

# AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE BACTERIAS RESISTENTES A METALES PESADOS DEL ESTADO DE ZACATECAS

María del Refugio Vázquez Banda (1), D.C. Lenin Sánchez Calderón (2), D.C. César Díaz Pérez (3)

1 [Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Guanajuato] | cookiezvazquezbanda@gmail.com

2 [Docente Investigador, Doctorado en Ciencias Básicas, Campus II UAZ, Universidad Autónoma de Zacatecas] | xamachana22@gmail.com

3 [Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Sede Salvatierra, Universidad de Guanajuato] | cdp276@gmail.com

## RESUMEN

Zacatecas tiene aproximadamente 450 años en la actividad minera, debido a esto varios sitios se encuentran contaminados con metales pesados (MPs). La presa del Bote es uno de estos sitios, una antigua presa donde una de las más antiguas minas almacenaba sus desechos en ella, por lo que se han encontrado altas concentraciones de MPs como lo son plata, plomo, zinc, cobre, cadmio. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar aislados bacterianos que fueran capaces de resistir MPs. Se tomaron muestras de suelo de distintos puntos de la presa, de donde se logró seleccionar 22 aislados bacterianos diferentes con base en su morfología. Los aislados se confrontaron con arsénico, cromo, cobalto, cobre y zinc. Se observó que cuatro aislados, S1-06, S1-06\_2, S1-06\_2A, S1-09\_2, tuvieron tolerancia a altas concentraciones de los MPs probados. Se realizó la extracción de DNA genómico y se amplificó el gen ribosomal 16S del aislado S1-09\_2 para su caracterización molecular. Con la reconstrucción de la filogenia molecular del aislado se concluyó que este pertenece al género *Pseudomonas*. Se puede concluir en la presa del Bote del estado de Zacatecas es un sitio donde es factible asilar fácilmente bacterias que presenten mecanismos de resistencia a varios MPs.

## ABSTRACT

Zacatecas has approximately 450 years in the mining activity, due to this several sites are contaminated with heavy metals (MPs). The Bote's dam is one of these sites, since one of the oldest mines flows into it, due to this, it has have been found high concentrations of MPs as silver, lead, zinc, copper, cadmium. The goal of this work was to isolate and characterize resistant bacterial isolates that were able to withstand different concentrations of MPs. Soil samples were taken from different points of the dam. 22 different bacterial isolates were chosen based on their morphology. The isolates were confronted with arsenic, chromium, cobalt, copper and zinc; It was observed that four isolates are multi-resistant. These isolates are S1-06, S1-06\_2, S1-06\_2A, S1-09\_2. Genomic DNA extraction was performed and the 16S ribosomal gene was amplified. Whit Molecular phylogeny reconstructing the of one of the isolates (S1-09\_2) it was observed that isolate belongs to the genus *Pseudomonas*. It can be concluded that in The Bote's dam from Zacatecas, it is feasible to isolate bacteria that be heavy metal resistant.

## PALABRAS CLAVE

Metales pesados; Bacterias resistentes; Zacateas; Filogenia Molecular.

## INTRODUCCIÓN

Los MPs se definen como los metales que tienen una densidad mayor a  $5 \text{ g/cm}^3$  [1], entre los cuales se encuentra As, Pb, Co, Hg, Cr, Cd, Ni, Se y Zn [2]. Se ha observado que los MPs afectan a los microorganismos del suelo y esto causa un gran impacto en los ecosistemas [3]. Los MPs pueden llegar a ser tóxicos en concentraciones bajas [4] y son especies químicas no degradables.

Existen organismos como son algunas plantas, algas, bacterias y hongos que han desarrollado diversos mecanismos para adaptarse a lugares con elevadas concentraciones de MPs, tales como bombas de expulsión, defensa contra el estrés oxidativo y sistemas de reparación de DNA [5]. Los organismos que son resistentes a los MPs pueden ser usadas en procesos de biorremediación, los cuales pueden efectuarse en el mismo lugar donde se encuentra el contaminante, o bien separando la porción contaminada y trasladándola a un biorreactor [6].

El estado de Zacatecas tiene un gran número de ecosistemas que se encuentran alterados por la industria mineral, por lo que son un factor de selección para los microorganismos que se encuentran presentes [7], por lo que se pueden aislar bacterias resistentes a MPs de estos sitios.

