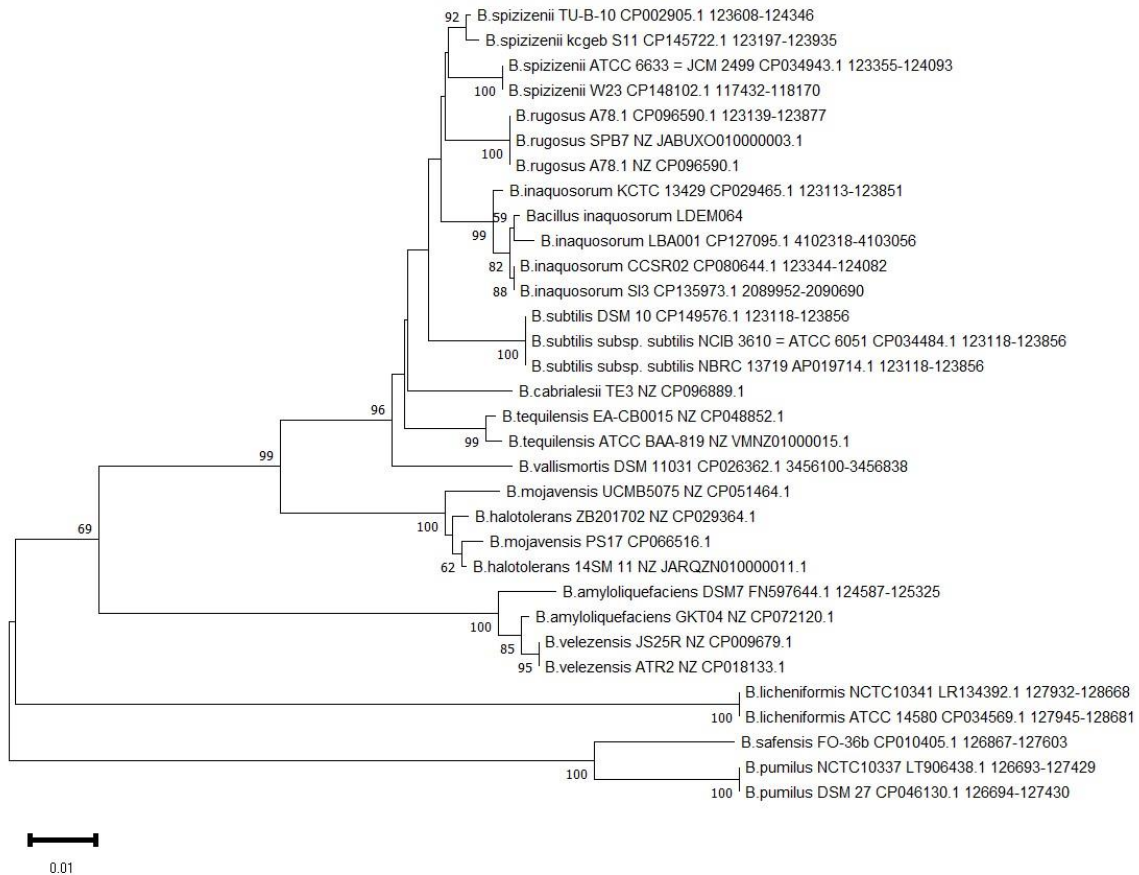
Árbol filogenético de Evolución Mínima para 122 secuencias de especies de Bacillaceae basado en secuencias del gen ribosomal 16S rRNA (2000 réplicas). Rama abierta del grupo de *Bacillus cereus*, en este grupo se clasificó la cepa LDEM040.



Nota. La cepa LDEM040 presentó tolerancia a 17 g/L de Cr⁶⁺. Los demás clados fueron comprimidos para una mejor visualización. Hubo un total de 1275 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

Figura 9

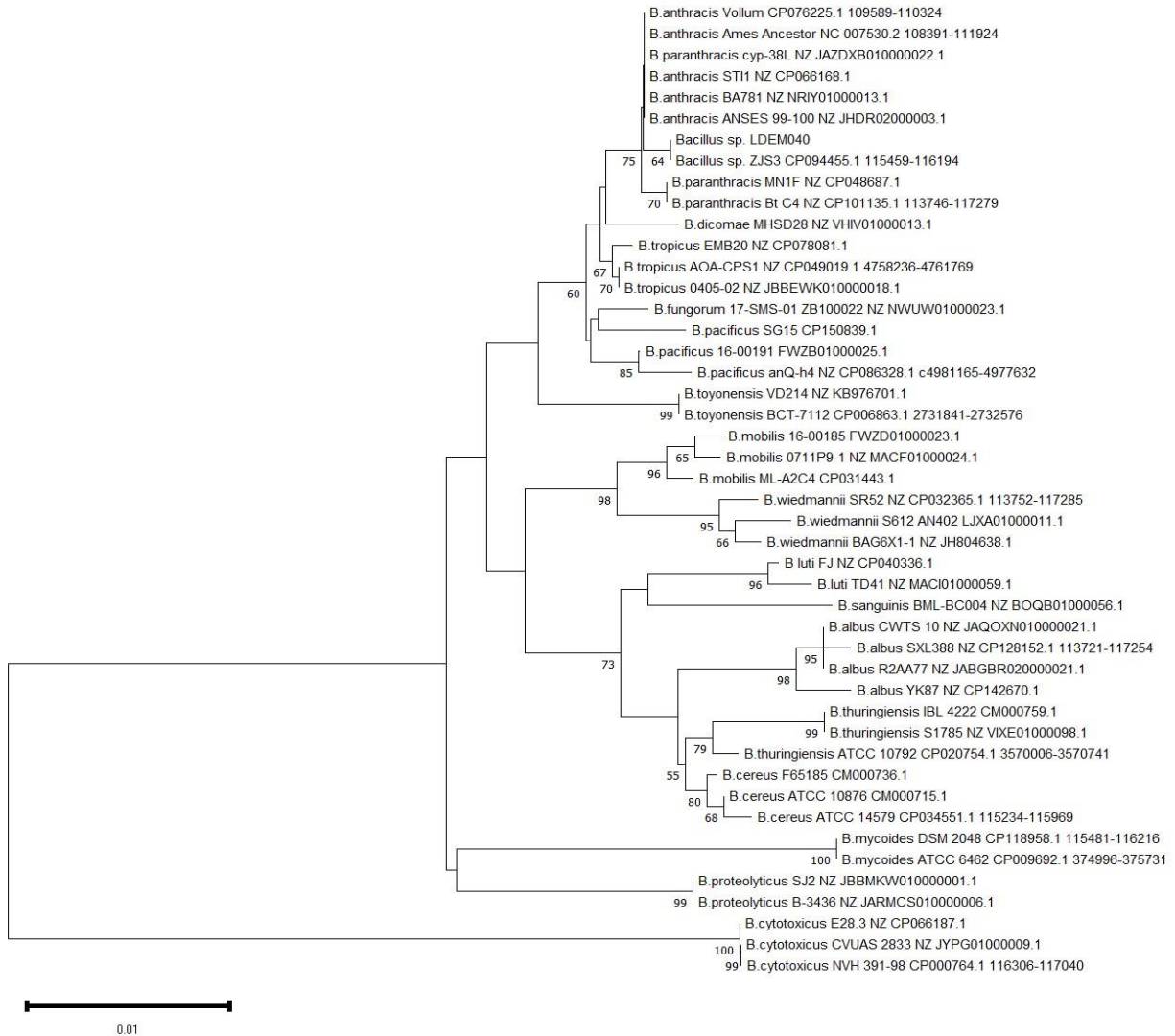
Árbol filogenético de Evolución Mínima para 32 secuencias de especies de *Bacillus* basado en secuencias del gen *rpoB* (2000 réplicas). Este grupo se clasificó la cepa LDEM064.



