

## Aislamiento de microorganismos resistentes a los metales para producción de nanopartículas, provenientes de zonas contaminadas de Guanajuato, México

Andrea Lizeth Díaz Barajas<sup>1</sup>, Claudia Pérez Castaneda<sup>1</sup>, Aurelio Álvarez Vargas<sup>2</sup>, Alma Hortensia Serafin Muñoz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ingeniería Ambiental/Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental/ División de Ingenierías/ Campus Guanajuato/ Universidad de Guanajuato

<sup>2</sup>Departamento de Biología/ División de Ciencias Naturales y Exactas/ Campus Guanajuato/ Universidad de Guanajuato  
semuah@ugto.mx<sup>1</sup>

### Resumen

La contaminación por metales y metaloides tóxicos está en aumento cada día debido a las actividades antropogénicas. Los microorganismos y los productos microbianos pueden ser bioacumuladores muy eficaces de las formas solubles y particuladas de los metales. Las tecnologías relacionadas con los microbios como la nanotecnología pueden proporcionar desarrollo de metodologías innovadoras para la eliminación o recuperación de metales. Los microorganismos son sistemas útiles para la producción de nanopartículas metálicas biocompatibles. En este estudio se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización de bacterias resistentes a los metales pesados ( $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) procedentes de varios sitios contaminados de la ciudad de Guanajuato, México. Se seleccionaron catorce aislados bacterianos mediante un procedimiento de aislamiento por enriquecimiento basado en el alto nivel de resistencia a los metales pesados. Todos los aislados mostraron una alta resistencia a los metales pesados con una concentración mínima de inhibidores (MIC) que oscilaba entre 1 a 30 mM. Dos cepas aisladas mostraron tener la mayor capacidad para la producción de nanopartículas. Las bacterias resistentes obtenidas en este trabajo podrían ser utilizadas para la biorremediación de entornos contaminados con metales pesados y metaloides, así como en el desarrollo de técnicas de innovación sustentable en el campo de la nanotecnología.

**Palabras clave:** Nanotecnología, cromo, plomo, hierro, biorremediación.

### Abstract

Contamination by toxic metals and metalloids is increasing daily due to anthropogenic activities. Microorganisms and microbial products can be very effective bioaccumulators of soluble and particulate forms of metals. Microbial-related technologies such as nanotechnology can provide development of innovative methodologies for metal removal or recovery. Microorganisms are useful systems to produce biocompatible metal nanoparticles. In this study, the isolation and characterisation of bacteria resistant to heavy metals ( $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) from several contaminated sites in the city of Guanajuato, Mexico, was carried out. Fourteen bacterial isolates were selected by an enrichment isolation procedure based on their high level of resistance to heavy metals. All isolates showed high resistance to heavy metals with a minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 1 to 30 mM. Two isolates were shown to have the highest capacity for nanoparticle production. The resistant bacteria obtained in this work could be used for bioremediation of environments contaminated with heavy metals and metalloids, as well as in the development of sustainable innovation techniques in the field of nanotechnology.

**Keywords:** Nanotechnology, chromium, lead, iron, bioremediation.

## Introducción

Dentro del medio ambiente, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas con otro tipo de microorganismos teniéndose así cultivos mixtos, sin embargo, para llevar a cabo estudios en los que se involucre el uso de microorganismos o identificación y caracterización de estos es necesario llevar a cabo su aislamiento hasta obtener nuestro microorganismo de interés en un cultivo puro. El aislamiento de microorganismos consiste en la separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que lo acompañan. Esta separación se puede llevar a cabo a través de diversas técnicas.

La técnica más empleada para el aislamiento de bacterias es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido dispuesto en una placa Petri. Se realiza tomando una pequeña cantidad de muestra con un asa bacteriológica y se reparte sobre la superficie del medio en forma de zigzag.<sup>3</sup> Sin embargo, existen otros métodos con los cuales se pueden aislar microorganismos como lo es a través de la técnica del palillo, la cual consiste en sujetar con unas pinzas estériles un palillo y con este tomar parte de la muestra y colocarlo en una caja petri realizando cuatro estrías.

Estas técnicas tienen como objetivo obtener el cultivo de un sólo tipo microbiano en un medio de cultivo, es decir, obtener un cultivo puro, para lo cual se recomienda hacer un segundo aislamiento antes de considerar un cultivo completamente puro. Teniendo este cultivo podemos identificar las bacterias a través de distintas técnicas como la tinción de gram. Las tensiones son técnicas que permiten identificar microorganismos en función de la capacidad de estos para retener determinadas sustancias colorantes, lo cual depende de la carga de la célula y del colorante. Existen distintos tipos de colorantes: los catiónicos que son sustancias con carga positiva que penetran en el interior de la célula y la tiñen, entre éstos se encuentra el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina; el otro tipo son los aniónicos que poseen carga negativa y por lo tanto no penetran en el interior de la célula y no la tiñen, entre este tipo se encuentra la eosina y la nigrosina.<sup>3</sup> Las tinciones se clasifican en simples, diferencial o selectivas. En las primeras sólo se utiliza un colorante ya que se basa en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente al colorante. Por otro lado, las tensiones diferenciales se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción lo que permite clasificar a los microorganismos en diferentes grupos, dentro de este tipo se encuentra una de las tensiones más conocidas la Tinción de Gram.<sup>3</sup> Esta tinción permite clasificar a las bacterias en los grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. La técnica se basa en propiedades estructurales de la pared celular ya que las Gram positivas poseen como componente estructural un 90% de peptidoglucano mientras que las Gram negativo solo un 10%, así que si bien a ambos pueden ser teñidos por el colorante cristal violeta la diferencia radica en su resistencia a la decoloración. Debido a la gruesa pared celular que tienen las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta y se tiñen de morado, mientras que las Gram negativas se decoloran y para poder observarse se utiliza una coloración de contraste en donde normalmente se utiliza safranina permitiendo que estas bacterias tomen un color rosado.

