

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

**FACULTAD DE INGENIERÍA CAMPUS MEXICALI
BIOINGENIERÍA**



**Microorganismos de un ambiente contaminado con plomo y su potencial
para la producción de metabolitos secundarios.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**PRESENTA
Najla Georgette Rosillo Murúa**

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Aseneth Herrera Martínez

CODIRECTOR DE TESIS

Dra. M. Socorro Romero Hernández

MEXICALI B. C., MÉXICO

JUNIO DE 2019

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1 El suelo y sus funciones.....	3
2.2 Fuentes de contaminación de suelo en México.	4
2.3 Metales en el medio ambiente.	6
2.4 Efectos del Pb en la salud.	7
2.5 Biodisponibilidad de los metales pesados en suelos.....	8
2.6 Microorganismos del suelo y su importancia.....	10
2.7 Microorganismos de ambientes extremos.	12
2.8 Metabolitos secundarios microbianos.	15
2.8.1 Auxinas.....	16
2.8.2 Biosurfactantes.	17
2.9 Bacterias fijadoras de Nitrógeno (N ₂).....	18
2.10 Microorganismos solubilizadores de fósforo (P).	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	21
5.1 <i>Objetivo General</i>	21
5.2 <i>Objetivos Específicos</i>	21
6. HIPÓTESIS	21
7. METODOLOGÍA	21
7.1 Descripción del sitio de estudio.	21
7.2 Muestreo del suelo bajo estudio.	22
7.3 Determinación de las características fisicoquímicas del suelo.	23
7.3.1 Textura del suelo.	23
7.3.2 Medición de pH.....	24
7.3.3 Conductividad Eléctrica (CE).....	24
7.3.4 Determinación de Materia Orgánica (%MO).	25
7.3.5 Determinación de Nitrógeno (N ₂) total en las muestras de suelo.	25
7.3.6 Análisis de Fósforo (P) en suelo.....	26
7.4 Concentración de Pb en el suelo del sitio en estudio.	26
7.5 Aislamiento de microorganismos cultivables.....	27

7.6	Escrutinio y selección de microorganismos aislados de las muestras de suelo.	27
7.6.1	Morfología colonial.	27
7.6.2	Tinción Gram.....	28
7.7	Microorganismos tolerantes al Pb.	28
7.8	Producción de metabolitos secundarios.	29
7.8.1	Análisis para bacterias fijadoras de N ₂	29
7.8.2	Solubilización de Fósforo (P).....	30
7.8.3	Determinación de la Auxina Ácido Indolacético (AIA).	31
7.8.4	Determinación de producción de biosurfactantes en los aislados microbianos.	31
7.8.5	Prueba de Índice de Emulsificación (IE) 24.....	32
7.9.	Actividad biocida de hongos.....	33
7.10	Análisis estadísticos.	34
7.11	Conservación de los aislados microbianos.	34
8.	RESULTADOS	34
8.1	Características fisicoquímicas del suelo.	34
8.1.1	Textura.	34
8.1.2	pH del suelo en estudio.....	35
8.1.3	Porcentaje de Materia Orgánica (%MO).	36
8.1.4	Conductividad Eléctrica (CE).....	37
8.1.5	Nitrógeno (N ₂) total.	37
8.2	Microorganismos cultivables.....	37
8.3	Selección de microorganismos.....	39
8.4	Selección de microorganismos para pruebas de tolerancia al Pb y producción de metabolitos secundarios.....	41
8.5	Características microbiológicas de los aislados.	42
8.6	Resultado de microorganismos tolerantes al Pb.....	53
8.7	Análisis estadísticos de resistencia a Pb por los cultivos microbianos.....	61
8.8	Bacterias productoras de metabolitos secundarios.	62
8.8.1	Fijación de N ₂	62
8.8.2	Solubilización de fosfatos.....	63
8.8.3	Producción de Auxinas.	64
8.8.4	Producción de biosurfactantes.	64
9.	CONCLUSIONES	65
10.	REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de residuos peligrosos que se encuentran como principales contaminantes en sitios abandonados y/o ilegales en varias entidades federativas.....	4
Tabla 2. Efectos del plomo en distintas zonas del cuerpo humano.....	8
Tabla 3. Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento.....	12
Tabla 4. Tipos de textura del suelo analizado (método del hidrómetro de Bouyoucos).....	35
Tabla 5. Características fisicoquímicas de muestras de suelo en estudio (número de muestra n=3).....	36
Tabla 6. Agrupación de aislados microbianos con características similares.....	39
Tabla 7. Agrupación de aislados fúngicos con características similares.....	40
Tala 8. Total de microorganismos seleccionados para el análisis de tolerancia al Pb y producción de metabolitos secundarios.....	41
Tabla 9. Morfología colonial bacteriana para los aislados en placas R2A.....	42
Tabla 10. Morfología característica de los aislados microbianos en medio PDA. P= punto de muestreo, M= número de microorganismo.....	48
Tabla 11. Tolerancia de los microorganismos al Pb a [500 mg L ⁻¹].....	54
Tabla 12. Tolerancia de los microorganismos al Pb a [600 mg L ⁻¹].....	55
Tabla 13. Tolerancia de los microorganismos al Pb a [700 mg L ⁻¹].....	57
Tabla 14. Tolerancia de los microorganismos al Pb a [800 mg L ⁻¹].....	58
Tabla 15. Tolerancia de los microorganismos al Pb a [900 mg L ⁻¹].....	59
Tabla 16. Tolerancia de los microorganismos al Pb a [1000 mg L ⁻¹].....	59
Tabla 17. Resultados resumidos sobre la tolerancia a distintas concentraciones de Pb de los aislados microbianos analizados.....	60
Tabla 18. Resumen de la actividad metabólica microbiana evaluada: fijación de N ₂ , solubilización de P, producción de auxinas y biosurfactantes.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Relación entre el comportamiento de la concentración celular (crecimiento) y la concentración de metabolitos, a través del tiempo. a) Metabolitos primarios. b) Metabolitos Secundarios.....	15
Figura 2. Imagen satelital del sitio de estudio (Fuente: Google Earth, 2017).....	22
Figura 3. Ubicación de los puntos muestreados del sitio de estudio. (Fuente: Google Earth, 2017).....	22
Figura 4. Realización de las perforaciones (a) y mediciones del suelo (b) a profundidades de 0-15 cm y 15-30 cm.....	23
Figura 5. Placa con medio NBRIP donde se indica actividad microbiana solubilizadora de fosfatos por presencia de halo. Microorganismo positivo a la prueba por formación de halo (izquierda) y microorganismo negativo a la prueba (derecha).....	31
Figura 6. Prueba negativa (izquierda) y prueba positiva (derecha) al IE24.....	33
Figura 7. UFC para bacterias y algunos actinomicetos en placas Petri con agar R2A.....	38
Figura 8. UFC para Levaduras y algunas bacterias y actinomicetos en placas Petri con PDA.....	38
Figura 9. Crecimiento de UFC para Hongos.....	39

AGRADECIMIENTOS

Agradezco mis padres por su apoyo incondicional, tiempo, paciencia y por haberme dado la oportunidad de crecer profesionalmente.

A la Dra. Aseneth Herrera Martínez y el Dr. Fernando Solís Domínguez por todo el apoyo y conocimiento que me brindaron durante mi formación académica y mi investigación.

A mis compañeros de laboratorio por brindar un buen ambiente laboral y por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Jaime Alonso Reyes López, la Dra. M. Socorro Romero Hernández y su equipo de laboratorio por brindarnos su apoyo durante la realización de este proyecto.

A CONACYT por darme la oportunidad de continuar mis estudios de grado.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, MEXICALI
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

TESIS DE GRADO

***Microorganismos de un ambiente contaminado con plomo
y su potencial para la producción de metabolitos
secundarios.***

PRESENTADA POR

Najla Georgette Rosillo Murúa

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Aseneth Herrera Martínez

Director del Comité

Dra. M. Socorro Romero
Hernández

Codirector del Comité

Dr. Fernando Amílcar Solís
Domínguez
Miembro del Comité

Dr. Jaime Alonso Reyes López
Miembro del Comité

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE
INGENIERÍA

Dr. Guillermo Galaviz Yáñez

Coordinador de Investigación y
Posgrado
Facultad de Ingeniería

15 de Mayo de 2019

RESUMEN

El Plomo (Pb) es un contaminante ambiental potencialmente tóxico y común en el suelo que no tiene una función biológica en los microorganismos del suelo. Sin embargo, éstos son capaces de llevar el metal a formas menos peligrosas e incluso eliminarlo del suelo mediante procesos de biorremediación. En el presente trabajo de investigación se aislaron 73 microorganismos (53 bacterias y 20 hongos) de un suelo contaminado con Pb del municipio de Mexicali, B. C. Se ensayó la tolerancia de los 53 aislados bacterianos, a distintas concentraciones de Pb (500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg L⁻¹ de Pb(C₂H₃O₂)₂) y se les caracterizó microbiológicamente. Además, se evaluó su capacidad para fijar N₂, solubilizar fosfatos, y su capacidad para producir metabolitos secundarios como biosurfactantes y auxinas. El 73.58% de los aislados bacterianos analizados mostraron tolerancia a Pb a una concentración de 500 mg L⁻¹. El 56% de los aislados microbianos mostraron capacidad para fijar N₂, mientras que sólo el 5.66% de éstos fueron capaces de solubilizar fosfatos. Para el caso de producción de metabolitos secundarios microbianos, el 11.32% y el 33.96%, del total de los 53 aislados microbianos trabajados, produjeron auxinas y biosurfactantes respectivamente. Se evaluó la posible actividad biocida de los 20 aislados fúngicos, sin embargo, bajo las condiciones ensayadas, ninguno presentó actividad biocida. Los resultados sugieren que algunos de los aislados microbianos trabajados poseen potencial para su posterior utilización en procesos de biorremediación de suelos contaminados por Pb.

1. INTRODUCCIÓN

Se conoce una gran variedad de elementos metálicos, alguno de estos metales suelen ser esenciales para plantas y animales. El término “metal pesado” se utiliza de forma globalizada para referirse a aquellos metales que son clasificados como contaminantes ambientales. Se consideran elementos esenciales al Fe, Mn, Zn, Cu, Co y Mo, como elementos benéficos al Ni, y Cr, y algunos de los elementos que no contribuyen en las funciones biológicas son el Cd, Hg, Pb y As (Bowen, 1979; Brady & Weil, 2002, citado en: Diez, 2008). Los elementos, esenciales o no, cuando se encuentran en altas concentraciones pueden llegar a ser tóxicos puesto que afectan el crecimiento y reproducción de los organismos vivos (incluyendo al ser humano); además de que pueden afectar el suelo y toda vida que dependa de él.

La falta de conocimiento y concientización de los ciudadanos sobre la contaminación de suelos por metales pesados (ya sea por un mal manejo de los residuos metálicos, desechos industriales o urbanización) ha generado que la ciudad de Mexicali, B. C., presente graves problemas de contaminación ambiental. Para conseguir minimizar el problema de suelos contaminados pueden aplicarse diversas metodologías, muchas de las cuales no pretenden eliminar directamente el metal pesado sino llevar dicho metal a formas no peligrosas (García y col., 2002).

El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar parcialmente microorganismos de un suelo, contaminado con Pb, de una fundidora de metales en la ciudad de Mexicali, B. C. Este metal estaba presente en altas concentraciones ($1,885 \text{ mg kg}^{-1}$) en el sitio de estudio. Encontrar microorganismos resistentes a altas concentraciones de metales pesados (en este caso Pb) es interesante para su uso en técnicas de biorremediación. Algunos de estos microorganismos, gracias a las condiciones de estrés que ofrece el suelo contaminado donde habitan, suelen ser más tolerantes a condiciones extremas e incluso generar metabolitos secundarios de interés. También pueden ser utilizados en técnicas de bioaumentación y/o fitorremediación con la ayuda de plantas nativas de la región resistentes a metales pesados, creando una simbiosis entre planta y microorganismo. Una gran variedad de microorganismos (bacterias, actinomicetos y hongos) son capaces de producir compuestos biológicos conocidos como sustancias bioactivas que son metabolitos secundarios con actividades biológicas importantes y diversas en el suelo (pueden contribuir a la nutrición del

suelo y plantas, incluso coadyuvar a la transformación de contaminantes a compuestos menos nocivos, entre otras actividades).

2. ANTECEDENTES

2.1 El suelo y sus funciones.

El suelo es un cuerpo natural conformado por un medio poroso ubicado en la superficie terrestre y es formado debido al proceso de meteorización. Éste posee cuatro componentes importantes: minerales, materia orgánica, aire y agua. La fase sólida (mineral y orgánica) ocupa hasta el 50% de su volumen total. El resto corresponde a la fase líquida (agua) y la fase gaseosa (aire), las que mantienen una proporción complementaria al llenar los poros que se originan entre los agregados y las partículas de la fase sólida (Fassbender, 1975).

El suelo constituye el 29% de la superficie del planeta y por su dinamismo se encuentra en constante cambio (Bautista, 1999). Es un sistema abierto, con entradas de tipo atmosféricas y salidas que pueden ser superficiales, en forma de escurrimiento y erosión. En él también se producen transformaciones que involucran la presencia de microorganismos, agua, raíces de plantas, intercambio de gases, descomposición y neoformaciones, entre muchos otros procesos (Cotler y col., 2007). En la capa superficial del suelo crecen las plantas, se obtienen los alimentos, agua, se construyen casas, edificios, puentes, etc., por lo cual es considerado uno de los recursos naturales más importantes (Cando, 2011; Jiménez, 2017). Valtueña en el 2002, clasifica las funciones del suelo como siguen:

- **Función Biológica:** acoger una enorme variedad de especies animales y vegetales, y en servir de estrato fundamental para numerosos ciclos biológicos.
- **Función Nutritiva:** albergar elementos indispensables para la vida como las sales minerales y el agua.
- **Función de Filtro:** retención de sustancias nocivas que, al pasar a las fuentes de agua, podrían contaminarlas.
- **Función de Aporte de materiales:** directa o indirectamente, obtención de materias primas destinadas a la construcción de edificios, carreteras, puentes, la ropa, los alimentos, etc.

El suelo es de gran importancia para la supervivencia de los seres vivos y el medio ambiente. La alimentación de los seres vivos (plantas, animales, humanos y microorganismos) depende del suelo; también aporta beneficios en algunos ciclos biogeoquímicos para el reciclaje de compuestos orgánicos (como el ciclo del agua). Sin embargo, debido a las grandes poblaciones y a la urbanización, incluyendo factores como la deforestación, contaminación por materia orgánica e inorgánica, desechos de procesos industriales y agropecuarios, entre otros, el suelo se ha ido deteriorando a través del tiempo.

2.2 Fuentes de contaminación de suelo en México.

La diversa actividad industrial que existe en México (minería, industria química básica, petroquímica y refinerías de petróleo, entre otras); han generado residuos peligrosos en cantidades exuberantes difíciles de cuantificar. Además, accidentes en el proceso de almacenamiento, transporte o envasado de sustancias (fugas, derrames e incendios) y la disposición clandestina e incontrolada de residuos, han contribuido a la contaminación de suelos de nuestro país (SEMARNAT, 2002 en Volke y col., 2002).

Entre los contaminantes altamente tóxicos y que se encuentran fácilmente en el ambiente están: dioxinas, furanos, hexaclorobenceno, bifenilos policlorados (BPC), plaguicidas organoclorados, compuestos tóxicos atmosféricos, hidrocarburos poliaromáticos (HAP) y metales pesados como Hg, Cr, Cd y Pb (Volke y col., 2002).

En la tabla 1 se muestra una relación de sitios ilegales y/o abandonados, detectados por La Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) entre 1995 y 1997, donde se han desechado residuos peligrosos generados por la actividad de diversas industrias (Kreiner, 2002). Como puede apreciarse, se encontraron alrededor de 166 sitios con residuos peligrosos para el bienestar de los seres vivos y el medio ambiente.

Tabla 1. Tipos de residuos peligrosos que se encuentran como principales contaminantes en sitios abandonados y/o ilegales en varias entidades federativas

Estado	Número de Sitios	Principales Residuos
Baja California	8	Solventes, metales pesados , polvo de fundición, aceites
Baja California Sur	2	Escorias de fundición, jales

Campeche	4	Aceite quema, residuos biológico-infecciosos, lodos de perforación
Chiapas	17	Hidrocarburos, plaguicidas, residuos hospitalarios, solventes
Chihuahua	13	Aceites, hidrocarburos, compuestos químicos
Coahuila	15	Gastado, aceite residual, hidrocarburos, jales, metales pesados, compuestos químicos, biológico-infecciosos
Durango	3	Hidrocarburos, insecticidas
Estado de México	10	Aceites, escorias de fundición, compuestos químicos, biológico-infecciosos, lubricantes
Guanajuato	10	Aceites, escorias de fundición, lodos, metales pesados, compuestos organoclorados, aceite gastado
Hidalgo	6	Escorias de fundición, natas de pinturas
Jalisco	7	Tierras de blanqueo, tierra contaminada con diésel y combustible, residuos de baterías, lodos, compuestos químicos, tetracloroetileno
Morelos	1	Tambores metálicos vacíos y llenos sin identificación
Nayarit	5	Hidrocarburos, jales, residuos hospitalarios
Nuevo León	22	Aceite, cianuros, escorias de fundición, hidrocarburos, aluminio, plomo, cadmio, níquel, cianuros
Oaxaca	1	Hidrocarburos industriales peligrosos

San Luis Potosí	10	Residuos hospitalarios, asbesto, escoria de fundición, níquel, lodos, botes de pintura
Sinaloa	4	Envases de agroquímicos
Tamaulipas	8	Aceites, escorias de fundición, compuestos químicos, arena silica, fenoles, recipientes vacíos
Veracruz	8	Azufre, biológico-infecciosos
Zacatecas	9	Jales, metales pesados, químicos
TOTAL	166	

Fuente: PROFEPA, 1998.

En lo que respecta al municipio de Mexicali, B. C., de los años sesentas a la fecha, han surgido diversos factores que contaminan el suelo, entre los cuales se pueden mencionar: la contaminación de origen salino por aguas salobres entregadas por los Estados Unidos como parte de la cuota del Tratado de Aguas de 1944; la intensificación de la actividad agrícola y el uso de agroquímicos en el distrito de riego; la depuración de crecientes volúmenes de aguas residuales derivadas del uso doméstico e industrial; el uso de aguas residuales sobre suelo agrícola y la exploración del subsuelo con fines de la explotación de la energía geotérmica de Cerro Prieto (Lázaro y col., 2006 en Atlas de riesgos del municipio de Mexicali, 2011). En un estudio realizado para evaluar la contaminación por metales pesados en sedimentos de caminos urbanos en la ciudad de Mexicali, se encontró que el Pb era uno de los contaminantes predominantes (Meza, 2013). Las concentraciones de Pb más altas estaban en el suelo del centro de la ciudad (180 mg kg^{-1}). Se cree que esta contaminación por Pb se debe al desgaste de los neumáticos, los frenos y el embrague, además de otros metales que los vehículos pueden aportar al medio ambiente (Zn, Cu, Cr, Ni, Cd, entre otros) que pueden afectar gravemente a la salud de los seres vivos.

2.3 Metales en el medio ambiente.

Se denominan metales pesados a aquellos elementos químicos que poseen un peso atómico comprendido entre 63.55 (Cu) y 200.59 (Hg), y presentan un peso específico superior a $4 \text{ (g cm}^{-3}\text{)}$: Pb, Cd, Cr, Hg, Zn, Cu, Ag y As, y en altas concentraciones pueden resultar tóxicos

para los seres vivos (incluido el ser humano, organismos del suelo, plantas, animales) y el agua (Rodríguez y col., 2006).

Los metales son un problema de contaminación muy diferente a los orgánicos ya que los metales no pueden degradarse por medios biológicos, químicos o físicos a un subproducto inofensivo. En consecuencia, los metales son persistentes en el medio ambiente y, además, son difíciles de eliminar (Pepper y col., 2009).

2.4 Efectos del Pb en la salud.

El Pb es un metal de coloración gris, blando y maleable, es usualmente obtenido por fundición o refinamiento de las minas, aunque también puede obtenerse como producto secundario del reciclamiento de materiales de desecho que lo contengan, un ejemplo de esto son las baterías de los automóviles (Valdivia, 2005).

El Pb es uno de los elementos tóxicos más persistentes que se encuentran en el ambiente (el tiempo medio de residencia en el ser humano es de 5 años en general, de más de 20 años en los huesos, y de 20 a 30 días en tejidos blandos) y cada año origina miles de envenenamientos, especialmente en niños de áreas urbanas. Al contrario que otros contaminantes comunes, como el Cd, el Pb no se acumula en el interior de las plantas (Rodríguez y col., 2005).

El Pb puede ser inhalado y absorbido a través del sistema respiratorio o ingerido y absorbido por el tracto gastrointestinal; la absorción percutánea del Pb inorgánico es mínima, pero su forma orgánica se absorbe bien por esta vía. Después de la ingestión de Pb, éste se absorbe activamente, dependiendo de la forma, tamaño, tránsito gastrointestinal, estado nutricional y la edad. En niños la absorción de Pb es de 30 a 50% mientras que en el adulto es de 10% (Valdivia, 2005). Además, el Pb es un veneno acumulativo, que desde el torrente sanguíneo llega a los tejidos blandos y se deposita fácilmente en los huesos, donde desplaza al Ca^{2+} , que tiene un radio iónico muy parecido. Una parte del Pb ingerido se acumula en el pelo. El contenido de Pb en los huesos aumenta con la edad y puede ser movilizado nuevamente, pasando a la sangre, lo que da lugar a efectos tóxicos adicionales. El Pb también disminuye la velocidad de la transmisión nerviosa y provoca, a concentraciones elevadas, la degeneración del sistema nervioso. El mecanismo bioquímico de la actuación de este metal pesado no se conoce con exactitud, pero se encuentra ligado a su capacidad para unirse al S o al N de las proteínas, interfiriendo su actividad (Rodríguez y col., 2005).