Nota. La cepa LDEM064 presentó tolerancia a 1 g/L de Pb^{+2} y 15 g/L de Cr^{+6} . Hubo un total de 737 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

Figura 10

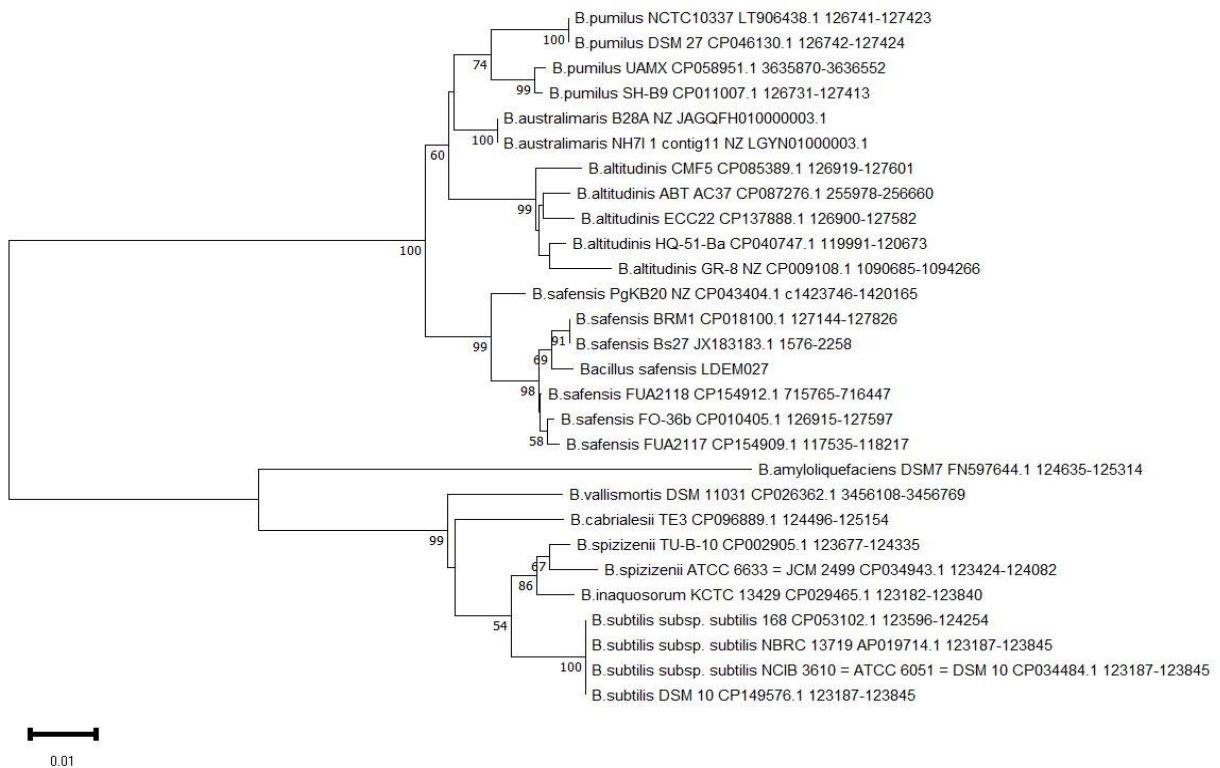
Árbol filogenético de Evolución Mínima para 46 secuencias de especies de del grupo de *Bacillus cereus* basado en secuencias del gen *rpoB* (2000 réplicas). Este grupo se clasificó la cepa LDEM040.



Nota. La cepa LDEM040 presentó tolerancia a 17 g/L de Cr⁺⁶. Hubo un total de 736 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

Figura 11

Árbol filogenético de Evolución Mínima para 28 secuencias de especies de *Bacillus* basado en secuencias del gen *rpoB* (2000 réplicas). Este grupo se clasificó la cepa LDEM027.