Las nanopartículas, también llamadas nano polvos, nano racimos o nano cristales, son aquellos elementos microscópicos que poseen una dimensión menor a 100 nm y se encuentran en distintos medios sólidos, líquidos y gaseosos.<sup>2</sup> Estas nanopartículas son nanomateriales que tienen una alta afinidad con las sustancias absorbentes debido a su alta porosidad, pequeño tamaño y superficie activa por lo cual son también llamados nano absorbentes los cuales son capaces de secuestrar contaminantes con diferente tamaño molecular, hidrofobicidad y comportamiento de especiación, además de que éstos actúan con rapidez y tiene una buena capacidad de fijación de contaminantes. En la nano escala, los materiales presentan características únicas y debido a su pequeño tamaño poseen una gran superficie y una relación superficie/volumen, características que mejoran su capacidad de absorción. Debido a estas características las nanopartículas se han vuelto una alternativa para la eliminación de contaminantes sobre todo aquellos presentes en el agua por lo cual actuarían como una técnica para el tratamiento de aguas residuales. La síntesis de nanopartículas normalmente se lleva a cabo a través de métodos químicos y físicos pero a pesar de ser los más utilizados y de tener muchas ventajas también cuentan con desventajas, los métodos químicos utilizan numerosas sustancias peligrosas como agentes reductores de tensioactivos o reactivos que son tóxicos para el medio ambiente, mientras que los métodos físicos requieren maquinaria sofisticada que consume energía y es costosa, por lo tanto es necesario recurrir a alternativas para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas. La síntesis biológica es el método alternativo que no cuenta con todos los inconvenientes de los otros 2 métodos, además de que es más rentable y fácil. La ventaja de los microorganismos es que tienen numerosas biomoléculas que son clave a lo largo del proceso y que además encapsulan la

nanopartícula a manera de protección.<sup>5</sup> Los sistemas biológicos, especialmente con el uso de las bacterias, actúan como un candidato único para lograr la síntesis nanopartículas no peligrosas debido a su alta tasa de crecimiento, ya que una bacteria individual puede ser un centro para el crecimiento controlado de nanopartículas debido a que es importante que éstas conserven su mismo tamaño pequeño. La otra ventaja ante esta síntesis es que incluso si sólo tenemos una cepa bacteriana ésta se puede cultivar en diferentes ambientes formando diferentes nanopartículas en el mismo instante de tiempo, es decir, se pueden sembrar en presencia de diferentes elementos. El mecanismo exacto de formación de nanopartículas basadas en microbios no se conoce y la mayoría de los estudios proyectan un consenso sobre el metabolismo de los compuestos tóxicos por parte de las bacterias, después de lo cual se activa toda una gama de genes defensivos para combatir las toxicidades resultantes. Sin embargo, se conoce que a síntesis de nanopartículas se asocia directamente con la capacidad de las bacterias para crecer en medios con altas concentraciones de metales pesados, por lo cual entre más resistencia tenga a estos más factible será para la formación de nanopartículas. El objetivo del presente trabajo es estudiar la resistencia a metales y la capacidad de biosintetizar nanopartículas por las cepas aisladas.

## Metodología

El diagrama de la Figura 1 es una representación de las etapas que se llevaron a cabo a lo largo del proyecto comenzando con la toma de muestras en un túnel y en una presa para posteriormente realizar un análisis microbiológico llevando a cabo el aislamiento de microorganismos hasta encontrarse puros. Estos microorganismos fueron sembrados en medios con distintas concentraciones de metales para probar su resistencia ante estos y al final se realizó la comparación del crecimiento de cada cepa. Cada una de estas etapas se describirá de manera más detallada en los apartados siguientes.

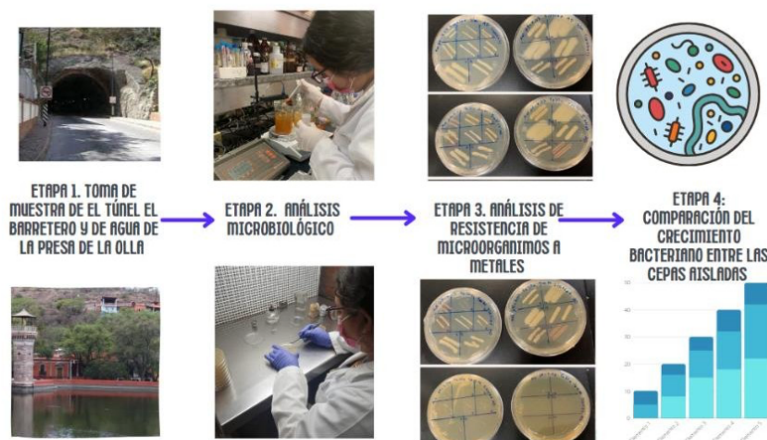


Figura 1. Metodología realizada a lo largo del proyecto.

