**Objetivos**

**¿La exposición de los objetivos refleja la importancia del tema y es consistente con el desarrollo del trabajo?: No**

**¿Por qué?: No se incluye el interés de los autores de comparar dos tipos diferentes de bacterias en cuanto a su clasificación Gram.**

No fue incluida la comparación de los tipos de bacterias en cuanto a su clasificación al Gram pues no constituyó objetivo del trabajo. La intención al referirnos a estos grupos fisiológicos en la discusión fue relacionar la composición química de la pared celular que aportan los grupos funcionales presentes en esta estructura y que son responsables de la unión a metales. De esta manera, se sustenta que independiente que responda de manera positiva o negativa al Gram, ambas tienen posibilidades de disponer de ligandos para los cationes. No obstante, atendiendo a las sugerencias realizadas para la discusión, la forma de redacción que proponemos ahora no resalta esta comparación, lo cual consideramos que fue motivo del criterio tan acertado emitido por el árbitro.

**Metodología**

**¿Explica cómo se llevó a cabo el estudio o investigación?: No**

**¿Por qué?: La redacción de la sección "Pretratamiento de la biomasa" es confusa. La redacción pareciera que se trata de una secuencia de tratamientos hacia una sola muestra. En la sección de resultados se observa que cada tratamiento es una condición independiente. También al explicar los resultados de dichos tratamientos, el lector se entera por primera vez que la biomasa se inactivo. No queda claro si esto fue intencional (autoclave) o si dicha inactivación se debió a los tratamientos a los que se somete a las bacterias.**

Estamos de acuerdo con el criterio emitido por el árbitro. A continuación se propone una nueva redacción del acápite de Pretratamiento de la biomasa, ubicado en la metodología.

¨Los cultivos bacterianos colectados por centrifugación a las 24 horas de crecimiento se inactivaron por calor seco a 60 oC en estufa durante 12 horas. La acción del tratamiento sobre la viabilidad celular se comprobó mediante la siembra en agar nutriente de las biomasas tratadas. Posteriormente las células inactivadas se trataron por separado con soluciones de HCL 0.1 M por 3 horas y de KOH 0.1 M por 2 horas. Transcurrido estos tiempos se realizaron lavados con agua destilada hasta que el pH alcanzó un valor de 6.0. Después de cada tratamiento, la biomasa se lavó con agua bidestilada y se secó en estufa a 60°C durante 12 horas para su puesta en contacto con el cinc y el cadmio. Como control del experimento se empleó biomasa microbiana no tratada (células vivas).¨

**Discusión**

**¿Explica los resultados y los compara con el estado del conocimiento sobre el tema?: No**

**¿Por qué?: Los primeros seis párrafos (pag. 12-13) deberían de estar en la introducción. Es información relacionada al marco teórico, donde los autores explican ciertos conceptos y justifican los métodos utilizados. Lo mismo ocurre con la información presentada en la página 14 y 15, antes de discutir los resultados, se escribe uno o dos párrafos con información de otros estudios explicando el marco conceptual.**

Estamos muy de acuerdo con los criterios emitidos sobre la redacción de la discusión. Esta se ha reelaborado considerando la utilización adecuada de la bibliografía en la propia discusión de los resultados. De esta manera no es necesario que aparezca la información en la introducción. No obstante, la sometemos nuevamente a su consideración.

¨Los resultados obtenidos (Figura 1) permiten inferir que la naturaleza polianiónica de la pared celular de *Proteus mirabilis*, caracterizada por la membrana externa de lipopolisacáridos y fosfolípidos, ofrece abundantes grupos funcionales como carboxilos, fosfatos e hidroxilos para la unión de cinc y cadmio (Sharma *et al*., 2016). Otros sitios activos en esta estructura implicados en el enlace de estos metales son: aminos, hidroxilo y sulfatos (Goswami *et al*., 2017). Disponer de estos ligandos posibilita que los metales se puedan ubicar en la región polar de la membrana o dentro de la capa de peptidoglicano, todo lo cual puede sustentar el comportamiento de esta bacteria frente a los metales ensayados. Por otro lado, en *Bacillus subtilis,* el contacto con los cationes puede ser por la presencia de ácidos teicoicos y teicurónico, asociados a los derivados de azúcares N-acetil murámico y N-acetil glucosamina, los que son una fuente de grupos fosfatos y carboxilos que ofrecen carga negativa a la superficie celular. De esta manera, se favorece la unión electrostática entre la célula y los iones metálicos y consecuentemente la captura de metales (Sharma *et al*., 2016). La composición química de las envolturas celulares de ambas bacterias puede constituir una vía para explicar sus capacidades de remover los iones cinc y cadmio.

