



# UAGro

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

---

### FACULTAD DE ECOLOGÍA MARINA NODO RECURSOS HÍDRICOS

## MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y ECOLOGÍA

### TESIS

Inmovilización de metales tóxicos en jales mineros a través de la precipitación de carbonatos por bacterias ureolíticas

Que para obtener el grado de Maestro en Recursos Naturales y Ecología

**PRESENTA**

**Q.B.P. Gustavo Cuaxinque Flores**

**Director: Dr. Oscar Talavera Mendoza**

**Co-director: M en B. José Luis Aguirre Noyola**

#### **Comité tutorial**

**Dr. Giovanni Hernández Flores**

**Dr. Sergio. A. Salgado Souto**

**Dra. Yanet Romero Ramírez**

**Dra. Esperanza Martínez-Romero**

**Esta investigación fue realizada en:**



**Laboratorio de Geoquímica y Difracción de Rayos X (UAGro)**



**Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido y  
Microanálisis (UAGro)**



**Centro de Ciencias Genómicas**

**Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias  
Genómicas (CCG-UNAM)**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para realizar este proyecto de investigación, con el número de CVU 858688 adscrito al programa de Maestría en Recursos Naturales y Ecología de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro).

Al Conacyt-fondos mixtos por el apoyo económico para realizar una estancia de investigación en el Programa de Ecología Genómica (CCG-UNAM), a cargo de la Dra. Esperanza Martínez-Romero.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	i
RESUMEN GRÁFICO .....	1
RESUMEN .....	2
IDEAS PRINCIPALES .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	4
2. OBJETIVOS .....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
3.1 Sitio de estudio y muestreo .....	7
3.2 Aislamiento y selección de las bacterias ureolíticas .....	7
3.3 Identificación molecular y análisis del gen <i>ureC</i> de las bacterias ureolíticas .....	8
3.4 Perfiles de resistencia a metales y producción de metalóforos y arsenóforos .....	9
3.5 Cinética de crecimiento y evaluación de la actividad ureasa .....	9
3.6 Precipitación de carbonatos metálicos por <i>S. luteola</i> UB3 y UB5 .....	10
3.7 Análisis de los carbonatos metálicos por SEM-EDX y XRD .....	10
3.8 Diseño de los microcosmos de jales mineros .....	11
3.9 Análisis estadístico .....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	12
4.1 Selección y asignación taxonómica de las bacterias ureolíticas .....	12
4.2 Perfiles de metaloresistencia y producción de metalóforos y arsenóforos .....	14
4.3 Efecto de la urea en el crecimiento de <i>S. luteola</i> UB3 y UB5 .....	16
4.4 Análisis molecular del gen <i>ureC</i> y caracterización de la actividad ureasa .....	17
4.5 Identificación de las fases polimórficas de CaCO <sub>3</sub> .....	19
4.6 Caracterización de carbonatos metálicos .....	21
4.7 Alcalinización y producción de carbonatos en microcosmos de jales mineros .....	23
4.8 Mineralogía de los microcosmos de jales mineros .....	24
5. CONCLUSIONES .....	29
6. PERSPECTIVAS .....	30
7. REFERENCIAS .....	31
ANEXOS .....	37

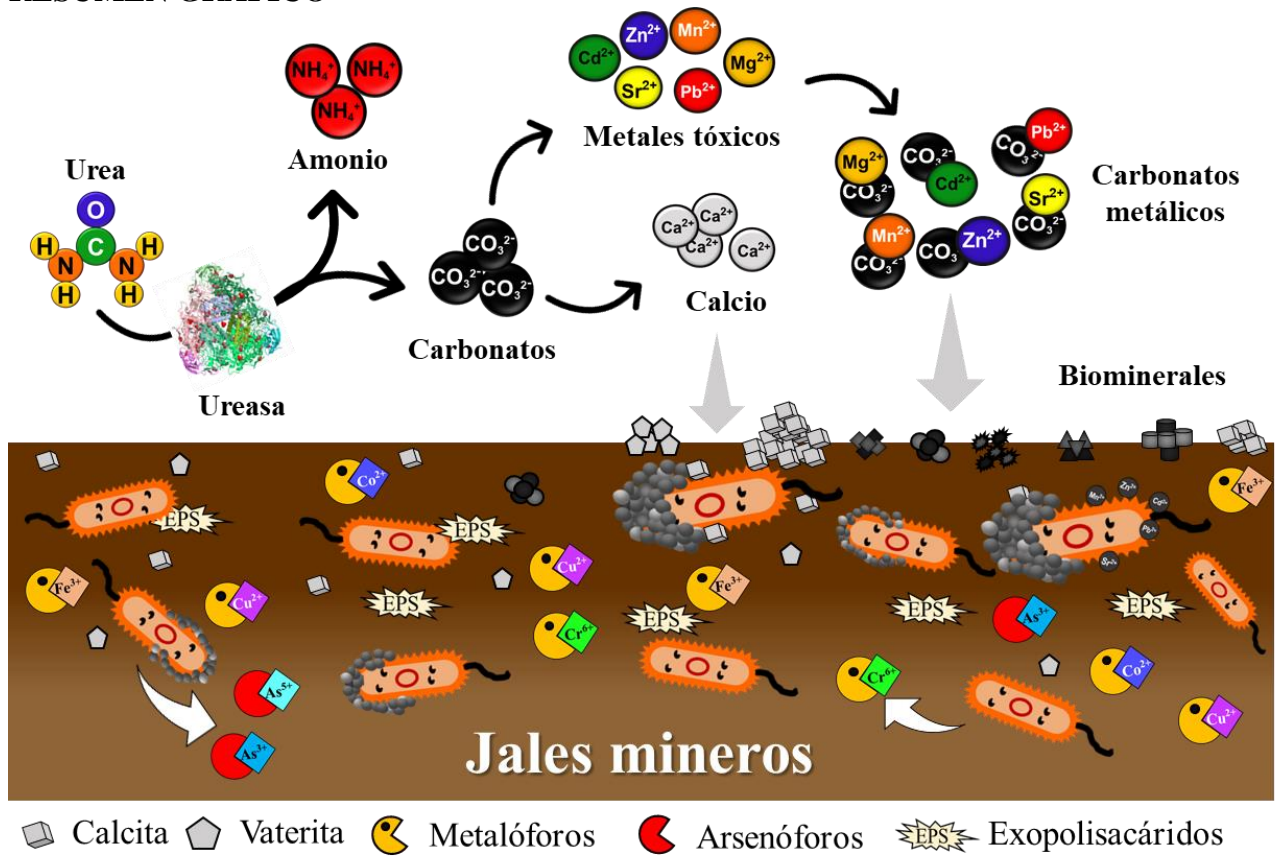
## ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Filogenia del gen *16S rRNA* de las cepas UB3 y UB5.
- Fig. 2.** Precipitación y análisis del  $\text{CaCO}_3$  por SEM-EDX y XRD de las cepas UB3 y UB5.
- Fig. 3.** Perfil de metaloresistencia de *Sporosarcina* spp incluyendo *S. luteola* UB3 y UB5.
- Fig. 4.** Producción de metalóforos y arsenóforos por *S. luteola* UB3 y UB5.
- Fig. 5.** Cinética de crecimiento y alcalinización del medio NBU por *S. luteola* UB3 y UB5.
- Fig. 6.** Filogenia por máxima verosimilitud del gen *ureC* de *S. luteola* UB3 y UB5.
- Fig. 7.** Actividad ureasa de *S. luteola* UB3, UB5 y el cultivo mixto UB3-UB5 en medio NBU.
- Fig. 8.** Precipitación de  $\text{CaCO}_3$  y análisis por SEM y XRD.
- Fig. 9.** Patrones de XRD de los carbonatos metálicos formados por *S. luteola* UB3 y UB5.
- Fig. 10.** Micrografías por SEM de los minerales formados por *S. luteola* UB3 y UB5.
- Fig. 11.** Valores de pH y concentración de carbonatos en los microcosmos de jales mineros
- Fig. 12.** Análisis mineralógico de los microcosmos de jales alcalinos y jales ácidos.
- Fig. 13.** Biocementación de los microcosmos de jales mineros alcalinos y ácidos.

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla. 1.** Tratamientos aplicados a los microcosmos de jales mineros

# RESUMEN GRÁFICO



## RESUMEN

La liberación de metales tóxicos por la minería es uno de los problemas de mayor trascendencia ambiental, provocando efectos graves en la salud humana. La precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente (MICP, por sus siglas en inglés) ha sido utilizada para inmovilizar metales en suelo y agua. En este estudio dos cepas bacterianas ureolíticas, UB3 y UB5, fueron aisladas del horizonte alcalino de los jales mineros “La Concha” y se evaluó su capacidad en la precipitación de carbonatos metálicos. La filogenia del gen *16S rRNA* identifica a ambas cepas como *Sporosarcina luteola*. Estas cepas presentan una elevada actividad ureasa, confirmada mediante ensayos enzimáticos y también presentan el gen *ureC* (urease subunit alpha). Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) y difracción de rayos X (XRD) determinamos que estas cepas pueden precipitar  $\text{CaCO}_3$  como calcita y vaterita, así como, rodocrosita ( $\text{MnCO}_3$ ), cerusita ( $\text{PbCO}_3$ ), otavita ( $\text{CdCO}_3$ ), estroncianita ( $\text{SrCO}_3$ ), witherita ( $\text{BaCO}_3$ ), hidrocincita ( $\text{Zn}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6$ ), hidromagnesita ( $\text{Mg}(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y calcita magnésica ( $(\text{Ca},\text{Mg})\text{CO}_3$ ) en condiciones *in vitro*. Adicionalmente, la inoculación *in situ* del cultivo mixto con *S. luteola* UB3-UB5 sobre los microcosmos de jales mineros alcalinos y ácidos, aumenta el pH e induce la formación de calcita, vaterita y smithsonita ( $\text{ZnCO}_3$ ). Estos resultados sugieren que la MICP por *S. luteola* podría utilizarse en jales mineros para inmovilizar metales tóxicos.

## IDEAS PRINCIPALES

- La formación de carbonatos metálicos fue descrita para las cepas ureolíticas de *S. luteola* UB3 y UB5.
- La producción de metalóforos para quelar  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  y arsenóforos para quelar  $\text{As}^{3+}$  y  $\text{As}^{5+}$  fue descrita para ambas cepas de *S. luteola*.
- La precipitación de hidrocincita y rodocrosita en condiciones *in vitro* por *S. luteola* no estaba reportada.
- La inoculación del cultivo mixto *S. luteola* UB3-UB5 en microcosmos de jales mineros promueve la formación de  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{ZnCO}_3$ .

**Palabras clave:** Bacterias ureolíticas, Precipitación de carbonatos, Jales mineros de sulfuros, Biomineralización, Biorremediación de metales.



## 1. INTRODUCCIÓN

La extracción y liberación de metales tóxicos como Pb, Cd, As, Hg, Ba, Cr, Co, Ni, Fe, Mn y Zn de los jales mineros se ha convertido en un grave problema ambiental debido a los efectos que estos producen en los ecosistemas (Fergusson, 1990; Lindsay et al., 2015; Gutiérrez et al., 2016). El suelo y agua son los recursos naturales más afectados (Xie et al., 2017; Xiao et al., 2017) e incluso las plantas silvestres y de cultivo pueden acumular elevadas concentraciones de metales, representando una grave amenaza para los organismos vivos (Pourret et al., 2016; Ngole-Jeme y Fantke 2017; Camizuli et al., 2018). Los metales ocasionan un impacto negativo en la población cercana a los jales mineros y están ampliamente documentados los efectos a la salud que estos producen (e.g. daños al sistema nervioso, trastornos inmunológicos, daño a células germinales, cáncer y afección a órganos como riñón, hígado y pulmón) (Tchounwou et al., 2012; Jaishankar et al., 2014). Estos efectos han provocado que la minería y fundición sean dos de las actividades antrópicas con mayor impacto en el ambiente y la salud del hombre (Kossoff et al., 2014).

Actualmente, se ha propuesto una gran variedad de técnicas físicas, químicas y biológicas para inmovilizar metales tóxicos en suelos y en jales mineros (Karaca et al., 2017). Algunas de estas técnicas (e.g. solidificación, estabilización, cubierta de suelo y remediación electrocinética) tienen un rendimiento aceptable a mediano y largo plazo (Martin y Ruby 2004; Ortiz-Soto et al., 2019) y otras (e.g. lavado ácido o alcalino, fijación química y tecnología de vitrificación) requieren de mantenimiento continuo incrementando el tiempo y costo de operación (Baek et al., 2009; Yao et al., 2012). Incluso otros (e.g. tratamiento térmico, extracción fisicoquímica y la fitorremediación) generan residuos tóxicos que requieren de tratamiento adicional (Ghosh y Singh 2005; Dermont et al., 2008; González-Martínez et al., 2019).