Nuestro grupo de trabajo ha llevado a cabo el estudio de diversos sitios no explorados, con el fin de conocer la diversidad bacteriana de dichos ecosistemas. Continuando con estos estudios sistemáticos, en este trabajo se lograron aplicar las técnicas de microbiología y biología molecular, para poder aislar, identificar y caracterizar bacterias resistentes a MPs de la antigua mina del Bote, un predio seco con altas concentraciones de MPs, localizado en el estado de Zacatecas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Muestreo y toma de metadatos.
- Aislamiento de bacterias resistentes a MPs.
- Caracterización de las bacterias aisladas.
- Amplificación de los genes ribosomales.
- Filogenia molecular de los genes ribosomales de las bacterias resistentes a metales pesados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Muestreo y caracterización del sitio.

Se recolectaron muestras de tierra de la comunidad de Francisco I. Madero en el municipio de Zacatecas, Zac. El sitio se encuentra a una altitud de 2250 msnm y presenta un clima templado subtropical árido y llega a tener una temperatura de  $19 \text{ }^\circ\text{C}$ . El suelo es pobre en nutrientes ya que hay muy poca humedad. Las muestras se tomaron cuando son épocas de lluvia, esto es en el mes de junio. La contaminación de este sitio se debe principalmente a la actividad minera, y se han cuantificado altas concentraciones de Pb, Ni y Cd. Actualmente esta antigua presa es un terreno árido que está en un proceso de recuperación natural.

Anteriormente se han delimitado cinco zonas de estudio con base en su índice de riqueza de especies vegetales (datos en preparación). Este trabajo se centro es la búsqueda de aislados bacterianos del sitio marcado como 1. Se tomaron tres muestras de 1 kg de suelo de distintos puntos del sitio 1, las cuales se mezclaron para tener una muestra global, y tener una mejor representación de las bacterias que se encuentran en dicho sitio. Las muestras fueron guardadas a baja temperatura y se llevaron al laboratorio para su procesamiento.

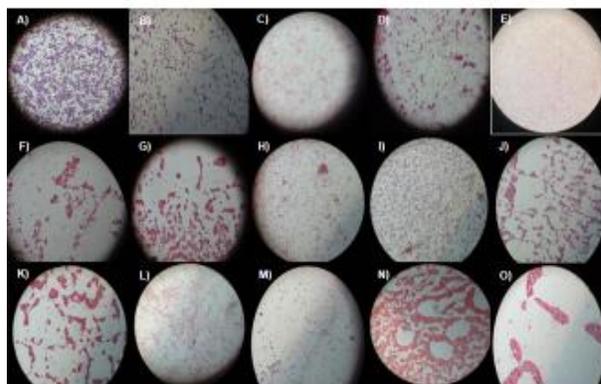
### Aislamiento de bacterias.

Para las muestras de suelo que fueron colectadas, se siguió la metodología de diluciones seriadas. Las diluciones se inocularon en un medio LB y nutritivo, y se crecieron de 2 a 3 días a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Solamente se obtuvieron colonias aisladas en las diluciones de  $10^{-3}$  hasta  $10^{-5}$ . Se creció por separado todas las colonias aisladas. Se procedió a hacer la caracterización morfológica de las colonias aisladas, para lo cual se consideraron ciertas características de la colonia como forma, color, margen y elevación. Teniendo en cuenta que su morfología colonial fuera diferencial, se obtuvieron 22 aislados bacterianos en total.

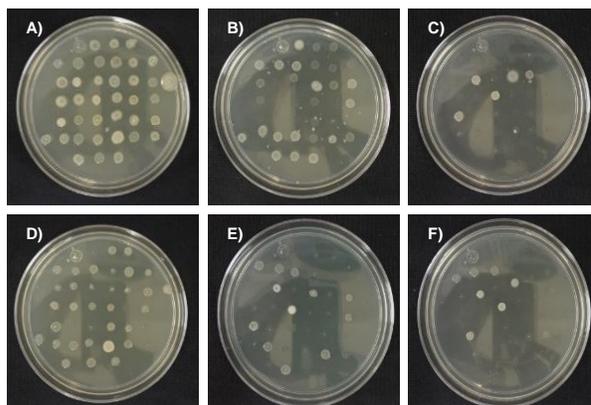
Para verificar que se contaba con cultivos axénicos, se hizo la tinción Gram de todas los aislados. Además, también se caracterizó la morfología microscópica de cada aislado (Figura 1). Morfológicamente observaron principalmente bacilos y cocos. (Tabla 1), el 50% de los aislados fueron Gram positivo y el otro 50% Gram negativo.