En la tabla 2, se observan algunos efectos causados por el Pb en la salud humana.

Tabla 2. Efectos del Pb en distintas zonas del cuerpo humano.

Sistema	Toxicidad
Sistema nervioso central	Fatiga, malestar, irritabilidad, ánimo deprimido, disminución de la libido, alteración de la función neuropsicológica, cefalea, tremor y encefalopatía (delirio, ataxia, convulsión, estupor, coma).
Sistema nervioso periférico	Debilidad motora.
Gastrointestinal	Anorexia, náusea, constipación, pérdida de peso, dolor abdominal y ribete de Burton.
Sangre (hem)	Anemia (hipocrónica; micótica o normocítica), punteado basófilo.
Renal	Insuficiencia renal crónica, nefritis intersticial y proteinuria leve.
Reumatológico	Mialgias, artralgias y gota.
Cardiovascular	Hipertensión
Reproductivo	Oligospermia

Fuente: Valdivia, 2005.

En cuanto a los efectos de los metales pesados en células de tipo procariótico, se sabe que exposiciones prolongadas a altas concentraciones de estos contaminantes (como el Pb) pueden desarrollar resistencia a éstos y a su vez generar diferentes estrategias para contrarrestar el estrés inducido por los compuestos tóxicos. Las estrategias de adaptación a las que se someten los microorganismos hacen que aquellos que son resistentes a los metales sean bioindicadores potenciales para la remediación de sitios contaminados (Caputo, 2019). Además, al estar en un ambiente estresante, éstos pueden producir sustancias bioactivas de interés biotecnológico que podrían ayudar al aporte de nutrientes en el suelo y plantas, inmovilizar o acumular contaminantes evitando su dispersión por el ambiente.

2.5 Biodisponibilidad de los metales pesados en suelos.

Al hablar de los metales debe considerarse su biodisponibilidad. Un metal biodisponible es aquel que puede ser absorbido por una célula microbiana, planta o animal. Esta biodisponibilidad generalmente consiste en la especie iónica libre o especie que se puede transformar fácilmente a la especie iónica libre en solución. De acuerdo a esta definición, los metales pueden existir en dos formas: disponibles y biodisponibles en el medio ambiente y es solamente la porción biodisponible la que ejerce toxicidad (Pepper y col., 2009). Dada la toxicidad proporcionada por los metales en el medio ambiente, los microorganismos han desarrollado múltiples formas de interactuar tanto con los metales tóxicos esenciales como

con los no deseados. Se sabe que las células necesitan metales esenciales tales como el Cu, Fe, Mn y Zn para mantener sus funciones. La forma más común de tratar los microorganismos con el exceso de metal es bombear los iones metálicos y restringir la absorción al mismo tiempo. Además, algunos microorganismos tienen mecanismos para secuestrar e inmovilizar metales, mientras que otros mejoran la solubilidad del metal en el ambiente (Pepper y col., 2009).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y col., 2005), entre ellos se encuentran (Cervantes y col., 2006):

- a) Componentes celulares que capturan los iones, neutralizando su toxicidad,
- b) Enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y
- c) Transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular.

La resistencia microbiana a metales en general es determinada por elementos genéticos móviles como lo son los plásmidos y transposones. La resistencia microbiana del metal se puede dividir en tres categorías (Pepper y col., 2009):

- Mecanismos generales de resistencia que no requieren estrés metálico
- Mecanismos generales de resistencia que son activados por el estrés del metal
- Mecanismos de resistencia que dependen de un metal específico para la activación

A través del tiempo, se ha observado que existen microorganismos capaces de tolerar la toxicidad de diversos metales pesados. Por ejemplo, estudios a principios de 1980 explican cómo *Bacillus subtilis* interactúa con una variedad de metales tóxicos tales como el Cu, Hg, Mg, Au y Pb. En este estudio, se encontró que la tolerancia del microorganismo al metal se debía a las diferencias entre la carga negativa neta de las bacterias y la carga catiónica de los metales. Es decir, se teorizaba que los sitios de nucleación en la superficie celular tenían la capacidad de unirse a metales de carga opuesta. Una vez unido a la pared celular del

microorganismo, resultaba un sitio de nucleación donde una gran concentración de metales puede unirse y precipitar en la pared celular (Monachese y col., 2012).

Como ya se mencionó, la biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con metales pesados de un ambiente, conocer su biodisponibilidad, es decir, la concentración de metal libre y lábil presente en la muestra (Brown y col., 1999; Kim y col, 2002; Krishnamurti y col, 2000; Lussier y col, 1999; Manson y col., 1999 en: Vullo D., 2003).

Dicho de otra forma, se entiende por biodisponibilidad la cantidad de metales pesados disponible para la absorción por las plantas o microorganismos. La biodisponibilidad depende de la solubilidad y movilidad de los metales en la solución del suelo (Cargua, 2010).

Los metales pesados están asociados a varios componentes del suelo, dando lugar a diversas formas químicas que determinan su movilidad y disponibilidad (Ahumada y col., 1999 en: Fernández, 2011). Los complejos que forman los metales con los distintos componentes del suelo son: estructuras solubles e intercambiables, metales complejados o adsorbidos en la materia orgánica, ocluidos en óxidos, asociados a minerales de arcilla y a minerales primarios del suelo. El metal en las formas de carbonato e intercambiable es considerado lábil y disponible para las plantas. A altos pH, los metales pesados se precipitan y en este caso se garantiza su inmovilidad. Por su baja cristalinidad y pequeño tamaño de partícula, los metales divalentes tienen una alta capacidad sortiva, especialmente el Cu, Pb y en menor grado Zn, Co, Cr, Mo, Ni y As. Por otro lado, la materia orgánica del suelo interacciona con los metales, formando complejos de intercambio o quelatos (Ahumada y col., 2004; Jamali y col., 2007; en: Fernández, 2011).

2.6 Microorganismos del suelo y su importancia.

La importancia de los microorganismos en diferentes hábitats naturales depende de la cantidad y diversidad de organismos que reside en dichos ambientes, principalmente de una amplia variedad de actividades que estos microorganismos aporten en el ambiente en el que se encuentren. En el suelo, los microorganismos pueden generar una amplia gama de acciones que intervienen en el desarrollo y la nutrición vegetal. Sin embargo, comúnmente el nivel de actividad de las poblaciones microbianas en los suelos es bajo, a excepción del microhábitat donde hay suficiente cantidad de fuente de carbono metabolizable. Al utilizar plantas en un sistema, la situación de los microorganismos cambia drásticamente ya que las plantas son la fuente principal de sustratos energéticos en el suelo tomado por los microorganismos que se

encuentran en la zona próxima de la raíz y proliferan en ella (Barea 1998 en Acuña y col., 2006). Ya que el suelo es rico en microorganismos, este potencial podría resolver problemas ambientales, de salud o alimenticios. Sin embargo, aún se realizan diversas investigaciones para identificarlos, preservarlos y conocer sus aplicaciones (Montaño y col., 2010), como es el caso de la presente investigación.

Debido a su historia evolutiva y a su rápida capacidad para adaptarse a los cambios ambientales, los microorganismos son más diversos y versátiles que los macroorganismos. Éstos participan en procesos ecológicos que permiten el funcionamiento de los ecosistemas, y en procesos biotecnológicos que son esenciales para la industria farmacéutica, alimenticia y médica (Montaño y col., 2010), además de ser utilizados en la industria agrícola (control de plagas, recuperación de suelos y vegetación de ecosistemas degradados), entre otros.

A la fecha se desconoce la relación entre la diversidad microbiana del suelo y la diversidad funcional, pero se cree que diversas comunidades del suelo aumentan la estabilidad del ecosistema, la productividad y la resistencia a distintos tipos de estrés (Torsvik y col., 2002, en Pepper y col., 2009). También es importante tomar en cuenta que el uso de microorganismos y la simbiosis de éstos con plantas tolerantes a contaminantes tales como los metales pesados pueden ser beneficiosos para recuperar suelos no sólo de usos agrícolas o forestales sino para la recuperación de suelos con una gran cantidad de contaminantes como los presentes en minas, zonas metalúrgicas, industriales y urbanas o donde el suelo se encuentra en condiciones extremas de pH, alcalinidad, temperaturas altas, sequía, entre otras. Según Salamanca (1998), la microbiota del suelo está conformada por una gran y dispersa variedad de algas, bacterias, hongos y actinomicetos juntos con los virus y componentes de la microfauna como: amebas, artrópodos, flagelados, nematodos y otros (Baquero y col., 2001).

Los actinomicetos, son bacterias ampliamente distribuidas en el suelo (90% del total de microorganismos presentes) que producen estructuras parecidas al micelio de los hongos (Blasco, 1970). Su metabolismo es complejo, secretar un amplio rango de enzimas que les permiten descomponer materia orgánica de baja labilidad (conformada por polímeros complejos como lignina, lignocelulosa y quitina). Estos microorganismos producen esporas, lo que les permite colonizar y sobrevivir en diferentes ambientes. A nivel del suelo, pueden facilitar la descomposición de moléculas recalcitrantes y desempeñar un papel importante en

la degradación de agroquímicos (Williams y col., 1984 en: Barrera y col., 2011). Además, algunos actinomicetos producen antibióticos (Heuer y col., 1997 en: Barrera y col., 2011), desempeñando un papel regulador de poblaciones fitopatógenas en el suelo.

2.7 Microorganismos de ambientes extremos.

Los ambientes extremos pueden albergar microorganismos con actividades y características únicas que podrían ser aprovechados no sólo con fines científicos sino que también pueden tener un alto potencial comercial, por lo cual este tipo de ambientes se consideran de alta importancia. Las comunidades microbianas que se encuentran en esta clase de ambientes se han adaptado a niveles asombrosos de estrés. El considerar estas adaptaciones puede ayudar en el desarrollo de enfoques de remediación en sitios contaminados, incluyendo sitios ácidos de drenaje de minas y sitios de desechos radiactivos (Pepper y col., 2009).

Es frecuente que estos organismos vivan en biotopos que combinan dos o más factores extremos, por ejemplo, altas temperaturas y condiciones ácidas, o temperatura baja y alta presión. Bajo la denominación de extremófilos se incluyen diferentes taxones de procariotas (*Bacteria* y *Archea*) y eucariotas. Entre los procariotas destacan las arqueobacterias como los microorganismos más abundantes en estos ambientes extremos (Castillo y col., 2005).

Según Ninfa y col., 2006, los microorganismos extremófilos se clasifican dependiendo de su ambiente extremo en:

- **Termófilos:** su crecimiento se da a temperaturas por encima de 65°C, la temperatura óptima de éstos se encuentra entre 70-80°C y la máxima entre 80-113°C.

Dependiendo de su temperatura óptima de crecimiento estos microorganismos se dividen en (Tabla 3):

Tabla 3. Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento.

Temperatura	Descripción
Hipertermófilos	Su temperatura óptima de crecimiento está por encima de los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos puros se ha llegado a dar entre 110 y 113°C.
Termófilos	Crece por encima de los 45°C.

Mesófilos	Temperatura óptima alrededor de 37°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 25 a 45°C.
Psicrófilos	Capaces de crecer por debajo de 5°C y con temperaturas máximas de 20°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 10°C.
Psicrófilos facultativos	Temperatura óptima de 15°C llegando a alcanzar los 20°C y también capaces de crecer hasta por debajo de 0°C.

Fuente: Ninfa y col., 2006.

- Psicrófilos:** sobreviven principalmente con agua y ésta debe estar presente en estado líquido para que los microorganismos alcancen su supervivencia. El límite para el crecimiento de estos organismos se encuentra por debajo de los 0°C, ya que pueden crecer en temperaturas por debajo de los 5°C, aunque su rango de temperaturas de crecimiento pueden ir desde los 20°C hasta menos de 0°C. Los principales ambientes que habitan incluyen regiones polares, montañas altas, glaciares, entre otros.

Algunos ejemplos de género de microorganismos psicrófilos son *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Vicrio*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Halorubrum*, *Methanococcoides*, entre otros.
- Alcalófilos:** sobreviven en ambientes con pH arriba de 9. Los lugares donde se desarrollan estos microorganismos son muy básicos, estos pueden ser lagos sódicos, suelos muy carbonatados, etc. Entre algunas de sus aplicaciones se encuentran la realización de detergentes, alimentos, industria farmacéutica, etc.
- Acidófilos:** estos microorganismos son capaces de sobrevivir en medios con pH menor a 5. El ambiente de éstos surge naturalmente de actividades geoquímicas, como la producción de gases sulfurosos de emanaciones volcánicas, desechos de minas, etc. La mayoría de microorganismos que crecen en estos ambientes son del dominio arquea.
- Xerófilos:** su supervivencia puede darse en climas extremadamente secos incluso por largos periodos de tiempo. Los microorganismos especializados que pertenecen a los hongos líquenes y algas tienen la capacidad de crecer en tales condiciones. Generalmente las colonias de bacterias sobreviven mejor en las rocas expuestas al

sol. Se conocen algunos tipos de bacterias xerófilas tales como *Metallogenium* y *Pedomicrobium*.

- **Metalófilos:** estos microorganismos son considerados de importancia ya que pueden crecer en la presencia de altas concentraciones de metales. Estos organismos, incluyendo varios miembros del género *Ralstonia*, colonizan los sedimentos, los suelos o basura industrial con alto contenido de metales pesados. Pueden aplicarse a sistemas que puedan remover o neutralizar los efectos tóxicos de metales pesados en suelos, sedimentos y aguas residuales.
- **Piezófilos:** Antes conocidos como barófilos, requieren condiciones de alta presión (superior a 1 atm) para su desarrollo y crecimiento. Se han obtenido barófilos en profundidades mayores a 6,000 m; mientras que a profundidades mayores de 10,000 m se han obtenido barófilos extremos; comúnmente los piezófilos se encuentran a profundidades marinas donde la presión atmosférica es mayor. Algunos géneros de microorganismos piezófilos son: *Shewanella*, *Moritella*, *Phyrococcus*, entre otros.
- **Halófilos:** Son aquellos microorganismos que para su óptimo desarrollo y crecimiento requieren cierta concentración de NaCl. Estos microorganismos se desarrollan en dos hábitats variadas, muchos de ellos han sido aislados de sitios con alta salinidad ubicados en diferentes partes del mundo; se encuentran generalmente en zonas calientes y secas, como los lagos salinos, salinas marinas y alimentos salados (salsa de soya, pescado, etc.). Algunos géneros encontrados de estos microorganismos son: *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Halomonas*, *Volcaniella*, entre otros.

Gracias a diversos estudios sobre este tipo de microorganismos extremos, se ha podido llegar a la conclusión de que hay vida en zonas o hábitats donde tiempo atrás no se creía que podría desarrollarse vida alguna debido a tales condiciones extremas; algunos microorganismos de condiciones extremas pueden propagarse a nivel laboratorio, dependiendo de las condiciones que éstos requieren, y ser utilizados en procesos o tratamientos en los que se emplean dichas condiciones extremas (recuperación de suelos en presencia de ambientes áridos, ya que estos microorganismos pueden soportar altas condiciones ya sea de temperatura, pH, salinidad,

cierta toxicidad a metales pesados, alcalinidad o acidez, pudiendo así contribuir a la producción de sustancias bioactivas y recuperación de suelos contaminados).

2.8 Metabolitos secundarios microbianos.

En los microorganismos, como en cualquier célula, ocurre una serie de reacciones químicas que en conjunto se denominan metabolismo; las sustancias que se producen se conocen como metabolitos que a su vez se dividen en primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son los compuestos esenciales para el crecimiento del microorganismo, mientras que los productos sintetizados no relacionados con su crecimiento se conocen como metabolitos secundarios (Hernández y col. 2003).

Durante la trofofase, que es la fase en la que los microorganismos se encuentran en crecimiento, no hay producción de metabolitos secundarios, sino durante la idiofase, que es cuando los microorganismos han dejado de crecer pero siguen metabólicamente activos.

Para obtener la producción de metabolitos secundarios es necesario asegurar condiciones óptimas durante la trofofase ya que como mecanismo de defensa éstos no se producen inmediatamente al concluir la trofofase. Los metabolitos primarios (Fig. 1 a) se producen al mismo tiempo que se da el crecimiento del microorganismo, mientras que los metabolitos secundarios (Fig. 1 b) se producen generalmente cuando la velocidad de crecimiento de los microorganismos es igual a su velocidad de muerte (Hernández y col., 2003).

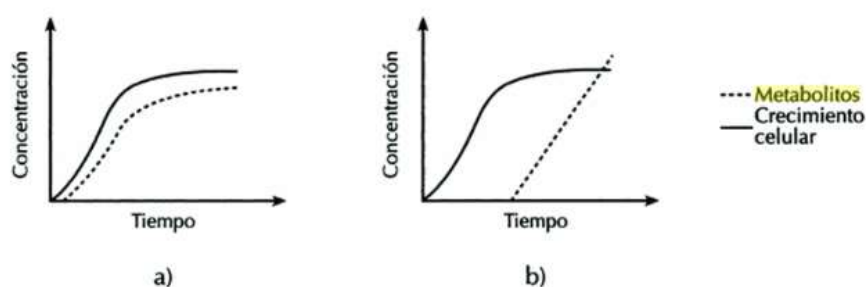


Fig. 1. Relación entre el comportamiento de la concentración celular (crecimiento) y la concentración de metabolitos, a través del tiempo. **a)** Metabolitos primarios. **b)** Metabolitos Secundarios.

Fuente: Madison 1996 en: Hernández y col. 2003

Según Parés y col., 2002; los metabolitos secundarios se definen por las siguientes características:

- a) Son productos naturales que tienen una distribución taxonómica restringida
- b) Se forman una vez que el crecimiento se ha detenido
- c) Suelen sintetizarse como una mezcla de compuestos químicamente relacionados
- d) No son esenciales para el crecimiento y la reproducción

La investigación del metabolismo secundario producido por microorganismos se centró en la década de los años cuarenta, particularmente en la producción de sustancias tóxicas (antibióticos) que contribuyeran a la eliminación de microorganismos patógenos. Durante la década de los sesenta, en la producción de sustancias con efectos especiales sobre animales y vegetales (toxinas y promotores del crecimiento) (Parés y col., 2002).

Los metabolitos quelantes de hierro (moléculas de pequeño tamaño con estructuras basadas en el 2,3-hidroxiato o hidroxiamato que quelan hierro y son excretadas por diferentes microorganismos del suelo) son de los más destacados entre una gran variedad de metabolitos secundarios. La formación de sideróforos también juega un papel importante en las interacciones microbianas que tienen lugar en la rizósfera (Parés y col., 2002).

Dentro del grupo de metabolitos con actividad en plantas se encuentran productos que o bien inhiben el crecimiento del vegetal o lo activan (Parés y col. 2002), tal es el caso de la producción de auxinas como el ácido indolacético (AIA) que aporta beneficios al desarrollo de las plantas.

2.8.1 Auxinas.

Las hormonas vegetales o fitohormonas son moléculas que ayudan en el crecimiento y desarrollo y respuesta a condiciones ambientales cambiantes de las plantas (Gómez y col., 2006). Los grupos de fitohormonas que más se conocen son: auxinas, giberelinas, citosinas, ácido abscísico y etileno (Vázquez y col., 2016).

Las auxinas, como el AIA, participan en el alargamiento y división celular, formación de pared celular y la dominancia del crecimiento apical en las plantas. Dichas sustancias también promueven el crecimiento radicular en los vegetales (Vázquez y col., 2016). Algunos microorganismos como las rizobacterias, producen compuestos indólicos contribuyendo así al desarrollo y mayor rendimiento de especies vegetales (Biswas y col., 1993 en: Lemos y col., 1999); otros microorganismos pertenecientes a los géneros bacterianos *Pseudomonae*,

Arthrobacter, *Bacillus*, *Azospirillum* y *Rhizobium* que habitan en el suelo, producen AIA, alteran la síntesis de RNA y proteínas en plantas (Carvajal y col., 1995 en: Lemos y col., 1999), causando incrementos en el desarrollo de las mismas. El uso constante de estas hormonas de crecimiento puede incrementar la productividad de suelo, reducir la fertilización y favorecer la producción en suelos pobres (Cauci y col., 1993 en: Lemos y col. 1999; Benito y col., 1986 en: Lemos y col., 1999).

2.8.2 Biosurfactantes.

Otro tipo de metabolitos secundarios de origen microbiano son los biosurfactantes, éstos son sustancias anfipáticas pues presentan una parte hidrofóbica y otra hidrofílica dentro de la misma molécula. Estas moléculas son tensoactivas y tienen un mayor impacto en el medio ambiente en comparación con los surfactantes convencionales debido a que pueden producirse a base de sustratos renovables. Los biosurfactantes son de fácil biodegradabilidad y son menos tóxicos que los surfactantes sintéticos (De la Rosa y col, 2014; Henkel y col., 2017).

En el área ambiental, este tipo de biomoléculas son utilizadas principalmente en la industria del petróleo (limpieza de derrames de petróleo, eliminan los residuos de aceite de tanques de almacenamiento) y biodegradación de plaguicidas. También pueden ser empleados en la biorremediación de suelo y agua (Silva y col, 2014).