Una alternativa para el tratamiento de los residuos mineros es la biorremediación, ya que aprovecha la capacidad metabólica de los microorganismos para modificar el estado redox de los metales y disminuir su biodisponibilidad, también ha mostrado ser eficiente, económica y además, mantiene un adecuado balance ecológico (Ayangbenro et al., 2018; Verma y Kuila 2019). La precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente (MICP) ha sido exitosamente aplicada en la remediación de sitios contaminados con metales y radionucleidos (Dhami et al., 2013; Anbu et al., 2016) y también se ha utilizado en la restauración de monumentos y biocementación de suelo, debido a que los biominerales mejoran la microestructura, rigidez y resistencia a la compresión (DeJong et al., 2010; Mujag et al., 2017). Además, es posible implementarla utilizando efluentes industriales (Achal et al., 2009).

Debido a sus diferentes aplicaciones ambientales la MICP es ideal para probarse en medios granulares con altas concentraciones de metales tóxicos como los jales mineros, ya que podría reducir la porosidad y la permeabilidad. Además, esta técnica podría usarse para prevenir o retrasar la oxidación de los sulfuros residuales en los jales mineros, ya que es el proceso responsable de la generación de DAM y la liberación de metales tóxicos al ambiente (Nordstron et al., 2015). Por otra parte, la alcalinización y la bioprecipitación de carbonatos pueden aumentar el pH de los jales ácidos y podría detener la liberación de metales tóxicos (Kumari et al., 2016; Tamayo-Figueroa et al., 2019). Por lo tanto, la MICP ofrece una gran posibilidad de ser aplicada para propósitos de prevención y recuperación en sitios mineros, mitigando su impacto ambiental y contribuyendo a que estas industrias sean más amigables con el ambiente.

En este estudio se evaluó la capacidad de un cultivo mixto de *S. luteola* UB3 y UB5 aisladas de los jales mineros alcalinos “La Concha” de Taxco, Guerrero (sur de México) para producir

ureasa y precipitar carbonatos metálicos, en condiciones *in vitro* e *in situ* en microcosmos de jales mineros alcalinos y acidificados. La identificación de los biominerales se realizó utilizando una combinación de microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada a un dispositivo de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) y técnicas de difracción de rayos X (XRD).

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la capacidad de las cepas ureolíticas en la precipitación de carbonatos y emplearlas como una estrategia para inmovilizar metales tóxicos en jales mineros.

### **Objetivos específicos**

1. Aislar, identificar molecularmente y evaluar la actividad ureasa de las bacterias aisladas de los jales mineros.
2. Caracterizar los carbonatos metálicos precipitados por las bacterias ureolíticas en condiciones *in vitro*.
3. Bioaumentar y bioestimular los microcosmos de jales mineros alcalinos y acidificados y analizar cambios de pH, concentración de carbonatos y la mineralogía.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Sitio de estudio y muestreo**

Los jales mineros “La Concha” derivan de la explotación de Ag y Au, estos jales fueron generados entre 1940-1950 al Sur de Taxco de Alarcón, Guerrero (México) a  $18^{\circ}32'22.2719''\text{N}$  y  $99^{\circ}38'9.0537''\text{O}$ . Aproximadamente 0.6 millones de toneladas de estos jales, están distribuidos en dos horizontes con características fisicoquímicas contrastantes. La zona superior es gris, alcalina (pH~8.0) y no oxidada con una conductividad eléctrica (CE) de  $88\ \mu\text{S}/\text{cm}$  mientras que, la zona inferior es ocre-rojiza, acidificada (pH< 2) y oxidada con CE de  $8990\ \mu\text{S}/\text{cm}$  (anexo 1). Ambos horizontes poseen altas concentraciones de As ( $11800\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ) Cd ( $780\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ), Cu ( $1320\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ), Pb ( $43700\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ), Zn ( $>10000\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ) y Fe (6.0-12-3%) (Talavera-Mendoza et al., 2005; Dótor-Almazán et al., 2017). De cada horizonte, 30 kg de jales fueron muestreados, secados y tamizados con malla #10 para obtener partículas <2 mm para posteriores ensayos.

#### **3.2 Aislamiento y selección de las bacterias ureolíticas**

10 g de jales fueron inoculados en 90 ml de medio NBU que contiene ( $\text{g}\ \text{L}^{-1}$ ) peptona 10, extracto de levadura 4, glucosa 10, urea 20, a un pH de 6. Las muestras fueron incubadas a  $30\ ^{\circ}\text{C}$  por 30 días en agitación a 200 rpm, 1 ml de este cultivo fue subcultivado 2 veces más con las mismas condiciones. Posteriormente, colonias aisladas fueron obtenidas mediante dilución seriada y plaqueo en medio NBU + ( $\text{g}\ \text{L}^{-1}$ ) agar 16 y rojo de fenol 0.012 como indicador de pH. Las placas fueron incubadas a  $30\ ^{\circ}\text{C}$  por 72 h y las colonias con un halo rosa alrededor fueron consideradas ureolíticas. Para determinar la capacidad biomineralizante,  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de las cepas ureolíticas fueron inoculadas en el centro de placas de medio NBU +  $\text{CaCl}_2$  (0.3 M) y fueron incubadas a  $30\ ^{\circ}\text{C}$  por 7 días. La

morfología y composición elemental de los minerales formados alrededor de las colonias fue determinada como se detalla en el apartado de análisis de carbonatos metálicos por SEM-EDX y XRD. Solo dos cepas bacterianas fueron capaces de formar  $\text{CaCO}_3$  y fueron denominadas como UB3 y UB5 (UB= Ureolytic Bacteria) y seleccionadas para los experimentos posteriores. *Proteus mirabilis* ATCC 7002 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron utilizadas como control positivo y negativo de la actividad ureolítica durante el aislamiento.

### **3.3 Identificación molecular y análisis del gen *ureC* de las bacterias ureolíticas**

El DNA genómico fue extraído con Dneasy Blood and Tissue® kit (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El gen *16S rRNA* fue amplificado por PCR con los primers universales fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5' CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991) y el gen *ureC* (Urease subunit alpha) fue amplificado con los primers ureC-F (5'-TGGGCCTTAAAATTCACGAAGAYTGGG-3') y ureC-R (5'-GGTGGTGGCACACCATAACCATRTC-3') como lo describe Hammes et al., (2003). Los productos de PCR fueron purificados con Gene Jet PCR purification kit® (Thermo scientific) y fueron clonados con el Kit InsTAclone PCR Cloning® (Thermo Scientific) para su secuenciación por Macrogen Inc (Seoul, Corea). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del NCBI y con los genomas de *Sporosarcina* disponibles utilizando BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las relaciones evolutivas entre las especies fueron establecidas por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura 3 parámetros en MEGA 7 evolutionary analysis software (Tamura 1992; Kumar et al., 2016).

### 3.4 Perfiles de resistencia a metales y producción de metalóforos y arsenóforos

La resistencia a metales y metaloides de las cepas UB3 y UB5 fue evaluada en placas de medio ATCC 1376® para *Sporosarcina pasteurii* ( $\text{g L}^{-1}$ ) extracto de levadura 20,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10, agar 20, Tris base 0.3 M a pH 9, suplementado con concentraciones de 0.05, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 mM de las siguientes sales metálicas  $\text{NaAsO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ,  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (JT Baker chemical) y  $\text{K}_2\text{TeO}_3$ ,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Ba}$ ,  $\text{CsCl}$ ,  $\text{RbCl}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{AgNO}_3$  (Sigma & Aldrich).  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  fueron inoculadas en las placas y fueron incubadas a  $30^\circ\text{C}$  por 7 días. La concentración del metal que inhibió el crecimiento bacteriano fue considerada como la concentración mínima inhibitoria (CMI). La producción de metalóforos y arsenóforos fue detectada en placas de medio LB + urea  $20 \text{ g L}^{-1}$  y Cromo Azurol S  $0.06 \text{ g L}^{-1}$  (Sigma & Aldrich). Para este ensayo  $1 \text{ mM}$  de  $\text{FeCl}_3$  utilizado en el *Universal chemical assay* (Schwyn y Neilands, 1987) fue sustituido por la misma concentración de la sal metálica de interés como lo propone Román-Ponce et al., (2018). *Pseudomonas putida* ATTC 12633 productora de metalóforos de  $\text{Fe}^{3+}$  fue utilizada para validar el método.

### 3.5 Cinética de crecimiento y evaluación de la actividad ureasa

La cinética de crecimiento de las cepas UB3 y UB5 fue realizada en medio NBU (medio con urea) y NB (medio sin urea), ajustado a una densidad óptica inicial de 0.1 a  $600 \text{ nm}$  ( $\text{DO}_{600}$ ) a pH 6. Los cultivos fueron incubados a  $30^\circ\text{C}$  por 72 h en agitación a  $200 \text{ rpm}$ , cada 30 min se midió la DO y el pH. La actividad ureasa de UB3, UB5 y el cultivo mixto en medio NBU fue determinada cada 24 h por el método de fenol-hipoclorito como lo describió Achal et al., (2009). Una unidad de actividad ureasa fue definida como la cantidad de enzima que libera  $2 \mu\text{mol}$  de amonio por  $1 \mu\text{mol}$  de urea hidrolizada por minuto. El cloruro de amonio en

concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900  $\mu\text{M}$  fue utilizado para obtener una curva de calibración ( $R^2 = 0.998$ ).

### **3.6 Precipitación de carbonatos metálicos por *S. luteola* UB3 y UB5**

Las cepas fueron inoculadas en 100 mL de medio NBU ( $\text{DO}_{600} = 0.1$ ) con 25 mM de  $\text{CaCl}_2$  e incubadas a 30 °C durante 72 h en agitación a 200 rpm. La precipitación de  $\text{CaCO}_3$  de los cultivos fue estimada cada 24 h como lo reporta [Omoregie et al., \(2019\)](#). Para inducir la formación de otros carbonatos metálicos se agregaron diferentes sales metálicas con la misma concentración utilizada en los ensayos de metaloresistencia, adicionalmente, se realizaron experimentos de coprecipitación con  $\text{CaCl}_2 + \text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{As}^{3+}$  y  $\text{As}^{5+}$ . Los biominerales se recuperaron de los cultivos por centrifugación a 8000 rpm por 10 min, lavados 2 veces con agua MQ ajustada a pH 8 con NaOH y secados a 50 °C ([Kang et al., 2015](#)).

### **3.7 Análisis de los carbonatos metálicos por SEM-EDX y XRD**

Los biominerales fueron fijados con cinta de grafito de doble faz a un portamuestras de aluminio y cubiertas con oro o grafito con un grosor de aproximadamente 20 nm. La microestructura fue examinada en un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL-IT-300 LV en condiciones de alto vacío y con electrones secundarios, con un voltaje de aceleración de 15 keV y la composición elemental fue determinada mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) con un detector Bruker X-Flash 6/30 en bajo vacío y con electrones retrodispersados. Por otra parte, la identificación mineralógica fue determinada por difracción de rayos X (XRD) con un equipo Bruker D8 advance, con portamuestras de polimetilmetacrilato y silicio, ánodo de Cu ( $1.5406 \text{ \AA}$ ) y radiación de 40kV y 30 mA con una velocidad de escaneo de  $3^\circ/\text{min}$  en un ángulo de  $5^\circ$  a  $80^\circ$  en  $2\theta$ . Las fases minerales se identificaron con el software DIFFRAC.EVA. V4.3 (Bruker, Germany)

acoplado a la Crystallography Open Database ([Gražulis et al., 2012](#)) y el software MATCH! 2 instalado con la base de datos de “*The International Centre for Diffraction Data*”. Los espectros de EDX y XRD se graficaron con el software OriginPro 8 (OriginLab Co., USA).

### **3.8 Diseño de los microcosmos de jales mineros**

La formación de carbonatos *in situ* fue evaluada en microcosmos con 35 g de jales alcalinos (n=24) o jales ácidos (n=24) en cajas petri de (100 x 15mm) y se inocularon cada 8 días hasta los 64 días con los tratamientos descritos en la tabla 1 (anexo 2). Los jales alcalinos y ácidos se ajustaron al 40% de su capacidad de retención de agua (CRA), para que la microbiota se adaptara a los diferentes tratamientos ([de Leon-Lorenzana et al., 2017](#)). Después del experimento, el pH fue medido en relación 1:2 (jales:agua) ([Armienta et al., 2003](#)) y la concentración de carbonatos fue estimada por el método de titulación descrito por [Loeppert y Suarez \(1996\)](#) y se compararon con el control sin tratar. Las fases minerales de los microcosmos tratados y el control se identificaron por XRD.

### **3.9 Análisis estadístico**

Todos los ensayos en condiciones *in vitro* y en jales mineros se realizaron por triplicado y los resultados fueron reportados como media  $\pm$  desviación estándar. La normalidad estadística fue determinada con la prueba de Shapiro–Wilk y un análisis de varianza (ANOVA) con *post hoc* de Tukey y Kruskal-Wallis test fueron utilizados para los datos paramétricos y no paramétricos respectivamente. El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con el software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) y GraphPad (Inc., San Diego CA, USA), respectivamente,  $p < 0.05$  fue reportado como estadísticamente significativo.