Otras propiedades inherentes a los procariontes, que sustentan las interacciones que se pueden establecer entre *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, y los iones metálicos, son la elevada relación superficie-volumen (Uthra y Kadirvelu, 2017), las características metabólicas (Kvasnová *et al*., 2017) y genéticas que facilitan la adsorción y absorción de metales disueltos en solución acuosa (Chauhan *et al*., 2017). Al considerar la absorción, como un posible mecanismo presente en las dos bacterias, la captura de los iones cinc y cadmio también pudiera ocurrir por acumulación intracelular. Este mecanismo mediado por sistemas de proteínas transportadoras que incorporan los metales al citoplasma ha sido referido para otras especies bacterianas en la captura de diferentes iones metálicos (Beltrán-Pineda, 2016; Hansda *et al*., 2016; Muñoz *et al*., 2017).

Los niveles de captura de cinc y cadmio alcanzados por *Proteus mirabilis* y *Bacillus subtilis*, cumplen con el criterio de selección informado en la literatura donde se plantea que para competir con tecnologías convencionales, en la eliminación de metales, el agente activo, en este caso el microorganismo, debe tener una capacidad de captura superior a 15 mg.g-1 (Brierley *et al*., 1985; Cañizares-Villanueva, 2000). Esto permite ratificar que las bacterias constituyen uno de los grupos microbianos de interés en el estudio de la remoción de metales (Ramya y Thatheyus, 2017). Resultados similares se han informado para las especies microbianas *Pseudomonas mendocina* (Ps-1) (Carballo *et al*., 2017), *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* (Uthra y Kadirvelu, 2017) y *Klebsiella* sp. 3S1 (Muñoz *et al*., 2017)*.*

La remoción de cinc y cadmio por *B.~~acillus~~ subtilis* y *P.~~roteus~~ mirabilis* en las dos fases de crecimiento evaluadas (Figura 2), sugiere la participación de manera conjunta de mecanismos de acumulación intracelular y extracelular de metales. Esto se deduce por la capacidad de captar ambos metales durante las diferentes fases de crecimiento, tanto en una fase de crecimiento exponencial avanzado como en fase estacionaria. La manifestación de un metabolismo activo está involucrada con un proceso de bioacumulación, mientras que la captura extracelular depende de las interacciones entre los cationes metálicos y los grupos activos de la superficie celular, lo cual puede ocurrir durante todo el ciclo celular. Igualmente se han explicado resultados similares obtenidos en trabajos previos (Ghaima *et al*., 2017).

No obstante, es importante tener en cuenta que la acumulación extracelular puede depender tanto de un metabolismo activo o no, al considerar que en las diferentes etapas fisiológicas de los cultivos microbianos es posible que ocurran alteraciones en los grupos funcionales, presentes en la pared celular, involucrados en los procesos de unión del metal a la biomasa, tal y como se ha referido en otras investigaciones (Fan *et al*., 2014; Ghaima *et al*., 2017). Los diferentes comportamientos de los microorganismos en el análisis de este factor biótico permiten plantear que la relación entre la captura de los metales y la edad del cultivo va a depender del tipo de microorganismo y sus características genéticas, así como de la especie metálica.

En relación a los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la concentración celular sobre la capacidad de captura en las bacterias evaluadas (Figura 3), un incremento en la concentración de células puede ocasionar una interferencia entre los sitios de unión del metal y la biomasa, lo cual puede provocar una disminución en el atrapamiento del catión. Resultados similares han sido informados por diferentes autores en la remoción de iones metálicos por biomasas bacterianas (Limcharoensuk *et al*., 2015; Choińska-Pulit *et al*., 2018). Esto puede explicar lo ocurrido en las muestras analizadas de *Bacillus subtilis*.