Nota. La cepa LDEM027 presentó tolerancia a 0.8 g/L de Pb^{+2} y 17 g/L de Cr^{+6} . Hubo un total de 659 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

9. CONCLUSIONES

Se encontraron cepas bacterianas capaces de crecer a altas concentraciones de Cr^{+6} (19 cepas crecieron a [15 g/L] y 9 a [17 g/L]) y de Pb^{+2} (8 cepas crecieron a [1 g/L] y 14 a [0.8 g/L]). Se seleccionaron las cepas con mayor tolerancia a Cr^{+6} y Pb^{+2} a las cuales se les realizaron análisis de secuencias de los genes *16SrRNA* y *rpoB*. Las cepas LDEM027 (tolerante a [0.8 g/L] de Pb^{+2} y [17 g/L] de Cr^{+6}) y LDEM064 (tolerante a [1 g/L] de Pb^{+2} y [15 g/L] de Cr^{+6}) fueron identificadas como *Bacillus safensis*, y *Bacillus inaquosorum*, respectivamente, la cepa LDEM040, tolerante a [17 g/L] de Cr^{+6} , fue identificada como perteneciente al grupo de *Bacillus cereus*, sin embargo, debido a las estrechas similitudes entre las secuencias *16SrRNA* y *rpoB* de las especies pertenecientes a este grupo, no fue posible su identificación a nivel de especie. En el caso de la cepa LDEM077, se agrupó junto a especies del grupo de *Pseudomonas putida*.

10. REFERENCIAS

- Abdel-rahman, G. N. (2022). Heavy metals, definition, sources of food contamination, incidence, impacts and remediation. A literature review with recent updates. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(1), 419–437. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.80825.4004>
- Adhikary, S., Saha, J., Dutta, P., & Pal, A. (2024). Bacterial Homeostasis and Tolerance to Potentially Toxic Metals and Metalloids through Diverse Transporters: Metal-Specific Insights. *Geomicrobiology Journal*, 1, 1–23. <https://doi.org/10.1080/01490451.2024.2340517>
- Ali, H., & Khan, E. (2018). What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term 'heavy metals' – proposal of a comprehensive definition. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(1), 6–19. <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652>
- Ali, H., & Khan, E. (2019). Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25(6), 1353–1376. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398>
- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Amenta, M. L., Vaccaro, F., Varriale, S., Sangaré, J. R., Defez, R., Mengoni, A., & Bianco, C. (2024). Cereals can trap endophytic bacteria with potential beneficial traits when grown ex-situ in harsh soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae041>
- Barbieri, M. (2016). The Importance of Enrichment Factor (EF) and Geoaccumulation Index (I_{geo}) to Evaluate the Soil Contamination. *Journal of Geology & Geophysics*, 5(1), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2381-8719.1000237>
- Chatterjee, S., Kumari, S., Rath, S., Priyadarshane, M., & Das, S. (2020). Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: metal resistance and possible

- applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics*, 12(11), 1637–1655. <https://doi.org/10.1039/d0mt00140f>
- Chen, C. Y., Nace, G. W., & Irwin, P. L. (2003). A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2), 475–479. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00194-5)
- Chen, J. P. (2012). *Decontamination of heavy metals: processes, mechanisms, and applications* (1ra ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12672>
- Chumacero, B. (2019). *Diversidad genética y filogenia de bacterias pertenecientes al género Bacillus, tolerantes a cromo, asociadas al mezquite (Prosopis Laevigata)* [Benemérita Universidad Autónoma De Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4806>
- Cihan, A. C., Tekin, N., Ozcan, B., & Cokmus, C. (2012). The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16s rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (1), 309–324. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120001000037>
- Cota-Ruiz, K., López de los Santos, Y., Hernández-Viezcas, J. A., Delgado-Rios, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2019). A comparative metagenomic and spectroscopic analysis of soils from an international point of entry between the US and Mexico. *Environment International*, 123(November 2018), 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.055>
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K., Lade, H., & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability (Switzerland)*, 7(2), 2189–2212. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Zeigler, D. R. (2020). Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01354-9>
- Ehsan, M., Ahmed, I., Hayat, R., Iqbal, M., Bibi, N., & Khalid, N. (2016). Molecular

- identification and characterization of phosphate solubilizing pseudomonas sp. Isolated from rhizosphere of mash bean (*Vigna Mungo* L.) for growth promotion in wheat. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(3), 775–788. <http://jast.modares.ac.ir/article-23-1247-en.html>
- Eid, E. M., Shaltout, K. H., Alamri, S. A. M., Sewelam, N. A., & Galal, T. M. (2020). Evaluating the uptake of ten heavy metals by kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in a soil-sludge mixture using a regression model. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(5), 7021–7039. https://doi.org/10.15666/aeer/1805_70217039
- Fonseca, F. S. A. da, Angolini, C. F. F., Arruda, M. A. Z., Junior, C. A. L., Santos, C. A., Saraiva, A. M., Pilau, E., Souza, A. P., Laborda, P. R., Oliveira, P. F. L. de, Oliveira, V. M. de, Reis, F. de A. M., & Marsaioli, A. J. (2015). Identification of oxidoreductases from the petroleum *Bacillus safensis* strain. *Biotechnology Reports*, 8, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.09.001>
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(3), 609–643. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Gall, J. E., Boyd, R. S., & Rajakaruna, N. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4436-3>
- Ge, Y., Wen, Z., He, L., & Sheng, X. (2023). Metal-immobilizing *Pseudomonas taiwanensis* WRS8 reduces heavy metal accumulation in *Coriandrum sativum* by changing the metal immobilization–related bacterial population abundances. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(31), 76911–76922. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27967-2>
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R. (2021). The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. *Microorganisms*, 9(8), 1766. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766>
- Harboul, K., El Aabedy, A., Hammani, K., & El-Karkouri, A. (2023). Reduction of hexavalent chromium using *Bacillus safensis* isolated from an abandoned mine.