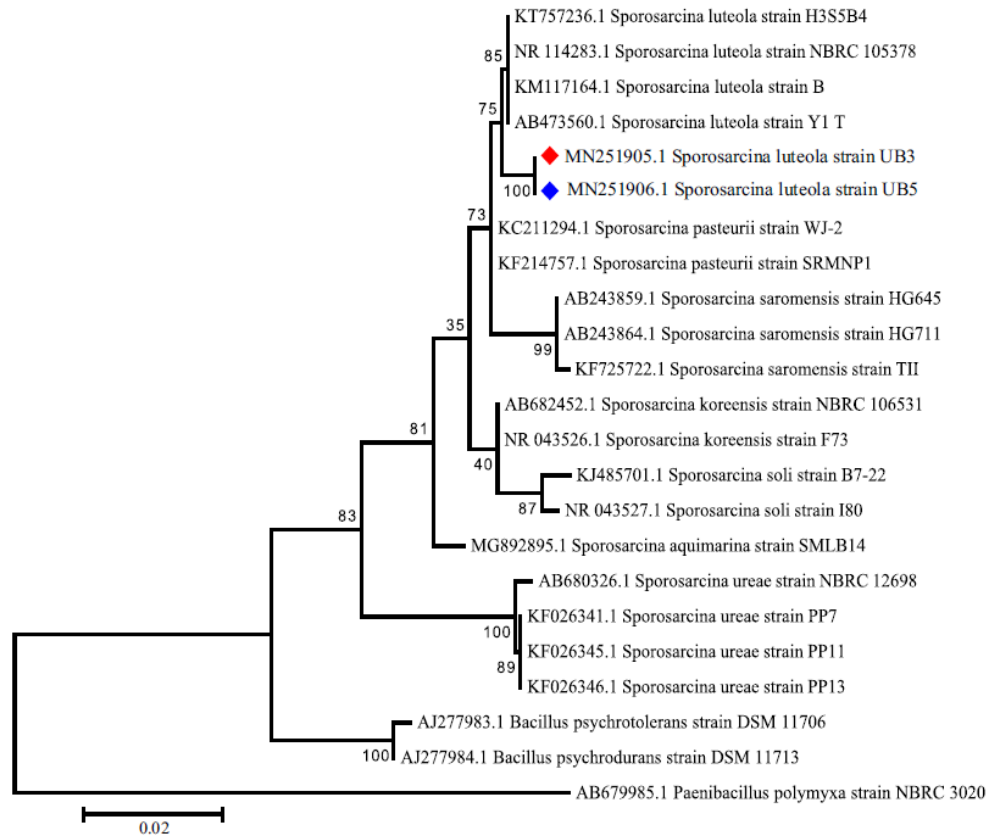


## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recientemente, las bacterias ureolíticas han mostrado potencial en la biorremediación por su capacidad de precipitar minerales carbonatados que incorporan metales tóxicos dentro de su estructura cristalina o los capturan mediante atracciones electrostáticas, químicas y fenómenos de adsorción (Li et al., 2013; Kumari et al., 2016; Tamayo-Figueroa et al., 2016). La precipitación de carbonatos vía ureolisis es catalizada por la ureasa (EC 3.5.1.5), que por 1 mol de urea libera 2 moles de  $\text{NH}_4^+$ , 1 mol de  $\text{HCO}_3^-$  y 1 mol de  $\text{OH}^-$ , lo que provoca la alcalinización y la saturación del sistema con carbono inorgánico y en presencia de iones metálicos inducen la precipitación de carbonatos (Hammes y Verstraete 2002; Dejong et al., 2010; Li et al., 2013).

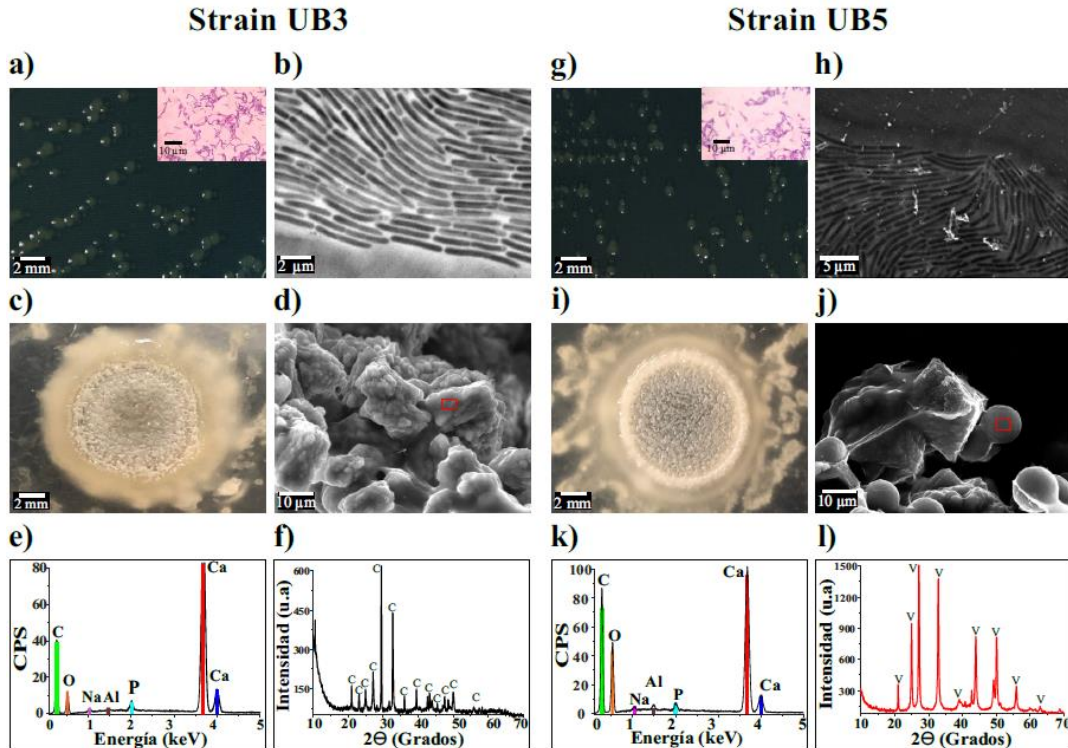
### 4.1 Selección y asignación taxonómica de las bacterias ureolíticas

En este estudio las cepas ureolíticas UB3 y UB5 aisladas del horizonte alcalino de los jales mineros “La Concha”, fueron identificadas molecularmente como *Sporosarcina luteola* (phylum firmicutes, familia planococcaceae). El análisis filogenético de las secuencias del gen *16S rRNA* de las cepas, revela que ambas tienen un 97% de similitud con la cepa tipo de *S. luteola* strain Y1, pero se agrupan en un clado distinto al resto de las cepas de este género (Fig. 1). Otras especies de *Sporosarcina* también han sido aisladas de jales mineros de Mn-Zn-Cu-Pb en Busan, Corea y en jales mineros de Pb-Zn en la provincia de Hunan, en China (Cheng et al., 2009; Park et al., 2014). El género *Sporosarcina* incluye a bacterias no patógenas e incluso sus propiedades probióticas han sido evaluadas (Priyodip y Balaji 2019), por lo que podrían emplearse con seguridad para procesos de biorremediación.



**Fig. 1.** Filogenia del gen *16S rRNA* de las cepas UB3 y UB5 generado por máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 réplicas. *Paenibacillus polymyxa* strain NBRC 3020 (AB679985.1) fue utilizado como grupo externo.

Las cepas aisladas son gram-positivas y con forma de bacilos alargados (Fig. 2a-g y b-h) con un tamaño aproximado de 3  $\mu\text{m}$  y fueron seleccionadas por su capacidad de precipitar  $\text{CaCO}_3$  en placas de medio NBU +  $\text{CaCl}_2$  (Fig. 2c-i). El análisis por SEM del precipitado alrededor de las colonias de *S. luteola* UB3 y UB5 muestran agrupamiento de cristales con forma romboédrica y esférica de diferentes tamaños (Fig. 2d-j) que corresponden a  $\text{CaCO}_3$  de acuerdo con los análisis de EDX (Fig. 2e-k) y mediante análisis por XRD fueron identificados como calcita y vaterita para la cepa UB3 y UB5, respectivamente (Fig. 2f-l).

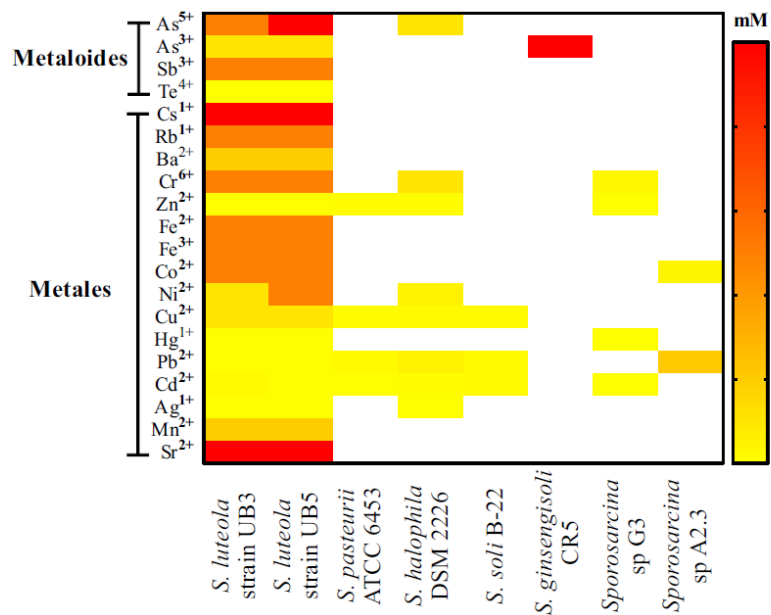


**Fig. 2.** Precipitación de  $\text{CaCO}_3$  por las cepas UB3, UB5 y análisis por SEM-EDX y XRD. a-b y g-h) morfología de las cepas aisladas, c-i) precipitación de  $\text{CaCO}_3$  alrededor de las colonias, d-j) micrografías de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  por SEM, e-k) espectros de EDX del  $\text{CaCO}_3$  precipitado, f-l) identificación de los biominerales por XRD (C=Calcita y V=Vaterita).

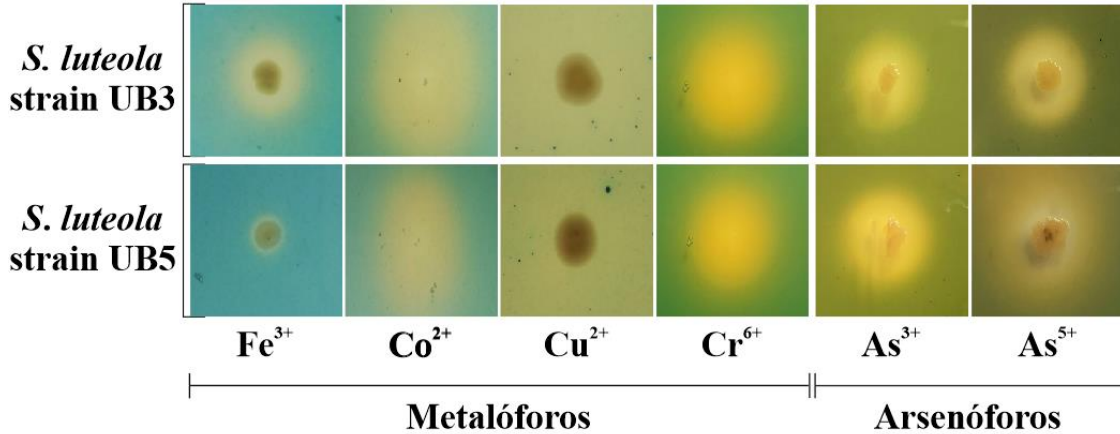
#### 4.2 Perfiles de metaloresistencia y producción de metalóforos y arsenóforos

Los perfiles de resistencia a metales y metaloides de *S. luteola* UB3 y UB5 muestran una CMI  $>50$  mM para  $\text{Cs}^{1+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ , una CMI entre 25-50 mM para  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^{1+}$  y  $\text{Sb}^{3+}$ , una CMI 5-10 mM para  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  y valores más bajos para  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Te}^{4+}$  y  $\text{Ag}^{1+}$  con una CMI  $<1$  mM (Fig. 3). Ambas cepas presentan un patrón similar de resistencia con excepción de  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{As}^{5+}$ , donde la cepa UB5 presentó una mayor CMI que la cepa UB3. El perfil de metaloresistencia de otras cepas de *S. luteola* no ha sido reportado, sin embargo valores de CMI similares para  $\text{Ag}^{1+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,

Cu<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> han sido reportados para *S. pasteurii*, *S. halophila* y *S. soli* (Nieto et al., 1989; Bafana et al., 2011; Kang et al., 2016; Mugwar y Harbottle 2016). Por su parte, *S. ginsengisoli* CR5 tolera 50 mM de As<sup>3+</sup> pero la cepa UB5 tolera 50 mM de As<sup>5+</sup> (Achal et al., 2012). Para los otros metales, reportamos una CMI superior a las de otros aislados de *Sporosarcina*, particularmente para el As<sup>5+</sup> y Cr<sup>6+</sup>, esto podría deberse a la capacidad de las cepas UB3 y UB5 de producir metalóforos que quelan Cr<sup>6+</sup> y arsenóforos quelantes de As<sup>3+</sup> y As<sup>5+</sup> (Fig. 4). Los metalóforos y arsenóforos secuestran metales y forman complejos organometálicos que son cinética y termodinámicamente estables, por lo que podrían funcionar como un mecanismo de resistencia a metales (Saha et al., 2013; Román-Ponce et al., 2018). La producción de metalóforos por *Sporosarcina* solo ha sido reportada para *S. aquimarina*, un endófito de *Avicennia marina* que produce metalóforos que quelan Fe<sup>3+</sup> (Janarthine y Eganathan 2012).