La disminución de los valores de captura de cinc y cadmio a pH 5.0, por las dos bacterias evaluadas (Figura 4) confirman que la biosorción depende de la protonación o la desprotonación de los grupos funcionales sobre la pared celular. En estas concentraciones los iones hidronio (H3O+) aumentan y la alta movilidad iónica que presentan favorece la competencia entre estos y el catión metálico por los grupos funcionales de unión al metal en la biomasa microbiana. El predominio que existe a este valor pH de cargas positivas en la superficie de la célula, que evitan la unión de las especies metálicas cargadas positivamente, se ha informado con anterioridad (Li *et al*., 2016). Otros trabajos han referido resultados similares en la remoción de metales por diferentes biomasas bacterianas (Fan *et al*., 2014; Limcharoensuk *et al*., 2015).

Los incrementos en la captura de los iones cinc y cadmio por *Proteus mirabilis* y *Bacillus subtilis* a valores de pH neutro o cercanos a este puede deberse a la presencia de menor cantidad de protones H+ libres en la solución, lo que consecuentemente disminuye la competencia entre estos y los iones metálicos. Además, la existencia de una menor protonación en los sitios activos de las biomasas, conlleva aun predominio de grupos cargados negativamente en la superficie celular, lo que provoca una intensificación de las fuerzas electrostáticas involucradas en el proceso de captura de los metales (Ghaima *et al*., 2017). Así, los ligandos en la superficie de la biomasa permiten que la reacción con los cationes sea mayor y aumente la cantidad de iones enlazados a la biomasa. Comportamientos semejantes se han detectado en la remoción de metales por diferentes biomasas microbianas (Limcharoensuk *et al*., 2015; Li *et al*., 2016; Carballo *et al*., 2017).

Los resultados de la evaluación de la dinámica de remoción de los iones por las biomasas bacterianas (Figura 5), están en correspondencia con las características propias de estos procesos de captura de cationes metálicos por microorganismos, el cual ocurre fundamentalmente de forma rápida en los primeros tiempos de contacto biomasa-metal. Esta particularidad reviste gran importancia para el diseño y operacionalidad del proceso. Tal y como ocurre en el presente trabajo, otros autores señalan la existencia de dos fases en el proceso de captura de metales. No obstante, destacan que el tiempo en que se alcanza el equilibrio puede variar desde minutos hasta días, lo que dependerá del tipo de biosorbente y de la especie metálica, entre otros factores (Nwidi y Agunwamba, 2015; Ling *et al*., 2016; Uthra y Kadirvelu, 2017, Zhang *et al*., 2017).

La acción favorable del tratamiento por calor seco aplicado a *Bacillus subtilis* y *Proteus mirabilis*, para esta última, con excepción de la remoción del cinc(Figura 6), en relación al control puede estar dado por la eliminación de impurezas presentes en la superficie celular y por lo tanto una mayor exposición de los grupos funcionales de unión a metales. La muerte celular de las dos bacterias, comprobada por la ausencia de crecimiento en agar nutriente después del tratamiento, condicionó un estado metabólicamente inactivo de estas células tratadas, en las que están ausentes los sistemas de transporte que permitirían la bioacumulación del metal y por tanto, es posible una mayor capacidad de biosorción en la superficie celular. En el caso de las biomasas inactivadas, tratadas con HCl y KOH, presentaron variaciones en sus propiedades de enlazar los metales. Este resultado es coincidente con los informados por otros autores (Hansda *et al*., 2016). Los agentes químicos aplicados en el presente trabajo pueden potenciar las interacciones electrostáticas, pues facilitan la formación de condiciones óptimas para el intercambio iónico e incrementan los sitios de unión para los cationes metálicos. De esta manera se han sustentados resultados previos (Zeraatkar *et al*., 2016).