### Etapa 1: toma de muestras y aislamiento de cepas

Para la realización del proyecto se tomaron muestras del Túnel El barretero que es uno de los más transitados en la ciudad de Guanajuato, se dejaron 2 Cajas Petri con medio de cultivo LB (TE1 y TE2) y 2 Cajas Petri con Agar Nutritivo (TE3 y TE4) abiertas en la entrada del túnel en un espacio no concurrido, se llevó a cabo la misma acción en la parte central del túnel (TM1, TM2, TM3 y TM4) y en la parte final de este (TF1, TF2, TF3 y TF4). Estas cajas permanecieron en el túnel durante aproximadamente una hora para asegurarnos que hubiera un buen crecimiento de microorganismos, transcurrido ese tiempo se llevaron al laboratorio y se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37.5°C. Simultáneamente se llevó a cabo la toma de muestra de agua de la Presa de la Olla, tomándose de la orilla de esta con un frasco estéril, la cual posteriormente se llevó al laboratorio en donde se guardó en el cuarto frío para evitar cambios en la muestra. Se prepararon medios de cultivo sólidos LB y Agar Nutritivo para la siembra de microorganismos provenientes de las muestras del túnel y la presa, a través del siguiente procedimiento:

1. En la balanza analítica se pesaron 5 gr de peptona biotriptosa, 2.5 gr de extracto de levadura, 5 gr de cloruro de sodio (NaCl) y 10 gr de Agar Bacteriológico para la preparación de 500 ml de medio de cultivo LB. Para la preparación de 500 ml de Agar Nutritivo se pesaron 4 gr de caldo nutritivo y 10 gr de Agar Bacteriológico.
2. En dos vasos de precipitado con 400 ml de agua destilada uno a uno se fue vertiendo los reactivos ya pesados para cada medio, los cuales se homogenizaron con un agitador magnético a 280 rpm.
3. Se ajustó el pH de los medios de cultivo para que estuviera a 7 o cercano utilizando Hidróxido de Sodio (NaOH) si el pH se encontraba muy ácido y Ácido Clorhídrico (HCl) si se encontraba muy básico.
4. Los medios de cultivo preparados se colocaron en una probeta que se aforó hasta los 500 ml con agua destilada para después verterlos en un Matraz Erlenmeyer y esterilizarlos en la autoclave a 15 libras de presión a 121 °C durante 15 minutos.
5. Posteriormente se enfriaron los medios hasta ser tolerables al tacto y dentro de la campana de extracción se vaciaron 500 ml de Agar Nutritivo en 20 cajas Petri y los otros 500 ml de LB en las cajas restantes.

Para la siembra en placa de la muestra se realizaron diluciones sucesivas de x10-10, x10-20 y x10-50 en Tubos de Eppendorf previamente etiquetados. En el primero se vaciaron 50µl de concentrado de agua, en el segundo 90µl de agua estéril y 10µl de concentrado de agua para x10-10, en el tercero 190µl de agua estéril y 10µl de concentrado de agua para x10-20 y en el último 490µl de agua estéril y 10µl de concentrado de agua para x10-50, preparadas las soluciones estas se mezclaron con un agitador vortex. Después se llevó a cabo la siembra en cajas previamente etiquetadas (Medio de cultivo, pH, fecha, PO y dilución), se tomaron 50µl de concentrado de agua y se vertieron sobre el medio en forma de gotas y con un asa triangular estéril se esparcieron hasta secar. Se tomó la misma cantidad para las diluciones de x10-10, x10-20 y x10-50 y se repitió el procedimiento realizado para el concentrado de agua. Realizada la siembra las cajas se incubaron a 37.5 °C por 24 horas. En Agar Nutritivo y medio LB de las muestras tomadas del túnel y de la presa se decidieron aislar las colonias que se muestran en la tabla 1, que fueron escogidas en base a su morfología, color y crecimiento.

**Tabla 1.** Colonias aisladas

Muestra	Núm. de colonias	Clave
TE2	4	TE2 1, TE2 2, TE2 3 y TE2 4
TE3	3	TE3 1, TE3 2 y TE3 3
TM2	3	TM2 1, TM2 2 y TM2 3
TM4	3	TM4 1, TM4 2 y TM4 3
TF2	3	TF2 1, TF2 2 y TF2 3
TF4	3	TF4 1, TF4 2 y TF4 3
PO	2	POBP y POBG

Todas las colonias se sembraron a través de la técnica del palillo exceptuando a POBG que sé que sembró con asa bacteriológica. Las cajas se dividieron en 3 partes para colocar las colonias de igual procedencia en una misma caja, únicamente TE2 4, POBP y POBG se sembraron solas. Con las pinzas estériles se tomó inóculo y se sembró en una Caja Petri previamente dividida y etiquetada, trazando cuatro líneas separadas en el medio de cultivo, este procedimiento se realizó para cada una de las colonias seleccionadas. El procedimiento con el asa bacteriológica es similar, se esteriliza el asa y con ella se toma la bacteria para sembrarla en la caja forma de zigzag. Realizada la siembra se sellaron las cajas y se incubaron a 37.5 °C por 24 horas. Para seleccionar las bacterias que se tendrían totalmente puras, de las anteriormente sembradas se escogieron algunas de acuerdo con su crecimiento y similitud para posteriormente medir la resistencia a los metales. Las bacterias que se resembraron fueron las siguientes:

- En Agar Nutritivo: TM4 2, TF4 2, TF4 3 y POBG.
- En medio de cultivo LB: TE2 3, TE2 4, TE3 1, TE3 2, TE3 3, TM2 1, TM2 2, TM4 3 y TF2 1

En un Tubo Falcon se vació el Caldo Nutritivo y a partir de ese se añadieron 6 ml del medio a cada uno de los 14 Tubos Falcon de 15 ml, uno por bacteria. Se sembró tomando inóculo con el palillo esterilizado y colocándolo en el tubo etiquetado para después meterlos en la incubadora a 37.5 °C. Pasadas las 24 horas se colocaron las muestras en Tubos de Eppendorf para utilizarlas en la Tinción de Gram. En cada uno de los portaobjetos previamente etiquetados se prepararon los frotis con 50 y 100  $\mu$ l de la muestra, este se cubrió con Cristal Violeta, se dejó actuar un minuto y se enjuagó con agua destilada, el mismo procedimiento se llevó a cabo con Yodo Lugol. Se añadió etanol – acetona hasta decolorar y después se lavó con agua destilada y por último se agregó safranina y se dejó actuar un minuto como con los primeros reactivos. Una vez realizada la tinción las bacterias fueron observadas en el microscopio óptico.