- Environmental Technology*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/09593330.2023.2256457>
- Hernández Caricio, C., Ramíres, V., Martínez, J., Quintero Hernández, V., Baez, A., Munive, J. A., & Rosas Murrieta, N. (2022). Los metales pesados en la historia de la humanidad, los efectos de la contaminación por metales pesados y los procesos biotecnológicos para su eliminación: el caso de *Bacillus* como bioherramienta para la recuperación de suelos. *ALIANZAS Tendencias BUAP*, 7, 1–68. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7091407>
- Hesse, E., O'Brien, S., Tromas, N., Bayer, F., Luján, A. M., van Veen, E. M., Hodgson, D. J., & Buckling, A. (2018). Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination. *Ecology Letters*, 21(1), 117–127. <https://doi.org/10.1111/ele.12878>
- Ismail, M. A., Amin, M. A., Eid, A. M., Hassan, S. E.-D., Mahgoub, H. A. M., Lashin, I., Abdelwahab, A. T., Azab, E., Gobouri, A. A., Elkelish, A., & Fouda, A. (2021). Comparative Study between Exogenously Applied Plant Growth Hormones versus Metabolites of Microbial Endophytes as Plant Growth-Promoting for *Phaseolus vulgaris* L. *Cells*, 10(5), 1059. <https://doi.org/10.3390/cells10051059>
- Jin, Y., Luan, Y., Ning, Y., & Wang, L. (2018). Effects and Mechanisms of Microbial Remediation of Heavy Metals in Soil : A Critical Review. *Applied Sciences*, 8, 1–17. <https://doi.org/10.3390/app8081336>
- Joshi, S., Gangola, S., Bhandari, G., Bhandari, N. S., Nainwal, D., Rani, A., Malik, S., & Slama, P. (2023). Rhizospheric bacteria: the key to sustainable heavy metal detoxification strategies. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1229828>
- Kalaimurugan, D., Balamuralikrishnan, B., Durairaj, K., Vasudhevan, P., Shivakumar, M. S., Kaul, T., Chang, S. W., Ravindran, B., & Venkatesan, S. (2020). Isolation and characterization of heavy-metal-resistant bacteria and their applications in environmental bioremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(3), 1455–1462. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02563-5>
- Kamali, M., Guo, D., Naeimi, S., & Ahmadi, J. (2022). Perception of Biocontrol Potential of *Bacillus inaquosorum* KR2-7 against Tomato Fusarium Wilt through Merging Genome Mining with Chemical Analysis. *Biology*, 11(1), 137.

<https://doi.org/10.3390/biology11010137>

- Keshavarz-Tohid, V., Vacheron, J., Dubost, A., Prigent-Combaret, C., Taheri, P., Tarighi, S., Taghavi, S. M., Moënne-Loccoz, Y., & Muller, D. (2019). Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *42*(4), 468–480. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.04.004>
- Ki, J.-S., Zhang, W., & Qian, P.-Y. (2009). Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiological Methods*, *77*(1), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.003>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lateef, A., Adelere, I. A., & Gueguim-Kana, E. B. (2015). The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia*, *70*(4), 411–419. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0062>
- Li, C., Yu, Y., Fang, A., Feng, D., Du, M., Tang, A., Chen, S., & Li, A. (2022). Insight into biosorption of heavy metals by extracellular polymer substances and the improvement of the efficacy: a review. *Letters in Applied Microbiology*, *75*(5), 1064–1073. <https://doi.org/10.1111/lam.13563>
- Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Vinothkanna, A., Yin, H., Liu, X., & Meng, D. (2021). Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment – A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *226*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112863>
- Meza, C., Valenzuela, F., Echeverría-Vega, A., Gomez, A., Sarkar, S., Cabeza, R. A., Arencibia, A. D., Quiroz, K., Carrasco, B., & Banerjee, A. (2022). Plant-growth-promoting bacteria from rhizosphere of Chilean common bean ecotype (*Phaseolus vulgaris* L.) supporting seed germination and growth against salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1052263>
- Morales, Y., Juárez, D., Aragón, C., Mascarua, M., Bustillos, R., Fuentes, L., Contreras,

- R., & Muñoz, J. (2011). Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol*, *43*(4), 287–293. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000400009>
- Nath, S., Deb, B., & Sharma, I. (2018). Isolation of toxic metal-tolerant bacteria from soil and examination of their bioaugmentation potentiality by pot studies in cadmium- and lead-contaminated soil. *International Microbiology*, *21*(1–2), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0003-4>
- Nriagu, J., & Pacyna, J. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, *333*, 134–139. <https://doi.org/10.1038/333134a0>
- Olabemiwo, F. A., Hagan, A., Cham, M., & Cohan, F. M. (2024). Two plant-growth-promoting *Bacillus* species can utilize nanoplastics. *Science of The Total Environment*, *907*, 167972. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167972>
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(11), 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Pourret, O., & Hursthouse, A. (2019). It's time to replace the term “heavy metals” with “potentially toxic elements” when reporting environmental research. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(22). <https://doi.org/10.3390/ijerph16224446>
- Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., & Maiti, T. K. (2018). Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092. *Journal of Hazardous Materials*, *351*, 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.03.009>
- Priyadarshane, M., & Das, S. (2021). Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(1), 104686. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104686>
- Pushkar, B., Sevak, P., Parab, S., & Nilkanth, N. (2021). Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review. *Journal of Environmental*

Management, 287(November 2020), 112279.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112279>

Qu, C., Yang, S., Mortimer, M., Zhang, M., Chen, J., Wu, Y., Chen, W., Cai, P., & Huang, Q. (2022). Functional group diversity for the adsorption of lead(Pb) to bacterial cells and extracellular polymeric substances. *Environmental Pollution*, 295. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118651>