**Tabla 1. Morfologías celulares y tinciones Gram de los aislados Bacterianos**

Aislados bacterianos	Morfología	Tinción Gram
S1-01	Cocos	Gram Positivas
S1-02_1	Cocos	
S1-02_2	Cocos	
S1-05_1	Cocos	
S1-05_2	Bacilos	
S1-07_ext	Bacilos	
S1-09_1	Cocos	
S1-10_2	Bacilos	
S1-11_1	Cocos	
S1-11_3	Cocos	
S1-16	Bacilos	Gram Negativas
S1-03	Bacilos	
S1-06	Bacilos	
S1-06_2	Bacilos	
S1-06_2A	Cocos	
S1-07	Cocos	
S1-08	Cocos	
S1-08_2	Cocos	
S1-09_2	Cocos	
S1-12	Bacilos	
S1-14_2	Cocos	
S1-15	Bacilos	



**Figura 1. Morfología microscópica de algunos de los aislados.** A) S1-04; B) S1-05\_1; C) S1-06; D) S1-06\_2; E) S1-06\_2A; F) S1-07; G) S1-08; H) S1-08\_2; I) S1-09\_1; J) S1-09\_2; K) S1-10\_1; L) S1-11\_2; M) S1-12; N) S1-113; O) S1-14\_2.



**Figura 2. Crecimiento de aislados bacterianos en MPs.** A) Control; B) As 40 mM; C) Co 0.5mM; D) Cr 0.1mM; E) Cu 2.0mM; F) Zn 0.5mM.

### Caracterización de las capas aisladas

Se caracterizó la resistencia de los aislados bacterianos contra MPs. Para hacer un estudio preliminar, se confrontaron los aislados bacterianos contra una concentración baja y una concentración alta de As, Co, Cr, Cu, y Zn, con la finalidad de observar a los aislados que fueran capaces de resistir el mayor número de MPs.

Se pudo ver que varios de estos aislados son resistentes a los MPs, lo que indica que se tienen aislados multi-resistentes (Figura 2). Se observó que los aislados, S1-06, S1-06\_2, S1-06\_2A, S1-

09\_2, son multiresistentes, por lo que se decidió trabajar con estos.

Para conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de los aislados que fueron seleccionados, se confrontaron a concentraciones crecientes de MPs, los resultados se muestran en la (Tabla 2). Dado nuestro interés para trabajar con cobalto, se decidió trabajar con el aislado S1-09\_2, dado que es el aislado que mejor resiste a este MP.

**Tabla 2. Aislados bacterianos en las concentraciones mayores las que fueron expuestos.**

Nombre	As	Co	Cr	Cu	Zn
<b>S1-06</b>	40 mM	0.1 mM	0.1 mM	2.0 mM	0.5 mM
<b>S1-06_2</b>	40 mM	0.1 mM	0.1 mM	2.0 mM	0.5 mM
<b>S1-06_2A</b>	40 mM	0.1 mM	0.1 mM	2.0 mM	0.5 mM
<b>S1-09_2</b>	40 mM	0.5 mM	0.1 mM	1.0 mM	0.1 mM

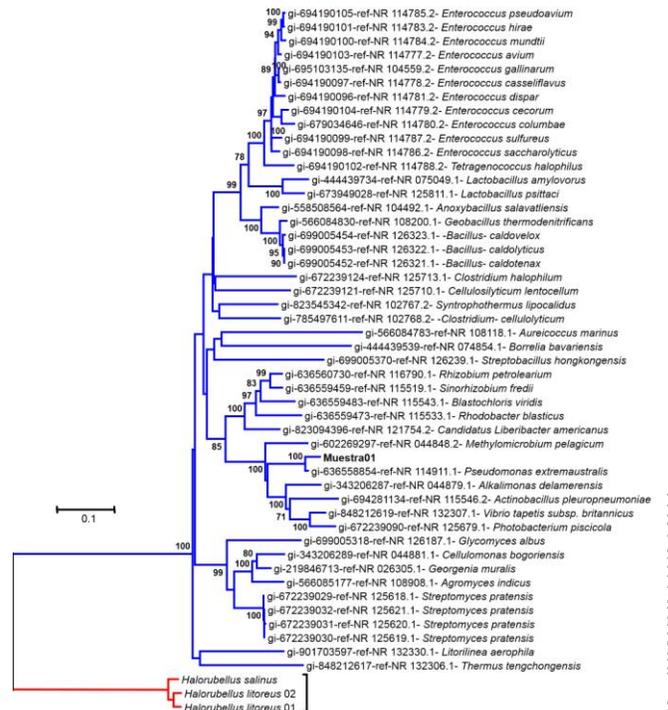
### Caracterización molecular del aislado S1-09\_2.