#### Etapa 2: análisis de resistencia de microorganismos a metales

1. Se prepararon 500ml de Agar Nutritivo a pH 7 y se esterilizó junto con 8 Matraces Erlenmeyer de 100 ml en la autoclave a 15 libras de presión a 121 °C durante 15 minutos.
2. En cada uno de los Matraces Erlenmeyer se llenó con 50 ml de Agar Nutritivo y estos fueron etiquetados de acuerdo con la concentración de sulfato ferroso que se les iba a añadir, las concentraciones fueron: 1mM, 2mM, 4mM, 8mM, 16mM, 18mM, 20mM y 30mM.
3. Con micropipetas de 200  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l se tomaron los microlitros correspondientes a cada una de las concentraciones y se añadieron al matraz correspondiendo, agitando en círculos para mezclar. La cantidad agregada de FeSO<sub>4</sub> de acuerdo la concentración se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Cantidad de Sulfato Ferroso agregado

Concentración de FeSO <sub>4</sub> (mM)	$\mu$ l agregados
1	50
2	100
4	200
8	400
16	800
18	900
20	1000
30	1500

4. Posteriormente los medios preparados con el sulfato ferroso se vaciaron en 2 Cajas Petri por concentración, se dejaron solidificar para después cerrarse, etiquetarse y sellarse. Debido a que eran 2 cajas por concentración y 14 bacterias, las cajas se cuadrícularon en 6 y 8 espacios.
5. Se le asignó una nueva clave a las bacterias que se iban a sembrar ya que el nombre que tenían hasta el momento era muy largo y abarcaba espacio de donde se iban a sembrar. En la tabla 3 se muestra la nueva clave que se les asignó.
6. Se sembraron con palillo las bacterias de acuerdo con su clave en cada una de las cajas con Agar Nutritivo.

Para medir la resistencia que tienen las bacterias a Cromo y Plomo, se llevó a cabo la siembra por la técnica del palillo en cajas que ya se encontraban preparadas con distintas concentraciones de estos metales.



**Tabla 3.** Claves de las bacterias

Clave	Bacteria
1	POBP
2	TM4 3
3	TM2 1
4	TE3 3
5	TE2 3
6	TF4 3
7	TM2 2
8	TM4 2
9	TF2 1
10	POBG
11	TF4 2
12	TE3 1
13	TE2 4
14	TE3 2

Etapa 3: comparación del crecimiento bacteriano entre cepas aisladas

En un Espectrofotómetro UV – visible Beckman DU-640 se llevó a cabo la medición de la absorbancia con una longitud de onda de 600 nm de cada una de las bacterias aisladas con el propósito de conocer el crecimiento bacteriano que es un factor de selectividad para aquellas que pueden ser aptas para la obtención de nanopartículas.

## Resultados

Las Figuras 2 y 3 representan como se colocaron las cajas en un punto estratégico a lo largo del túnel, estos puntos no estaban pavimentados, razón por la cual al final del muestreo el medio de cultivo tenía adherido tanto tierra como insectos.



Figuras 2 y 3. Toma de muestra en el túnel El Barretero

Se tomó una pequeña muestra de agua de la Presa de la Olla (figura 4) pues para la siembra no se necesitaría una cantidad excesiva. En la toma de muestra se observó que el agua de la presa se encontraba en malas condiciones, estando demasiado sucia ya que se podía ver dentro del agua, basura como vasos de plástico y hasta calcetines.



Figura 4. Toma de muestra en la Presa de la Olla

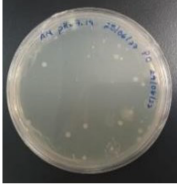
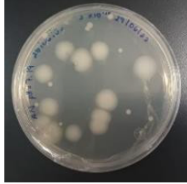

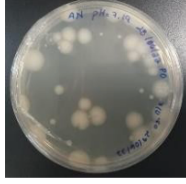
El crecimiento de microorganismos que se obtuvo como resultado de las muestras del túnel y de la presa se presenta en las tablas siguientes donde se observaron colonias con diferentes morfologías y colores entre los que destacaron el color naranja, amarillo, blanquecino y rosado. En la Tabla 4 se muestra el desarrollo que se tuvo a las 24 horas de incubación, observándose un mayor crecimiento en Agar Nutritivo que en medio de cultivo LB. Hubo una menor cantidad de colonias en las Cajas Petri que se colocaron en la entrada y una mayor en las que se colocaron en la parte de en medio esto debido a que hay una mayor concentración de contaminación por el paso constante de los coches en comparación de las orillas del túnel donde se está en contacto con aire libre. En las muestras tomadas en la parte de en medio del túnel, las colonias de TM1, TM2, TM3 y TM4 muestran una morfología menos definida en comparación de las que se observan en las muestras de la entrada y de la salida.