**Fig. 3.** Heatmap de la CMI de metales y metaloides para cepas del género *Sporosarcina*, incluyendo las cepas de *S. luteola* UB3 y UB5. El color rojo indica las concentraciones más altas, en amarillo las concentraciones menores y en blanco no reportado.



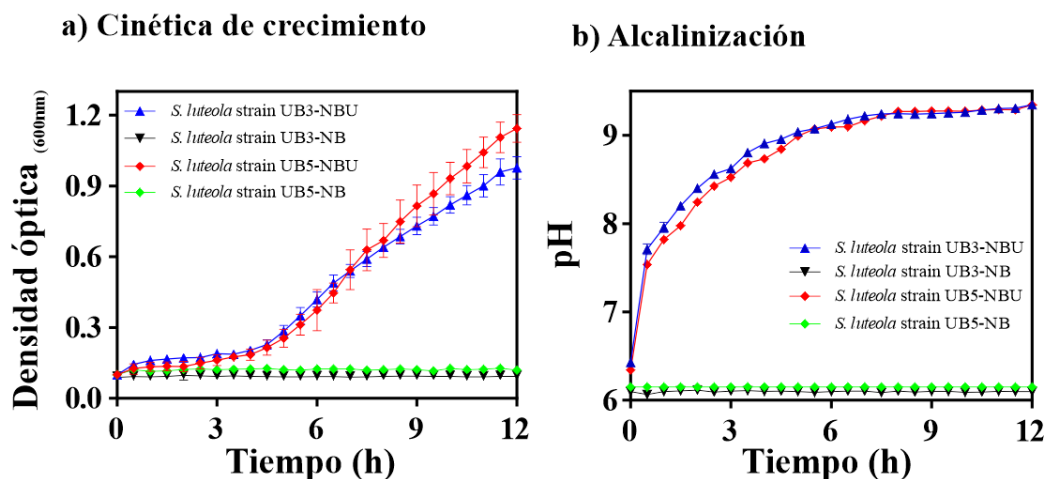
**Fig. 4.** Producción de metalóforos ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{6+}$ ) y arsenóforos ( $\text{As}^{3+}$  y  $\text{As}^{5+}$ ) por *S. luteola* UB3 y UB5. El halo amarillo alrededor de las colonias indica la producción de quelantes orgánicos.

La capacidad intrínseca de los microorganismos para tolerar metales tóxicos es un factor importante que debe considerarse en experimentos de biorremediación *in situ* (Li y Ramakrishna 2011).

#### 4.3 Efecto de la urea en el crecimiento de *S. luteola* UB3 y UB5

La cinética de crecimiento de *S. luteola* UB3 y UB5 en medio NBU muestra que la urea es indispensable para su supervivencia en pH ácido, ya que en medio NB sin urea no hay crecimiento bacteriano después de 12 h de incubación (Fig. 5a). La fase exponencial de crecimiento de las cepas en medio NBU inició después de las 5 h de incubación y correlaciona positivamente con la alcalinización del medio, alcanzando un pH máximo de  $9.4 \pm 0.01$  (Fig 5b). La alcalinización del medio se debe a la liberación de iones  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{OH}^-$  liberados durante la hidrólisis de la urea (Anbu et al., 2016). Es importante mencionar que la cepa tipo de *S. luteola* strain Y1 fue descrita como no ureolítica y no requiere de urea para su crecimiento (Tominaga et al., 2009), en contraste con nuestras cepas que si la requieren,

incluso en medios con pH neutro. La actividad ureolítica de las cepas UB3 y UB5 podría actuar como un mecanismo para contener el estrés ácido, como previamente ha sido reportado para *Helicobacter pylori* (Williams et al., 1996) y en otras bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus salivarius* (Chen et al., 2000; Zhou et al., 2019).

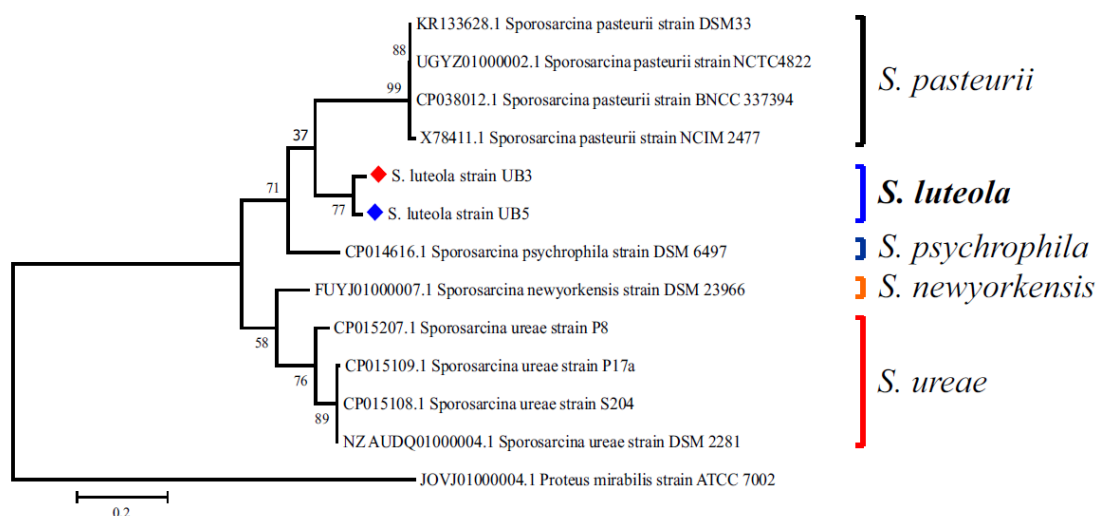


**Fig. 5.** a) Cinética de crecimiento y b) Alcalinización de cultivos de *S. luteola* UB3 y UB5 en medio NB y NBU (urea 2%). La DO y el pH fueron medidos cada 30 min por 12 h.

#### 4.4 Análisis molecular del gen *ureC* y caracterización de la actividad ureasa

El análisis molecular de las secuencias del gen *ureC* de las cepas UB3 y UB5 las agrupa en un clado cercano a *S. pasteurii* (Fig. 6), especie que ha sido modelo para el estudio de la MICP (Achal et al., 2009). No fue posible comparar el gen *ureC* de nuestras cepas con otras cepas de *S. luteola*, debido a que estas últimas no tienen secuencias depositadas en las bases de datos, sin embargo, el árbol filogenético muestra otras secuencias del gen *ureC* del género *Sporosarcina* que las agrupan en clados definidos por especie. Un número limitado de secuencias de los genes que codifican para la ureasa (*ureA*, *ureB* y *ureC*) y sus proteínas accesorias (*ureD*, *ureE*, *ureF* y *ureG*) del género *Sporosarcina* han sido reportadas, lo que

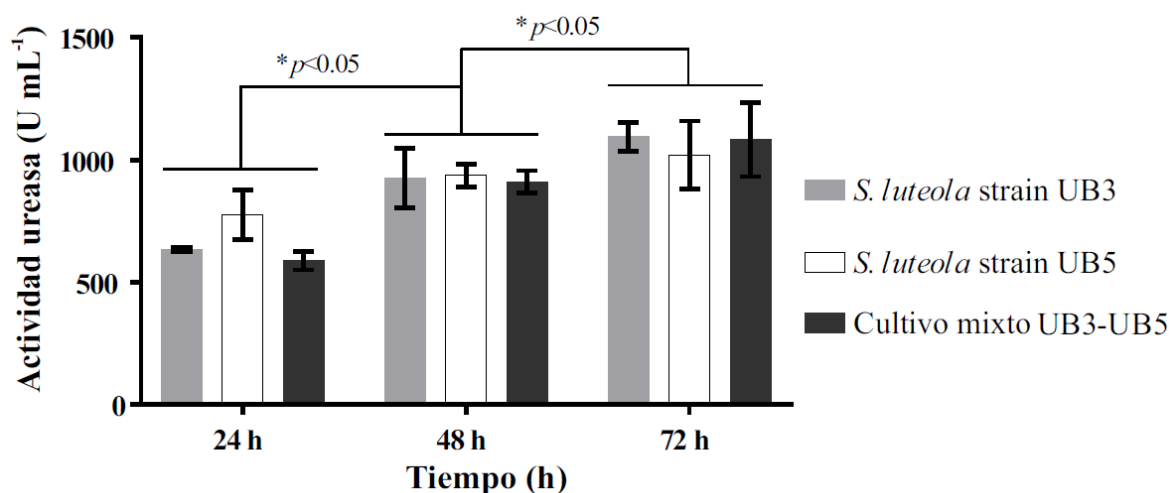
limita el establecimiento de las relaciones evolutivas entre las especies y su capacidad ureolítica. [Su et al., \(2013\)](#) demostró que existe una correspondencia entre la filogenia del gen *16S rRNA* y el gen *ureC* de algunos géneros bacterianos, sin embargo, la actividad ureasa difiere entre cepas de la misma especie ([Hammes et al., 2003](#)).



**Fig. 6.** Filogenia por el método de máxima verosimilitud del gen *ureC* de *S. luteola* UB3 y UB5 comparado con secuencias de genomas de *Sporosarcina*. El árbol fue enraizado con *Proteus mirabilis* ATCC 7002 (JOVJ01000004) con un bootstrap de 1000 réplicas.

La actividad ureasa de las cepas UB3 y UB5 fue evaluada individualmente y en cultivo mixto a través de la cuantificación del amonio liberado durante la hidrólisis de la urea y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad enzimática en 24, 48 y 72 h entre las cepas ([Fig. 7](#)). Sin embargo, hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de cultivo alcanzando los valores máximos a las 72 h con  $1094 \pm 58.386 \text{ U mL}^{-1}$  para UB3,  $1120 \pm 139.215 \text{ U mL}^{-1}$  para UB5 y  $1082 \pm 150.931 \text{ U mL}^{-1}$  para el cultivo mixto. Nuestros resultados son similares a los reportados para *S. ureae* strain 634 con una actividad enzimática de  $1380 \text{ U mL}^{-1}$  a las 18 h de cultivo ([McCoy et al., 1992](#)) pero son superiores a los reportados para *S. pasteurii* NCIM 2477 y *S. ginsengisoli* CR5 con  $412 \text{ U mL}^{-1}$  a las 120

h (Achal et al., 2009; Achal et al., 2012) y a otras especies del género *Sporosarcina* (Okuyay y Rodrigues 2015; Burbank et al., 2012; Li et al., 2013). Las bacterias ureolíticas utilizan diferentes estrategias metabólicas para aprovechar los productos generados de la hidrólisis de la urea, una de ellas es aumentar el pH extracelular para favorecer su desarrollo óptimo (Achal et al., 2009), utilizar el amonio como fuente de nitrógeno y acoplarlo a la generación de adenosín trifosfato (ATP) para las reacciones bioquímicas de la bacteria (Chen y Shahin 2019).



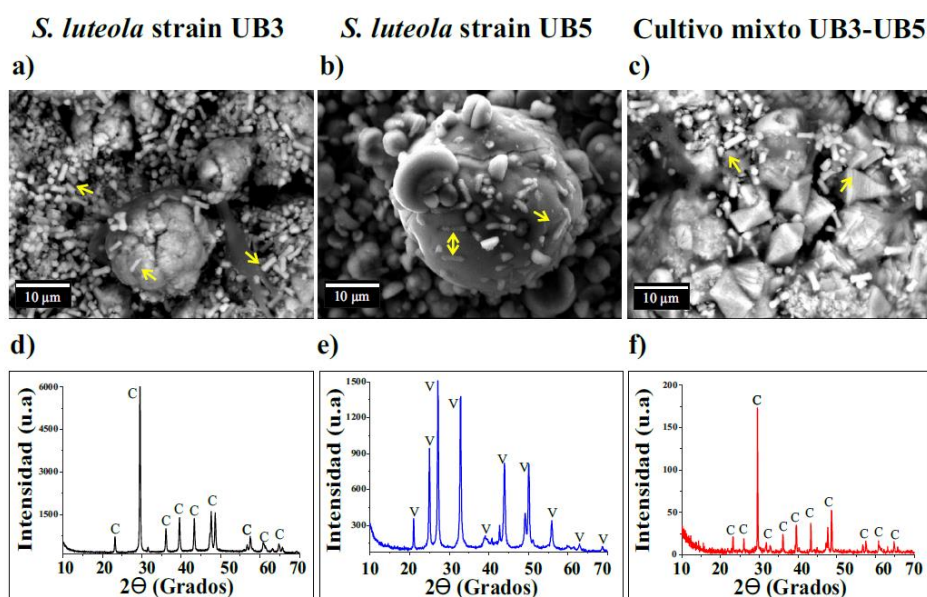
**Fig. 7.** Actividad ureasa de *S. luteola* UB3, UB5 y el cultivo mixto en medio NBU cuantificada por el método Fenol-Hipoclorito. La actividad ureasa fue medida cada 24 h.