Después de que se obtuvo un grupo de aislados bacterianos con multi-resistencia a MPs, se procedió a caracterizar molecularmente al aislado S1-09\_2, para lo cual se extrajo y purificó su DNA genómico, mediante el método de purificación de ácidos nucleicos con CTAB y sales, lográndose obtener el DNA genómico con gran pureza.

Una vez aislado el DNA genómico, se llevó cabo la amplificación mediante PCR los genes ribosomales 16S de la bacteria seleccionada. Para esto se probaron distintas temperaturas de alineamiento. Se obtuvo que la mejor condición para el apareamiento de los oligos fue 62° C. Solo se observó una banda de aproximadamente 1.5 kpb, lo cual concuerda con lo esperado para el gen 16S bacteriano.

### Reconstrucción del árbol filogenético

Para ubicar filogenéticamente al aislado S1-09\_2, se reconstruyó un árbol filogenético, usando como base las secuencias de los genes ribosomales 16S de la base de datos del NCBI. Se utilizaron 43 secuencias bacterianas, tres secuencias de arqueas y se incluyó la secuencia del aislado S1-09\_2 (Muestra01). Las secuencias se alinearon con el programa T-COFFEE, y se reconstruyó el árbol usando el programa MEGA 6. Cuando se analizó el árbol filogenético (Figura 3) se pudo observar que la secuencia del aislado S1-09\_2 se agrupo con las cepas del género *Pseudomonas*, por lo que podemos concluir que este aislado pertenece a este género.



**Figura 3. Árbol filogenético de la cepa S1-09\_2. En azul se muestran las 48 secuencias de los genes ribosomales 16S bacterianos, y en rojo las 3 secuencias de genes de arqueas que sirvieron para enraizar el árbol. Se reconstruyó el árbol usando el método de NJ, con un bootstrap de 1000 repeticiones.**

### CONCLUSIONES

En la presente investigación se pudieron obtener 22 aislados bacterianos resistentes a metales

pesados de la presa del Bote del estado de Zacatecas. De los aislados cuatro fueron multi-resistentes, lo que sugiere una gran capacidad adaptativa de los organismos presentes en este sitio.

Uno de los aislados se identificó como miembro del género *Pseudomonas*, el cual presentó la mayor resistencia a Co, por lo que podemos deducir que presenta un mecanismo de expulsión de este metal.

Se puede concluir en la presa del Bote del estado de Zacatecas es un sitio donde es factible asilar fácilmente bacterias que presenten mecanismos de resistencia a varios MPs.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se llevó a cabo gracias al financiamiento DAIP-Universidad de Guanajuato, proyectos 979/2016 y 169/2016.

## REFERENCIAS

- [1] Nies, D.H., "Microbial heavy-metal resistance", *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 51, 6, 1999, pp. 730-50.
- [2] Duffus, J.H., "" Heavy metals" a meaningless term?(IUPAC Technical Report)", *Pure and applied chemistry.* Vol. 74, 5, 2002, pp. 793-807.
- [3] Giller, K.E., E. Witter, y S.P. McGrath, "Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review", *Soil Biology and Biochemistry.* Vol. 30, 10, 1998, pp. 1389-1414.
- [4] Ramirez-Diaz, M.I., C. Diaz-Perez, E. Vargas, H. Riveros-Rosas, J. Campos-Garcia, y C. Cervantes, "Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds", *Biometals.* Vol. 21, 3, 2008, pp. 321-32.
- [5] Wang, J. y C. Chen, "Biosorbents for heavy metals removal and their future", *Biotechnology advances.* Vol. 27, 2, 2009, pp. 195-226.
- [6] Bréant, D., Jézéquel, K., y Lebeau, T, 2002. Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd<sup>2+</sup>: influence of Cd<sup>2+</sup>, inoculum size, culture medium and alginate beads

characteristics. *Biotechnology Letters* 24: 1237-1241.

[7] Hemme, C.L., Y. Deng, T.J. Gentry, M.W. Fields, L. Wu, S. Barua, K. Barry, S.G. Tringe, D.B. Watson, y Z. He, "Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community", *The ISME journal.* Vol. 4, 5, 2010, pp. 660-672.