Tabla 4. Crecimiento de bacterias de las muestras del Túnel

Tiempo de incubación	Túnel El Barretero					
	Entrada / Inicio		Centro / En medio		Salida / Final	
24 horas						

En la Tabla 5 se muestra el crecimiento de las bacterias en cada una de las diluciones seriadas que se prepararon. Observándose que donde únicamente hay concentrado de agua se presenta un menor desarrollo que en las cajas con las diluciones, además de que solo se identificaron dos tipos de colonias con distinta morfología.

**Tabla 5.** Crecimiento de bacterias de la muestra de agua

Tiempo de incubación	Presa de la Olla			
	Concentrado de agua	x10 <sup>-10</sup>	x10 <sup>-20</sup>	x10 <sup>-50</sup>
24 horas				

Posterior al aislamiento de las bacterias seleccionadas se llevó a cabo el análisis microbiológico donde se pudo observar lo siguiente:

#### Bacterias aisladas de agua

- POBP: No se resembró debido a que se encontraba pura y completamente aislada.
- POBG: Se observaba mucho crecimiento que no se alcanza a apreciar bien por lo cual se decidió resembrar, pero ahora por el método del palillo para una mayor separación.

#### Bacterias aisladas de la entrada del túnel

- TE2 3 y TE3 3: Son parecidas en cuanto a morfología y crecimiento, pero se decidió volver a sembrar ambas tomando el inóculo de la primera estría alejada de las otras cepas.
- TE2 1 y TE3 1: Son similares en cuanto a morfología, se resembró TE3 1 por tener un crecimiento más controlado.
- TE2 2 y TE3 2: Tienen similitud en su morfología, sin embargo, la primera tuvo un gran crecimiento invadiendo el espacio de las otras bacterias por lo cual se descartó y se resembró TE3 2.

#### Bacterias aisladas del centro del túnel

- TM2 1 y TM4 3: Son similares y cuentan con coloración naranja – amarilla y se decidió resembrar ambas. TM4 3 fue invadida por TM4 1 por lo que el inóculo se tomó alejado de la bacteria invasora.
- TM2 3 y TM4 2: Son parecidas, pero se siguió aislando TM4 2 ya que presenta menos crecimiento que la primera en donde las estrias se mostraban muy juntas por lo cual era más fácil tomar inóculo de la bacteria similar.
- TM2 2 y TM4 1: Se observan con morfología idénticas, sin embargo, TM4 1 tuvo un mayor crecimiento llegando a invadir otras cepas por lo cual no era factible resembrarla y se optó por su parecida.

#### Bacterias aisladas del final del túnel

- TF4 1 y TF2 1: Son similares en cuanto a morfología. Se identificó que TF2 1 es una bacteria valiosa ya que se presentan propiedades antibióticas puesto que la bacteria TF2 3 intentó invadirla, pero esta se lo impidió creando una barrera por lo que esta se resembró.
- TF2 2 y TF4 3: Tienen morfologías iguales destacando un color blanquecino con un pequeño tono amarillo. Se aisló TF4 3 debido que TF2 2 fue invadida por otra bacteria impidiendo la toma de inóculo sin contaminarse.
- TF4 2 y TF2 3: Tienen comportamiento similar con un alto crecimiento llegando a sobrepasar los espacios de las otras bacterias, sin embargo, la segunda bacteria tuvo un mayor desarrollo que la primera llegando a invadir casi por completo las otras bacterias por lo cual se resembró la primera.



En la Figura 9 se muestran las 14 bacterias completamente aisladas y puras que se sembraron en los medios con metales.

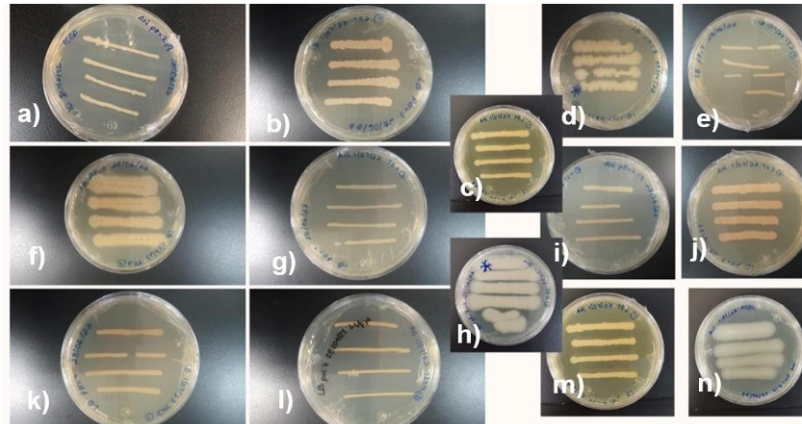
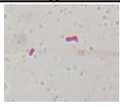

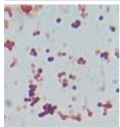

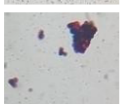
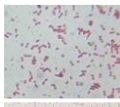

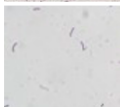
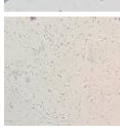

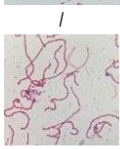

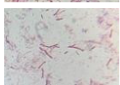


Figura 9. Bacterias completamente aisladas. a) POBP, b) TE2 4, c) TE2 1, d) TM2 2, e) TE2 3, f) TF2 1, g) TE3 3, h) TF4 2, i) TF4 3, j) TE3 2, k) TM2 1, l) TM4 3, m) TE3 1 y n) POBG.