#### 4.5 Identificación de las fases polimórficas de CaCO<sub>3</sub>

La concentración de CaCO<sub>3</sub> producido por *S. luteola* UB3 y UB5 durante 24 h de cultivo, no mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se evaluaron individualmente y en cultivo mixto, alcanzando una producción máxima de 21.6±1.19 g L<sup>-1</sup>. Sin embargo, el análisis por SEM y XRD revela que diferentes polimorfos de CaCO<sub>3</sub> fueron precipitados. La cepa UB3 precipita calcita con forma irregular, UB5 precipita vaterita con forma esférica y



el cultivo mixto precipita cristales de calcita con forma bipiramidal y de mayor tamaño a los obtenidos por las cepas UB3 y UB5 individualmente (Fig. 8). Otras especies como *S. ureae*, *S. psychrophila* y *S. pasteurii* también tienen la capacidad de precipitar biominerales de calcita y vaterita (Kang et al., 2014b; Mugwar y Harbottle 2016). La precipitación de las diferentes fases polimórficas de  $\text{CaCO}_3$  está determinada en algunas bacterias por la producción de proteínas extracelulares que se unen específicamente al calcio (Kawaguchi y Decho 2002). Además, observamos bacterias atrapadas en la estructura de los carbonatos, por lo que probablemente funcionen como sitios para la nucleación heterogénea de los minerales, ya que poseen grupos funcionales con carga negativa en la pared celular (Dhami et al., 2013; Chen y Achal 2019). El tamaño y estabilidad de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  formados por el cultivo mixto es superior con respecto a las cepas de manera individual, por lo que los ensayos de microcosmos de jales mineros fueron realizados con el cultivo mixto formado por *S. luteola* UB3-UB5.



**Fig. 8.** Precipitación y análisis del  $\text{CaCO}_3$  precipitado por las cepas UB3, UB5 y en cultivo mixto UB3-UB5. a-b-c) Micrografías por SEM, d-e-f) análisis por XRD, las letras en los patrones de XRD indican las fases minerales identificadas (C=Calcita y V=Vaterita).

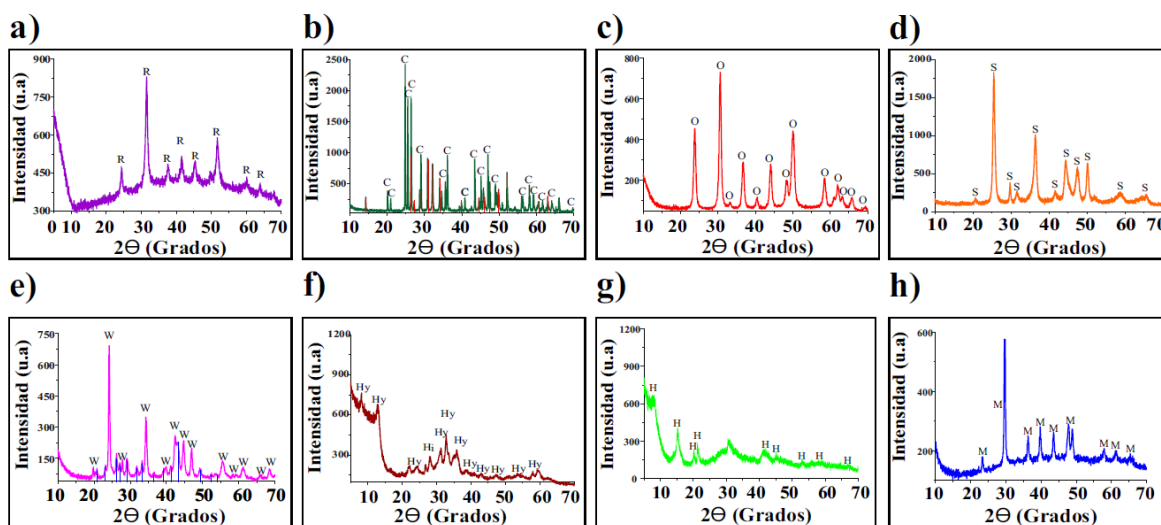
#### 4.6 Caracterización de carbonatos metálicos

Se ha descrito que el calcio es el elemento que se une con mayor afinidad a los carbonatos (Brečević et al., 1996), en nuestro estudio, observamos que otros metales divalentes como Pb, Cd, Sr, Ba, Zn y Mg también pueden precipitar como carbonatos anhidros o hidratados por *S. luteola* UB3 y UB5 en medio NBU. Los patrones de XRD revelan que las cepas UB3 y UB5 precipitan biominerales que corresponden a rodocrosita ( $\text{MnCO}_3$ ), cerusita ( $\text{PbCO}_3$ ), otavita ( $\text{CdCO}_3$ ), estroncianita ( $\text{SrCO}_3$ ), witherita ( $\text{BaCO}_3$ ), hidrocincita ( $\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6$ ) e hidromagnesita ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Fig. 9). Además, se detectó  $\text{BaSO}_4$  asociado con witherita, el cual se forma por la presencia de sulfatos en el medio y el Ba adicionado. Por otra parte, la presencia residual de  $\text{Pb}_3\text{O}_4$  fue detectada en presencia de cerusita. La precipitación de algunos carbonatos ya se ha descrito para cepas del género *Sporosarcina*. Fujita et al., (2004) y Kang et al., (2014a) reportan que la hidrólisis de la urea por *S. pasteurii* y *S. pasteurii* WJ-2 precipitan  $^{90}\text{Sr}$  como  $\text{SrCO}_3$ . Li et al (2013) describen mediante análisis por SEM-EDX que las cepas de *S. koreensis* UR47 y *Sporosarcina* sp UR31 precipitan  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  como  $\text{PbCO}_3$  y  $\text{ZnCO}_3$ , respectivamente. Mientras que, Mugwar y Harbottle (2016) a través de modelamiento geoquímico con Visual MINTEQ predicen la formación de  $\text{ZnCO}_3$ ,  $\text{CdCO}_3$ ,  $\text{PbCO}_3$  en cultivos de *S. pasteurii* ATCC 6453 suplementados con  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . Por último, Yu et al., (2016) demostraron que *S. pasteurii* puede formar ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) cuando se adiciona  $\text{Mg}^{2+}$ . Es importante mencionar que este es el primer reporte de la capacidad del género *Sporosarcina* para inducir la precipitación de hidrocincita y rodocrosita.

Interesantemente, nuestras cepas precipitan  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  en medio NBU, pero estos precipitados no tienen estructura cristalina, pero si muestran una señal orgánica en los análisis de XRD, lo que sugiere que estas bacterias podrían estar produciendo quelantes orgánicos

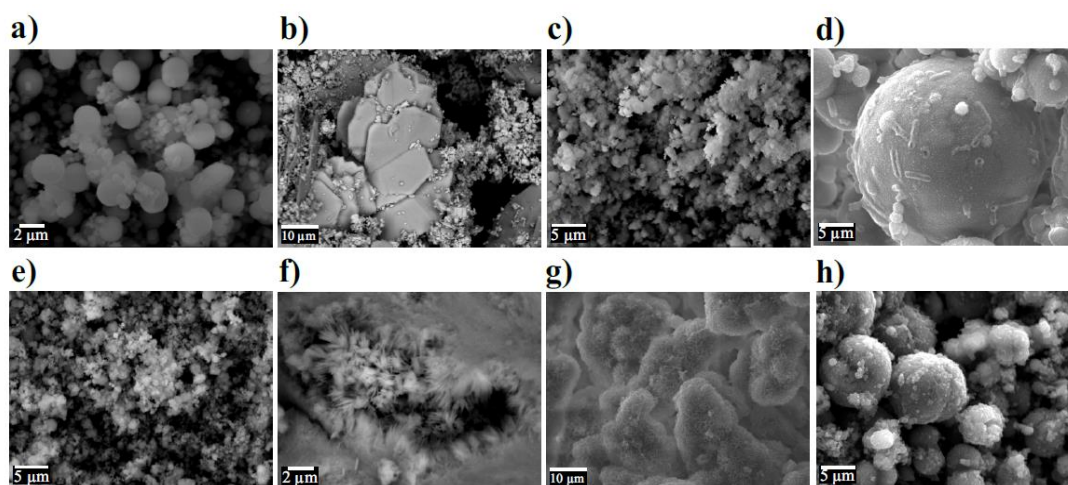
para inmovilizar metales. Como ya se mencionó, nuestras cepas producen metalóforos quelantes de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  (Fig. 4) y se ha descrito que su producción está asociada a la disolución de fases minerales poco solubles como los carbonatos y óxidos (Lian et al., 2008; Akafia et al., 2014), lo que podría estar perturbando el proceso de precipitación. Estos resultados sugieren que la capacidad de precipitar carbonatos metálicos difiere entre especies y podría estar asociado a la diversidad estructural de los grupos funcionales de la capa S del género *Sporosarcina* (Knobloch et al., 2012).

En los ensayos con  $\text{Ca}^{2+}$  y otro metal observamos la formación de vaterita, a excepción de la mezcla Ca/Mg, en donde reportamos la precipitación de calcita magnésica  $(\text{Ca-Mg})\text{CO}_3$ , para UB3. Estos minerales suelen formarse por reacciones de dolomitización, en donde el  $\text{Ca}^{2+}$  es sustituido por  $\text{Mg}^{2+}$  debido a la similitud en sus radios iónicos (0.99 Å) (Pan, 2009).



**Fig. 9.** Patrones de XRD representativos de los carbonatos metálicos formados por *S. luteola* UB3 y UB5 en medio NBU. a) R=Rodocrosita ( $\text{MnCO}_3$ ), b) C=Cerusita ( $\text{PbCO}_3$ ), I= $\text{Pb}_3\text{O}_4$ , c) O=Otavita ( $\text{CdCO}_3$ ), d) S=Estroncianita ( $\text{SrCO}_3$ ), e) W=Witherita ( $\text{BaCO}_3$ ) y I= $\text{BaSO}_4$ , f) Hy=Hidrocincita ( $\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6$ ), g) H=Hidromagnesita ( $(\text{Mg}(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ) y h) M=Calcita magnésica  $(\text{Ca-Mg})\text{CO}_3$ .

Los carbonatos metálicos formados por nuestras cepas presentan una diversidad estructural y tamaño que correlacionan con los sistemas de cristalización descritos (Chang et al., 1997), particularmente la calcita presentó una simetría hexagonal y la cerusita mostró una simetría poligonal similar a lo descrito por Dermatas (2004). La rodocrosita, otavita, witherita y estroncianita mostraron formas esferoidales, mientras que, la hidrocincita e hidromagnesita poseen estructura fibrosa (Fig. 10).



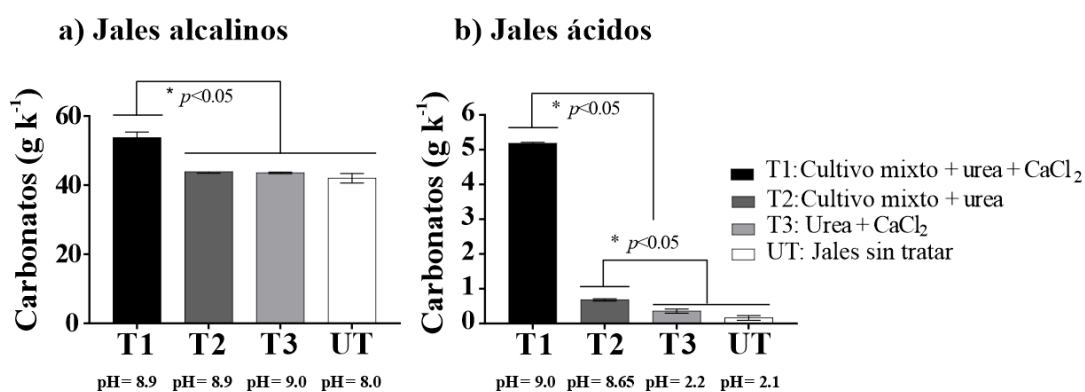
**Fig. 10.** Microestructura por SEM de los carbonatos metálicos formados por *S. luteola* UB3 y UB5 en medio NBU. a) Rodocrosita ( $\text{MnCO}_3$ ), b) Cerusita ( $\text{PbCO}_3$ ), c) Otavita ( $\text{CdCO}_3$ ), d) Estroncianita ( $\text{SrCO}_3$ ), e) Witherita ( $\text{BaCO}_3$ ), f) Hidrocincita ( $\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6$ ), g) Hidromagnesita ( $(\text{Mg}(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ), y h) Calcita magnésica  $(\text{Ca-Mg})\text{CO}_3$ .