Está bien documentado que en el proceso de biosorción está involucrada fundamentalmente la pared celular y que su modificación puede potenciar la captura de los iones metálicos (Barange *et al*., 2014; Hansda *et al*., 2016). Otros autores refieren que la efectividad de los tratamientos va a depender entre otros factores de la especie metálica y del microorganismo (Mota *et al*., 2016), así como del mecanismo o submecanismo que gobierna la captura de los iones por las biomasas microbianas (Kiran *et al*., 2016). No obstante han sido bien respaldados en la literatura como alternativa para incrementar la remoción de metales (Shoaib *et al*., 2013).¨

**Otros comentarios.**

**El artículo requiere trabajo de edición y corrección, antes de su publicación.**

**La estructura y el diseño del artículo es muy similar a la referencia: Carballo, M. E., Martínez, A., Salgado -Bernal I., Pérez L., Cruz, M.; Liva M.B.; Allende S.; Rodríguez M.M.; & Garza, Y. (2017).**

**Standardization of variables involved in cadmium and zinc microbial removal from aqueous solutions. Biotecnología Aplicada, 33, 1221-1225.**

**Los autores deben de justificar la innovación y originalidad del trabajo presentado.**

En el presente trabajo se evalúan dos cepas microbianas diferentes a las utilizadas en el trabajo publicado en la revista Biotecnología Aplicada. Además, no son totalmente coincidentes los factores evaluados que influyen en la remoción de los metales. No obstante, teniendo en cuenta la sugerencia, en la introducción incluimos la necesidad de esta investigación, la cual responde a la innovación y originalidad del trabajo.

**La introducción debe de ser corregida. Mucha de la información que corresponde a esta sección se presenta en la sección de discusión.**

En la introducción se consideró incluir algunos de los factores que influyen en el proceso de remoción de los metales. La información que se sugiere que pase de discusión a la introducción fue más trabajada y reelaborada en la propia discusión.

**No se describen las características o importancia ambiental de las dos bacterias que se usan para el estudio. Se presenta en las conclusiones que una de estas bacterias es Gram positiva y la otra Gram negativa.**

En correspondencia con lo expresado anteriormente que no fue objetivo comparar entre Gram positivas y Gram negativa, lo cual se ha arreglado en el trabajo, proponemos sustituir en las conclusiones los términos bacteria Gram positiva y Gram negativa por los nombre de las dos bacterias evaluadas. De esta manera quedaría en las conclusiones como se pone a continuación:

¨Los valores de captura de cinc y cadmio por las biomasas microbianas evidenciaron las potencialidades de *Bacillus subtilis* y *Proteus mirabilis* para la eliminación de estos metales presentes en soluciones acuosas.¨

La importancia ambiental que tiene ambas bacterias es que por las capacidades que presentan de capturar los iones de cinc y cadmio pueden ser prometedoras para su aplicación futura en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con estos metales. Si bien *Bacillus subtilis* no se informa como un agente patógeno a los seres humanos, en el caso de *Proteus mirabilis* si causa infecciones en el tracto urinario. No obstante, la posibilidad que ofrecen los resultados con las biomasas inactivadas constituye una condición favorable de aplicación sin riesgo ambiental y en particular para la salud. Esta consideración se ha incluido de manera más explícita en las conclusiones, a las que en general se les corrigió la redacción.

**No se describen en esta sección todos los factores que influyen en la sorción de los metales pesados.**

Proponemos mencionar algunos de estos factores, lo cual se ha incluido en la introducción, sin necesidad de describir los mismos lo cual resultaría en extender demasiado la introducción.

**La metodología debe de ser descrita de manera más clara para explicar mejor los pretratamientos que se utilizaron, incluyendo la justificación de los autores para aplicar dichos pretratamientos. Dicha información se presenta en la discusión.**

Esta parte esperamos que haya quedado con más claridad después de la nueva redacción, ubicada en la pregunta sobre la metodología.

**La sección de discusión contiene una mezcla de marco teórico y discusión de resultados. Debe de ser re-escrita para separar claramente ambas secciones.**

De manera similar, esta parte ha sido re-escrita y se la proponemos a su consideración.

**Correcciones puntuales**

En la página 2, definir/especificar qué es "altas concentraciones" o qué

se puede considerar como una concentración alta.

Atendiendo a esta sugerencia, se especificó en cada metal trabajado los valores de estas concentraciones, considerando que la de todos los metales es muy variable.

El resto de las correcciones puntuales fueron realizadas en el documento