Para llevar a cabo la identificación de estas bacterias se realizó la técnica de tinción de gram y se observó en el microscopio, obteniendo como resultado los datos que se encuentran en la tabla 6 donde se identifica la forma que tienen estas bacterias y si son gram positivas o gram negativas. Se identificó que aquellas bacterias que eran gram positivas tenían forma de cocos mientras que las gram negativas forma de bacilos. La TF4 2 no se analizó debido a que no se obtuvo crecimiento suficiente en el medio líquido. De igual forma algunas fueron difíciles de identificar pues al momento de mirarlás en el microscopio se veía de un color y cuando se les tomaba foto de otro, esto debido a que se utilizó un cristal violeta muy concentrado.

**Tabla 6.** Identificación de microorganismos

Bacteria	Color	Gram	Forma	Evidencia fotográfica
POBP	Morado	+	Cocos y diplococos	
TM4 3	Morado	+	Cocos y diplococos	
TM2 1	Morado	+	Cocos y diplococos	
TE3 3	Morado	+	Cocos y diplococos	
TE2 3	Morado	+	Cocos, diplococos y estafilococos	
TF4 3	Rosado	-	Bacilos y Diplobacilos	
TM2 2	Morado	+	Cocos y diplococos	
TM4 2	Morado	+	Cocos y diplococos	
TF2 1	Morado	+	Cocos	
POBG	Rosado	-	Bacilos y Diplobacilos	
TF4 2	/	/	/	/
TE3 1	Rosado	-	Estreptobacilos	
TE2 4	Rosado	-	Estreptobacilos	
TE3 2	Rosado	-	Bacilos y Estreptobacilos	

En la Figura 10 se observa que conforme hay un aumento en la concentración de hierro las bacterias dejan de presentar crecimiento. De igual forma se obtuvo como resultado que el metal inducía el color en las bacterias 1, 2, 3 y 14 volviéndose más intensos, además se observó que tanto la 2 y 3 presentan comportamientos similares al igual que las 10 y 11.

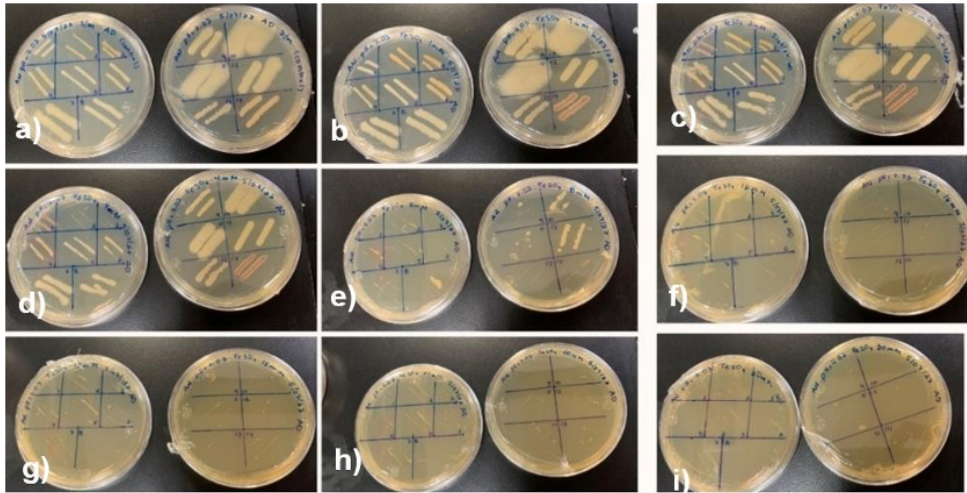


Figura 10. Resistencia de las bacterias a hierro a) Control, b)1mM FeSO4, c)2mM FeSO4, d)4mM FeSO4, e)8mM FeSO4, f)16mM FeSO4, g)18mM FeSO4, h)20mM FeSO4 e i)30mM FeSO4

En la Tabla 7 se representa con un + cuando las bacterias resistieron a la presencia del metal y con un – cuando las bacterias dejaron de crecer debido a la presencia del hierro. Se observa que la mayoría de las bacterias se dejaron de desarrollar a una concentración de 8 mM y a partir de los 16 mM no hubo crecimiento de ninguna.

Tabla 7. Resistencia de las bacterias al hierro

Clave	Bacterias	Concentración de sulfato ferroso (mM)								
		0	1	2	4	8	16	18	20	30
1	POBP	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	TM4 3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	TM2 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	TE3 3	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5	TE2 3	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6	TF4 3	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7	TM2 2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	TM4 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9	TF2 1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10	POBG	+	+	+	+	+	-	-	-	-
11	TF4 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-
12	TE3 1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
13	TE2 4	+	+	+	+	-	-	-	-	-
14	TE3 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-

La Figura 11 muestra el crecimiento de las bacterias a diferentes concentraciones de cromo teniendo como resultado un buen desarrollo a 2mM para bacterias como la 2, 3, 4, 8 10, 12 y 14 y teniendo un nulo crecimiento de la bacteria 2R que fue aislada al final. Sin embargo, al pasar a un medio con doble de concentración las bacterias ya no resistieron, únicamente la 8 se ve con un buen crecimiento y en 6mM se observó un bajo crecimiento para las bacterias.