Ramírez, V., Baez, A., López, P., Bustillos, R., Villalobos, M. Á., Carreño, R., Contreras, J. L., Muñoz-rojas, J., Fuentes, L. E., Martínez, J., & Munive, J. A. (2019). Chromium Hyper-Tolerant *Bacillus* sp . MH778713 Assists Phytoremediation of Heavy Metals by Mesquite Trees (*Prosopis laevigata*). *Frontiers in Microbiology*, 10(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01833>

Ranade, Y., Pathak, P., Chandrashekar, M., Pardeshi, A., & Saha, S. (2024). Bioremediation of lambda cyhalothrin by *Bacillus inaquosorum* and *Bacillus spizizenii* isolated from surface of Thompson seedless grape berry. *Biologia*, 79(3), 1015–1026. <https://doi.org/10.1007/s11756-024-01598-5>

Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., & Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 59(10), 2429–2436. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009126-0>

Roobahani, M. M., Sobhanardakani, S., Karimi, H., & Sorooshnia, R. (2015). Natural and Anthropogenic Source of Heavy Metals Pollution in the Soil Samples of an Industrial Complex ; a Case Study. *Iranian Journal of Toxicology Volume*, 9(29), 1336–1341. <http://ijt.arakmu.ac.ir/article-1-337-en.html>

Sahmoune, M. N. (2018). Performance of *Streptomyces rimosus* biomass in biosorption of heavy metals from aqueous solutions. *Microchemical Journal*, 141, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.009>

Samuel, M. S., Datta, S., Khandge, R. S., & Selvarajan, E. (2021). A state of the art review on characterization of heavy metal binding metallothioneins proteins and their widespread applications. *Science of The Total Environment*, 775, 145829. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145829>

- Sandhya, V., Shrivastava, M., Ali, S. Z., & Sai Shiva Krishna Prasad, V. (2017). Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russian Agricultural Sciences*, 43(1), 22–34. <https://doi.org/10.3103/s1068367417010165>
- Satomi, M., La Duc, M. T., & Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1735–1740. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64189-0>
- Shafique, M., Jawaid, A., & Rehman, Y. (2017). As(V) Reduction, As(III) Oxidation, and Cr(VI) Reduction by Multi-metal-resistant *Bacillus subtilis*, *Bacillus safensis*, and *Bacillus cereus* Species Isolated from Wastewater Treatment Plant. *Geomicrobiology Journal*, 34(8), 687–694. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1240265>
- Shah, T., Munsif, F., D'amato, R., & Nie, L. (2020). Lead toxicity induced phytotoxic impacts on rapeseed and clover can be lowered by biofilm forming lead tolerant bacteria. *Chemosphere*, 246, 125766. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125766>
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for Rhizobia* (1st ed.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- Sun, Q., Li, Y., Shi, L., Hussain, R., Mehmood, K., Tang, Z., & Zhang, H. (2022). Heavy metals induced mitochondrial dysfunction in animals: Molecular mechanism of toxicity. *Toxicology*, 469, 153136. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153136>
- Tapia-García, E. Y., Hernández-Trejo, V., Guevara-Luna, J., Rojas-Rojas, F. U., Arroyo-Herrera, I., Meza-Radilla, G., Vásquez-Murrieta, M. S., & Estrada-de los Santos, P. (2020). Plant growth-promoting bacteria isolated from wild legume nodules and nodules of *Phaseolus vulgaris* L. trap plants in central and southern Mexico. *Microbiological Research*, 239, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126522>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2014). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *National Institutes of Health*, 1–30. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4>
- Tripathi, M., Munot, H. P., Shouche, Y., Meyer, J. M., & Goel, R. (2005). Isolation and

- Functional Characterization of Siderophore-Producing Lead- and Cadmium-Resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Current Microbiology*, 50(5), 233–237. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4459-4>
- Vareda, J. P., Valente, A. J. M., & Durães, L. (2019). Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review. *Journal of Environmental Management*, 246, 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.126>
- Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. IBP handbook.
- Weissmannová, H. D., & Pavlovský, J. (2017). Indices of soil contamination by heavy metals – methodology of calculation for pollution assessment (minireview). *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(12), 616. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6340-5>
- Wróbel, M., Śliwakowski, W., Kowalczyk, P., Kramkowski, K., & Dobrzyński, J. (2023). Bioremediation of Heavy Metals by the Genus *Bacillus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph20064964>
- Wu, T., Xu, J., Liu, J., Guo, W.-H., Li, X.-B., Xia, J.-B., Xie, W.-J., Yao, Z.-G., Zhang, Y.-M., & Wang, R.-Q. (2019). Characterization and Initial Application of Endophytic *Bacillus safensis* Strain ZY16 for Improving Phytoremediation of Oil-Contaminated Saline Soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00991>
- Wu, X.-Y., Walker, M. J., Hornitzky, M., & Chin, J. (2006). Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.021>
- Zeng, Y., Liu, W., Li, H., Yu, Y., & Chen, B. (2007). Effect of restriction endonucleases on assessment of biodiversity of cultivable polar marine planktonic bacteria by amplified

ribosomal DNA restriction analysis. *Extremophiles*, 11(5), 685–692.
<https://doi.org/10.1007/s00792-007-0086-x>

11. ANEXOS

ANEXO 1. Medios utilizados.