Según Neu 1996, los biosurfactantes se clasifican por su peso molecular en bajo peso molecular y alto peso molecular. Aquellos de bajo peso molecular incluyen a los glicolípidos (ramnolípidos, lípidos de trealosa, soforolípidos y lípidos de fructosa) o lipopéptidos (surfactina, gramidicina y polimixina), los cuales son eficientes en la disminución de la tensión superficial e interfacial. Sin embargo, a los polímeros de alto peso molecular se les definen como bioemulsificadores (Roseberg y col., 1997 en De la Rosa y col., 2014); éstos incluyen a polisacáridos anfipáticos, lipoproteínas o mezclas complejas de los dos anteriores, los cuales son buenos estabilizadores de emulsiones hidrocarburo-agua (De la Rosa y col, 2014).

Actualmente se encuentran diversas patentes de biosurfactantes producidos por microorganismos, entre los más estudiados y utilizados en el proceso de producción y aplicaciones industriales se encuentran los producidos por *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Bacillus spp.* y *Cándida spp.* (Sachdev y col., 2013, en Silva y col., 2014).

Además de los biosurfactantes una amplia gama de agentes de lavados se han utilizado a lo largo del tiempo para recuperar metales pesados de los suelos, entre estos están tensoactivos sintéticos, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), agentes orgánicos e inorgánicos quelantes, entre otros. Sin embargo, la utilización de productos sintéticos pueden convertirse en contaminantes secundarios ya que suelen presentar toxicidad y resistencia a la biodegradación; es por eso, que los biosurfactantes son más eficientes y amigables con el medio ambiente en comparación con los surfactantes de origen sintético (Qi, 2018).

2.9 Bacterias fijadoras de Nitrógeno (N₂).

El proceso de convertir el gas N₂ en amoníaco es conocido como fijación de nitrógeno (N₂). Algunas bacterias poseen una enzima llamada nitrogenasa (se inhibe en presencia de O₂) que les permite fijar N₂. Se conocen dos tipos de microorganismos capaces de fijar el N₂: microorganismos libres y simbiotes.

Bacterias libres fijadoras de N₂: presentes en cantidades abundantes en la rizósfera (Tortora y col., 2007). Algunos microorganismos capaces de llevar a cabo la fijación de N₂ en condiciones no simbióticas son: cianobacterias (*Nostoc*, *Anabaena*, *Calothric*), bacterias aeróbicas como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, etc., bacterias facultativas como *Bacillus* y *Klebsiella*, bacterias anaerobias no fotosintéticas como *Clostridium*, *Methanococcus* (archaeobacterias) y bacterias fotosintéticas como *Rhodospirillum* y *Chromatium* (Anaya, 2003).

Bacterias simbióticas fijadoras de N₂: Desempeñan un papel importante en la producción de cultivos. Éstas se encargan de colonizar simbióticamente raíces de leguminosas tales como la soja, judías, guisantes, cacahuates, alfalfa y el trébol, su clasificación incluye especies del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*; quienes forman nódulos en las raíces de las plantas. En este tipo de asociación simbiótica, la planta aporta a la bacteria condiciones anaerobias y nutrientes, mientras que la bacteria fija N₂ para que la planta pueda incorporarlo a las proteínas (Tortora y col., 2007).

Algunas especies vegetales capaces de llevar a cabo la fijación de N₂ en condiciones simbióticas son: familia Leguminosae con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, *Alnus*, *Ceanothus* y *Casuarina* con *Frankia* (actinomiceto), pastos tropicales con *Azospirillum* (actinomiceto), y *Azolla* (helecho acuático) con *Anabaena* (Cyanobacteria) (Anaya, 2003). Las bacterias

fijadoras de N₂ pueden emplearse como biofertilizantes alternativos o complementarios de plantas (Xu y col., 2018).

Microorganismos como *Rhizobium* habitan en la rizósfera de las plantas y son capaces de mejorar la fitorremediación de un sitio a través de la fijación del N₂ y la producción de factores que promueven el crecimiento vegetal. Estas condiciones aportan una mayor captación y translocación de algunos metales presentes en el suelo a las plantas debido a que hay un cambio en la biodisponibilidad del metal. Además, el metabolismo de los microorganismos como la producción de sustancias poliméricas extracelulares y sus actividades enzimáticas pueden llegar a inmovilizar o cambiar el estado redox de los metales para disminuir la toxicidad de éstos al momento de interactuar con las plantas. Algunas cepas de *Rhizobium* también pueden adsorber y acumular metales ayudando a la fitoestabilización (Hao y col., 2013).

2.10 Microorganismos solubilizadores de fósforo (P).

El fósforo (P) es considerado un nutriente esencial e importante para las plantas, éste no se encuentra disponible en el suelo ya que está en su forma insoluble ocasionando que no pueda adquirirse como una fuente atmosférica en comparación con el N₂. El P se absorbe por las plantas como de iones H₂PO₄ y HPO₄²⁻. A éstos se les conoce como fósforo lábil y son absorbidos fácilmente a través de las raíces de las plantas. Sin embargo, no se encuentran disponibles para las plantas al interactuar con el entorno por lo que requieren la aplicación repetida de fertilizantes (Tomer y col., 2017).

Los compuestos de P no disponibles para la planta pueden estarlo con la ayuda de bacterias solubilizadoras de P. Algunos de los géneros bacterianos que realizan este proceso son *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, que en su mayoría abundan en las raíces de las plantas. Este tipo de microorganismos modifican la nutrición del suelo aumentando la solubilidad del P mediante muchos procesos, en algunos casos pueden llegar a disminuir el pH del suelo produciendo ácidos orgánicos y minerales, fitohormonas o producción de sideróforos que promueven la solubilización del P en el suelo. La utilización de estos microorganismos es una alternativa amigable ya que puede evitar la adición frecuente de fertilizantes sintéticos en el suelo reduciendo costos de producción y evitando daños al medio ambiente por la utilización de productos químicos. Se puede promover el crecimiento de las plantas de

diversas maneras, aumentar su resistencia a estrés abiótico, protegerlas de enfermedades y mejorar la morfología de sus raíces utilizando microorganismos solubilizadores de P (Adnan y col., 2017).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación por metales pesados, es un problema que aqueja a las sociedades a nivel global y México no es la excepción pues la cada vez mayor industrialización y el flujo vehicular de las zonas urbanas han contribuido enormemente a la contaminación por metales pesados. Mexicali, B. C., es considerada una de las ciudades más contaminadas del país y del mundo, ocupando la séptima posición entre la lista de las ciudades del continente americano que presentan mayor contaminación en el aire (OMS, 2018). La contaminación de la ciudad ha ido aumentando, debido tanto a su ubicación geográfica como a su basta actividad industrial; se tienen problemas de contaminación por metales pesados principalmente debido a la quema de materiales, muchos de ellos provenientes de la actividad industrial de la región. Entre los metales pesados más persistentes se encuentra el Pb, el cual en grandes cantidades puede provocar problemas de salud en grupos vulnerables (adultos de la tercera edad y niños). El Pb tiene la peculiaridad de adherirse fácilmente al subsuelo, residuos de lodo o simplemente volar por el aire, exponiendo a la población a adquirir mayores riesgos de salud. Por otro lado, la presencia de Pb en suelos impide el desarrollo y crecimiento adecuado de muchas especies vegetales. Por lo que, debido a los problemas de riesgo a la salud y de contaminación asociados al medio ambiente y la ecología que traen consigo la presencia de Pb, es imperativo atender esta situación.

4. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de microorganismos tolerantes a metales pesados y que además producen metabolitos secundarios como biosurfactantes, auxinas, sideróforos, entre otros, representa una opción viable para la utilización de estos microorganismos o sus metabolitos secundarios en sitios contaminados por metales pesados como el Pb, pues se sabe que algunas sustancias bioactivas (biosurfactantes y sideróforos) son capaces de inmovilizar o simplemente transformar a los metales pesados en compuestos menos nocivos, mientras que las auxinas contribuyen a procesos de fitorremediación. La incorporación de este tipo de microorganismos como bioinoculantes, puede contribuir a un mejor desarrollo de plantas presentes en un sitio contaminado por metales pesados.

En este trabajo se utilizaron muestras de suelo contaminado por Pb, provenientes de un sitio ubicado en la ciudad de Mexicali, B. C., con la finalidad de aislar microorganismos e identificar sus capacidades metabólicas que coadyuven procesos de biorremediación que pueden implementarse en un futuro en el sitio de estudio u otros sitios impactados con este metal pesado.

5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Objetivo General

- Identificar capacidades metabólicas (tolerancia máxima a Pb, fijación de N₂, solubilización de P, producción de biosurfactantes y auxinas) de aislados microbianos provenientes de un suelo árido contaminado con Pb.

5.2 Objetivos Específicos

- Aislar microorganismos de un suelo árido impactado por Pb para seleccionar aquellos con capacidad máxima de tolerancia al Pb.
- Caracterizar, mediante técnicas microbiológicas, aislados microbianos resistentes al Pb.
- Evaluar la capacidad de los aislados microbianos resistentes al Pb para producir metabolitos secundarios (auxinas y biosurfactantes).
- Evaluar la capacidad de los aislados microbianos resistentes al Pb para fijar N₂ y solubilizar P.

6. HIPÓTESIS

- Algunos microorganismos cultivables presentes en el sitio contaminado con Pb poseen resistencia al metal, además de la capacidad de producir metabolitos secundarios de interés biotecnológico.

7. METODOLOGÍA

7.1 Descripción del sitio de estudio.

El sitio de estudio (Figura 2) se encuentra en la ciudad de Mexicali, B. C. Dado que éste es propiedad privada, su ubicación fue conservada en el anonimato. El terreno es de forma rectangular, cuenta con 49.63 m de largo y 374.91 m de ancho, se encuentra cercado perimetralmente contando con 845.899 m de perímetro y está en constante remodelación por

sus propietarios. En el pasado, el sitio era utilizado como una fundidora de metales, se llevaba a cabo quema de metales para su posterior reciclamiento, lo cual trajo problemas de contaminación por distintos metales pesados en el suelo entre los que destaca el Pb.



Figura 2. Imagen satelital del sitio de estudio (Fuente: Google Earth, 2017).

7.2 Muestreo del suelo bajo estudio.

Se realizaron muestreos de suelo contaminado en colaboración con el grupo de Química Ambiental dirigido por la Dra. M. Socorro Romero Hernández del Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Mexicali. Se consideró realizar los muestreos del suelo en los puntos de estudio previamente seleccionados y marcados, con una P seguida de la numeración correspondiente, por el grupo de Investigación ya mencionado. Los puntos muestreados para el análisis microbiológico del suelo se indican en la figura 3.



Figura 3. Ubicación de los puntos muestreados del sitio de estudio (Fuente: Google Earth, 2017).

Los puntos marcados en color rojo (Fig. 3) indican las zonas con mayor contaminación con Pb, mientras que los puntos de muestreo marcados en color amarillo (Fig. 3) indican las zonas con menor contaminación. Se realizó el muestreo a detalle del sitio bajo especificaciones de

la norma oficial mexicana NMX-AA-132-SCFI-2006. Se tomaron 50 g de muestra por punto con una pala limpia y sanitizada y se depositaron en bolsas estériles, se obtuvo un total de 12 muestras provenientes de 6 puntos diferentes a dos profundidades distintas (de 0-15 cm y 15-30 cm) por cada punto seleccionado y se marcaron como P12, P13, P14, P15, P16 y P17; cada uno de estos puntos se muestrearon a las dos profundidades diferentes mencionadas anteriormente. Para realizar las perforaciones a las dos diferentes profundidades se utilizó una barrena Riverside y palas (Fig. 4a), posteriormente con una cinta métrica se midió la profundidad del suelo (Fig. 4b).



Figura 4. Realización de las perforaciones (a) y mediciones del suelo (b) a profundidades de 0-15 cm y 15-30 cm.

Las muestras de suelo, ya colocadas en bolsas estériles, fueron rotuladas y guardadas en una hielera para su transporte al laboratorio donde fueron almacenadas a 4 °C hasta su posterior procesamiento para ensayos microbiológicos.

7.3 Determinación de las características fisicoquímicas del suelo.

7.3.1 Textura del suelo.

El análisis de textura de suelo se realizó de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000, mediante el método del hidrómetro de Bouyoucos. Debido a que en el sitio de estudio se efectuaron modificaciones (remoción de suelo contaminado y sustitución de éste por suelo agrícola), se observó que se encontraban tres tipos de suelo diferentes, los cuales fueron seleccionados y marcados como: P12, P15 y P17.

Las muestras de suelo fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente y tamizadas (sin pulverizar) en malla de 2 mm. Se pesaron 50 g de suelo y se colocaron en un vaso de precipitado de 250 ml. Se adicionaron 100 ml de agente dispersante (solución de calgon: disolver 50 g de hexametáfosfato de sodio en agua destilada y se afora a 1 L) y se dejó reposar

por 24 horas. Luego se vació a una copa de dispersión (previamente enjuagada con agua destilada). La copa de dispersión se llenó con agua destilada dejando un espacio libre (6 cm³ aproximadamente) para evitar derrames. La copa conteniendo la mezcla ya mencionada se colocó en un aparato dispersor y se agitó durante 5 minutos. Se retiró la copa del aparato dispersor y se vació su contenido a una probeta de 1000 ml lavando la copa con agua destilada (el lavado de la copa se vació en la misma probeta) y se aforó a 1000 ml con agua destilada. La probeta fue tapada con un tapón de hule y se agitó de manera ascendente y descendente y viceversa 20 veces. La probeta se colocó rápidamente en una superficie plana. A los 15 segundos de haber agitado la muestra, se introdujo el hidrómetro dentro de la suspensión y se realizó la primera lectura a los 40 segundos y se midió la temperatura de la suspensión. Una hora después, se introdujo nuevamente el hidrómetro y se tomó una segunda lectura y se registró la temperatura. A las dos horas, se tomó la tercera lectura del hidrómetro y se registró la temperatura. Se realizaron los cálculos correspondientes de acuerdo a las especificaciones del método de Bouyoucos y se registraron los resultados.

7.3.2 Medición de pH.

Se midió el pH de cada una de las muestras de suelo a las dos distintas profundidades (0-15 y 15-30 cm), según la especificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Esta determinación se realizó por triplicado. Se tomaron 10 g de suelo y se colocaron en un vaso de precipitado. Se añadieron 2 volúmenes de agua desionizada (20 ml). La mezcla se agitó hasta quedar completamente homogénea y se dejó reposar por 30 minutos. Se volvió a agitar y reposar la muestra por 30 minutos. Posteriormente, se tomaron las mediciones de pH para cada muestra de suelo con un pH-metro HI 112 programable marca Hanna.

Se obtuvo un promedio del valor del pH de todas las repeticiones de las muestras de suelo (n=3) para ajustar un valor de éste al momento de propagar y conservar los microorganismos en condiciones de laboratorio.

7.3.3 Conductividad Eléctrica (CE).

Esta determinación se realizó por quintuplicado para cada una de las 12 muestras de suelo colectadas. Se pesaron 20 g de suelo, previamente secado a temperatura ambiente, que fueron depositados en un tubo de fondo cónico de 50 ml marca Falcon. Posteriormente, se añadieron

20 ml de agua destilada y se mezcló con un vórtex (Vortex Maxi Mix II, Thermo Scientific) por 30 segundos o hasta que la muestra quedara completamente homogénea. La mezcla contenida en los tubos se puso en agitación oscilatoria de 100 revoluciones por minuto (rpm) por 24 horas. La muestra se agitó con un vórtex por 1 minuto y se dejó reposar por 2 horas. El total de los sobrenadante de los quintuplicados (aproximadamente 20 ml) se filtró utilizando un filtro de papel cuantitativo, endurecido sin cenizas grado 40 (8 µm de porosidad) y de 110 mm de diámetro; se transfirió a un tubo de fondo cónico nuevo donde se midió la CE con un conductímetro (HQ430d flexi, HACH) (Hayes y col., 2009), los valores obtenidos de CE fueron registrados para su posterior análisis.

7.3.4 Determinación de Materia Orgánica (%MO).

Este ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Dean en 1974. Se pesaron 2 g de muestra de suelo y se colocaron en crisoles, previamente secados a 105 °C por 2 horas y enfriados por 3 horas en un desecador, posteriormente se calentaron en una mufla (SIBRON, Thermodyne) a 450 °C por 4 horas y se dejaron enfriar por 8 horas dentro de la mufla. Los crisoles fueron colocados en el desecador por 3 horas y se procedió a pesar las cenizas resultantes. Se registraron los datos obtenidos y con éstos se calculó el %MO contenido en cada muestra de suelo.

7.3.5 Determinación de Nitrógeno (N₂) total en las muestras de suelo.

Este análisis se realizó por duplicado bajo las especificaciones de la norma NOM-021-RECNAT-2000. Las muestras de suelo fueron tamizadas en mallas de 60 µm y pesadas dependiendo del %MO contenida (5, 2.5 y 1.25 g de muestra para suelos con 2, 4 y 8 %MO respectivamente). Se agregaron 20 ml de agua destilada a la muestra de suelo contenida en un matraz Kjeldahl, se dejó reposar durante 30 minutos. Después se adicionaron 5.5 g de mezcla de catalizadores K₂SO₄, CuSO₄·5H₂O y Selenio metálico y 20 ml de H₂SO₄, se calentó lentamente la mezcla contenida en el matraz en un equipo macro Kjeldahl (combinado destilación y digestión) hasta el cese de desprendimiento de vapores. Se incrementó la temperatura a 390 °C hasta la clarificación de la mezcla. Posteriormente, la muestra se dejó en ebullición lenta por 1 hora y una vez terminada la digestión se dejó enfriar para luego añadir 100 ml de agua destilada. La mezcla se dejó reposar hasta que los sólidos precipitaran y el sobrenadante se decantó a un matraz de destilación. Los residuos sólidos se lavaron

cuatro veces con 50 ml de agua destilada y se transfirió el líquido de lavado al matraz de destilación donde se colocaron perlas de ebullición. Por las paredes del matraz y con mucha precaución, se adicionaron 150 ml de NaOH 10N y se procedió a destilar. El producto de destilación (aproximadamente 150 ml) se recuperó en distintos matraces que contenían 50 ml de una solución de ácido bórico con indicadores (verde bromocresol, rojo metilo y alcohol etílico al 95%). El producto de la destilación mezclado con los indicadores fue titulado con H₂SO₄ 0.001N. Un viraje en la coloración de verde a rosa intenso correspondía al fin de la titulación. Se registró el volumen utilizado de la solución tituladora y se determinó el % de N total mediante la siguiente fórmula:

$$\%NT = \frac{(Vm - Vb)(N)(14)}{(p)(10)}$$

Donde:

V_m= Volumen de H₂SO₄ empleado en titular muestra

V_b= Volumen de H₂SO₄ empleado en titular el blanco

N= Normalidad del H₂SO₄

14= peso equivalente del N

10= Factor de conversión %

p= peso de la muestra en g

7.3.6 Análisis de Fósforo (P) en suelo.

Para determinar el P total en el suelo bajo estudio, se realizó una mezcla mixta del suelo y se mandó a analizar a un laboratorio privado (Quimical, S.A. de C.V.).

7.4 Concentración de Pb en el suelo del sitio en estudio.

La concentración de Pb en el suelo se obtuvo por espectrofotometría de absorción atómica (modelo 3100, Perkin Elmer) y fueron proporcionados por el grupo de trabajo de la Dra. M. Socorro Romero Hernández del Instituto de Ingeniería de la UABC. Se calculó el valor promedio de los datos obtenidos (entre la zona donde se observó mayor contaminación y la zona donde se observó menor contaminación).

7.5 Aislamiento de microorganismos cultivables.

Para el aislamiento de microorganismos presentes en el suelo del sitio de estudio se emplearon las técnicas microbiológicas de diluciones seriadas y sembrado en placa por extensión con varilla. En condiciones de esterilidad, se pesaron 10 g de suelo y se adicionaron a frascos estériles conteniendo 90 ml de agua destilada. La mezcla se agitó hasta homogeneizar, se tomó 1ml de mezcla y se agregó a un tubo de ensaye estéril con 9 ml de agua destilada, se mezcló vigorosamente y de esta mezcla se transfirió 1 ml a otro tubo de ensaye conteniendo 9 ml de agua destilada. Esta operación se efectuó hasta obtener la dilución seriada adecuada (diluciones 10^{-5} a 10^{-7} para bacterias y 10^0 y 10^{-2} para levaduras y hongos). Por duplicado, se sembraron por extensión con varilla 100 μ l de dilución; para bacterias, sobre agar R2A contenido en placas Petri y para el caso de hongos sobre Agar Papa Dextrosa (PDA) contenido en placas. Posteriormente, las placas inoculadas, fueron incubadas a 35 °C hasta observar crecimiento microbiano en la superficie de placas (en promedio de 1 a 6 días). Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo mediante la siguiente fórmula:

$$UFC/g = \frac{(\text{No. de colonias por placa})(\text{factor de dilución})}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

7.6 Escrutinio y selección de microorganismos aislados de las muestras de suelo.

Se obtuvo un gran número de microorganismos cultivables en los medios de cultivo R2A y PDA, por lo que se realizó un tamizaje o escrutinio para descartar microorganismos que se repitieran en las distintas muestras para lo cual se compararon las características de morfología colonial y los resultados de la tinción de Gram.