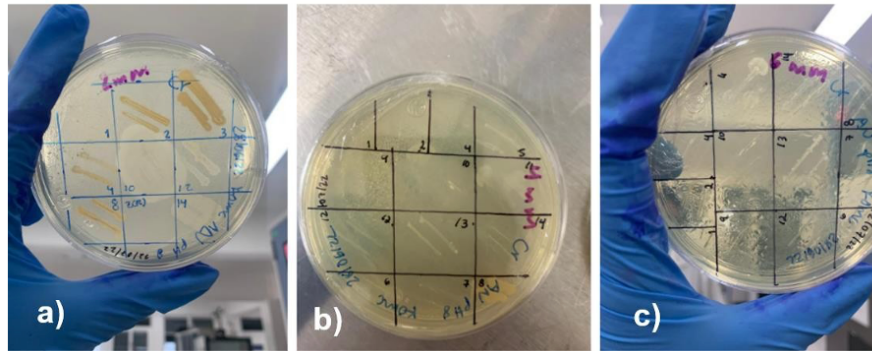


Figura 11. Resistencia de las bacterias a Cromo a)2mM Cr, b)4mM Cr, c)6mM Cr

En la tabla 8 se muestra como la mayoría de las bacterias no se desarrollaron ante la presencia de cromo siendo que a partir de la concentración de 8 mM hubo nulo crecimiento. La bacteria que tuvo más resistencia ante este metal fue la número 14 proveniente del túnel y la de menor fue la 2R. La caja que contenía una concentración de Cromo de 2mM ya se encontraba cuadrículada con menos espacios por lo cual en ella se decidieron sembrar distintas bacterias teniendo como referencia las que habían resistido ante la presencia de hierro y se obtuvo como resultado crecimiento en la mayoría, sin embargo, la mayoría solo creció a bajas concentraciones. El símbolo / representa aquellas que no fueron sembradas en ese medio.

Tabla 8. Resistencia de las bacterias al Cromo

Clave	Bacterias	Concentración de cromo (mM)									
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1	POBP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	TM4 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	TM2 1	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/
4	TE3 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	TE2 3	/	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	TF4 3	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	TM2 2	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	TM4 2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	TF2 1	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	POBG	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11	TF4 2	/	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	TE3 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	TE2 4	/	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14	TE3 2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2R	2R	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/

La figura 12 nos muestra la resistencia por parte de las bacterias ante la presencia de plomo donde a una concentración de 1mM apenas se logra percibir crecimiento de algunas bacterias, pero a una concentración de 4mM se observa una buena resistencia en las bacterias 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

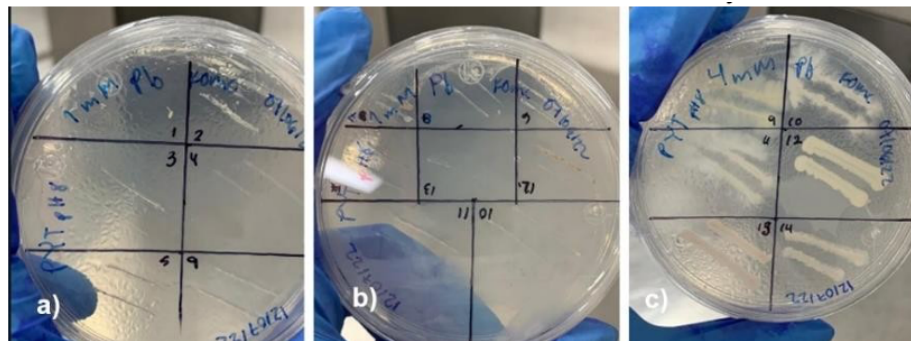


Figura 12. Resistencia de las bacterias a Plomo a)1mM Pb, b)1mM Pb, c)4mM Pb

La tabla 9 muestra una enorme variación en la resistencia que tienen las bacterias pues no se observa crecimiento a concentraciones bajas de 1 o 2 mM en la mayoría de las bacterias, pero al pasar a una concentración de 4 mM seis de ellas muestran crecimiento que en concentraciones pasadas no mostraron. Ninguna bacteria creció a una concentración de 2 mM ni de 6mM.

**Tabla 9.** Resistencia de las bacterias al Plomo

Clave	Bacterias	Concentración de Plomo (mM)			
		1	2	4	6
1	POBP	-	-	-	-
2	TM4 3	-	-	-	-
3	TM2 1	-	-	-	-
4	TE3 3	-	-	-	-
5	TE2 3	-	-	-	-
6	TF4 3	-	-	-	-
7	TM2 2	+	-	-	-
8	TM4 2	-	-	-	-
9	TF2 1	-	-	+	-
10	POBG	-	-	+	-
11	TF4 2	-	-	+	-
12	TE3 1	+	-	+	-
13	TE2 4	-	-	+	-
14	TE3 2	-	-	+	-

En la figura 13 se observa el crecimiento bacteriano entre las 14 cepas aisladas, se aprecia que la bacteria TF2 1 tiene un mayor crecimiento en comparación con las demás y que la cepa TM4 3 tiene un menor crecimiento.

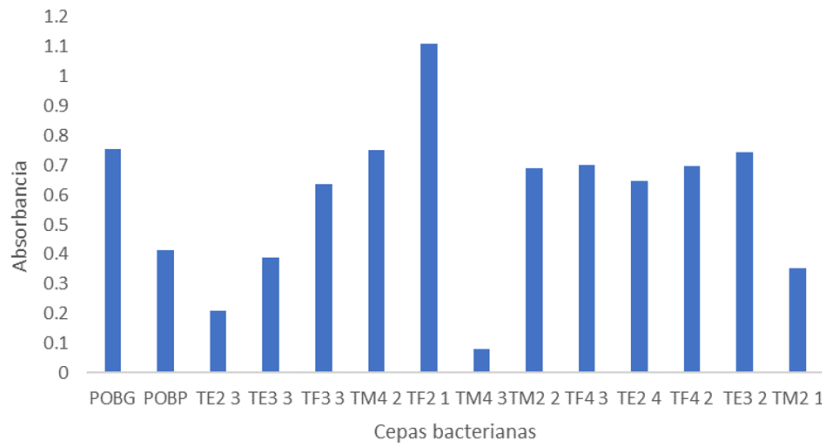


Figura 13. Comparación del crecimiento bacteriano entre 14 cepas por 24 horas ( $T=37.5^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH}=7$ ). Esta gráfica representa la selectividad para el uso potencial de las mismas en la obtención de nanopartículas.