Medio Jensen libre de nitrógeno

Solución P (K ₂ HPO ₄ 20g/L, MgSO ₄ 20 g/L)	10 mL
Solución Q (NaCl 20 g/L)	10 mL
Solución R (CaHPO ₄ 50 g/L)	20 mL
Solución D (FeCl ₃ 4 g/L)	10 mL
Oligoelementos (H ₃ BO ₃ 2.86 g/L, MnSO ₄ •4H ₂ O 2.03 g/L, ZnSO ₄ •7H ₂ O 0.22 g/L, CuSO ₄ •5H ₂ O 0.08 g/L, Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O 0.14 g/L)	1 mL
Agar (para medio sólido)	18 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 6.8-7.0 con NaOH. Fuente: (Somasegaran & Hoben, 1994)

Medios YM Y YMA

Manitol	10 g
Extracto de levadura	1 g
K ₂ HPO ₄	0.66 g
Glutamato de sodio	0.5 g
NaCl	0.05 g
Solución T (MgSO ₄ •7H ₂ O 10 g/L)	10 mL
Solución U (CaCl ₂ 40 g/L)	1 mL
Solución V (FeCl ₃ •6H ₂ O 4 g/L)	1 mL
Agar para YMA (medio sólido)	18 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 0.1 N. Fuente: (Vincent, 1970)

Medio Luria-Bertani (LB)

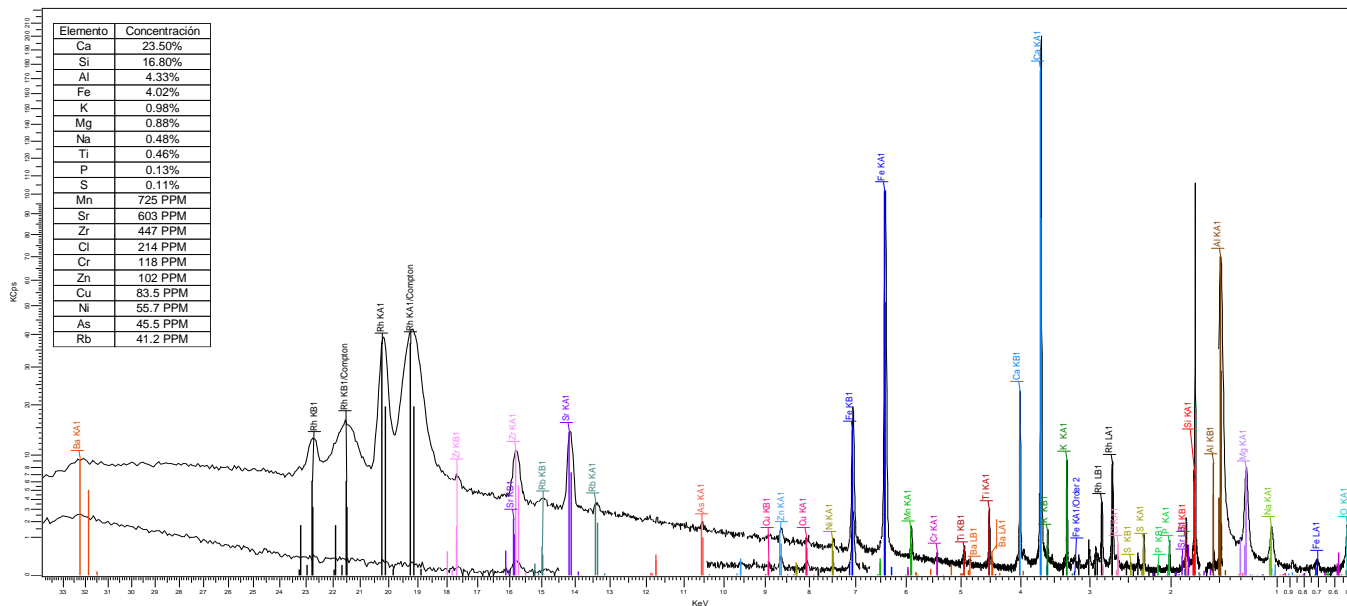
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

Ajustar a pH 7.4 con NaOH 1 N. Fuente: (Somasegaran & Hoben, 1994)

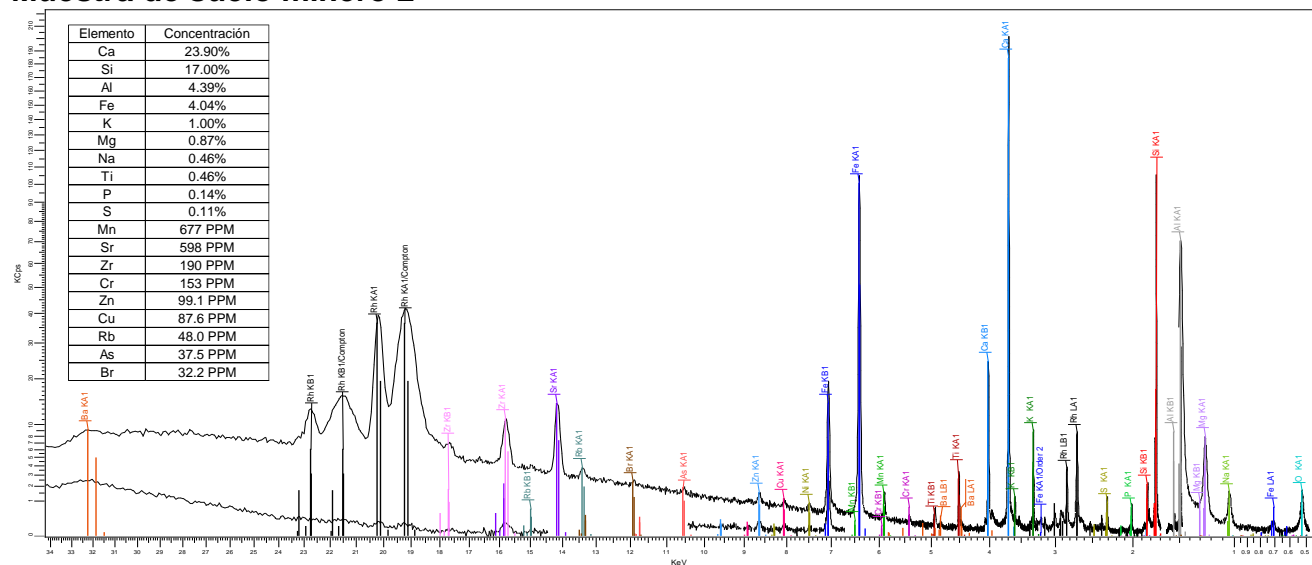
12. APÉNDICES

APÉNDICE A. Espectros de WDXRF (espectrometría de fluorescencia de rayos-x secuencial de longitud de onda dispersiva).