7.6.1 Morfología colonial.

De los microorganismos obtenidos con las técnicas descritas en el apartado anterior, de cada placa y en condiciones de esterilidad, se seleccionaron las colonias diferenciales y se sembraron por separado en medio R2A o PDA según correspondiera. Se realizó la descripción de la morfología colonial, por observación y registro de características (color, forma, elevación, borde, consistencia, etc.), y se les asignó una clave de identificación. A los microorganismos obtenidos en R2A se les asignó un nombre clave iniciando con la letra “P” y un número (en mención a la palabra punto de muestreo y el número del área de donde se

tomó la muestra), seguido por la letra “B” y su número correspondiente (en mención a la palabra “bacteria” y el número de aislado). A los microorganismos aislados en medio PDA se les asignó un nombre clave se inició con la letra “P” y su número correspondiente seguido por la letra “M” y el número correspondiente (en mención a la palabra “microorganismo” y el número de aislado).

7.6.2 Tinción Gram.

Como parte de la identificación microscópica de las colonias diferenciales obtenidas, se realizó tinción de Gram. Para esto, se realizaron frotis de las distintas colonias microbianas obtenidas; Se añadió una gota de agua destilada estéril en un portaobjetos, después se tomó una asada de la colonia bacteriana, se esparció la mezcla de colonia con agua a lo largo y ancho del portaobjetos y se fijó por calor con a la flama de un mechero. Una vez obtenidos los frotis, se añadió cristal violeta durante 1 minuto cubriendo todo el porta objetos con el reactivo, se enjuagó con agua corriente, se cubrió la muestra con Yodo Lugol por 1 minuto y se enjuagó con agua corriente, posteriormente se añadieron de 5 a 10 gotas de alcohol acetona dejando esperar 30 segundos y se enjuagó con agua corriente, se cubrió la muestra con safranina durante 45 segundos y se enjuagó con agua corriente. Las muestras se dejaron secar y se observaron al microscopio (Zeiss, Primo Star) con los objetivos de 40X y 100X. Los microorganismos Gram negativos se tiñen de un color rosado o rojo mientras que los microorganismos Gram positivos se tiñen de un color azul oscuro o violeta. Esta distinción de color es debido a las diferencias en los componentes de las paredes celulares de los microorganismos (Forbes, 2009). Se capturaron las imágenes correspondientes para su documentación y análisis.

7.7 Microorganismos tolerantes al Pb.

De los distintos microorganismos seleccionados, se realizaron precultivos. Para esto, se inoculó por separado una asada de cada uno de los microorganismos diferenciales obtenidos en 7 ml de medio LB (pH 7.5 ± 0.2) contenidos en tubos de ensaye, el medio contenido en los tubos ya inoculado, se incubó a 35 °C con agitación oscilatoria de 100 rpm por 1 o 2 días, se separó el paquete celular por centrifugación a 4000 rpm por 15 min., se retiró el sobrenadante y se lavó el paquete celular dos veces con 7 ml de agua destilada estéril cada vez. Las células fueron resuspendidas en 7 ml de agua destilada estéril y se midió la absorbancia a 600 nm

con un espectrofotómetro (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BIO-RAD) para determinar la densidad óptica (DO). Basados en la curva de Mcfarland, se inocularon los cultivos microbianos con valores de DO en el rango de (0.200 a 1.100) a una longitud de onda de 600 nm. Los cultivos microbianos con DO a partir de 1.150 fueron diluidos con agua destilada estéril hasta obtener un valor de DO cercana a 1.00. Posteriormente, se tomaron 150 µl del cultivo o dilución (aproximadamente 1305.5×10^6 UFC/ml) y se inocularon 7ml de LB (pH 7.5 ± 0.2) contenidos en tubos de ensaye estériles. Para cada aislado microbiano trabajado, se inoculó un blanco (LB sin Pb) y por triplicado 7 ml de LB con Pb utilizando la sal $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ en concentraciones de 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg L^{-1} en tubos de ensaye estériles. Se preparó LB al 50% con una concentración de 500 mg L^{-1} de Pb. Al aumentar la concentración del metal se adicionó un 10% más de LB y así evitar la precipitación del metal. Los cultivos se incubaron a 35 °C con agitación oscilatoria de 120 rpm de 24 a 72 horas, según el tiempo de crecimiento del microorganismo. Se contrastó el crecimiento de los microorganismos en el blanco con el crecimiento obtenido en el medio con Pb y se midió la absorbancia de los cultivos que presentaron crecimiento en el medio con Pb. Utilizando la curva de Mcfarland se determinó las UFC en cada cultivo en presencia de Pb.

7.8 Producción de metabolitos secundarios.

7.8.1 Análisis para bacterias fijadoras de N_2 .

Los aislados microbianos fijadores de N_2 fueron identificados sembrándolos por triplicado en 5 ml de medio malato sacarosa semisólido (Nautiyal, 1999) en condiciones de esterilidad. Para esto, los aislados microbianos fueron preinoculados por separado en 7 ml de los medios de cultivo LB y Soja tripticasa. Estos preinóculos se incubaron a 35 °C con agitación oscilatoria de 120 rpm por 24 horas para la mayoría de las bacterias a excepción de los actinomicetos que requirieron de 48 a 72 horas para su crecimiento. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano se centrifugó, se retiró el sobrenadante y las células bacterianas se lavaron con 5 ml de agua destilada de dos a tres veces. Los microorganismos fueron resuspendidos en agua destilada estéril con la ayuda de un vórtex. Se tomaron 100 µl de las suspensiones microbianas para inocular medio malato-sacarosa contenido en tubos de ensaye y se cerró con parafilm la tapa de los tubos; esto ayuda a evitar falsos positivos por efecto del O_2 del aire. Se incubó a 35 °C y en total oscuridad por 5 días para posteriormente observar y

registrar cambios en la coloración del medio (viraje de azul a amarillo o verde claro), lo cual indica metabolismo microbiano positivo para fijación de N_2 .

7.8.2 Solubilización de Fósforo (P).

Se utilizó el medio de cultivo NBRIP por sus siglas en inglés “National Botanical Research Institute’s Phosphate growth médium” (Nautiyal, 1999). Para preparar 1L de este medio se adicionaron 10g de glucosa, 5g de $Ca_3(PO_4)_2$, 5g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g de KCl, 0.1g de $(NH_4)_2SO_4$ y 15g de agar bacteriológico. En condiciones de esterilidad, se vació el medio en placas Petri y se dejó a prueba de esterilidad por 24 horas. Debido a que los fosfatos se precipitan, con la ayuda de un horador y en condiciones de esterilidad se hicieron orificios de 60 mm de diámetro en el medio y así permitir que los microorganismos solubilizadores de fosfatos accedieran a éstos. Una vez realizados los orificios al medio de cultivo, se volvió a dejar a prueba de esterilidad durante 24 horas. Se hicieron dos pocillos para cada microorganismo analizado ya que esta prueba fue realizada por duplicado.

Se inocularon y cultivaron los microorganismos de interés por duplicado en 7 ml de medio LB y Soja tripticasa pH=7.5 contenidos en tubos de ensaye estériles. Los inóculos fueron incubados a 35 °C con agitación oscilatoria de 120 rpm por 24 horas a excepción de los actinomicetos que se incubaron de 48 a 72 horas. Los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos y se retiró el sobrenadante por decantación; los microorganismos fueron lavados dos veces con 5 ml de agua destilada estéril (se centrifugó durante este paso) y se resuspendieron entre cada lavado. Se tomaron 80 μ l de los cultivos y se introdujeron en los pocillos realizados en el medio NBRIP contenido en placas. Las placas se cubrieron en su totalidad con papel aluminio y se incubaron a 35°C por 15 días. Los microorganismos positivos a la prueba (solubilizadores de fosfatos) mostraron un halo transparente alrededor de los pocillos (Figura 5), se midió el radio del halo con un vernier y se registraron los valores colectados.



Figura 5. Placa con medio NBRIP donde se indica actividad microbiana solubilizadora de fosfatos por presencia de halo. Microorganismo positivo a la prueba por formación de halo (izquierda) y microorganismo negativo a la prueba (derecha).

7.8.3 Determinación de la Auxina Ácido Indolacético (AIA).

Para esta determinación, se utilizó como indicador de producción de auxinas el reactivo de Salkowsky: 12g L⁻¹ de FeCl₃ en 7.9 M de H₂SO₄ (Glickmann y col., 1995). Se adicionaron 7 ml de medio King B en tubos de fondo cónico de 15 ml marca Falcon. Los aislados microbianos fueron sembrados por triplicado y se incubaron a 35 °C con agitación oscilatoria de 200 rpm de 48 a 72 horas, dependiendo de la velocidad de crecimiento del microorganismo. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos. 1ml de sobrenadante se transfirió a un tubo de ensaye limpio donde se añadió 1ml del reactivo de Salkowsky y se agitó cuidadosamente para homogeneizar la muestra. Los tubos fueron incubados en total oscuridad por 30 minutos. Por comparación de un control negativo (1ml de medio King B sin inocular añadido con 1 ml de reactivo de Salkowsky) se identificaron cambios de coloración en el medio de cultivo inoculado con los distintos microorganismos. Una coloración rojiza indica positivo para la producción de auxinas. Se registraron los resultados.

7.8.4 Determinación de producción de biosurfactantes en los aislados microbianos.

Para comprobar la producción de biosurfactantes se utilizó el medio de cultivo MSM (Mineral Salts Medium) glucosa 2% como única fuente de carbono y energía. Este medio de cultivo se basa en una solución A que para 1L requiere: 2.5 g NaNO₃, 0.4 g MgSO₄·7H₂O, 1 g NaCl, 1 g KCl, 0.05 g CaCl₂·2H₂O y 10 ml de H₃PO₄. La solución debe ajustarse a un

pH=7.2 con pellets de KOH, y una solución B que para 1L requiere: 0.5 g FeSO₄.7H₂O, 1.5 g ZnSO₄.7H₂O, 1.5 g MnSO₄.7H₂O, 0.56 g H₃BO₃, 0.42 g CoCl₂, 0.15 g CuSO₄.5H₂O y 0.1 g NaMO₂O₄.2H₂O. Se debe añadir 1 ml de solución B a 1 L de solución A. Se preparó un stock de glucosa al 20 %. Las soluciones A y B se mezclan para su posterior esterilización mientras que la solución de glucosa debe añadirse a la mezcla (A y B) después de haber sido esterilizada. En condiciones de esterilidad, se colocaron 30 ml de medio MSM glucosa 2 % en matraces estériles, se dejó a prueba de esterilidad por 24 horas para luego inocular el medio contenido en los distintos matraces con los aislados microbianos. Para esto, se hicieron preinóculos (por duplicado) en 7 ml de medio LB contenido en tubos de ensaye, se incubó a 35 °C con agitación oscilatoria de 200 rpm durante 24 horas. Posteriormente, 200 µl de los preinóculos se sembraron por duplicado en 30 ml de MSM glucosa 2 % contenidos en matraces y se incubó bajo las condiciones antes mencionadas por 7 días; en el caso de los actinomicetos el tiempo de incubación fue alrededor de 10 días. Posteriormente, se tomaron 15 ml cada uno de los cultivos y se transfirieron de forma individual a tubos cónicos de 15 ml estériles marca Falcon, se centrifugó a 4000 rpm. Los sobrenadantes se guardaron en tubos de 15 ml estériles y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis. Para determinar si había producción de biosurfactantes por los distintos aislados microbianos, se midió la tensión superficial (TS) de los sobrenadantes por el método del anillo de Du Noüy con ayuda de un tensiómetro (CSC Scientific 70535 Tensiometer). Las distintas lecturas de TS se registraron en (mN/m) y se contrastaron con un control negativo (medio MSM sin inocular). Las lecturas de TS menores al control negativo son positivas a la producción de biosurfactantes.

7.8.5 Prueba de Índice de Emulsificación (IE) 24.

Se analizó la capacidad de los caldos microbianos (sobrenadantes de los cultivos) para formar emulsiones estables mediante la prueba del índice de emulsificación (IE) a las 24 horas de acuerdo a Cooper y col., (1987). Se colocaron 7 ml del medio MSM glucosa 2% en tubos estériles. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Se propagaron los aislados microbianos en placas de R2A y PDA para obtener inóculos jóvenes. Posteriormente, los microorganismos fueron sembrados por triplicado en 7 ml de LB contenidos en tubos de ensaye y se incubaron a 35 °C con agitación oscilatoria de 120 rpm por 24 horas. Estos cultivos se utilizaron como preinóculos para el medio MSM glucosa 2% contenido en tubos

de ensaye. Se incubó en las condiciones ya mencionadas de temperatura y agitación por 5 días. En el caso de los actinomicetos el tiempo de incubación fue de 15 días debido a que su crecimiento era más lento. Los cultivos microbianos en MSM glucosa 2%, después de su tiempo de incubación, se transfirieron a tubos cónicos estériles marca Falcon y se centrifugo a 4000 rpm por 30 minutos. Se tomaron 2 ml de los sobrenadantes y se añadieron por separado a tubos de ensayo estéril, después se añadieron 3 ml de diésel y se agitaron en vortex por 2 minutos. Las muestras de sobrenadante con diésel se dejaron reposar en posición vertical durante 24 horas (Figura 6) a temperatura ambiente. El IE24 se calculó dividiendo la altura de la capa emulsificada entre la altura total de las fases (acuosa y no acuosa) y multiplicada por 100. Los datos fueron registrados para su posterior análisis.

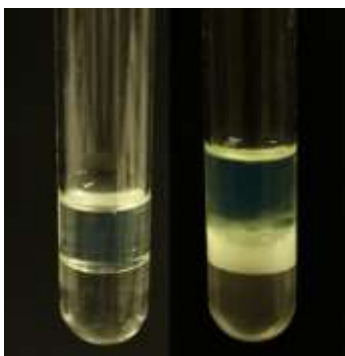


Figura 6. Prueba negativa (izquierda) y prueba positiva (derecha) al IE24.

7.9. Actividad biocida de hongos.

Se inocularon 50 ml de medio PDB (Potato Dextrose Broth) contenido en matraces Erlenmeyer de 125 ml, los distintos aislados fúngicos obtenidos en el presente trabajo de investigación. Para ello, con ayuda de un sacabocados estéril se tomó un fragmento de cada hongo obtenido y se colocaron en el medio antes mencionado en condiciones de esterilidad, se incubación a 35 °C con agitación oscilatoria de 100 rpm de 25 a 30 días. Se recuperó el sobrenadante de los distintos cultivos fúngicos por filtración con vacío y se almacenaron los distintos sobrenadantes a 4 °C para su posterior utilización.

En placas con agar Mueller Hinton se inocularon, por extensión con varilla y por triplicado, 100 µl de cultivo de *Escherichia coli*, posteriormente se embebieron discos de papel filtro estériles, de 60 mm de diámetro, en los distintos sobrenadantes fúngicos y se colocaron sobre las placas ya inoculadas. Se incubaron las placas a 35 °C por 24 a 48 horas. La presencia de

un halo transparente alrededor de los discos de papel indican que la prueba es positiva a la actividad biocida contra *E. coli*. En caso de la presencia del halo transparente alrededor de los discos de papel se toma la medida del halo (radio o diámetro) con un vernier.

7.10 Análisis estadísticos.

Se realizaron análisis estadísticos de los resultados de tolerancia microbiana a diferentes concentraciones de Pb empleando el método de t-student con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ entre el crecimiento (UFC ml⁻¹) de los microorganismos en presencia y ausencia de Pb (ver tablas en anexos) utilizando el programa MINITAB. Para los datos con una diferencia significativa entre el crecimiento microbiano en presencia y ausencia de Pb se utilizó el símbolo “*” y para el crecimiento microbiano que no presentó diferencia estadísticamente significativa se utilizaron las iniciales “NS”.

7.11 Conservación de los aislados microbianos.

Cada microorganismo aislado fue conservado en glicerol. En condiciones de esterilidad, se tomó una asada de cada uno de los distintos microorganismos trabajados y se inocularon por separado 6 ml de caldo de cultivo contenidos en tubos de ensaye, posteriormente los caldos inoculados se incubaron a 35 °C con una agitación oscilatoria de 100 rpm de 24 a 72 horas, según el tipo de microorganismo. Se tomaron 50 µl de cada cultivo y se depositaron por separado en microtubos estériles de 2 ml marca Eppendorff, posteriormente se añadieron 50 µl de glicerol al 30% a cada tubo conteniendo los cultivos. Se agitó suavemente y se almacenaron y conservaron a -20 °C. Los medios de cultivo utilizados para la conservación de los microorganismos fueron caldos Luria Bertani (LB) para bacterias y PDB (Potato Dextrose Broth) y PYD (Peptone Yeast Dextrose) para levaduras y hongos.

8. RESULTADOS

8.1 Características fisicoquímicas del suelo.

8.1.1 Textura.

En la tabla 4 se muestran los resultados del análisis de textura del suelo bajo estudio; puede observarse que la textura predominante fue la arenosa. Los suelos con textura arenosa se caracterizan por contener una permeabilidad al agua elevada por lo que retienen muy poca humedad en comparación con los suelos arcillosos. La arena puede proporcionar un buen dren al suelo facilitando los cultivos sin embargo, también tienden a secarse fácilmente y a perder nutrientes por lixiviación (Gliessman, 2002). Por el contrario, los suelos con textura arcillosa, como el encontrado en el punto de muestreo P15, se caracterizan por una mayor

retención de agua y nutrientes, favoreciendo así la producción de biomasa y por lo tanto el contenido de materia orgánica (MO). El suelo franco, considerado ideal para cultivos en campo, contienen una mezcla equilibrada entre arena, limo y arcilla; lo que permite una buena permeabilidad y retención del agua y nutrientes.

Tabla 4. Tipos de textura del suelo analizado (método del hidrómetro de Bouyoucos).

Clave Muestra	% de Arenas	% Arcilla Total	% Limo	Tipo de suelo
P12	66.76	28.24	5	Arcilloarenoso
P13	94.2	4	1.8	Arenoso
P14	94.2	3	2	Arenoso
P15	1.48	75.52	23	Arcilloso
P16	95.2	4.2	0.6	Arenoso
P17	68.6	22.52	8.88	Francoarenoso

8.1.2 pH del suelo en estudio.

El suelo en estudio tiene un pH moderadamente alcalino. El promedio (pH 8.3), de los datos de pH se estableció para emular las condiciones de cultivo de los aislados microbianos en el laboratorio. Los valores de pH obtenido a las dos distintas profundidades de suelo, de los puntos de muestreo seleccionados en el sitio, son muy similares (Tabla 4); las muestras de suelo tomadas de 0 a 15 cm de profundidad mostraron un rango de pH entre 7.96 y 8.94 mientras que las muestras de suelo tomadas de 15 a 30 cm de profundidad mostraron un rango de pH de 7.94 a 8.21. Los valores de pH más elevados: 8.94 y 8.84 a profundidad de 0 a 15 cm y profundidad de 15 a 30 cm respectivamente, se encontraron en el punto de muestreo 13, y los valores de pH más bajos: 7.96 a profundidad de 0 a 15 cm y pH 7.94 a una profundidad de 15 a 30 cm, en los punto de muestreo 16 y 15 respectivamente.

Los valores de pH encontrados pueden estar directamente relacionados con el tipo de rocas y materiales presentes en el sitio, deberse a la falta de lluvias (pues el sitio está en una zona árida). Además, tratándose de un suelo impactado por metales pesados, el pH es un factor preponderante a considerar para la movilidad y biodisponibilidad de éstos. La mayoría de los metales, entre ellos el Pb, tienden a estar más disponibles a pH ácido, con excepción del As, Mo, Se y Cr, que están más disponibles a pH alcalino (Kabata, 2000 en Prieto y col., 2009).

McGrath y col. (2000) encontraron que la biodisponibilidad del Pb es mayor durante los primeros tres años siguientes a la aplicación de materia orgánica en el suelo impactado por dicho metal, seguida por una más baja pero sostenida biodisponibilidad.

Tabla 5. Características fisicoquímicas de muestras de suelo en estudio (número de muestra n=3).

Muestra (profundidad en cm)	%MO	CE mS/cm	pH	Nitrógenos Totales	Fósforo P ₂ O ₅ Kg/Ha
P12 0-15	0.6310±.04	3.3633±.09	8.49±.00	0.0016±.00	219.2
P12 15-30	1.3491±.07	7.5200±.04	8.21±.01	0.0337±.00	
P13 0-15	1.1962±.37	1.2463±.00	8.94±.00	0.0047±.00	
P13 15-30	1.2015±.33	1.5620±.00	8.84±.00	0.0056±.00	
P14 0-15	1.2229±.14	9.3266±.17	8.02±.03	0.0322±.00	
P14 15-30	2.2735±.15	8.5133±.15	7.95±.01	0.0439±.00	
P15 0-15	4.8436±.18	12.5200±.18	8.01±.02	0.2119±.00	
P15 15-30	6.2851±.09	12.4266±.17	7.94±.00	0.2189±.00	
P16 0-15	4.6780±.21	10.1133±.03	7.96±.02	0.1400±.00	
P16 15-30	5.2939±.51	10.7200±.11	7.95±.01	0.1274±.00	
P17 0-15	2.6149±.21	2.0696±.07	8.25±.00	0.0403±.00	
P17 15-30	0.6057±.00	2.1313±.00	8.80±.01	0.0182±.00	

8.1.3 Porcentaje de Materia Orgánica (%MO).

Los suelos áridos, como el utilizado en la presente investigación, se caracterizan por su bajo contenido de materia orgánica (MO). Sin embargo, los resultados de %MO, en los dos perfiles de suelo trabajados (Tabla 5), van desde 0.60 %MO hasta 6.28 %MO, lo cual puede deberse a la sustitución de suelo contaminado por suelo agrícola en algunos puntos del sitio de estudio. El suelo de los puntos P15 y P16 presentó mayor %MO seguido de los puntos P17, P14, P13 y P12 (Figura 3).