#### 4.7 Alcalinización y producción de carbonatos en microcosmos de jales mineros

Microcosmos de jales mineros fueron inoculados con el cultivo mixto para evaluar su eficiencia en la formación de carbonatos. En los jales alcalinos, en el T1 (cultivo mixto + urea +  $\text{CaCl}_2$ ) y T2 (cultivo mixto + urea) el pH aumentó de  $7.9 \pm 0.02$  hasta  $8.9 \pm 0.01$  y  $9.0 \pm 0.05$  respectivamente, sin embargo, el T1 tiene las concentraciones más altas de carbonatos ( $53.71 \pm 1.69 \text{ g kg}^{-1}$ ) (Fig. 11a). Interesantemente, en el T3 (urea +  $\text{CaCl}_2$ ) también incrementó el pH, probablemente se deba a la hidrólisis de la urea por la microbiota nativa

de los jales. Algunos estudios metagenómicos han determinado cuáles poblaciones microbianas participan en el metabolismo de la urea, durante procesos de bioestimulación de suelos contaminados con metales (Chen y Achal et al., 2019), pero lamentablemente en este estudio no fue contemplada esta estrategia.

Por otra parte, en el T1 y T2 de los jales ácidos aumentaron el pH de 2.1 a >8.65 y presentan  $5.18 \pm 0.03 \text{ g kg}^{-1}$  y  $0.72 \pm 0.03 \text{ g kg}^{-1}$  de carbonatos respectivamente, ambos superiores a los  $0.36 \pm 0.02 \text{ g kg}^{-1}$  del T3 (Fig. 11b). En ambos lotes de jales observamos que la adición de calcio es importante para potenciar la formación de los carbonatos, ya que el T2 no alcanzó los mismos rendimientos de carbonatos que el T1, pero si son superiores con respecto a UT.



**Fig. 11.** Valores de pH y concentración de carbonatos en los microcosmos de jales mineros tratados. a) jales alcalinos y b) jales ácidos.

#### 4.8 Mineralogía de los microcosmos de jales mineros

Los análisis mineralógicos mediante XRD de los microcosmos de jales alcalinos sin tratar revela que las fases minerales mayoritarias son el cuarzo (SiO<sub>2</sub>), calcita, dolomita y smithsonita (Fig. 12a). Talavera et al., (2005) describió la presencia de barita, feldspatos, ferromagnesianos, pirita, galena, calcopirita, esfalerita, sulfosales de plata, arsenopirita y magnetita en los jales mineros “La Concha”, pero no fueron detectadas mediante XRD,

debido a que su abundancia es <1% y se encuentran por debajo de límite de detección del método. Las fases minerales de cuarzo, dolomita, calcita y smithsonita fueron detectadas en T1, T2 y T3, pero la jarosita ( $\text{KFe}_3^{3+}(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ) solo fue detectada en T1 y T2. [Cogram \(2018\)](#) reporta que la jarosita es formada en condiciones ácidas y su presencia en el horizonte alcalino indicaría acarreo del horizonte oxidado donde está ampliamente distribuida. En T1, T2 y T3 la vaterita se encuentra como una fase dominante, independientemente del tratamiento aplicado, la precipitación de vaterita en estos ensayos concuerda con el aumento en la concentración de carbonatos, lo que sugiere que; a) los jales sin tratar no tienen la capacidad de precipitar vaterita; b) la urea es esencial para inducir la precipitación de los minerales; c) la adición de calcio aumenta la precipitación de carbonatos de Ca-Mg; d) la microbiota nativa y la adición de urea inducen la precipitación de minerales carbonatados; e) el cultivo mixto + urea y calcio muestran mejores resultados en los tratamientos. Los jales mineros de sulfuros no oxidados contienen bajas concentraciones de metales en la fracción intercambiable y soluble, pero tienen gran potencial para liberar metales tóxicos a medida que ocurre el proceso de oxidación de los sulfuros residuales ([Ritcey et al., 1989](#)). Por esto, la oxidación de sulfuros, particularmente la pirita, se considera un proceso crítico en la liberación de metales tóxicos de los jales mineros.

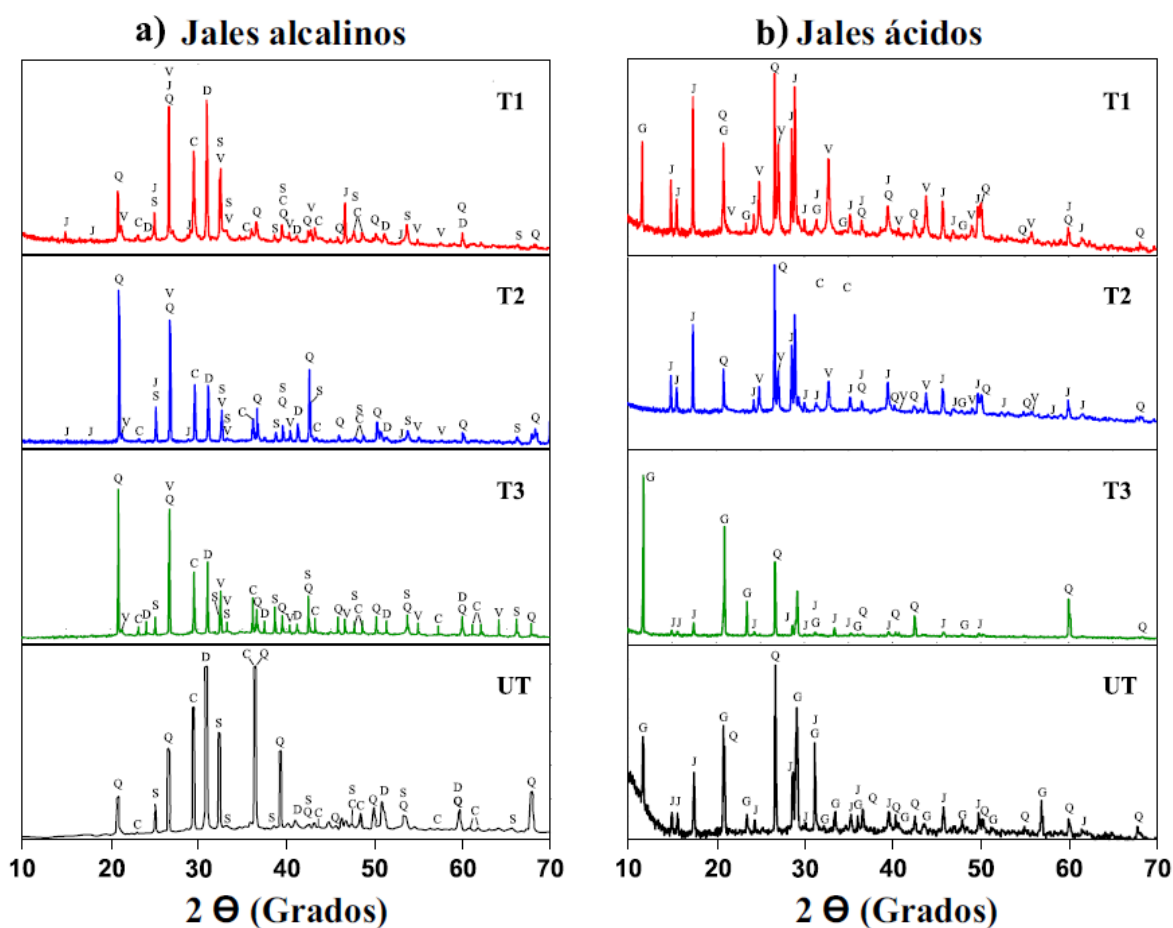
Nuestros resultados, sugieren que la precipitación *in situ* de los carbonatos metálicos pueden prevenir o disminuir la oxidación de los sulfuros residuales, ya que reducen el tamaño de los poros y la permeabilidad en los jales, restringiendo la entrada de oxígeno atmosférico y agua meteórica esenciales para la oxidación abiótica de los jales mineros. Por otra parte, la precipitación de carbonatos reduciría la concentración de metales tóxicos biodisponibles mediante reacciones de precipitación, coprecipitación y adsorción.

En los jales ácidos, las fases minerales mayoritarias incluyen al cuarzo, yeso y jarosita (Fig. 12b). Talavera et al., (2005) reportó la presencia de barita, feldespatos, ferromagnesianos, magnetita, calcocita, escorodita y kohoeita. En los tratamientos T1, T2 y T3 observamos minerales como cuarzo y jarosita, pero el yeso solo fue detectado en T1 y T3, mientras que, la vaterita es una fase predominante en T1 y T2. El secuestro de metales por coprecipitación con vaterita, induce la precipitación de oxihidróxidos de Fe-Mn, otro mecanismo conocido para inmovilizar metales vía coprecipitación y adsorción (Gadde y Laitinem 1974; Gasparatos 2013). Por lo tanto, en jales ácidos, la inoculación del cultivo mixto es esencial para alcalinizar y precipitar carbonatos y oxihidróxidos de Fe-Mn, favoreciendo la transformación de metales tóxicos biodisponibles a formas químicas estables como los carbonatos. Aunque la vaterita se encuentra como una fase predominante en el T2, en este tratamiento la producción de carbonatos es menor que en T1, lo que indica una deficiencia de calcio biodisponible en los jales ácidos y que la adición de calcio externo mejora el rendimiento del cultivo mixto.

Buikema et al., (2017) y Chen et al., (2018) mostraron que la formación de  $\text{CaCO}_3$  por *S. pasteurii* ATCC 11859 sobre la superficie de jales de minas de Fe mejora la resistencia superficial evitando la dispersión de material particulado, mientras que en jales de minas As-Cu-Zn-Mo aumenta la resistencia a la compresión de 0.55 Mpa hasta 6.68 MPa.

La formación de  $\text{CaCO}_3$  por bacterias ureolíticas favorece la adsorción de metales tóxicos y disminuye su movilidad y biodisponibilidad. Yang et al., (2016) reportan que *B. firmus* XP8 induce la formación de  $\text{CaCO}_3$  en jales mineros y retiene 55% de Cu, 45% de Pb y 48% de Cd en la fracción unida a carbonatos. Govarthanan et al., (2013) demostraron que la bioaumentación de jales mineros con *Bacillus sp* KK1 incorpora el Pb soluble a los carbonatos producidos *in situ* por esta bacteria hasta en un 38%.

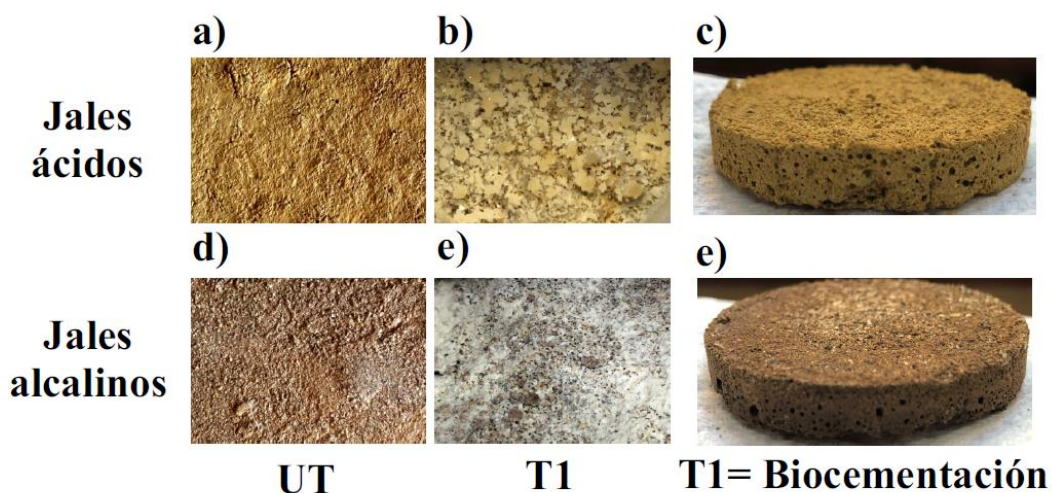
A pesar de que la minería es una de las actividades económicas más relevantes en el mundo, ya que proporciona un gran porcentaje de materia prima para el desarrollo tecnológico, también es una de las actividades antrópicas con mayor impacto ambiental (Ritcey, 1990; Norgate 2006; Kadiyala et al., 2016; Yadav y Jamal, 2018). Por ello, es importante diseñar alternativas biotecnológicas para prevenir o mitigar los daños ambientales ocasionados por los desechos de mina. Nuestros resultados demuestran que la precipitación de carbonatos por las bacterias ureolíticas tiene gran potencial para propósitos de prevención y neutralización de jales mineros de sulfuros ya que podría reducir la biodisponibilidad de metales tóxicos.



**Fig. 12.** Patrones de XRD de los microcosmos de jales mineros a) jales alcalinos y b) jales ácidos. Los tratamientos se indican en la tabla 1. Q = Cuarzo; G = Yeso; J = Jarosita; C = Calcita; D = Dolomita; V = Vaterita; S = Smithsonita.