## Discusión de resultados

En base a la tinción de gram las cepas TE2 4 y TE3 1 aunque a simple vista no se observaba, son similares, ya que a través del microscopio se pudo apreciar que ambas son gram negativas con forma de estreptobacillus que no se alcanzan a apreciar en otras cepas, esto se puede deber a que ambas provienen del mismo punto de muestreo, de la entrada del túnel. En cuanto a las demás cepas se clasificaron entre gram negativas y gram positivas siendo la mayoría gram negativas debido a las condiciones en las que se tomaron la muestra. En cuanto a las cepas aisladas de la presa de la olla, la tinción muestra que si se presentaron dos colonias diferentes pues POBG es gram negativa y tiene una forma de bacilo mientras que POBP es gram positiva con forma de cocos. En la resistencia a hierro se obtuvo que las bacterias dejaron de crecer a los 8mM habiendo solo crecimiento en la mitad de las cajas sembradas esto se puede deber a que



había mucha variación en las concentraciones de cada placa pues se fue aumentando el doble de hierro, probablemente se hubiera visto más crecimiento si se hubieran colocado concentraciones más cercanas y en lugar de pasar de 8 a 16 mM colocar un intermedio. En base a la resistencia mostrada al hierro las bacterias TM4 2, TF2 1, POBG, TF4 2, TE3 1 y TE3 2 son aptas para la formación de nanopartículas pues son las que crecieron a 8mM de hierro, la concentración más alta de crecimiento, pero principalmente la TE3 1 debido a que es la que se observa con un completo crecimiento ante este medio con hierro.

La mayoría de las bacterias no crecieron ante la presencia de estos metales, de tener una concentración hasta 20mM de cromo únicamente se tuvo crecimiento hasta 6 mM y solamente de 4 bacterias lo que indica que las bacterias aisladas son poco resistentes a este metal, la únicas que crecieron ante la presencia del cromo a 2, 4 y 6 mM fueron las cepas POBG y TE3 2. En cuanto al plomo hubo mucha variación en el comportamiento de las bacterias, puesto que a una concentración de 1mM resistieron dos bacterias mientras que a 2mM hubo nulo crecimiento, pero a 4mM se tuvo de nuevo crecimiento y en 6mM otra vez nulo. La variación de este crecimiento se puede deber a que la incubadora del laboratorio se encontraba mal calibrada pues la temperatura de esta variaba de los 30 °C a los 40 °C aproximadamente o que como los medios con estos metales ya se encontraban hechos se pudieron etiquetar mal las cajas. Los datos de absorbancia muestran que la cepa TF2 1 tiene una alta tasa de crecimiento por lo cual tiene una buena capacidad de síntesis de nanopartículas, mientras la cepa TM4 3 crece de manera muy lenta por lo cual sería poco apta para la síntesis mismo resultado que se observó al medir su resistencia ante los metales pues en hierro y cromo solo creció ante una concentración de 2mM y no resistió ante la presencia de plomo.

## Conclusión

Al obtener la resistencia que tienen cada una de las cepas aisladas a diferentes concentraciones de hierro, cromo y plomo se concluye que la cepa TE3 2 proveniente del túnel es la más apta para la producción de nanopartículas debido a que presentó un mayor crecimiento en comparación de las demás cepas, además de que las bacterias presentes en el túnel El Barretero es más resistentes a la presencia de los metales que las presentes en el agua de la presa. La biosíntesis de nanopartículas a través de estas bacterias tendría muchas ventajas en comparación con otros métodos como los químicos y físicos, además de que el uso de nanopartículas puede ser una alternativa para el tratamiento de aguas residuales ya que actúa como nano absorbente de contaminantes lo cual tendría varios beneficios medioambientales y sociales. El presente trabajo contribuye para el desarrollo de técnicas de innovación nanotecnológica sustentable con el uso de bacterias dentro del campo de la biorremediación.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al comité de Veranos UG 2022 y a la DAIP-UG por el apoyo otorgado, así como a la Secretaría del Edo de Guanajuato IdeaGTO, ya que este producto forma parte del proyecto Guanajuato Rumbo al Desarrollo Sustentable: Caso de Estudio Comunidades Sostenibles Etapa 2.0, (070/2021); 2021-2022.

## Referencias bibliográficas

- José, J., & Maldonado, V. (2017). NANOPARTÍCULAS DE METALES CEROVALENTES PARA PURIFICACIÓN DE AGUA.
- Remediación, L. A., & Contaminadas, D. E. A. (2020). Biosíntesis de nanopartículas de hierro (fe 3 o 4 ) en la remediación de aguas contaminadas. 24, 35–45.
- Ricardo, J., Virginia, M., & Albarracín, H. (2012). Aislamiento , cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. 5(5), 79–93.
- Troncoso, C., Lamilla, C., Llanquino, V., & Barrientos, L. (2017). Nanopartículas Sintetizadas por Bacterias Antárticas y sus Posibles Mecanismos de Síntesis. 35(1), 26–33.  
[https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022017000100005](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000100005)
- Wang, S. (2020). Microbial Biotechnology : Basic Research and Applications.