La determinación de %MO en suelos es importante ya que el contenido de MO es crítico para controlar la solubilidad de los metales, experimentalmente hablando, la adsorción de los suelos algunas veces no revela la fuerte correlación entre el contenido de MO y la solubilidad o capacidad de absorción del metal. Esto es por varias razones, primero debido a que el pH controla la variación de la complejización del metal por materia orgánica, no existe una forma

satisfactoria para desacoplar la variable pH del % MO así que el efecto de estas dos variables en la absorción del metal puede determinarse por separado.

8.1.4 Conductividad Eléctrica (CE).

Como se indica en la sección de materiales y métodos, para cada muestra de suelo se hicieron por triplicado las mediciones de CE para luego promediarlas. Con este parámetro se determinó indirectamente la presencia de sales en el suelo; el suelo del punto de muestreo 13(P13) (0 a 15 cm de profundidad) mostró una CE promedio de 1.24 mS/cm (la más baja de los puntos de muestreo), indicando se trata de un suelo ligeramente salino (1.1 a 2.0 mS/cm), mientras que para el suelo del punto de muestreo 15 (P15) a la misma profundidad, se obtuvo el valor promedio más alto de CE (12.52 mS/cm), indicando un suelo altamente salino (rangos de 8.1 a 16 mS/cm) (Tabla 5). Esta variación de CE puede deberse en gran medida a la adición de suelo agrícola en el sitio de estudio.

8.1.5 Nitrógeno (N₂) total.

De acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000, el N₂ total es muy bajo en los puntos de muestreo P12 0-15, P12 15-30, P13 0-15, P14 0-15, P14 15-30, P17 0-15 y P17 15 (<0.05) (Tabla 5). Mientras que el N₂ total para P13 15-30 fue bajo (0.05-0.10), valor de N₂ total medio (0.10-0.15) en los puntos P16 0-15, P16 15-30 y N₂ total alto (0.15-0.25) en P15 0-15 y P15 15-30. Estos niveles de variación en el suelo pueden deberse a la adición de suelo agrícola en el sitio de estudio.

8.2 Microorganismos cultivables.

En las figuras 7 y 8 se observa la cantidad de células microbianas obtenidas de la siembra en R2A de las muestras de suelo del sitio en estudio. Se encontraron bacterias, hongos, posibles levaduras y actinomicetos. El mayor contenido de microorganismos cultivables de las muestras de suelo correspondió a P17 15-30 cm y P12 0-15 cm, el sitio más contaminado y uno de los menos contaminados respectivamente. No se obtuvo crecimiento microbiano de la siembra de las muestras de suelo P13 15-30 cm (Figura 7).

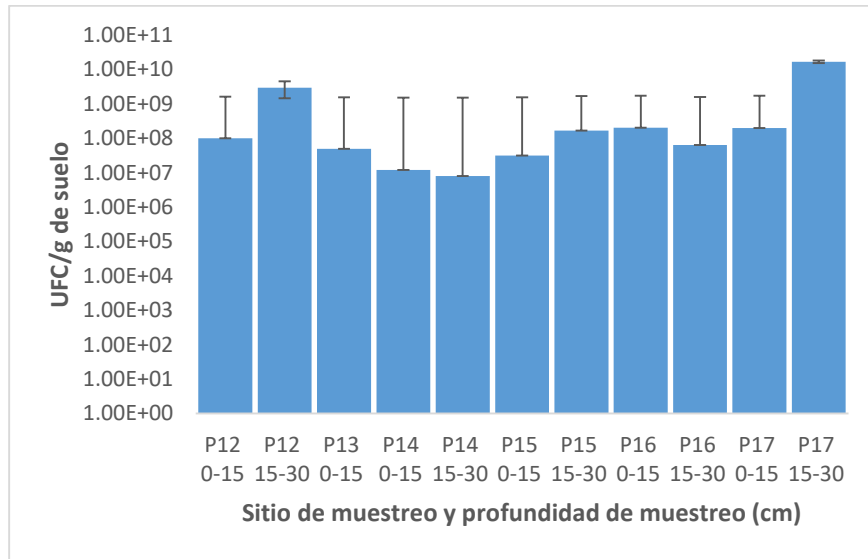


Figura 7. UFC para bacterias y algunos actinomicetos en placas Petri con agar R2A.

En la figura 8 los puntos 12 y 15 destacaron en cuanto al crecimiento de microorganismos. También se obtuvo que el punto 17 de 15-30 cm de profundidad fue el más destacado en cuanto a crecimiento de microorganismos, lo cual fue de suma importancia, ya que se observó durante el muestreo del sitio, que el punto 17 es uno de los puntos más contaminados.

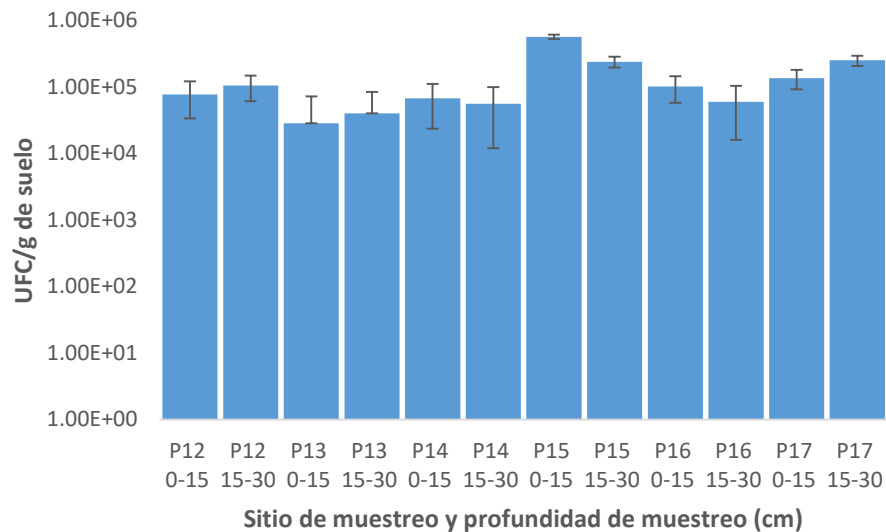


Figura 8. UFC para Levaduras y algunas bacterias y actinomicetos en placas Petri con PDA.

En la figura 9 se observa la cantidad de UFC fúngicas obtenidas de la siembra de las muestras de los diferentes puntos. Las muestras con mayor cantidad de microorganismos fueron las correspondientes a P16 15-30 cm y P17 0-15 cm. No se encontró crecimiento microbiano para las muestras de P13 0-15 cm, P14 0-15 y 15-30 cm, P15 0-15 y 15-30 cm por lo que no se incluyeron en la gráfica de la figura 9.

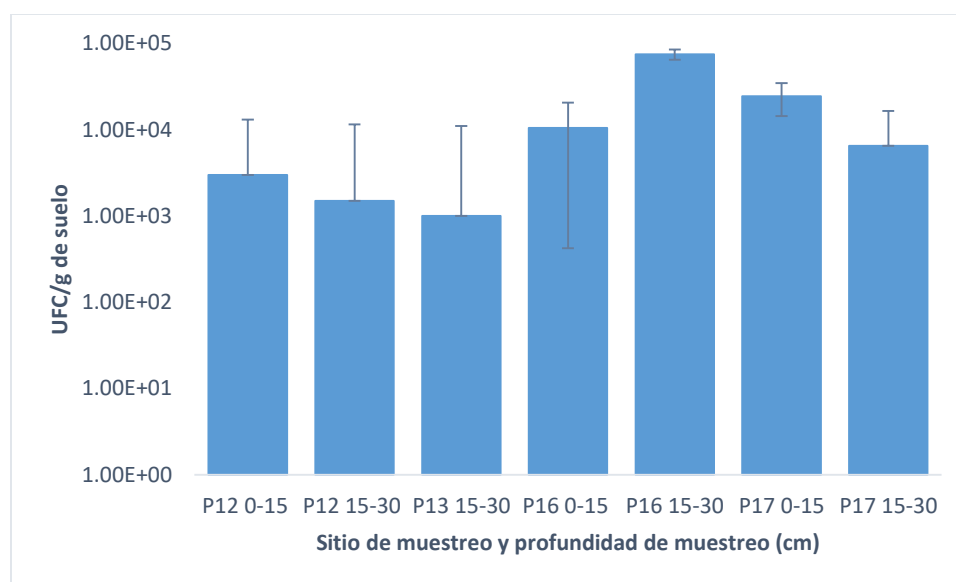


Figura 9. Crecimiento de UFC para Hongos.

8.3 Selección de microorganismos.

Se obtuvieron alrededor de 78 aislados microbianos en medio R2A. En la tabla 6 se indican los grupos microbianos en los que se clasificaron los aislados similares o parecidos según su morfología colonial y celular así como los resultados de tinción Gram. Se seleccionó un aislado microbiano por cada grupo generado.

Tabla 6. Agrupación de aislados bacterianos con características similares.

Grupos	Microorganismos similares	Microorganismo seleccionado
1	P15B6, P14B7, P14B10, P14B15, P14B14, P14B4, P14B8	P14B5
2	P12B4, P16B5	P12B4
3	P12B3, P16B17	P12B3
4	P16B1, P16B4	P16B1
5	P13B1, P13B2, P13B3, P13B4, P14B9, P14B16	P14B9

6	P13B5, P13B8	P13B5
7	P13B7, P14B16, P17B6, P15B15, P15B3, P15B16	P17B6
8	P14B3, P17B4	P17B4
9	P14B9, P16B12, P16B15	P14B9
10	P15B10, P16B11	P15B10
11	P15B1, P15B2, P15B3, P16B13	P15B2
12	P15B4, P15B16	P15B4
13	P16B17, P16B19	P16B19
14	P15B5, P15B7	P15B5
15	P16B1, P16B4	P16B1
16	P15B14, P16B12	P15B14
17	P16B3, P17B5	P17B5
18	P16B18, P16B20	P16B18
19	P17B3, P17B9	P17B3

Para el caso de los aislados fúngicos, se realizó el mismo criterio de selección empleado para las bacterias, se consideró morfología celular y coloración para agruparlos (Tabla 7).

Tabla 7. Agrupación de aislados microbianos con características similares.

Grupo	Microorganismos iguales	Microorganismo seleccionado
1	P12M5, P12M6, P12M10, P12M12, P12M13, P12M17, P12M19, P12M19, P12M20, P12M24, P12M25, P13M1, P13M4, P13M8, P13M9, P13M10, P14M2, P14M3, P14M5, P14M8, P14M10, P15M1, P15M3, P15M4, P15M6, P15M9, P15M10, P15M11, P15M12, P15M13, P15M15, P15M18, P15M22, P16M17, P16M18, P16M19, P16M29, P16M31, P17M27, P17M34, P17M36, P17M38	P17M38
2	P14M14, P14M15, P15M8, P15M20, P15M24, P15M25, P15M26, P15M27, P15M28, P15M29, P15M30, P16M3, P16M4,	P14M14
3	P14M16, P16M14,	P14M16

4	P17M18, P17M19, P17M21	P17M18
5	P12M7, P14M9, P14M12, P14M13, P14M17, P15M23, P16M5, P16M9, P16M11, P16M13, P16M28,	P14M9
6	P12M8, P12M14, P12M18, P12M21, P12M27, P13M3, P13M5, P14M6, P14M7, P14M11, P15M17, P16M26, P16M32	P14M6
7	P12M9, P13M2, P13M14, P16M34, P17M37	P17M37
8	P16M16, P16M21	P16M21
9	P16M6, P16M15	P16M6
10	P12M16, P12M26.	P12M16
11	P13M12, P17M14, P17M16, P17M22, P17M25	P17M14
12	P15M2, P17M20	P17M20
13	P13M11, P17M4	P17M4
14	P12M4, P16M22	P12M4
15	P16M1, P16M24	P16M24
16	P17M1, P17M32	P17M1

8.4 Selección de microorganismos para pruebas de tolerancia al Pb y producción de metabolitos secundarios.

Para el análisis de tolerancia a Pb, los microorganismos aislados se inocularon en el medio seleccionado (LB sin Pb) ya que en éste no precipitó el Pb a concentraciones por arriba de 500 mg L⁻¹. Los aislados microbianos que crecieron en LB se utilizaron para determinar su tolerancia a Pb así como evaluar su capacidad para producir metabolitos secundarios (Tabla 8).

Tala 8. Total de microorganismos seleccionados para el análisis de tolerancia al Pb y producción de metabolitos secundarios.

Puntos de muestreo (0-15 y 15-30 cm)	Microorganismos seleccionados
P12	P12B1, P12B2, P12B4, P12B5, P12B6, P12M11, P12M16
P13	P13M6, P13M7





P14	P14B5, P14B9, P14B13, P14B15, P14B17, P14M6, P14M9, P14M14, P14M16, P14M18, P14M19
P15	P15B2, P15B11, P15B12, P15B14, P15M5, P15M7, P15M14, P15M16, P15M19, P15M21
P16	P16B1, P16B7, P16B8, P16B10, P16B14, P16B16, P16B18, P16B19, P16B21, P16B23, P16M7, P16M10, P16M21, P16M34
P17	P17B2, P17B3, P17B4, P17B6, P17B7, P17B8, P17M6, P17M14, P17M18, P17M37







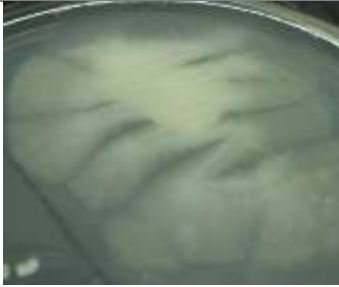

8.5 Características microbiológicas de los aislados.

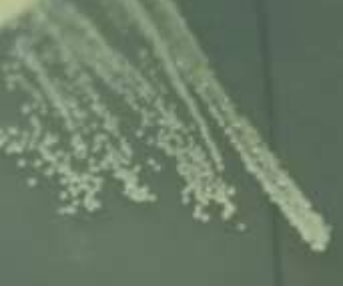
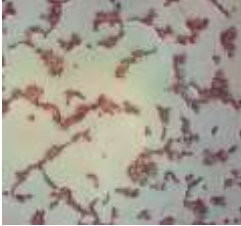








En la tabla 9 se muestran las características morfológicas de los aislados microbianos en R2A y su morfología celular y tinción Gram.



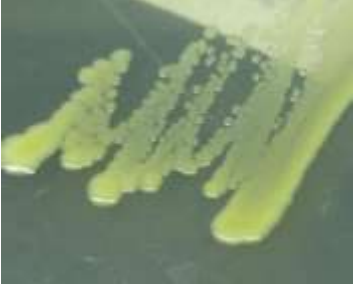







De los 53 aislados trabajados El 75.47% fueron Gram – mientras que el 20.75% corresponden a células Gram + (Tablas 9 y 10).











Tabla 9. Morfología colonial bacteriana para los aislados en placas R2A.











Microorganismo	Foto del aislado	Tinción de Gram	Morfología
P12B1		 Actinomicetos Gram (+) 100x	Forma Circular Elevación Planoconvexa Margen Ondulado con consistencia dura Color Crema con blanco en el medio
P12B4		 Cocos Gram (-) 40x	Forma Irregular Elevación Elevada Margen Dentado con consistencia pastosa Color

			Amarillo-crema semi opaco
P12B5		 Cocos Gram (-) 100x	Forma Irregular Elevación Convexa Margen Ondulado con consistencia gomosa Color Amarillo semi transparente
P12B6		 Cocos Gram (-) 40x	Forma Irregular Elevación Plana Margen Ondulado con consistencia pastosa Color Blanco opaco
P14B5		 Actinomicetos Gram (+) 100x	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Elevado con consistencia suave Color: Crema con blanco
P14B9		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: Irregular Elevación: Plana Margen: Ondulado con consistencia pastosa Color: Blanco- crema

P14B13		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: Puntiforme Elevación: Convexa Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Blanco
P14B17		 Actinomicetos Gram (+) 100x	Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero con consistencia semi dura Color: Crema semi transparente
P15B2		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: Irregular Elevación: Planoconvexa Margen: Lobulado con consistencia pastosa Color: Crema
P15B11		 Bacilos Gram (-) 100x	Forma: Irregular Elevación: Plana Margen: Ondulado con consistencia pastosa Color: Crema semi transparente
P15B12		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Pluinada Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Amarillo semi transparente

P15B14		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: Circular Elevación: Elevada Margen: Entero con consistencia pastosa Color: Blanco-crema
P16B1		 Cocos Gram (+) 40x	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Amarillo
P16B7		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Blanco
P16B8		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Puntiforme Elevación: Convexa Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Crema
P16B10		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: Circular Elevación: Planoconvexa Margen: Ondulado con consistencia semi dura Color: Amarillo-naranja

P16B14		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Puntiforme Elevación: Plana Margen: Entero con consistencia pastosa Color: Crema semi transparente
P16B16		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Blanco
P16B18		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Planoconvexa Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Amarillo- crema con bordes semi transparentes
P16B19		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Irregular Elevación: Plana Margen: Ondulado con consistencia pastosa Color: Blanco- crema
P16B21		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Puntiforme Elevación: Planoconvexa Margen: Ondulado con consistencia pastosa Color: Blanco

P16B23		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Ondulado con consistencia gomosa Color: Amarillo semi transparente
P17B2		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Pluinada Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Blanco
P17B3		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero con consistencia pastosa Color: Rosado-naranja
P17B4		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: Irregular Elevación: Plana Margen: Ondulado con consistencia gomosa Color: Transparente
P17B6		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: circular Elevación: Plana Margen: Entero con consistencia gomosa Color: Transparente



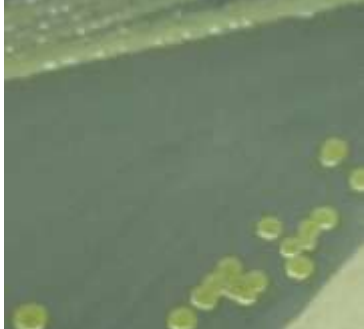





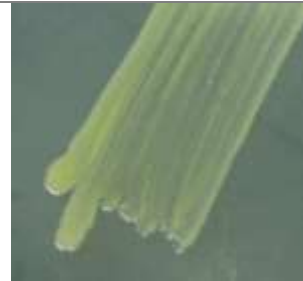











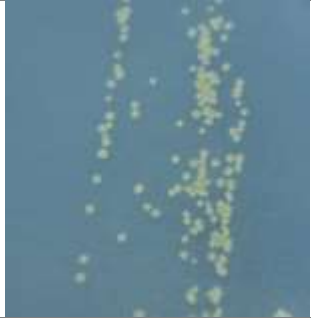





















P17B7		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero con consistencia pastosa Color: Rosa
P17B8		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero con consistencia pastosa Color: Amarillo













Tabla 10. Morfología característica de los aislados microbianos en medio PDA. P= punto de muestreo, M= número de microorganismo.



Microorganismo	Foto aislado	Tinción de Gram o vista al microscopio (para hongos)	Morfología
P12M11		 Actinomicetos Gram (+) 40x	Forma: circular Superficie: elevada Consistencia: suave Margen: entero Color: amarillo con café
P12M16		 Cocos Gram (-) PH=2, 100x	Forma: circular Superficie: elevada Consistencia: dura Margen: entero Color: transparente

P13M6		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: circular Superficie: plana Consistencia: suave Margen: entero Color: amarillo
P13M7		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: circular Superficie: elevada Consistencia: suave Margen: entero Color: blanco
P14M6		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: circular Superficie: plana Consistencia: gomosa Margen: entero Color: blanco-crema
P14M9		 Cocos Gram (-) 40x Nota: extremadamente pequeños	Forma: puntiforme Superficie: plana Consistencia: suave Margen: ondulado Color: blanco-crema semi transparente
P14M14		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: circular Superficie: plana Consistencia: suave Margen: entero Color: blanco con bordes blancos semi transparentes

P14M16			Forma: irregular Superficie: plana Consistencia: suave Margen: ondulado Color: blanco con bordes blancos semi transparentes
P14M18			Forma: circular Superficie: Plana Consistencia: suave Margen: entero Color: amarillo
P14M19			Forma: irregular Superficie: Plana Consistencia: suave Margen: entero Color: blanco-crema
P15M5			Forma: irregular Superficie: elevada Consistencia: gomosa Margen: entero Color: transparente
P15M7			Forma: pusiforme Superficie: Plana Consistencia: gomosa Margen: ondulado Color: transparente
P15M14			Forma: circular Superficie: Plana Consistencia: semi dura Margen: entero Color: semi transparente

		40x	
P15M16			Forma: circular Superficie: plana Consistencia: suave Margen: entero Color: blanco
P15M19			Forma: circular Superficie: planoconvexa Consistencia: gomosa Margen: entero Color: crema con bordes transparentes
P15M21			Forma: circular Superficie: plana Consistencia: suave Margen: entero Color: blanco-crema con bordes semi transparentes
P16M7			Forma: circular Superficie: plana Consistencia: suave Margen: entero Color: blanco al centro con bordes blancos semi transparentes
P16M10			Forma: circular Superficie: plana Consistencia: gomosa Margen: entero Color: transparente
P16M21			Forma: circular Superficie: pluinada Consistencia: gomosa Margen: entero Color: rosa; se vuelve más pigmentada al madurar

P16M34		 Actinomycetos Gram (+) 100x	Forma: puntiforme Superficie: plana Consistencia: suave Margen: entero Color: crema
P17M6		 Levaduras 40x	Forma: circular Superficie: elevada Consistencia: gomosa Margen: entero Color: blanco
P17M14		 Cocos Gram (-) 100x	Forma: irregular Superficie: planoconvexa Consistencia: gomosa Margen: ondulado Color: blanco con bordes blancos mate
P17M17		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: circular Superficie: elevada Consistencia: gomosa Margen: entero Color: blanco
P17M18		 Bacilos Gram (+) 100x	Forma: circular Superficie: plana Consistencia: gomosa Margen: ondulado Color: crema semi transparente
P17M33		 Cocos Gram (-) 40x	Forma: circular Superficie: plana Consistencia: suave Margen: entero Color: blanco

P17M37		 Actinomycetos Gram (+) 40x	Forma: puntiforme Superficie: elevada Consistencia: suave Margen: entero Color: blanco
--------	---	---	---

8.6 Resultado de microorganismos tolerantes al Pb

Los 53 microorganismos trabajados presentaron crecimiento en el medio Luria Bertani (LB), además este medio no mostró problemas de precipitación al adicionar $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ a las siguientes concentraciones: 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg L^{-1} , por lo que fue seleccionado para las pruebas de tolerancia microbiana a Pb. Para la preparación de este medio, se ajustó el pH a 7.5 ya que éste fue el más cercano al detectado en el suelo en estudio (pH 8.3) que no afectó la solubilidad de la sal de Pb utilizada; por arriba de este valor de pH el Pb se precipitaba en el medio de cultivo.