Por otra parte, observamos la biocementación de los microcosmos del T1 (Fig. 13), lo que sugiere que la inoculación del cultivo mixto podría mejorar la porosidad y permeabilidad, debido a que los cristales de  $\text{CaCO}_3$  forman puentes estables entre las diferentes partículas del suelo, principalmente entre arenas y arcillas, confiriendo una mayor resistencia al intemperismo físico y químico (Dejong et al., 2010; Mujah et al., 2017). Por lo anterior, la formación de carbonatos biogénicos por bacterias ureolíticas sobre los jales mineros reduciría la lixiviación de los metales tóxicos a ecosistemas adyacentes y evitaría la oxidación de los sulfuros metálicos, principal evento que desencadena la formación de DAM.



**Fig. 13.** Biocementación de jales mineros tratados con el cultivo mixto UB3-UB5 + urea y calcio. a-d) jales sin tratamiento, b-e) precipitación de  $\text{CaCO}_3$  sobre la superficie de los jales, c-f) evidencia de la biocementación en jales alcalinos y ácidos.

## 5. CONCLUSIONES

Dos bacterias ureolíticas (UB3 y UB5) aisladas de los jales mineros alcalinos “La Concha” en Taxco, Guerrero, México, fueron identificadas molecularmente como *Sporosarcina luteola*. Ambas cepas mostraron alta resistencia a metales pesados y tienen la capacidad de producir metalóforos y arsenóforos, como un mecanismo eficiente para disminuir la biodisponibilidad de los metales. Estas cepas precipitan  $\text{CaCO}_3$  (calcita y vaterita) y carbonatos de metales divalentes como rodocrosita (Mn), cerusita (Pb), otavita (Cd), estroncianita (Sr), hidrocincita (Zn), witherita (Ba) e hidromagnesita (Mg) en condiciones *in vitro*. Además, la inoculación de los jales alcalinos y ácidos con el cultivo mixto + urea y  $\text{CaCl}_2$  mostro mejor rendimiento para precipitar carbonatos, esenciales para inmovilizar metales divalentes a través de mecanismos de absorción y adsorción. La precipitación de carbonatos disminuye el tamaño de poro y la permeabilidad en los jales, por ello, evitaría la oxidación de los sulfuros residuales y disminuiría la liberación de metales tóxicos al ambiente. Finalmente, el aumento de pH en los jales ácidos indujo la precipitación de carbonatos y oxihidróxidos de Fe-Mn, otro mecanismo para inmovilizar metales altamente biodisponibles.

Por lo tanto, la aplicación de esta estrategia biotecnológica podría reducir la emisión de metales tóxicos de los desechos mineros y contribuiría a que la industria minera sea más amigable con el ambiente.

## 6. PERSPECTIVAS

- Determinar la especiación de los metales tóxicos en jales mineros ácidos y alcalinos tratados con el cultivo mixto.
- Elucidar por metagenómica que poblaciones microbianas participan en la hidrólisis de la urea en jales mineros bioestimulados.
- Analizar el genoma de *S. luteola* UB5 para identificar los mecanismos y vías metabólicas involucradas en la precipitación de carbonatos y la resistencia a metales.
- Patentar el proceso de formación de carbonatos *in situ* en jales mineros.

## 7. REFERENCIAS

- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C., Reddy, M.S., 2009. Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 433–438. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0514-7>
- Achal, V., Pan, X., Fu, Q., Zhang, D., 2012. Biomineralization based remediation of As(III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*. J. Hazard. Mater. 201–202, 178–84. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.067>
- Akafia, M.M., Harrington, J.M., Bargar, J.R., Duckworth, O.W., 2014. Metal oxyhydroxide dissolution as promoted by structurally diverse siderophores and oxalate. Geochim. Cosmochim. Acta 141, 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.06.024>
- Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J., So, J.-S., 2016. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springerplus 5, 250. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>
- Armienta, M.A., Talavera, O., Morton, O., Barrera, M., 2003. Geochemistry of Metals from Mine Tailings in Taxco, Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 387–393. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0176-0>
- Ayangbenro, A.S., Olanrewaju, O.S., Babalola, O.O., 2018. Sulfate-Reducing Bacteria as an Effective Tool for Sustainable Acid Mine Bioremediation. Front. Microbiol. 9, 1986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01986>
- Baek, K., Kim, D.-H., Park, S.-W., Ryu, B.-G., Bajargal, T., Yang, J.-S., 2009. Electrolyte conditioning-enhanced electrokinetic remediation of arsenic-contaminated mine tailing. J. Hazard. Mater. 161, 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.127>
- Bafana, A., 2011. Mercury resistance in *Sporosarcina* sp. G3. Biometals 24, 301–9. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9396-z>
- Brečević, L., Nöthig-Laslo, V., Kralj, D., Popović, S., 1996. Effect of divalent cations on the formation and structure of calcium carbonate polymorphs. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 92, 1017–1022. <https://doi.org/10.1039/ft9969201017>
- Buikema, N.D., Zwissler, B.E., Seagren, E.A., Oommen, T., Vitton, S., 2018. Stabilisation of iron mine tailings through biocalcification. Environ. Geotech. 5, 94–106. <https://doi.org/10.1680/jenge.16.00006>
- Burbank, M.B., Weaver, T.J., Williams, B.C., Crawford, R.L., 2012. Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria. Geomicrobiol. J. 29, 389–395. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.575913>
- Camizuli, E., Scheifler, R., Garnier, S., Monna, F., Losno, R., Gourault, C., Hamm, G., Lachiche, C., Delivet, G., Chateau, C., Alibert, P., 2018. Trace metals from historical mining sites and past metallurgical activity remain bioavailable to wildlife today. Sci. Rep. 8, 3436. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20983-0>
- Chang, L.L., Howie, R.A., Zussman, J., 1997. Rock-forming minerals. Vol. 5B, Non-silicates. Geological Society.
- Chen, X., Achal, V., 2019. Biostimulation of carbonate precipitation process in soil for copper immobilization. J. Hazard. Mater. 368, 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.108>
- Chen, X., Guo, H., Cheng, X., 2018. Heavy metal immobilisation and particle cementation of tailings by biomineralisation. Environ. Geotech. 5, 107–113. <https://doi.org/10.1680/jenge.15.00068>

- Chen, Y.Y., Weaver, C.A., Burne, R.A., 2000. Dual functions of *Streptococcus salivarius* urease. *J. Bacteriol.* 182, 4667–9. <https://doi.org/10.1128/jb.182.16.4667-4669.2000>
- Cheng, L., Shahin, M.A., 2019. Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization BT - Ecological Wisdom Inspired Restoration Engineering, in: Achal, V., Mukherjee, A. (Eds.), . Springer Singapore, Singapore, pp. 47–68. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0149-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0149-0_3)
- Cheng, Y., Guo, Z., Liu, X., Yin, H., Qiu, G., Pan, F., Liu, H., 2009. The bioleaching feasibility for Pb/Zn smelting slag and community characteristics of indigenous moderate-thermophilic bacteria. *Bioresour. Technol.* 100, 2737–2740. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.038>
- Cogram, P., 2018. Jarosite. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.10960-1>
- D. Dermatas, P. Arienti, G. Shen, Weathering of lead in fort Irwin firing range soils, *Global Nest.* 2 (2004). 171-179.
- de León-Lorenzana, A.S., Delgado-Balbuena, L., Domínguez-Mendoza, C., Navarro-Noya, Y.E., Luna-Guido, M., Dendooven, L., 2017. Reducing Salinity by Flooding an Extremely Alkaline and Saline Soil Changes the Bacterial Community but Its Effect on the Archaeal Community Is Limited. *Front. Microbiol.* 8, 466. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00466>
- DeJong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez, B.C., Nelson, D.C., 2010. Bio-mediated soil improvement. *Ecol. Eng.* 36, 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.029>
- Dermont, G., Bergeron, M., Mercier, G., Richer-Lafèche, M., 2008. Metal-Contaminated Soils: Remediation Practices and Treatment Technologies. *Pract. Period. Hazardous, Toxic, Radioact. Waste Manag.* 12, 188–209. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)1090-025x\(2008\)12:3\(188\)](https://doi.org/10.1061/(asce)1090-025x(2008)12:3(188))
- Dhami, N.K., Reddy, M.S., Mukherjee, A., 2013. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Front. Microbiol.* 4, 314. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00314>
- Dótor-Almazán, A., Armienta-Hernández, M.A., Talavera-Mendoza, O., Ruiz, J., 2017. Geochemical behavior of Cu and sulfur isotopes in the tropical mining region of Taxco, Guerrero (southern Mexico). *Chem. Geol.* 471, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2017.09.005>
- Fergusson, J.E., 1990. *The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects.* Pergamon Press, Oxford, England
- Fujita, Y., Redden, G.D., Ingram, J.C., Cortez, M.M., Ferris, F.G., Smith, R.W., 2004. Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 3261–3270. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2003.12.018>
- Gadde, R.R., Laitinen, H.A., 1974. Heavy metal adsorption by hydrous iron and manganese oxides. *Anal. Chem.* 46, 2022–2026. <https://doi.org/10.1021/ac60349a004>
- Gasparatos, D., 2013. Sequestration of heavy metals from soil with Fe–Mn concretions and nodules. *Environ. Chem. Lett.* 11, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10311-012-0386-y>
- Ghosh, M., P. Singh, S., 2005. A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of Its By-products. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 3. [https://doi.org/10.15666/aeer/0301\\_001018](https://doi.org/10.15666/aeer/0301_001018)
- González-Martínez, A., de Simón-Martín, M., López, R., Táboas-Fernández, R., Bernardo-Sánchez, A., 2019. Remediation of Potential Toxic Elements from Wastes and Soils:

- Analysis and Energy Prospects. Sustainability 11, 3307. <https://doi.org/10.3390/su11123307>
- Govarthanan, M., Lee, K.-J., Cho, M., Kim, J.S., Kamala-Kannan, S., Oh, B.-T., 2013. Significance of autochthonous *Bacillus* sp. KK1 on biomineralization of lead in mine tailings. Chemosphere 90, 2267–2272. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.038>
- Gražulis, S., Daškevič, A., Merkys, A., Chateigner, D., Lutterotti, L., Quirós, M., Serebryanaya, N.R., Moeck, P., Downs, R.T., Le Bail, A., 2012. Crystallography Open Database (COD): an open-access collection of crystal structures and platform for world-wide collaboration. Nucleic Acids Res. 40, D420–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr900>
- Gutiérrez, M., Mickus, K., Camacho, L.M., 2016. Abandoned PbZn mining wastes and their mobility as proxy to toxicity: A review. Sci. Total Environ. 565, 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.143>
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S.D., 2003. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4901–9. <https://doi.org/10.1128/aem.69.8.4901-4909.2003>
- Hammes, F., Verstraete, W., 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1, 3–7. <https://doi.org/10.1023/a:101513562915>
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdiscip. Toxicol. 7, 60. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Janarthine, S.R.S., Eganathan, P., 2012. Plant Growth Promoting of *Endophytic Sporosarcina aquimarina* SjAM16103 Isolated from the Pneumatophores of *Avicennia marina* L. Int. J. Microbiol. 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/532060>
- Kadiyala, V., Nirola, R., Kuppusamy, S., Palanisami, T., Naidu, R., Mallavarapu, M., 2016. Abandoned metalliferous mines: ecological impacts and potential approaches for reclamation. Rev. Environ. Sci. Bio/Technology 15. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9398-6>
- Kang, C.-H., Choi, J.-H., Noh, J., Kwak, D.Y., Han, S.-H., So, J.-S., 2014a. Microbially Induced Calcite Precipitation-based Sequestration of Strontium by *Sporosarcina pasteurii* WJ-2. Appl. Biochem. Biotechnol. 174, 2482–2491. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1196-4>
- Kang, C.-H., Han, S.-H., Shin, Y., Oh, S.J., So, J.-S., 2014b. Bioremediation of Cd by Microbially Induced Calcite Precipitation. Appl. Biochem. Biotechnol. 172, 2907–2915. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0737-1>
- Kang, C.-H., Kwon, Y.-J., So, J.-S., 2016. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. Ecol. Eng. 89, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.023>
- Kang, C.-H., Oh, S.J., Shin, Y., Han, S.-H., Nam, I.-H., So, J.-S., 2015. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. Ecol. Eng. 74, 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.10.009>
- Karaca, Ö., Cameselle, C., Reddy, K.r., 2017. Mine tailing disposal sites: contamination problems, remedial options and phytocaps for sustainable remediation. Rev. Environ. Sci. Bio/Technology. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9453-y>
- Kawaguchi, T., Decho, A.W., 2002. A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO<sub>3</sub> polymorphism. J. Cryst. Growth 240, 230–235. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(02\)00918-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(02)00918-1)