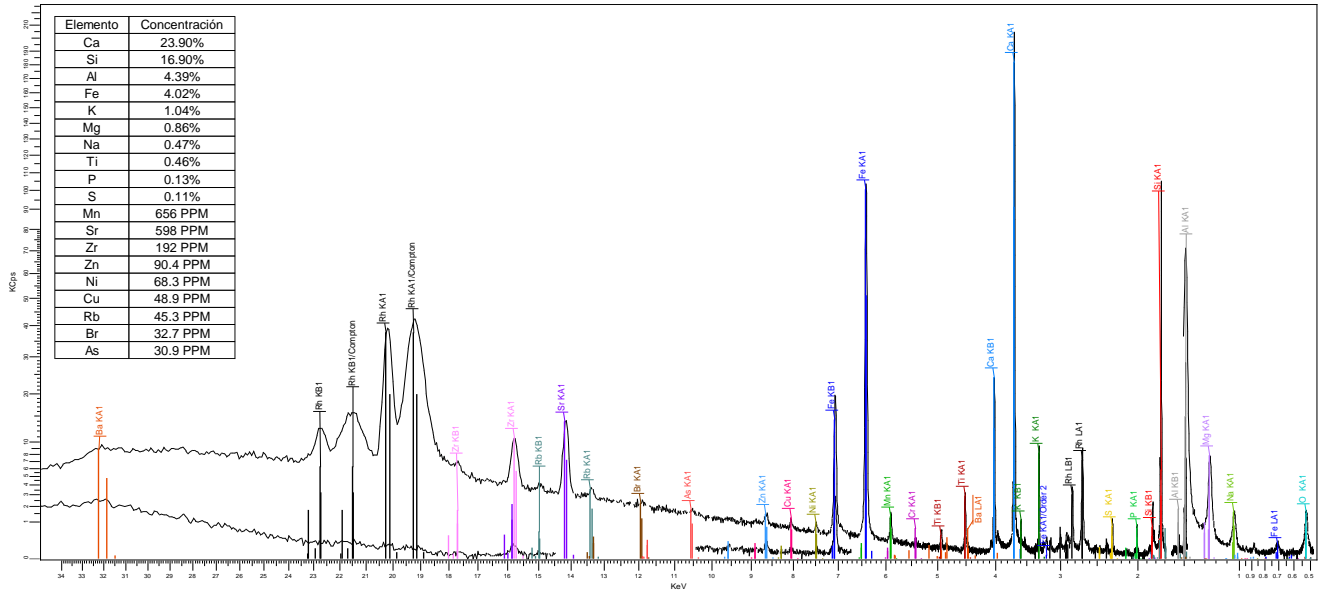
Muestra de suelo minero 1









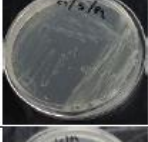

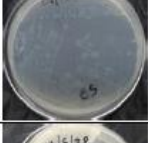




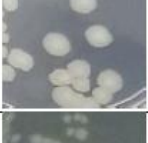





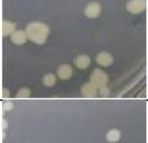


Muestra de suelo minero 2



















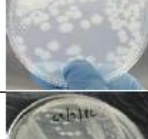








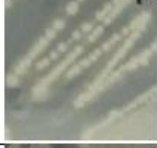

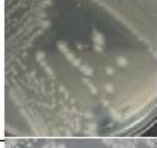





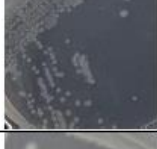










Muestra de suelo minero 3






















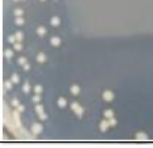





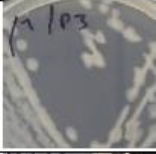

















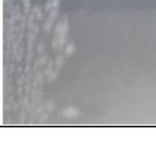
APÉNDICE B Morfología de cepas aisladas de suelo minero























CÓDIGO (LDEM)	AISLADO	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	PROCEDENCIA DE LA CEPA	PROCEDENCIA DE LA PLANTA
LDEM001			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM002			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM003			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM004			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM005			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM006			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM007			Endosfera	Suelo minero
LDEM008			Endosfera	Suelo minero
LDEM009			Endosfera	Suelo minero
LDEM010			Endosfera	Suelo minero
LDEM011			Endosfera	Suelo minero






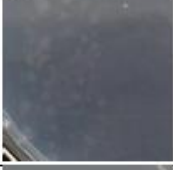





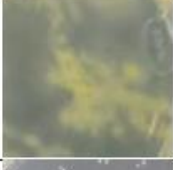



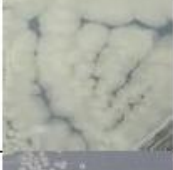




CÓDIGO (LDEM)	AISLADO	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	PROCEDENCIA DE LA CEPA	PROCENCIA DE LA PLANTA
LDEM012			Endosfera	Suelo minero
LDEM013			Endosfera	Suelo minero
LDEM014			Endosfera	Suelo minero
LDEM015			Endosfera	Suelo minero
LDEM016			Endosfera	Suelo minero
LDEM017			Endosfera	Suelo minero
LDEM018			Endosfera	Suelo minero
LDEM019			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM020			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM021			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM022			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo








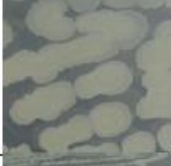



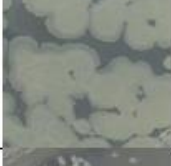


CÓDIGO (LDEM)	AISLADO	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	PROCEDENCIA DE LA CEPA	PROCENCIA DE LA PLANTA
LDEM023			Endosfera	Suelo minero
LDEM024			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM025			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM026			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM027			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM028			Endosfera	Suelo minero
LDEM029			Endosfera	Suelo minero
LDEM030			Endosfera	Suelo minero
LDEM031			Endosfera	Suelo minero
LDEM032			Endosfera	Suelo minero
LDEM033			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita

CÓDIGO (LDEM)	AISLADO	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	PROCEDENCIA DE LA CEPA	PROCENCIA DE LA PLANTA
LDEM034			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM035			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM036			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM037			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM038			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM039			Endosfera	Suelo minero
LDEM040			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM041			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM042			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM043			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM044			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita

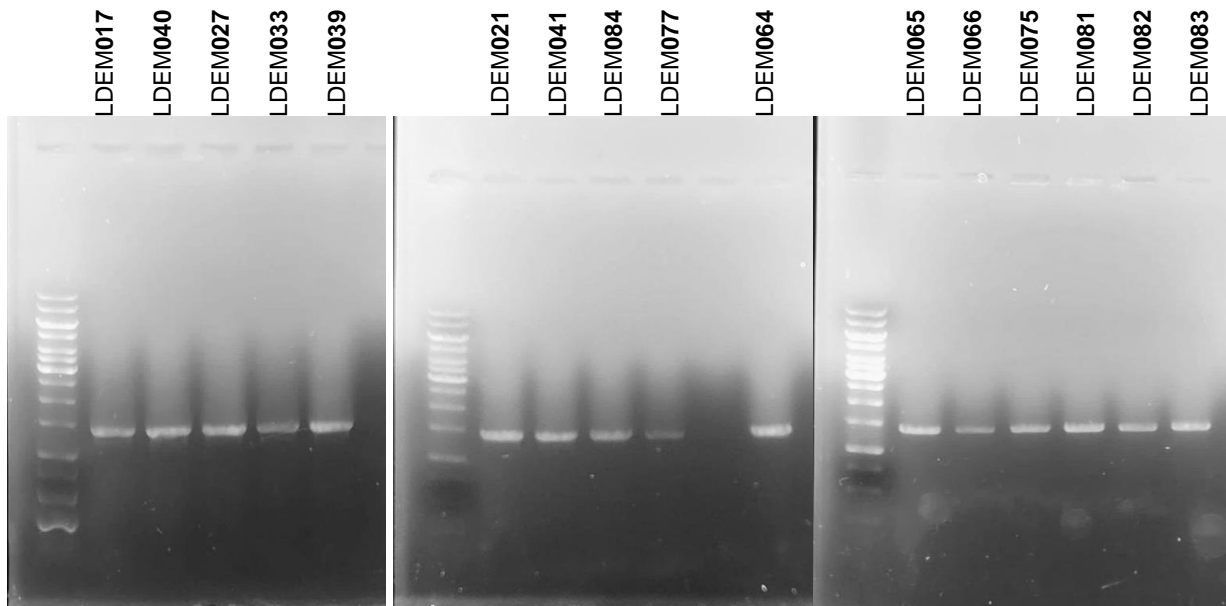
CÓDIGO (LDEM)	AISLADO	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	PROCEDENCIA DE LA CEPA	PROCENCIA DE LA PLANTA
LDEM45			Endosfera	Suelo minero
LDEM46			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM47			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM48			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM49			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM050			Rizosfera	Suelo minero
LDEM051			Rizosfera	Suelo minero
LDEM052			Rizosfera	Suelo minero
LDEM053			Suelo	Suelo Minero
LDEM054			Suelo	Suelo Minero
LDEM055			Suelo	Suelo Minero

CÓDIGO (LDEM)	AISLADO	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	PROCEDENCIA DE LA CEPA	PROCENCIA DE LA PLANTA
LDEM056			Endosfera	Medio Jensen libre de nitrógeno + suelo
LDEM057			Rizosfera	Suelo minero
LDEM058			Rizosfera	Suelo minero + Vermiculita + Agrolita
LDEM059			Rizosfera	Suelo minero + Vermiculita + Agrolita
LDEM060			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero
LDEM061			Rizosfera	Suelo minero
LDEM062			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero
LDEM063			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero
LDEM064			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita
LDEM065			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita
LDEM066			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita

CÓDIGO (LDEM)	AISLADO	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	PROCEDENCIA DE LA CEPA	PROCEDENCIA DE LA PLANTA
LDEM067			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita
LDEM068			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita
LDEM069			Rizosfera	Suelo minero + Vermiculita + Agrolita
LDEM070			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero
LDEM071			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita
LDEM072			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita
LDEM073			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita
LDEM075			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero
LDEM076			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero
LDEM077			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero

CÓDIGO (LDEM)	AISLADO	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	PROCEDENCIA DE LA CEPA	PROCENCIA DE LA PLANTA
LDEM078			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero
LDEM079			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM080			Rizoplano/ endosfera	Suelo minero
LDEM081			Endosfera	Medio Jenssen libre de nitrógeno + suelo
LDEM082			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM083			Endosfera	Suelo minero + vermiculita + agrolita
LDEM084			Rizoplano/ endosfera	Suelo + Vermiculita + Agrolita

APÉNDICE C Electroforesis de los genes *16S rRNA* de las cepas tolerantes a los metales de Pb^{+2} y Cr^{+6} .



Nota. Los productos fueron visualizados en el transiluminador con luz UV en gel de agarosa al 1% teñido con el colorante de ADN Midori Green Advance.