El 73.58% de los aislados microbianos ensayados mostraron crecimiento en el medio LB suplementado con Pb a una concentración de 500 mg L^{-1} (Tabla 11). Dicha concentración está por arriba del límite permisible según la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 que indica un máximo de 400 mg Kg^{-1} de Pb en suelo para uso agrícola, residencial o comercial. En la tabla 11 se observa que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Pb para los aislados P12B5, P12B6, P15B11, P16B10, P16B18, P16B19, P16B21, P16B23, P17B4, P12M22, P14M18, P16M34 y P17M6 fue de 500 mg L^{-1} . Los aislados P12M22 y P17M37 no mostraron crecimiento en el medio LB (Tabla 11) lo cual puede deberse a que los nutrientes presentes en dicho medio y/o las condiciones de cultivo y manipulación utilizadas no fueron las adecuadas para el crecimiento y desarrollo de estos dos aislados.

Tabla 11. Tolerancia de los aislados microbianos al Pb a [500 mg L⁻¹].

Clave identificación microorganismo	Número de células (UFC ml ⁻¹)			Tolerancia al Pb
	Inicial	Final		
		Sin Pb	Con Pb	
P12B1	3.95E+08	7.91E+08	4.34E+08	+
P12B4	1.03E+09	1.94E+09	2.02E+09	+
P12B5	1.08E+09	2.01E+09	-	-
P12B6	1.05E+09	1.84E+09	-	-
P14B5	3.51E+08	9.47E+08	4.28E+08	+
P14B9	1.19E+09	3.91E+09	4.34E+09	+
P14B13	1.38E+09	4.00E+09	4.47E+09	+
P14B17	1.12E+09	1.22E+09	4.73E+08	+
P15B2	1.15E+09	2.40E+09	2.52E+09	+
P15B11	5.16E+08	1.46E+09	-	-
P15B12	1.22E+09	1.08E+09	1.08E+09	+
P15B14	1.22E+09	2.75E+09	2.31E+09	+
P16B1	1.34E+09	3.74E+09	3.75E+09	+
P16B7	1.17E+09	3.11E+09	2.80E+09	+
P16B8	5.54E+08	3.75E+09	1.13E+08	+
P16B10	6.82E+08	1.95E+09	-	-
P16B14	1.49E+09	3.96E+09	1.33E+09	+
P16B16	1.36E+09	3.26E+09	6.31E+08	+
P16B18	3.59E+08	1.24E+09	-	-
P16B19	6.43E+08	1.58E+09	-	-
P16B21	9.70E+08	1.93E+09	-	-
P16B23	1.43E+09	3.07E+09	-	-
P17B2	1.33E+09	4.22E+09	1.49E+09	+
P17B3	3.56E+08	4.59E+08	6.51E+08	+
P17B4	1.13E+09	1.46E+09	-	-
P17B6	9.38E+08	2.16E+09	1.65E+09	+
P17B7	4.17E+08	4.55E+08	4.64E+08	+
P17B8	7.67E+08	1.972E+09	5.59E+08	+
P12M11	5.20E+08	1.579E+09	1.10E+09	+
P12M16	1.21E+09	2.06E+09	2.16E+09	+
P12M22	0	-	-	-
P13M6	1.11E+09	3.93E+09	1.89E+09	+
P13M7	1.29E+09	3.65E+09	1.91E+09	+
P14M6	6.85E+08	2.31E+09	2.20E+09	+
P14M9	1.20E+09	2.68E+09	2.51E+09	+
P14M14	8.39E+08	2.099E+09	2.47E+09	+
P14M16	1.13E+09	2.06E+09	1.78E+09	+

P14M18	4.05E+08	9.80E+08	-	-
P14M19	1.31E+09	2.22E+09	1.31E+09	+
P15M5	1.06E+09	2.22E+09	1.96E+09	+
P15M7	1.67E+09	3.66E+09	2.07E+09	+
P15M14	1.39E+09	2.03E+09	1.91E+09	+
P15M16	1.46E+09	2.10E+09	1.40E+09	+
P15M19	1.58E+09	3.10E+09	2.45E+09	+
P15M21	9.96E+08	2.06E+09	2.14E+09	+
P16M7	5.70E+08	1.92E+09	1.96E+09	+
P16M10	1.32E+09	2.58E+09	2.95E+09	+
P16M21	1.32E+09	2.63E+09	1.91E+09	+
P16M34	4.81E+08	1.14E+09	-	-
P17M6	9.34E+08	1.77E+09	-	-
P17M14	1.30E+09	2.06E+09	1.49E+09	+
P17M18	1.24E+09	2.80E+09	6.64E+08	+
P17M37	0	-	-	-

58.49% de los microorganismos trabajados fueron tolerantes a una concentración de Pb de 600 mg L⁻¹ en medio LB (Tabla 12) bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

Tabla 12. Tolerancia de los aislados microbianos al Pb a [600 mg L⁻¹].

Clave identificación microorganismo	Número de células (UFC ml ⁻¹)			Tolerancia al Pb
	Inicial	Final		
		Sin Pb	Con Pb	
P12B1	7.60E+08	1.19E+09	3.68E+08	+
P12B4	1.06E+09	2.10E+09	-	-
P14B5	1.09E+09	1.09E+09	6.44E+08	+
P14B9	1.29E+09	4.29E+09	4.48E+09	+
P14B13	1.44E+09	4.19E+09	4.24E+09	+
P14B17	9.55E+08	1.04E+09	-	-
P15B2	9.73E+08	2.05E+09	2.01E+09	+
P15B12	7.63E+08	9.73E+08	3.76E+08	+
P15B14	1.20E+09	2.85E+09	1.90E+09	+
P16B1	1.28E+09	3.73E+09	6.17E+08	+
P16B7	8.38E+08	2.15E+09	-	-
P16B8	4.41E+08	2.93E+09	-	-
P16B14	1.24E+09	5.24E+08	4.43E+08	+
P16B16	1.29E+09	2.80E+09	1.03E+09	+

P17B2	1.35E+09	3.51E+09	4.52E+08	+
P17B3	4.49E+08	4.99E+08	-	-
P17B6	1.07E+09	1.62E+09	1.69E+09	+
P17B7	5.85E+08	1.11E+09	5.75E+08	+
P17B8	7.81E+08	1.96E+09	-	-
P12M11	9.71E+08	2.39E+09	-	-
P12M16	7.82E+08	1.66E+09	1.29E+09	+
P13M6	7.74E+08	2.75E+09	2.06E+09	+
P13M7	1.17E+09	3.35E+09	1.55E+09	+
P14M6	6.36E+08	1.76E+09	1.46E+09	+
P14M9	1.24E+09	2.59E+09	1.32E+09	+
P14M14	9.99E+08	2.31E+09	1.64E+09	+
P14M16	6.86E+08	1.64E+09	1.14E+09	+
P14M19	7.60E+08	2.65E+09	1.65E+09	+
P15M5	8.75E+08	1.79E+09	2.20E+09	+
P15M7	1.02E+09	3.88E+09	2.60E+09	+
P15M14	5.52E+08	2.51E+09	1.53E+09	+
P15M16	9.53E+08	1.87E+09	2.83E+08	+
P15M19	1.00E+09	2.90E+09	2.03E+09	+
P15M21	5.04E+08	2.55E+09	1.51E+09	+
P16M7	8.75E+08	1.32E+09	2.18E+09	+
P16M10	1.27E+09	2.75E+09	2.07E+09	+
P16M21	1.25E+09	2.57E+09	1.98E+09	+
P17M14	1.23E+09	2.61E+09	1.67E+09	+
P17M18	1.25E+09	2.29E+09	5.67E+08	+

Los aislados microbianos P12B4, P14B17, P16B7, P16B8, P17B4, P17B8 y P12M11 (Tabla 12) no mostraron tolerancia al Pb a una concentración de 600 mg L⁻¹, lo cual indica que para estos aislados la CMI de Pb son 600 mg L⁻¹.

El 49.05% de los aislados microbianos fue tolerante a una concentración de Pb de 700 mg L⁻¹. La presencia de Pb a 700 mg L⁻¹ en el medio fue la CMI para los cultivos microbianos P12B1, P14B9, P14B13, P15B12, P16B1, P17B2 y P17B8 (Tabla 13).

Tabla 13. Tolerancia de los aislados microbianos al Pb a [700 mg L⁻¹].

Clave identificación microorganismo	Número de células (UFC ml ⁻¹)		Tolerancia al Pb	
	Inicial	Final		
		Sin Pb		Con Pb
P12B1	8.13E+08	1.47E+09	-	-
P14B5	9.25E+08	9.11E+08	4.06E+08	+
P14B9	1.45E+09	4.58E+09	-	-
P14B13	1.34E+09	4.17E+09	-	-
P15B2	6.32E+08	1.37E+09	1.92E+09	+
P15B12	6.01E+08	7.94E+08	-	-
P15B14	8.39E+08	2.01E+09	9.53E+08	+
P16B1	1.25E+09	3.46E+09	-	-
P16B14	9.38E+08	1.33E+09	3.09E+08	+
P16B16	1.05E+09	1.63E+09	9.30E+08	+
P17B2	1.31E+09	3.47E+09	-	-
P17B6	1.06E+09	3.02E+09	2.28E+09	+
P17B7	3.75E+08	1.08E+09	5.58E+08	+
P12M16	8.09E+08	2.88E+09	2.28E+09	+
P13M6	1.10E+09	4.60E+09	2.45E+09	+
P13M7	1.17E+09	4.70E+09	1.69E+09	+
P14M6	6.85E+08	2.87E+09	1.61E+09	+
P14M9	8.39E+08	3.34E+09	1.85E+09	+
P14M14	1.06E+09	3.16E+09	3.02E+09	+
P14M16	1.37E+09	2.75E+09	1.99E+09	+
P14M19	1.27E+09	2.53E+09	1.91E+09	+
P15M5	1.40E+09	2.54E+09	2.11E+09	+
P15M7	1.32E+09	3.82E+09	2.03E+09	+
P15M14	8.16E+08	3.36E+09	2.58E+09	+
P15M16	7.05E+08	3.28E+09	2.27E+09	+
P15M19	9.02E+08	3.55E+09	3.18E+09	+
P15M21	1.24E+09	3.50E+09	3.13E+09	+
P16M7	9.69E+08	3.17E+09	2.34E+09	+
P16M10	8.36E+08	3.51E+09	3.30E+09	+
P16M21	1.35E+09	2.30E+09	2.71E+09	+
P17M14	9.50E+08	2.81E+09	2.53E+09	+
P17M18	1.19E+09	2.62E+09	2.25E+09	+

Un 35.84% de los aislados mostraron la capacidad de crecer a una concentración de Pb de 800 mg L⁻¹ (Tabla 14) que es el límite establecido en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para suelos de uso industrial.

Tabla 14. Tolerancia de los aislados microbianos al Pb a [800 mg L⁻¹].

Clave identificación microorganismo	Número de células (UFC ml ⁻¹)			Tolerancia al Pb
	Inicial	Final		
		Sin Pb	Con Pb	
P14B5	1.09E+09	1.11E+09	-	-
P15B2	5.81E+08	2.35E+09	1.73E+09	+
P15B14	7.56E+08	4.55E+09	3.72E+09	+
P16B14	9.02E+08	1.30E+09	-	-
P16B16	1.06E+09	1.72E+09	-	-
P17B6	6.86E+08	3.44E+09	1.73E+09	+
P17B7	4.26E+08	4.62E+08	-	-
P12M16	9.04E+08	3.05E+09	-	-
P13M6	1.34E+09	4.20E+09	3.04E+09	+
P13M7	1.40E+09	4.81E+09	2.04E+09	+
P14M6	1.35E+09	3.24E+09	2.89E+09	+
P14M9	9.32E+08	2.92E+09	3.27E+09	+
P14M14	1.27E+09	3.22E+09	2.82E+09	+
P14M16	1.20E+09	3.62E+09	2.54E+09	+
P14M19	1.26E+09	3.77E+09	3.22E+09	+
P15M5	1.20E+09	3.06E+09	3.30E+09	+
P15M7	1.19E+09	4.20E+09	3.26E+09	+
P15M14	9.20E+08	3.67E+09	-	-
P15M16	1.16E+09	3.70E+09	3.24E+09	+
P15M19	8.28E+08	4.39E+09	-	-
P15M21	1.24E+09	3.38E+09	2.99E+09	+
P16M7	5.91E+08	3.50E+09	1.31E+09	+
P16M10	8.19E+08	3.45E+09	-	-
P16M21	1.21E+09	3.08E+09	3.50E+09	+
P17M14	1.35E+09	4.04E+09	3.39E+09	+
P17M18	8.94E+08	3.70E+09	2.55E+09	+

Los aislados (P15B14, P13M6, P14M6, P14M9, P14M14, P14M19, P15M5, P15M7, P15M14, P15M16, P15M19, P15M21, P16M21, P17M14 y P17M18) mostraron crecimiento en agregados esféricos (pellets) por lo que fue imposible determinar su densidad poblacional por absorbancia. Además los aislados (P15B14, P13M6, P14M6, P14M16, P14M18, P15M5,

P15M7, P15M16, P15M21, P16M21, P17M14 y P17M18) aumentaron el pH del medio de cultivo, por actividad metabólica, lo que a su vez generó precipitación de la sal de Pb. Estos aislados microbianos fueron descartados para determinar la CMI de Pb en sus cultivos.

9.43% de los aislados mostraron tolerancia al Pb a concentraciones de 900 y 1000 mg L⁻¹ (Tablas 15 y 16).

Tabla 15. Tolerancia de los aislados microbianos al Pb a [900 mg L⁻¹].

Clave identificación microorganismo	Número de células (UFC ml ⁻¹)			Tolerancia al Pb
	Inicial	Final		
		Sin Pb	Con Pb	
P15B2	1.08E+09	1.75E+09	1.90E+09	+
P17B6	1.01E+09	2.89E+09	2.01E+09	+
P13M7	1.34E+09	5.10E+09	2.75E+09	+
P14M16	8.13E+08	3.99E+09	3.27E+09	+
P16M7	6.93E+08	3.42E+09	3.54E+09	+

Tabla 16. Tolerancia de los aislados microbianos al Pb a [1000 mg L⁻¹].

Clave identificación microorganismo	Número de células (UFC ml ⁻¹)			Tolerancia al Pb
	Inicial	Final		
		Sin Pb	Con Pb	
P15B2	1.08E+09	1.75E+09	2.71E+09	+
P17B6	1.01E+09	2.89E+09	2.62E+09	+
P13M7	1.34E+09	5.10E+09	3.24E+09	+
P14M16	8.13E+08	3.99E+09	3.45E+09	+
P16M7	6.93E+08	3.42E+09	3.07E+09	+

Los resultados aquí reportados indican que los microorganismos tolerantes al Pb son potencialmente viables para ser utilizados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con dicho metal pesado y así contribuir a los ciclos biogeoquímicos de éstos. Además, la resistencia bacteriana a metales pesados es un indicador biológico de la contaminación por dichos metales (Rahman & Singh, 2016).

El condensado de los resultados de tolerancia microbiana a las diferentes concentraciones de Pb ensayadas se muestra en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados resumidos sobre la tolerancia a distintas concentraciones de Pb de los aislados microbianos analizados.

Clave identificación microorganismo	CMI de Pb (mg L ⁻¹)					
	500	600	700	800	900	1000
P12B1	+	+	-	-	-	-
P12B4	+	-	-	-	-	-
P12B5	-	-	-	-	-	-
P12B6	-	-	-	-	-	-
P14B5	+	+	+	-	-	-
P14B9	+	+	-	-	-	-
P14B13	+	+	-	-	-	-
P14B17	+	-	-	-	-	-
P15B2	+	+	+	+	+	+
P15B11	-	-	-	-	-	-
P15B12	+	+	-	-	-	-
P15B14	+	+	+	+	-	-
P16B1	+	+	-	-	-	-
P16B7	+	-	-	-	-	-
P16B8	+	-	-	-	-	-
P16B10	-	-	-	-	-	-
P16B14	+	+	+	-	-	-
P16B16	+	+	+	-	-	-
P16B18	-	-	-	-	-	-
P16B19	-	-	-	-	-	-
P16B21	-	-	-	-	-	-
P16B23	-	-	-	-	-	-
P17B2	+	+	-	-	-	-
P17B3	+	-	-	-	-	-
P17B4	-	-	-	-	-	-
P17B6	+	+	+	+	+	+
P17B7	+	+	+	-	-	-
P17B8	+	-	-	-	-	-
P12M11	+	-	-	-	-	-
P12M16	+	+	+	-	-	-
P13M6	+	+	+	+	-	-
P13M7	+	+	+	+	+	+
P14M6	+	+	+	+	-	-

P14M9	+	+	+	+	-	-
P14M14	+	+	+	+	-	-
P14M16	+	+	+	+	+	+
P14M18	-	-	-	-	-	-
P14M19	+	+	+	+	-	-
P15M5	+	+	+	+	-	-
P15M7	+	+	+	+	-	-
P15M14	+	+	+	-	-	-
P15M16	+	+	+	+	-	-
P15M19	+	+	+	-	-	-
P15M21	+	+	+	+	-	-
P16M7	+	+	+	+	+	+
P16M10	+	+	+	-	-	-
P16M21	+	+	+	+	-	-
P16M34	-	-	-	-	-	-
P17M6	-	-	-	-	-	-
P17M14	+	+	+	+	-	-
P17M18	+	+	+	+	-	-

(+) Tolerancia a determinada concentración de Pb

(-) Nula tolerancia a determinada concentración de Pb.

8.7 Análisis estadísticos de resistencia a Pb por los cultivos microbianos.

Se realizaron pruebas de t student con un valor de significancia $\alpha=0.05$ para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento microbiano en presencia y ausencia de Pb (ver tablas en anexos). Se encontró una diferencia estadística significativa para el 60.37% de los cultivos microbianos no expuestos y expuestos al Pb a una concentración de 500 mg L⁻¹. El 15.09% de los microorganismos cultivados a la misma concentración de Pb fueron no significativos en las dos condiciones ensayadas. Para el caso de los cultivos, en presencia de Pb a una concentración de 600 mg L⁻¹, el 47.16% mostró diferencia significativa mientras que el 7.54% no mostró diferencia significativa. A 700 mg L⁻¹ el 41.50% fue diferentemente significativo y el 5.66% fue no significativo. A la concentración de 800 mg L⁻¹ todos los microorganismos analizados fueron diferentemente significativos (33.96% de los 53 microorganismos analizados). Para las concentraciones de 900 mg L⁻¹ y 1000 mg L⁻¹ el 7.54% y 9.43% fueron diferentemente significativos; el 1.88% fue no significativo para 900 mg L⁻¹, mientras que para la concentración de 1000 mg L⁻¹ no hubo significancia.

8.8 Bacterias productoras de metabolitos secundarios.

8.8.1 Fijación de N₂.

El 56.60% de los 53 microorganismos analizados fueron positivos para la prueba de fijación de N₂, (Tabla 18).

Tabla 18. Resumen de la actividad metabólica microbiana evaluada: fijación de N₂, solubilización de P, producción de auxinas y biosurfactantes.