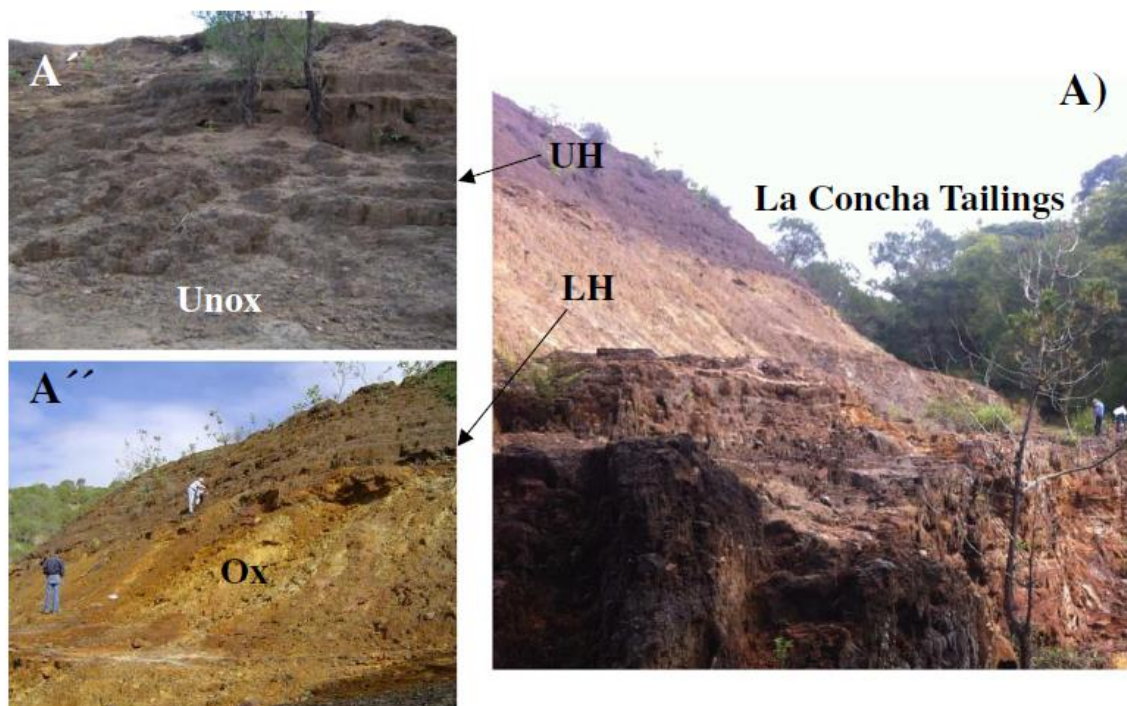
- Knobloch, D., Ostermann, K., Rödel, G., 2012. Production, Secretion, and Cell Surface Display of Recombinant *Sporosarcina ureae* S-Layer Fusion Proteins in *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 560 LP – 567. <https://doi.org/10.1128/aem.06127-11>
- Kossoff, D., Dubbin, W.E., Alfredsson, M., Edwards, S.J., Macklin, M.G., Hudson-Edwards, K.A., 2014. Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. *Appl. Geochemistry* 51, 229–245. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.09.010>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumari, D., Qian, X.-Y., Pan, X., Achal, V., Li, Q., 2016. Microbially-induced Carbonate Precipitation for Immobilization of Toxic Metals. *Adv. Appl. Microbiol.* 94, 79–108. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.12.002>
- Li, K., Ramakrishna, W., 2011. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *J. Hazard. Mater.* 189, 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.02.075>
- Li, M., Cheng, X., Guo, H., 2013. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 76, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.016>
- Lian, B., Chen, Y., Zhu, L., Yang, R., 2008. Effect of Microbial Weathering on Carbonate Rocks. *Earth Sci. Front.* 15, 90–99. [https://doi.org/10.1016/s1872-5791\(09\)60009-9](https://doi.org/10.1016/s1872-5791(09)60009-9)
- Lindsay, M.B.J., Moncur, M.C., Bain, J.G., Jambor, J.L., Ptacek, C.J., Blowes, D.W., 2015. Geochemical and mineralogical aspects of sulfide mine tailings. *Appl. Geochemistry* 57, 157–177. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.01.009>
- Loeppert, R., Suarez, D., 1996. Carbonate and Gypsum. In: Sparks, (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 3.* 3rd ed. ASA and SSSA, Madison, 437–474.
- Martin, T.A., Ruby, M. V., 2004. Review of in situ remediation technologies for lead, zinc, and cadmium in soil. *Remediat. J.* 14, 35–53. <https://doi.org/10.1002/rem.20011>
- McCoy, D.D., Cetin, A., Hausinger, R.P., 1992. Characterization of urease from *Sporosarcina ureae*. *Arch. Microbiol.* 157, 411–416. <https://doi.org/10.1007/bf00249097>
- Mugwar, A.J., Harbottle, M.J., 2016. Toxicity effects on metal sequestration by microbially-induced carbonate precipitation. *J. Hazard. Mater.* 314, 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.039>
- Mujah, D., Shahin, M.A., Cheng, L., 2017. State-of-the-Art Review of Biocementation by Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization. *Geomicrobiol. J.* 34, 524–537. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1225866>
- Ngole-Jeme, V.M., Fantke, P., 2017. Ecological and human health risks associated with abandoned gold mine tailings contaminated soil. *PLoS One* 12, e0172517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172517>
- Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M.C., Ventosa, A., Quesada, E., Ruiz-Berraquero, F., 1989. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2385–90.
- Nordstrom, D., Blowes, D.W., Ptacek, C.J., 2015. Hydrogeochemistry and microbiology of mine drainage: An update. *Appl. Geochemistry* 57, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.02.008>

- Norgate, T., Jahanshahi, S., Rankin, W., 2006. Assessing the environmental Impact of metal production processes. *J. Clean. Prod.* 15, 838–848. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.06.018>
- Okuyay, T.O., Rodrigues, D.F., 2015. Biotic and abiotic effects on CO<sub>2</sub> sequestration during microbially-induced calcium carbonate precipitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv017>
- Omoregie, A.I., Ong, D.E.L., Nissom, P.M., 2019. Assessing ureolytic bacteria with calcifying abilities isolated from limestone caves for biocalcification. *Lett. Appl. Microbiol.* 68, 173–181. <https://doi.org/10.1111/lam.13103>
- Ortiz-Soto, R., Leal, D., Gutierrez, C., Aracena, A., Rojo, A., Hansen, H.K., 2019. Electrokinetic remediation of manganese and zinc in copper mine tailings. *J. Hazard. Mater.* 365, 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.048>
- Pan, X.L., 2009. Microbiologically induced carbonate precipitation as a promising way to in situ immobilize heavy metals in groundwater and sediment. *Res. J. Chem. Environ.* 13:3–4
- Park, M.-J., Yoon, M.-H., Nam, I.-H., 2014. Characterization of Urease-Producing Bacteria Isolated from Heavy Metal Contaminated Mine Soil. *Korean J. Soil Sci. Fertil.* 47, 391–397. <https://doi.org/10.7745/kjssf.2014.47.6.391>
- Pourret, O., Lange, B., Bonhoure, J., Colinet, G., Decrée, S., Mahy, G., Séleck, M., Shutcha, M., Faucon, M.-P., 2016. Assessment of soil metal distribution and environmental impact of mining in Katanga (Democratic Republic of Congo). *Appl. Geochemistry* 64, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.07.01>
- Priyodip, P., Balaji, S., 2019. A Preliminary Study on Probiotic Characteristics of *Sporosarcina* spp. for Poultry Applications. *Curr. Microbiol.* 76, 448–461. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01647-2>
- Ritcey, G.M., 1989. Tailings management : problems and solutions in the mining industry. Amsterdam : Elsevier Science Publishers ; New York : Elsevier Science Pub. Co.
- Román-Ponce, B., Ramos-Garza, J., Arroyo-Herrera, I., Maldonado-Hernández, J., Bahena-Osorio, Y., Vásquez-Murrieta, M.S., Wang, E.T., 2018. Mechanism of arsenic resistance in endophytic bacteria isolated from endemic plant of mine tailings and their arsenophore production. *Arch. Microbiol.* 200, 883–895. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1495-1>
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S., Bestervelt, L.L., 2013. Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* 53, 303–317. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Su, J., Jin, L., Jiang, Q., Sun, W., Zhang, F., Li, Z., 2013. Phylogenetically diverse ureC genes and their expression suggest the urea utilization by bacterial symbionts in marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *PLoS One* 8, e64848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064848>
- Talavera-Mendoza, O., Yta, M., Moreno-Tovar, R., Dótor-Almazán, A., Flores-Mundo, N., Duarte-Gutiérrez, C., 2005. Mineralogy and geochemistry of sulfide-bearing tailings from silver mines in the Taxco, Mexico area to evaluate their potential environmental impact. *Geofísica Int.* 44, 49–64.
- Tamayo-Figueroa, D.P., Castillo, E., Brandão, P.F.B., 2019. Metal and metalloid immobilization by microbiologically induced carbonates precipitation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 58. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2626-9>



- Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9, 678–87. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment, in: *Experientia Supplementum* (2012). pp. 133–164. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6)
- Tominaga, T., An, S.-Y., Oyaizu, H., Yokota, A., 2009. *Sporosarcina luteola* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55, 217–23.
- Verma, S., Kuila, A., 2019. Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environ. Technol. Innov.* 14, 100369. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Williams, C.L., Preston, T., Hossack, M., Slater, C., McColl, K.E.L., 1996. *Helicobacter pylori* utilises urea for amino acid synthesis. *Pathog. Dis.* 13, 87–94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1996.tb00220.x>
- Xiao, R., Wang, S., Li, R., Wang, J.J., Zhang, Z., 2017. Soil heavy metal contamination and health risks associated with artisanal gold mining in Tongguan, Shaanxi, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 141, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.002>
- Xie, W., Peng, C., Wang, H., Chen, W., 2017. Health Risk Assessment of Trace Metals in Various Environmental Media, Crops and Human Hair from a Mining Affected Area. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 1595. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121595>
- Yadav, A.K., Jamal, A., 2018. Impact of mining on human health in and around mines. *Environ. Qual. Manag.* 28, 83–87. <https://doi.org/10.1002/tqem.21568>
- Yang, J., Pan, X., Zhao, C., Mou, S., Achal, V., Al-Misned, F.A., Mortuza, M.G., Gadd, G.M., 2016. Bioimmobilization of Heavy Metals in Acidic Copper Mine Tailings Soil. *Geomicrobiol. J.* 33, 261–266. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1068889>
- Yao, Z., Li, J., Xie, H., Yu, C., 2012. Review on Remediation Technologies of Soil Contaminated by Heavy Metals. *Procedia Environ. Sci.* 16, 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.099>
- Yu, X., Qian, C., Xue, B., 2016. Loose sand particles cemented by different bio-phosphate and carbonate composite cement. *Constr. Build. Mater.* 113, 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.03.105>
- Zhou, C., Bhinderwala, F., Lehman, M.K., Thomas, V.C., Chaudhari, S.S., Yamada, K.J., Foster, K.W., Powers, R., Kielian, T., Fey, P.D., 2019. Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection. *PLOS Pathog.* 15, e1007538. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007538>

## ANEXOS.



Anexo 1. (Tomada de [Dotor-Almazan et al., 2017](#)). Jales alcalinos y acidificados “La Concha”. A´ UH=Horizonte superior alcalino (pH~8.4), no oxidado y A´´ LH=Horizonte inferior ácido (pH=<2), zona oxidada.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos aplicados a los microcosmos experimentales

Tratamientos <sup>a</sup>	Tipo de jales	pH	CRA <sup>b</sup> (g Kg <sup>-1</sup> )	Inoculantes			Tipo de tratamiento	Objetivo
				Cultivo mixto UB3+UB5 <sup>c</sup>	2.5 M urea	0.3 M CaCl <sub>2</sub> .		
<b>T1</b>	Alcalino	8.1	279.6	Si	Si	Si	Bioaumentación	Evaluar la capacidad del cultivo mixto para precipitar carbonatos en los jales mineros
<b>T2</b>	Alcalino	8.1	279.6	Si	Si	-	Bioaumentación	Evaluar la capacidad del cultivo mixto para precipitar carbonatos sin adición de calcio externo
<b>T3</b>	Alcalino	8.1	279.6	-	Si	Si	Bioestimulación	Evaluar la habilidad de la microbiota ureolítica nativa para producir carbonatos
<b>UT</b>	Alcalino	8.1	279.6	-	-	-	Control negativo	Mantener la misma CRA que los otros tratamientos
<b>T1</b>	Ácido	2.2	347.1	Si	Si	Si	Bioaumentación	Evaluar la capacidad del cultivo mixto para precipitar carbonatos en los jales mineros
<b>T2</b>	Ácido	2.2	347.1	Si	Si	-	Bioaumentación	Evaluar la capacidad del cultivo mixto para precipitar carbonatos sin adición de calcio externo
<b>T3</b>	Ácido	2.2	347.1	-	Si	Si	Bioestimulación	Evaluar la habilidad de la microbiota ureolítica nativa para producir carbonatos
<b>UT</b>	Ácido	2.2	347.1	-	-	-	Control negativo	Mantener la misma CRA que los otros tratamientos

<sup>a</sup>Cada tratamiento incluye 24 unidades experimentales. <sup>b</sup>CRA=Capacidad de retención de agua. <sup>c</sup>Inóculo con 10<sup>9</sup> células/ml.