Clave identificación microorganismo	Fijación de N ₄	Solubilización de P	Producción de auxinas (AIA)	Producción de biosurfactantes	
		Radio del halo (mm)		TS (mN/m)	IE ₂₄ (%)
P12B1	-	-	-	55.66	0
P12B4	-	-	+	67.08	0
P12B5	-	-	-	-	-
P12B6	-	-	-	66.80	0
P14B5	+	-	-	-	-
P14B9	+	-	-	-	-
P14B13	+	-	-	70.50	0
P14B17	-	-	-	-	-
P15B2	+	-	-	32.25	12.28
P15B11	+	-	-	-	-
P15B12	+	-	-	67.83	0
P15B14	-	-	-	48.15	0
P16B1	+	-	-	-	-
P16B7	-	-	-	-	-
P16B8	-	-	-	-	-
P16B10	-	-	-	-	-
P16B14	-	-	+	69.83	0
P16B16	-	-	-	70.16	0
P16B18	-	-	-	-	-
P16B19	-	-	-	57.40	11.42
P16B21	-	-	+	65.16	0
P16B23	-	-	+	53.66	0
P17B2	+	-	+	58.33	5.71
P17B3	-	-	-	-	-
P17B4	-	-	-	-	-
P17B6	+	-	-	32.18	18
P17B7	-	-	-	-	-
P17B8	+	-	+	-	-
P12M11	+	-	-	-	0
P12M16	+	-	-	38.25	3.71

P12M22	+	30 mm	-	-	-
P13M6	+	-	-	66.26	5.71
P13M7	+	-	-	69.98	2.85
P14M6	+	-	-	33.16	22.85
P14M9	+	-	-	48.83	29.42
P14M14	+	-	-	32.30	14.28
P14M16	+	-	-	36.70	0
P14M18	-	-	-	70	0
P14M19	+	-	-	29.16	15.14
P15M5	+	-	-	29.91	20
P15M7	+	-	-	43.23	5.71
P15M14	+	-	-	31.11	0
P15M16	+	-	-	29	42.85
P15M19	+	-	-	30.58	17.14
P15M21	+	-	-	50.75	0
P16M7	+	-	-	41.41	5.71
P16M10	+	-	-	48	0
P16M21	-	20 mm	-	68.83	0
P16M34	-	-	-	69.65	0
P17M6	-	35 mm	-	70.50	0
P17M14	+	-	-	40.16	3.71
P17M18	+	-	-	30.01	20
P17M37	-	-	-	-	0

8.8.2 Solubilización de fosfatos.

El 5.66% de los 53 microorganismos analizados fueron positivos a la prueba de solubilización de fosfatos (Tabla 18). La utilización de microorganismos solubilizadores de fosfatos es una alternativa viable en la utilización de biofertilizantes ya que éstos se concentran en alta proporción en la rizósfera de las plantas y son metabólicamente más activos. En los suelos, las bacterias solubilizadoras de fosfatos podrían producir ácidos orgánicos y enzimas de fosfato para mejorar la solubilización de los compuestos de fosfato insolubles; gracias a esto se han utilizado ampliamente como inoculantes para aumentar los contenidos de fosfato disponibles en el suelo y mantener un buen rendimiento en los cultivos. También, estos microorganismos prometen remediar suelos contaminados con metales pesados (por ejemplo el plomo) reduciendo en algunos casos la movilidad y disponibilidad del metal (Yuan y col., 2017).

8.8.3 Producción de Auxinas.

Se analizó igualmente los 53 microorganismos para determinar si producían ácido indolacético (auxinas); los resultados arrojaron un porcentaje de 11.32% de microorganismos capaces de producir el metabolito (Tabla 18). Sólo hubo un microorganismo que presentó una mayor coloración rojiza (indicador de positivo) al momento de realizar la prueba con el reactivo de Salkowsky y este fue P16B16, del cual se observó una coloración rojo intenso.

8.8.4 Producción de biosurfactantes.

La tensión superficial (TS) y el índice de emulsificación (IE_{24}) son parámetros esenciales que reflejan indirectamente la producción de biosurfactantes. Es importante determinarlos ya que la reducción de la TS no asegura que una emulsificación sea estable. Como se indica en la sección de materiales y métodos, para el % IE_{24} se utilizó diesel como agente dispersante y la TS se evaluó mediante el método de Du nouy, esto se hizo para los sobrenadantes recuperados de 36 de los cultivos microbianos (Tabla 18). El 33.96% de los sobrenadantes obtenidos redujeron la TS por debajo de 51.33 mN/m (valor obtenido para el control negativo: medio MSM sin inocular). Los sobrenadantes de los aislados P15M16 y P14M19 tuvieron un valor de TS de 29.0 mN/m y 29.16 mN/m respectivamente; seguidos de los sobrenadantes de los aislados P15M5, P17M18, P15M19, P15M14, P17B6, P15B2, P14M14, P14M6, P14M16, P12M16, P17M14, P16M7, P15M7 y P15B14 con valores de TS de 29.91 mN/m, 30.01 mN/m, 30.58 mN/m, 31.11 mN/m, 32.18 mN/m, 32.25 mN/m, 32.30 mN/m, 33.16 mN/m, 36.70 mN/m, 38.25 mN/m, 40.16 mN/m, 41.41 mN/m, 43.23 mN/m y 48.15 mN/m respectivamente (Tabla 18). Los aislados P12B5, P14B5, P14B9, P14B17, P15B11, P16B1, P16B7, P16B8, P16B10, P16B18, P17B3, P17B4, P17B7, P17B8 y P12M22 no crecieron en MSM 2% glucosa por lo que fueron registrados como negativo (-) para la determinación de TS y % (IE_{24}) (Tabla 18).

El 32.07% de los 53 microorganismos analizados fueron positivos a la prueba (IE_{24}). El sobrenadante del cultivo P15M16 mostró el mayor IE_{24} (42.85%) y la menor TS (29 mN/m) bajo las condiciones ensayas. Los valores IE_{24} para los sobrenadantes de los aislados P14M9, P14M6, P15M5, P17M18, P17B6, P15M19, P14M19, P14M14, P15B2, P16B19, fueron 29.42%, 22.85%, 20%, 20%, 18%, 17.14%, 15.14%, 14.28%, 12.28%, 11.42% respectivamente, mientras que los sobrenadantes de los cuatro aislados P17B2, P13M6, P15M7 y P16M7 mostraron un IE_{24} de 5.71%. Los sobrenadantes P12M16 y P17M14

mostraron un IE₂₄ de 3.71%. El valor más bajo de IE (2.85) se detectó en el sobrenadante del aislado P13M7.

9. CONCLUSIONES

Se observó que hubo variedad de microorganismos en los puntos de mayor contaminación; el punto 17 fue considerado de gran importancia debido a que es uno de los que se encuentran más cercanos al área contaminada, pues de estos microorganismos se esperaba obtener la capacidad de contribuir a la eliminación o retención de metales pesados y producir sustancias bioactivas que puedan ayudar en futuros proyectos de interés biotecnológico.

Se obtuvo una gran variedad de microorganismos capaces de tolerar altas concentraciones de metales pesados; de éstos se observó que a las concentraciones de Pb de 500 a 800 mg L⁻¹ hubo más microorganismos tolerantes al metal, aunque a las concentraciones de 900 y 1000 mg.L⁻¹ aún se presentó tolerancia por 14 microorganismos que fueron descartados ya que su medición era imprecisa por la formación de pellets y precipitación del metal debido a cambios de pH realizados por éstos. Se demostró que los 11.32% para microorganismos productores de auxinas y 33.96% para microorganismos productores de biosurfactantes) microorganismos aislados del sitio contaminado con Pb producen los metabolitos secundarios auxinas y biosurfactantes. Los metabolitos donde se presentó más resultados de parte de los microorganismos fueron las fijadoras de N₂ y los productores de biosurfactantes. Los biosurfactantes fueron considerados de importancia ya que éstos han sido utilizados para remover metales pesados y podrían ser utilizados a futuro para analizar sus capacidades para remover distintos contaminantes; además, la utilización de microorganismos productores de algunos metabolitos secundarios de interés biotecnológicos con altas capacidades de tolerar el Pb podría ser una opción factible en procesos de bioaumentación ya que aseguraría una posible tolerancia y supervivencia para adaptarse a ambientes extremos como es en este caso la presencia del metal como contaminante.

La prueba realizada a los hongos para actividad biocida no arrojó algún resultado favorecedor y no pudieron analizar su resistencia al plomo debido a que no se encontró un medio de cultivo disponible que no se precipitara ante altas concentraciones de plomo.

10. REFERENCIAS

1. Acuña O., Peña W., Serrano E., Pocasangre L., Rosales F., Delgado E., Trejos J. y Segura A., (2006). La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos; pag. 224.
2. Ahumada I., Ascar L., Pedraza C., Vásquez V., Carrasco A., Richter P., y Brown S. (2011). Determination of the Bioavailable Fraction of Cu and Zn in Soils Amended with Biosolids as Determined by Diffusive Gradients in Thin Films (DGT), BCR Sequential Extraction, and Ryegrass Plant. *Water Air Soil Pollut.* 219: 225 - 237.
3. Ahumada I., Escudero P., Carrasco A., Castillo G., Ascar, L., y Fuentes, E.. (2004). Use of sequential extraction to asses the influence of sewage sludge amendment of metal mobility in Chilean soils. *J. Environmental Monitoring.* 5: 327-334.
4. Ahumada, I., Gudenschwager O., Carrasco M., Castillo G., Ascar L. y Richter P.,(2009). Copper and Zinc bioavailabilities to ryegrass (*Lolium perenne* L.) and subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) grown in biosólido treated Chilean soils. *J. Environ. Manage.* 90: 2665 – 2671.
5. Anaya A., (2003). *Ecología química*; 1era Edición; pag. 130.
6. Anaya A., Espinosa F., y Cruz R., (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*; Instituto de ecología UNAM, Plaza y Valdés, S.A. de C.V.; pág. 111.
7. Atlas de riesgos del municipio de Mexicali, (2011). Peligros Sanitarios, pág. 212.
8. Baquero J., Aristizábal D., Rendón W. y Salamanca C., (2001). Manejo conservacionista de los suelos arroeros de la Orinoquia colombiana; pág. 33.
9. Barea J. y Olivares J., (1998). Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: Jiménez Díaz, L.R. y R. Lamo de Espinosa (ed). *Agricultura Sostenible*. Editorial Mundi Prensa. Madrid; pág. 173-193.
10. Barkay T. y Schaefer J., (2001). Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current opinion in Microbiology* 4: 318-323
11. Barrera J., Hernández M. y Melgarejo L., (2011). Arazá, estudios ecofisiológicos en la amazonia colombiana; pág. 22.
12. Bautista F., (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados, pág. 22.
13. Benito R., Sáenz S., Vázquez J. y Fenoll A., (1986). Esquemas de identificación y biotipia de *Gardnerella vaginalis*; pág. 54-60.
14. Biswas M., (1993). Bacterial vaginosis; pág. 166-176.

15. Brown, G.E. (Jr.), Foster, A.L. y Ostergren, J.D., (1999). Mineral surfaces and Bioavailability of Heavy Metals: A Molecular-scale Perspective. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3388-3395.
16. Cando M., (2011). Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos; pág. 6
17. Caputo S., Papale M., Rizzo C., Giannarelli S., Conte A., Moscheo F., Graziano M., Aspholm P., Onor M., De Domenico E., Misericocchi S., Michaud L., Azzaro M. y Lo A., (2019). Metal resistance in Bacteria from Contaminated Arctic Sediment is Driven by Metal Local Inputs. Archives of Environmental Contamination and Toxicology; pág 1-17.
18. Cargua J., (2010). Determinación de las formas de Cd, Cu, Ni, Pb y Zn y su biodisponibilidad en suelos agrícolas del litoral ecuatoriano; pág. 27.
19. Carvajal A., Sánchez A. y Hurtarte G., (1995). Metronidazole during pregnancy; pag. 323-324
20. Castillo F., Dolóres M., Blasco R., Huertas M., Caballero F., Moreno C. y Martínez M., (2005). Biotecnología ambiental; pág. 381.
21. Cervantes C., Espono AE, Acevedo F., León IL., Rivera ME., Avila M., Wróbel K., Wróbel K., Gutiérrez JF., Rodríguez JS., y Moreno R., (2006). Interacciones microbianas con metales pesados; pág. 203.
22. Cooper D., y Goldenberg B., (1987). Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Applied and environmental microbiology*, 224-229.
23. Cortés A., y Mosqueda T., (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico; pág. 64-90.
24. Cotler, H., Zorrilla M., Dominguez, J., Quiñones L., Cortina, S. y Sotelo E., (2007). La conservación de suelos: un asunto de interés público. *Gaceta Ecológica*, abril-junio, 5-71.
25. De la Rosa N., Sánchez E. y Ortiz M., (2014). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. Vol. 5; pág. 47-56.
26. Dean W., (1974). Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: Comparison with other methods. *J. Sed. Petrol.* 44: 242-248.

27. Diez J., (2008). Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas. Universidad de Santiago de Compostela. Pág. 9-10.
28. Fassbender H., (1975). Química de suelos: con énfasis en suelos de América Latina; pág.1
29. Fernández P., (2011). Determinación de la fracción biodisponible de metales trazas (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) en suelos tratados con biosólidos por medio de métodos biosimuladores validados a través de ensayos con plantas de maravilla; pág. 15-16.
30. Forbes B., (2009). Diagnóstico Microbiológico. 12ª Edición. Pág. 22.
31. Fuentes C. y Román A., (1980). Los surfactantes: clases, propiedades y uso con herbicidas; pág. 16.
32. García C., Moreno J., Hernández Ma. T., Polo A., (2002). Metales pesados y sus implicaciones en la calidad del suelo. Pág. 133.
33. Glickmann E. y Dessaux Y., (1995), A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 61: 793-796.
34. Hao X., Safyih T., Xie P., Orbach M., Alwathnani H., Rensing C., y Wei G., (2013). Phytoremediation of heavy and transition metals aided by legume-rhizobia symbiosis; pag. 4-5.
35. Hayes S., White S., Thompson T., Maier R. y Chorover J., (2009). Changes in lead and zinc lability during weathering-induced acidification of desert mine tailings: coupling chemical and micro-scale analyses.
36. Henkel M., Geissler M., Weggenmann F. y Hausmann R., (2017). Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production; pp.1.
37. Hernández A., Alfaro I. y Arrieta R., (2003). *Microbiología Industrial*; pag. 7.
38. Jamali, M., Kazi, T., Arain, M., Afridi, H., Jalbani N., Memon A. y Shah, A. (2007). Heavy metals from soil and domestic sewage sludge and their transfer to Sorghum plants. *Environ. Chem. Lett.* 5:209-218.
39. Jiménez R., (2017). Introducción a la contaminación del suelo. Pág. 3.
40. Kabata A. (2000). Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton. USA. pag. 365, 413.

41. Kim S., Allen, H. y Cha, D., (2002). Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: effect of complexation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 275-280.
42. Kreiner I. (2002). Tecnologías para el tratamiento de residuos peligrosos. En: Cortinas, C. y C. Mosler (eds.). *Gestión de residuos peligrosos*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
43. Krishnamurti G. y Naidu R., (2000). Speciation and phytoavailability of cadmium in selected surface soils of South Australia. *Australian Journal of Soil Research* 38(5), 991-1004.
44. Lázár, O., Ramírez J. y Reyes J. (2006) La contaminación del suelo. En Jorge Ramírez Hernández. (2006). *Una visión de la problemática ambiental de Mexicali y su valle* (pág.93-136). Mexicali, Baja California: Universidad Autónoma de Baja California.
45. Lemos A., Hernández C. y Noguera B., (1999). *Microbiología; Asociación Mexicana de Microbiología*; pág. 21.
46. Lussier S., Boothman W., Poucher S., Champlin D. y Helmstetten A., (1999). Comparison of Dissolved and Total Metals Concentrations from Acute Tests with Saltwater Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 : 889-898.
47. Manson R. y Lawrence A., (1999). Concentration, Distribution, and Bioavailability of Mercury and Methylmercury in Sediments of Baltimore Harbor and Chesapeake Bay, Maryland, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 : 2438-2447.
48. Meza L., Quintero M. y Valdez B., (2013). Metales pesados en sedimentos de caminos urbanos de la ciudad de Mexicali, México. *Rev. Int. Contam. Ambient* vol.30 no.1 México feb. 2014.
49. Montaña N., Sandoval A., Camargo S. y Sánchez J., (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes; pág.16
50. Nautiyal, C., (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265–270.
51. Neu T., (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev* 60:151-166.n
52. Ninfa D., Serrano J. y Sandoval H., (2004). *Microorganismos extremófilos: Actinomicetos halófilos en México*; Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Dpto. de sistemas biológicos, Grupo de Investigaciones de actinomicetos patógenos humanos y del suelo. Dpto. de Fisiología Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela; pág. 57-67.

53. Parés R. y Juárez A., (2002). Bioquímica de los microorganismos; pág. 324-330.
54. Pepper I., Gerba C., Gentry T., Rich V. y Maier R., (2009). Environmental Microbiology; pag. 123, 350, 421, 422, 429
55. Prieto J., González C., Román A. y Prieto F., (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*; pág. 35.
56. PROFEPA, (1998). Informe Triannual 1995-1997. Procuraduría Federal de protección al Ambiente, pág. 115-118.
57. Qi X., Xu X., Zhong C., Jiang T., Wei W. y Song X., (2018). Removal of cadmium and Lead from Contaminated soils using Sophorolipids from Fermentation Culture of *Starmerella bombicola* CGMCC 1576 Fermentation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Pag. 2.
58. Rahman Z. y Singh V., (2016). Assessment of heavy metal contamination and Hg-resistant bacteria in surface water from different regions of Delhi, India. *Saudi Journal of biological Sciences* (2018) 25, 1687-1695.
59. Rodríguez F., Roldán M., Blasco R., Huertas M., Caballero F., Moreno C. y Martínez M., (2005). *Biología Ambiental*; pág. 226-227.
60. Rodríguez O., García A. y Rodríguez R., (2006). Los residuos minero-metalúrgicos en el medio ambiente. España: Instituto geológico y minero de España. Serie Medio ambiente N° 11.
61. Sachdev, D. y Cameotra, S., (2013). Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1005–1016.
62. Silva R., Almeida D., Rufino R., Luna J., Santos V. y Sarubbo A., (2014). Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills; *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 12523-12542; doi:10.3390/ijms150712523
63. Silver S., Phung L., (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*; pag. 587-605.
64. Tomer S., Suy D., Shukla A., Rajwar J., Yadav A., Shouche Y., y Goel R., (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from western Indian Himalayan soils; pag. 1.
65. Torsvik V., y Øvreås L., (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems; pag. 240-245.
66. Tortora G., Funke B. y Case C., (2007). *Introducción a la microbiología*; 9na Edición; pág. 815.

67. Valdivia M., (2005). Intoxicación por plomo. Rev. Soc. Per. Med. Inter. 18(1) 2005; pág. 22-25.
68. Valtueña J., (2002). Enciclopedia de la ecología y la salud; pág. 28
69. Vázquez R. y Vázquez R., (2016). Temas selectos de biología; pág. 67.
70. Volke T., Velasco J. y De la Rosa D., (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Pág. 93-94.
71. Volke T., y Velasco J., (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT); pp. 22; Recuperado de: <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/372.pdf>
72. Vullo D., (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente.
73. Xu J., Kloepper J., Huang P., McInroy J. y Hu C., (2018). Isolation and characterization of N₂-fixing bacteria from giant reed and switchgrass for plant growth promotion and nutrient uptake; pag. 2.
74. Yuan Z., Yi H., Wang T., Zhang Y., Zhu X. y Yao J., (2017). Application of phosphate solubilizing bacteria in immobilization of Pb and Cd in soil. Environmental Science and Pollution Research, 24(27), 212877-21884.

ANEXOS

Pruebas de t student para la comparación de crecimiento de microorganismos a diferentes concentraciones de Pb y sin Pb.

P12B1									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.9062	C1= 0.0073	C1= 0.0043	0.2680	0.2279	28.75	0.001	2	*
	C2= 8.6383	C2= 0.0144	C2= 0.0083		0.3081				
600	C1= 9.0791	C1= 0.0042	C1= 0.0025	0.5157	0.3454	1303	0.006	2	*
	C2= 8.5635	C2= 0.0684	C2= 0.0390		0.6859				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P12B4									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.2752	C1= 0.0135	C1= 0.0078	-0.0300	-0.0665	-2.61	0.079	3	N. S
	C2= 9.3052	C2= 0.0145	C2= 0.0084		0.0665				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14B5									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 8.9873	C1= 0.0299	C1= 0.0170	0.3558	0.2787	19.87	0.003	2	*
	C2= 8.6315	C2= 0.0082	C2= 0.0048		0.4328				
600	C1= 9.0335	C1= 0.0122	C1= 0.0070	0.2242	0.1906	28.71	0.001	2	*
	C2= 8.8092	C2= 0.0059	C2= 0.0034		0.0034				
700	C1= 8.9658	C1= 0.0072	C1= 0.0042	0.3580	0.2764	18.86	0.003	2	*
	C2= 8.6079	C2= 0.0321	C2= 0.0190		0.4397				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14B9									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.5905	C1= 0.0017	C1= 0.0010	-0.0474	-0.0612	-14.78	0.005	2	*
	C2= 9.6379	C2= 0.0052	C2= 0.0030		-0.0336				
600	C1= 9.6333	C1= 0.0034	C1= 0.0020	-0.0176	-0.0383	-3.65	0.067	2	N. S
	C2= 9.6509	C2= 0.0076	C2= 0.0044		0.0031				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14B13									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.6016	C1= 0.0009	C1= 0.0005	-0.0468	-0.0542	-27.45	0.001	2	*
	C2= 9.6485	C2= 0.0027	C2= 0.0016		-0.0395				
600	C1= 9.6232	C1= 0.0014	C1= 0.0008	-0.0042	-0.0168	-1.46	0.282	2	N. S
	C2= 9.6275	C2= 0.0048	C2= 0.0048		0.0083				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14B17									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.0937	C1= 0.0059	C1= 0.0035	0.4188	0.3797	46.07	0.000	2	*
	C2= 8.6749	C2= 0.0146	C2= 0.0084		0.4579				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P15B2									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3774	C1= 0.0039	C1= 0.0023	-0.0308	-0.0600	-4.56	0.045	2	*

	C2= 9.4083	C2= 0.0111	C2= 0.0064		-0.0017				
600	C1= 9.3043	C1= 0.0083	C1= 0.0048	-0.0396	-0.0884	-3.49	0.073	2	N. S
	C2= 9.3439	C2= 0.0178	C2= 0.0100		0.0092				
700	C1= 9.1378	C1= 0.0102	C1= 0.0059	-0.1461	-0.1692	-20.16	0.000	3	*
	C2= 9.2839	C2= 0.0073	C2= 0.0042		-0.1231				
800	C1= 9.3703	C1= 0.0060	C1= 0.0035	0.1228	0.0997	16.93	0.000	3	*
	C2= 9.2475	C2= 0.0110	C2= 0.0064		0.1459				
900	C1= 9.2420	C1= 0.0011	C1= 0.0006	-0.0357	-0.0716	-4.27	0.051	2	N. S
	C2= 9.2778	C2= 0.0144	C2= 0.0083		0.0002				
1000	C1= 9.2420	C1= 0.0011	C1= 0.0006	-0.2126	-0.2428	-30.29	0.001	2	*
	C2= 9.4547	C2= 0.0121	C2= 0.0070		-0.1824				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P15B12									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.0467	C1= 0.0127	C1= 0.0073	0.0118	-0.0198	1.61	0.249	2	N. S
	C2= 9.0348	C2= 0.0009	C2= 0.0005		0.0434				
600	C1= 8.9790	C1= 0.0144	C1= 0.0083	0.4088	0.3042	16.81	0.004	2	*
	C2= 8.5701	C2= 0.0396	C2= 0.0230		0.5135				

P15B14									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.4437	C1= 0.0028	C1= 0.0016	0.0799	0.0559	14.36	0.005	2	*
	C2= 9.3637	C2= 0.0092	C2= 0.0053		0.1038				
600	C1= 9.4549	C1= 0.0016	C1= 0.0009	0.1665	0.1410	28.10	0.001	2	*
	C2= 9.2884	C2= 0.0101	C2= 0.0058		0.1920				
700	C1= 9.3039	C1= 0.0032	C1= 0.0019	0.3246	0.2948	46.74	0.000	2	*
	C2= 8.9792	C2= 0.0116	C2= 0.0067		0.3545				
800	C1= 9.6579	C1= 0.0003	C1= 0.0001	0.0721	0.0617	29.92	0.001	2	*
	C2= 9.5858	C2= 0.0041	C2= 0.0024		0.0825				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P16B1									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.5701	C1= 0.0064	C1= 0.0037	-0.0041	-0.0250	-0.62	0.577	3	N. S
	C2= 9.5742	C2= 0.0093	C2= 0.0054		0.0168				
600	C1= 9.5708	C1= 0.0011	C1= 0.0006	0.7797	0.7201	56.31	0.000	2	*
	C2= 9.7912	C2= 0.0240	C2= 0.0140		0.8393				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P16B7									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.4892	C1= 0.0103	C1= 0.0060	0.0418	0.0151	6.73	0.021	2	*
	C2= 9.4472	C2= 0.0031	C2= 0.0018		0.0686				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P16B8									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.5711	C1= 0.0073	C1= 0.0042	1.5210	1.3615	41.02	0.001	2	*
	C2= 8.0501	C2= 0.0638	C2= 0.0370		1.6806				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P16B14									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.5669	C1= 0.0028	C1= 0.0016	0.4850	0.4756	164.09	0.000	3	*

	C2= 9.1118	C2= 0.0042	C2= 0.0025		0.4945				
600	C1= 8.7194	C1= 0.0028	C1= 0.0016	0.0889	0.0542	11.03	0.008	2	*
	C2= 8.6306	C2= 0.0137	C2= 0.0079		0.1236				
700	C1= 9.1223	C1= 0.0040	C1= 0.0023	0.6332	0.5750	46.82	0.000	2	*
	C2= 8.4891	C2= 0.0231	C2= 0.0130		0.6914				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P16B16									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.5128	C1= 0.0022	C1= 0.0013	0.7151	0.5881	24.23	0.002	2	*
	C2= 8.7978	C2= 0.0511	C2= 0.0290		0.8421				
600	C1= 8.6645	C1= 0.0051	C1= 0.0030	0.0370	0.0013	4.47	0.047	2	*
	C2= 8.6306	C2= 0.0134	C2= 0.0077		0.0726				
700	C1= 9.1440	C1= 0.1120	C1= 0.0650	0.1436	-0.1345	2.22	0.156	2	N. S
	C2= 9.0001	C2= 0.0049	C2= 0.0029		0.4216				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P17B2									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.6269	C1= 0.0080	C1= 0.0047	0.4520	0.4300	88.15	0.000	2	*
	C2= 9.1748	C2= 0.0037	C2= 0.0022		0.4741				
600	C1= 9.5450	C1= 0.0009	C1= 0.0005	0.8906	0.8163	51.60	0.000	2	*
	C2= 8.6545	C2= 0.0299	C2= 0.0170		0.9648				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P17B3									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 8.6641	C1= 0.0043	C1= 0.0025	-0.1497	-0.1866	-17.49	0.003	2	*
	C2= 8.8139	C2= 0.0142	C2= 0.0082		-0.1129				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P17B6									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3332	C1= 0.0042	C1= 0.0025	0.1152	0.1005	24.99	0.000	3	*

	C2= 9.2180	C2= 0.0067	C2= 0.0039		0.1298				
600	C1= 9.2179	C1= 0.0136	C1= 0.0079	-0.0334	-0.0748	-2.57	0.083	3	N. S
	C2= 9.2513	C2= 0.0180	C2= 0.0100		0.0080				
700	C1= 9.4800	C1= 0.0024	C1= 0.0014	0.1219	0.1051	31.24	0.001	2	*
	C2= 9.3580	C2= 0.0063	C2= 0.0036		0.1387				
800	C1= 9.5362	C1= 0.0017	C1= 0.0010	0.3345	0.3302	246.31	0.000	3	*
	C2= 9.2017	C2= 0.0015	C2= 0.0009		0.3388				
900	C1= 9.4617	C1= 0.0028	C1= 0.0016	0.1492	0.1313	35.88	0.001	2	*
	C2= 9.3124	C2= 0.0066	C2= 0.0038		0.1671				
1000	C1= 9.4617	C1= 0.0028	C1= 0.0016	0.0438	0.0103	5.63	0.030	2	*
	C2= 9.4179	C2= 0.0132	C2= 0.0076		0.0773				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P17B7									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 8.6692	C1= 0.0070	C1= 0.0040	0.0035	-0.1051	0.14	0.902	2	N. S
	C2= 8.6657	C2= 0.0432	C2= 0.0250		0.1122				
600	C1= 9.0400	C1= 0.0073	C1= 0.0042	0.3034	0.2466	23	0.002	2	*
	C2= 8.7367	C2= 0.0216	C2= 0.0120		0.3602				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa
 N. S= No diferencia significativa
 IC= Intervalo de confianza

P12M11									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.1671	C1= 0.0063	C1= 0.0037	0.1252	0.0736	10.44	0.009	2	*
	C2= 9.0420	C2= 0.0198	C2= 0.0110		0.1768				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb
 C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb
 [Pb]= Concentración de plomo
 GL= Grados de libertad
 *= diferencia significativa
 N. S= No diferencia significativa
 IC= Intervalo de confianza

P12M16									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3130	C1= 0.0043	C1= 0.0025	-0.0217	-0.0575	-2.62	0.120	2	N. S
	C2= 9.3348	C2= 0.0137	C2= 0.0079		0.0140				
600	C1= 9.2172	C1= 0.0092	C1= 0.0053	0.1160	0.0632	9.46	0.011	2	*
	C2= 9.1013	C2= 0.0191	C2= 0.0110		0.1687				
700	C1= 9.4593	C1= 0.0022	C1= 0.0013	0.1009	0.0732	15.65	0.004	2	*
	C2= 9.3584	C2= 0.0109	C2= 0.0063		0.1287				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb
 C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb
 [Pb]= Concentración de plomo
 GL= Grados de libertad
 *= diferencia significativa
 N. S= No diferencia significativa
 IC= Intervalo de confianza

P13M6									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.5982	C1= 0.0009	C1= 0.0005	0.3197	0.2985	64.92	0.000	2	*
	C2= 9.2785	C2= 0.0084	C2= 0.0049		0.3409				
600	C1= 9.4401	C1= 0.0042	C1= 0.0025	0.1262	0.1144	46.29	0.000	2	*
	C2= 9.3139	C2= 0.0020	C2= 0.0012		0.1379				
700	C1= 9.6631	C1= 0.0006	C1= 0.0003	0.2653	0.2563	126.92	0.000	2	*
	C2= 9.3977	C2= 0.0035	C2= 0.0021		0.2743				
800	C1= 9.6235	C1= 0.00007	C1= 0.00004	0.1399	0.1298	59.75	0.000	2	*
	C2= 9.4836	C2= 0.0040	C2= 0.0023		0.1499				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P13M7									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.5633	C1= 0.0003	C1= 0.0001	0.2821	0.2477	35.33	0.001	2	*
	C2= 9.2812	C2= 0.0138	C2= 0.0080		0.3164				
600	C1= 9.5235	C1= 0.0040	C1= 0.0024	0.3318	0.3213	135.67	0.000	2	*
	C2= 9.1916	C2= 0.0011	C2= 0.0006		0.3424				
700	C1= 9.6718	C1= 0.0024	C1= 0.0014	0.4302	0.3936	50.46	0.000	2	*
	C2= 9.2415	C2= 0.0146	C2= 0.0084		0.4669				

800	C1= 9.6815	C1= 0.0013	C1= 0.0007	0.3880	0.3849	399.14	0.000	3	*
	C2= 9.2934	C2= 0.0009	C2= 0.0005		0.3911				
900	C1= 9.7073	C1= 0.0014	C1= 0.0008	0.2825	0.2596	53.11	0.000	2	*
	C2= 9.4247	C2= 0.0091	C2= 0.0053		0.3054				
1000	C1= 9.7073	C1= 0.0014	C1= 0.0008	0.1792	0.1631	47.85	0.000	2	*
	C2= 9.5281	C2= 0.0063	C2= 0.0037		0.1953				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14M6									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3673	C1= 0.0028	C1= 0.0016	0.0240	0.0077	6.35	0.024	2	*
	C2= 9.3432	C2= 0.0059	C2= 0.0034		0.0403				
600	C1= 9.2456	C1= 0.0016	C1= 0.0009	0.0804	0.0710	36.87	0.001	2	*
	C2= 9.1651	C2= 0.0033	C2= 0.0020		0.0898				
700	C1= 9.4572	C1= 0.0017	C1= 0.0010	0.2766	0.2194	20.82	0.002	2	*
	C2= 9.1807	C2= 0.0229	C2= 0.0130		0.3337				
800	C1= 9.5099	C1= 0.0005	C1= 0.0003	0.0484	0.0398	24.37	0.002	2	*
	C2= 9.4615	C2= 0.0034	C2= 0.0020		0.0569				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14M9									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.4303	C1= 0.0054	C1= 0.0032	0.0323	0.0179	7.14	0.006	3	*
	C2= 9.3980	C2= 0.0056	C2= 0.0032		0.0467				
600	C1= 9.3899	C1= 0.0051	C1= 0.0029	0.2692	0.2015	17.11	0.003	2	*
	C2= 9.1207	C2= 0.0268	C2= 0.0150		0.3369				
700	C1= 9.5231	C1= 0.0013	C1= 0.0007	0.2770	0.2438	35.82	0.001	2	*
	C2= 9.2460	C2= 0.0133	C2= 0.0077		0.3103				
800	C1= 9.4654	C1= 0.0004	C1= 0.0002	-0.01493	-0.0842	-6.09	0.026	2	*
	C2= 9.5148	C2= 0.0140	C2= 0.0081		-0.0144				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14M14									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3200	C1= 0.0038	C1= 0.0022	-0.0723	-0.0946	-14	0.005	2	*
	C2= 9.3924	C2= 0.0080	C2= 0.0047		-0.0501				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14M16									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3164	C1= 0.0025	C1= 0.0015	0.0650	0.0309	8.21	0.014	2	*
	C2= 9.2515	C2= 0.0135	C2= 0.0078		0.0990				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P14M19									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.2292	C1= 0.0053	C1= 0.0031	0.1109	0.0970	34.23	0.001	2	*
	C2= 9.1183	C2= 0.0018	C2= 0.0010		0.1248				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P15M5									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3486	C1= 0.0032	C1= 0.0019	0.0547	0.0360	12.64	0.006	2	*

	C2= 9.2939	C2= 0.0067	C2= 0.0039		0.0733				
600	C1= 9.2520	C1= 0.0025	C1= 0.0015	-0.0905	-0.1152	-15.76	0.004	2	*
	C2= 9.3426	C2= 0.0096	C2= 0.0056		-0.0658				
700	C1= 9.4038	C1= 0.0017	C1= 0.0010	0.0810	0.0641	20.58	0.002	2	*
	C2= 9.3228	C2= 0.0065	C2= 0.0038		0.0980				
800	C1= 9.4849	C1= 0.0035	C1= 0.0021	-0.0198	-0.0287	-9.59	0.011	2	*
	C2= 9.5048	C2= 0.0003	C2= 0.0002		-0.0109				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P15M7									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.5654	C1= 0.0024	C1= 0.0014	0.2477	0.2313	64.98	0.000	2	*
	C2= 9.3177	C2= 0.0061	C2= 0.0035		0.2641				
600	C1= 9.5882	C1= 0.0009	C1= 0.0005	0.1738	0.1615	60.76	0.000	2	*
	C2= 9.4144	C2= 0.0048	C2= 0.0028		0.1861				
700	C1= 9.5816	C1= 0.0010	C1= 0.0006	0.2748	0.2529	53.89	0.000	2	*
	C2= 9.3067	C2= 0.0087	C2= 0.0051		0.2668				
800	C1= 9.6221	C1= 0.0024	C1= 0.0014	0.1133	0.0768	13.36	0.006	2	*
	C2= 9.5088	C2= 0.0145	C2= 0.0084		0.1498				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P15M14									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3076	C1= 0.0021	C1= 0.0012	0.0249	-0.0014	4.06	0.056	2	N. S
	C2= 9.2827	C2= 0.0104	C2= 0.0060		0.0514				
600	C1= 9.4031	C1= 0.0024	C1= 0.0014	0.7569	0.6056	21.53	0.002	2	*
	C2= 8.6462	C2= 0.0608	C2= 0.0350		0.9082				
700	C1= 9.5264	C1= 0.0008	C1= 0.0005	0.1204	0.1143	84.30	0.000	2	*
	C2= 9.4059	C2= 0.0023	C2= 0.0013		0.1266				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P15M16									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3264	C1= 0.0051	C1= 0.0030	0.1803	0.1619	31.30	0.000	3	*
	C2= 9.1461	C2= 0.0085	C2= 0.0049		0.1986				
600	C1= 9.2695	C1= 0.0039	C1= 0.0023	0.8317	0.5039	10.92	0.008	2	*
	C2= 8.4380	C2= 0.1320	C2= 0.0760		1.1595				
700	C1= 9.5160	C1= 0.0017	C1= 0.0010	0.1595	0.1531	78.74	0.000	3	*
	C2= 9.3564	C2= 0.0030	C2= 0.0017		0.1660				

800	C1= 9.5678	C1= 0.0015	C1= 0.0009	0.0577	0.0246	7.50	0.017	2	*
	C2= 9.5101	C2= 0.0132	C2= 0.0076		0.0909				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P15M19									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.4937	C1= 0.0019	C1= 0.0011	0.1007	0.0774	18.58	0.003	2	*
	C2= 9.3929	C2= 0.0091	C2= 0.0053		0.1241				
600	C1= 9.4626	C1= 0.0031	C1= 0.0018	0.1551	0.1192	18.58	0.003	2	*
	C2= 9.3075	C2= 0.0141	C2= 0.0081		0.1910				
700	C1= 9.5488	C1= 0.0034	C1= 0.0020	0.0460	0.0373	22.63	0.002	2	*
	C2= 9.5027	C2= 0.0005	C2= 0.0003		0.0548				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P15M21									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3130	C1= 0.0030	C1= 0.0018	-0.0181	-0.0364	-4.27	0.051	2	N. S

	C2= 9.3312	C2= 0.0066	C2= 0.0039		0.0001				
600	C1= 9.4155	C1= 0.0045	C1= 0.0026	0.2368	0.1915	22.53	0.002	2	*
	C2= 9.1788	C2= 0.0176	C2= 0.0100		0.2820				
700	C1= 9.5409	C1= 0.0052	C1= 0.0030	0.0363	0.0249	10.18	0.002	3	*
	C2= 9.5045	C2= 0.0032	C2= 0.0019		0.0477				
800	C1= 9.5288	C1= 0.0009	C1= 0.0005	0.0876	0.0763	33.33	0.001	2	*
	C2= 9.4412	C2= 0.0044	C2= 0.0026		0.0989				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P16M7									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.2830	C1= 0.0081	C1= 0.0047	-0.0481	-0.0675	-7.89	0.004	3	*
	C2= 9.3312	C2= 0.0066	C2= 0.0039		-0.0287				
600	C1= 9.1255	C1= 0.0213	C1= 0.0120	-0.2133	-0.2680	-16.76	0.004	2	*
	C2= 9.3387	C2= 0.0056	C2= 0.0033		-0.1585				
700	C1= 9.5008	C1= 0.0018	C1= 0.0011	0.1412	0.1111	20.18	0.002	2	*
	C2= 9.3596	C2= 0.0120	C2= 0.0069		0.1713				
800	C1= 9.5443	C1= 0.0068	C1= 0.0039	0.4277	0.3290	18.64	0.003	2	*
	C2= 9.1167	C2= 0.0392	C2= 0.0230		0.5265				
900	C1= 9.5328	C1= 0.0042	C1= 0.0025	-0.0162	-0.0255	-5.57	0.011	3	*

	C2= 9.5490	C2= 0.0027	C2= 0.0016		-0.0069				
1000	C1= 9.5328	C1= 0.0042	C1= 0.0025	0.0421	0.0047	4.85	0.040	2	*
	C2= 9.4907	C2= 0.0144	C2= 0.0083		0.0795				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P16M10									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.4134	C1= 0.0040	C1= 0.0024	-0.0760	-0.1649	-3.68	0.067	2	N. S
	C2= 9.4895	C2= 0.0356	C2= 0.0210		0.0129				
600	C1= 9.4441	C1= 0.0047	C1= 0.0028	0.1291	0.1153	29.87	0.000	3	*
	C2= 9.3150	C2= 0.0057	C2= 0.0033		0.1428				
700	C1= 9.5457	C1= 0.0025	C1= 0.0015	0.0278	-0.0079	3.35	0.079	2	N. S
	C2= 9.5178	C2= 0.0142	C2= 0.0082		0.0636				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P16M21									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia

500	C1= 9.4215	C1= 0.0019	C1= 0.0011	0.1393	0.1114	21.47	0.002	2	*
	C2= 9.2822	C2= 0.0111	C2= 0.0064		0.1672				
600	C1= 9.4104	C1= 0.0006	C1= 0.0003	0.0854	0.0737	31.40	0.001	2	*
	C2= 9.3249	C2= 0.0046	C2= 0.0027		0.0971				
700	C1= 9.3611	C1= 0.0006	C1= 0.0003	-0.0751	-0.1023	-11.91	0.007	2	*
	C2= 9.4363	C2= 0.0109	C2= 0.0063		-0.0480				
800	C1= 9.4891	C1= 0.0010	C1= 0.0006	-0.0660	-0.0759	-28.59	0.001	2	*
	C2= 9.5552	C2= 0.0038	C2= 0.0022		-0.0561				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P17M14									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.3210	C1= 0.0109	C1= 0.0063	0.1460	0.1183	22.68	0.002	2	*
	C2= 9.1749	C2= 0.0024	C2= 0.0014		0.1337				
600	C1= 9.4216	C1= 0.0047	C1= 0.0028	0.2011	0.1046	8.96	0.012	2	*
	C2= 9.2206	C2= 0.0386	C2= 0.0220		0.2976				
700	C1= 9.4491	C1= 0.0028	C1= 0.0016	0.0466	0.0397	21.62	0.000	3	*
	C2= 9.4024	C2= 0.0024	C2= 0.0014		0.0534				
800	C1= 9.6076	C1= 0.0025	C1= 0.0015	0.0832	0.0262	6.29	0.024	2	*
	C2= 9.5245	C2= 0.0228	C2= 0.0130		0.1401				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

P17M18									
[Pb]	Media	Desviación estándar	Media del error estándar	Diferencia C1-C2	IC 95% para la diferencia	Valor de T	Valor de P	GL	Significancia
500	C1= 9.4505	C1= 0.0080	C1= 0.0046	0.6281	0.5777	53.72	0.000	2	*
	C2= 8.8225	C2= 0.0186	C2= 0.0110		0.6784				
600	C1= 9.3578	C1= 0.0016	C1= 0.0009	0.6044	0.5626	62.23	0.000	2	*
	C2= 8.7534	C2= 0.0167	C2= 0.0097		0.6462				
700	C1= 9.4198	C1= 0.0055	C1= 0.0032	0.0642	0.0511	15.58	0.001	3	*
	C2= 9.3556	C2= 0.0044	C2= 0.0026		0.0773				
800	C1= 9.5673	C1= 0.0013	C1= 0.0007	0.1684	0.1638	116.06	0.000	3	*
	C2= 9.3989	C2= 0.0021	C2= 0.0012		0.1731				

C1= UFC de microorganismos crecidos sin Pb

C2= UFC de microorganismos crecidos con Pb

[Pb]= Concentración de plomo

GL= Grados de libertad

*= diferencia significativa

N. S= No diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza