



AISLAMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES A METALES PESADOS DE LECHOS DE MINAS

César Díaz-Pérez^{1*}, Patricia Castro-Moreno², Blanca Estela Gómez-Luna¹, Juan Carlos Ramírez-Granados¹, Mauricio Nahuam Chávez-Avilés³ y Lenin Sánchez-Calderón⁴

¹*Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Sede Salvatierra, Universidad de Guanajuato.*

²*Unidad de Biomedicina, División de Investigación y Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.*

³*Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, División de Ingeniería Bioquímica, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo.*

⁴*Doctorado en Ciencias Básicas, Campus II UAZ, Universidad Autónoma de Zacatecas.*

*cesar.diaz@ugto.mx

Resumen

Los metales pesados son un problema de contaminación ambiental debido a su uso en diversas actividades económicas. En Zacatecas la actividad minera desde la colonia ha provocado que se generen sitios contaminados con metales pesados (MPs). La presa del Bote es el lugar donde se vertían las aguas de desecho de las minas más antiguas, debido a esto se han encontrado altas concentraciones de MPs como el arsénico. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar aislados bacterianos que sean capaces de resistir altas concentraciones de MPs. En la presa del bote, se realizó un muestreo aleatorizado dividiéndola en tres zonas. Se tomaron cinco muestras de cada, se aislaron las bacterias en medios LB y nutritivo, y se seleccionaron los aislados que tuvieran distintas morfologías para su estudio. Los aislados se confrontaron con Arsénico (como arsenito, AsV y arseniato, AsIII), Mercurio (HgII), Cromo (CrVI), Cadmio (CdII), Cobre (CuII), Zinc (ZnII) y Cobalto (CoII). Se obtuvieron 81 aislados resistentes a MPs, de los cuales 32 son multirresistentes. De los aislados multirresistentes la cepa S1-05-2 presentó la mayor resistencia a As, por lo que se caracterizó su resistencia en medio

líquido, confirmando que este aislado resiste altas concentraciones de estos MPs. Más aún, los resultados sugieren que en esta cepa el As puede servir como un inductor del crecimiento. Los resultados obtenidos sugieren que los aislados pueden ser valorados para desarrollar herramientas biotecnológicas para biorremediar suelos contaminados con MPs.

Palabras clave: Aislados bacterianos, resistencia, metales pesados

Introducción

Los metales pesados (MPs) se definen como los metales con densidad mayor a 5 g/cm^3 , entre los cuales se pueden nombrar al arsénico, plomo, cobalto, mercurio, cromo, cadmio, níquel, selenio y zinc (Lugun *et al.*, 2022). Los MPs son tóxicos a la mayoría de los organismos (Alvarez *et al.*, 2021), sin embargo, algunos organismos tales como plantas, algas, bacterias y hongos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a los MPs, por ejemplo, sistemas de expulsión que transportan a los MPs fuera de las células (Wang & Chen, 2009). Estos organismos y sus mecanismos asociados con la resistencia a los MPs, se han utilizado para el desarrollo de procesos eficientes para la biorremediación de sitios o materiales contaminados.

Actualmente, los MPs son un problema de salud pública ya que estos se pueden encontrar en el suelo urbano en concentraciones superiores a las permitidas por las normas mexicanas (Covarrubias & Cabriales, 2017), por lo que es necesario encontrar alternativas de biorremediación para su manejo. Los sitios contaminados con MPs son lugares excelentes para aislar microorganismos resistentes a estos que puedan ser utilizados en biotecnología (Nanda *et al.*, 2019). El estado de Zacatecas, en la región centro-norte de México, cuenta con una rica tradición minera desde la época colonial, por lo que se ha caracterizado un gran número de pasivos ambientales contaminados con MPs, de los cuales se han aislado microorganismos resistentes con posibles aplicaciones biotecnológicas (Pérea *et al.*, 2017; Escamilla *et al.*, 2021).

Objetivo

Aplicar un enfoque basado en técnicas de microbiología que permita aislar microorganismos resistentes a MPs con la posibilidad de ser usados en biorremediación.

Materiales y métodos

Muestreo y toma de metadatos

La toma de muestras se realizó a 20 km de la capital de Zacatecas, Zacatecas. El sitio se dividió en cinco zonas limitadas por su orografía y tipo de vegetación. Cada zona se dividió en transectos, de donde tomaron cinco muestras de un litro de suelo. Se recabaron la altura del sitio y temperatura ambiente. Cada muestra de suelo se diluyó en agua destilada (1:10), y el pH se midió en el laboratorio con un potenciómetro.

Aislamiento y caracterización morfológica

Se hicieron diluciones seriadas de las muestras de suelo que se obtuvieron en el paso anterior. Estas fueron sembradas en agar LB y nutritivo (CN), y se crecieron por 72 h a 25°C. Los aislados se clasificaron mediante tinción de Gram y sus características macro y microscópica.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Se prepararon cajas de agar nutritivo adicionado con concentraciones crecientes de cada uno de los metales: AsV (Na_2HAsO_4 ; 10-150 nM) AsIII (NaAsO_2 ; 1-7 mM), Cromo (K_2CrO_4 ; 0.1-1 mM), Cadmio (CdCl_2 ; 0.1-1 mM), Mercurio (HgCl_2 ; 0.1-0.5 mM), Cobre (CuCl_2 ; 1-10 mM), Zinc (ZnCl_2 ; 1-5 mM) y Cobalto (CoCl_2 ; 0.1-1 mM). Se inocularon tubos de CN y se crecieron por 18 h en agitación a 25° C. En cada una de las cajas con distinta concentración del MP se inocularon 2 μL (100 UFC) de inóculo y se incubaron por 120 h a 25°C. Se hicieron observaciones cada 24 h.

Curvas de susceptibilidad.

Se inocularon tubos de caldo nutritivo adicionado con concentraciones crecientes de cada uno de los metales: AsV (0-4000 μM) AsIII (0-800 μM), CrVI (0-100 μM), CdII (0-5 μM), HgII (0-5 μM), CoII (0-100 μM), CuII (0-500 μM) y ZnII (0-50 μM) y se incubaron en agitación a 25 °C durante 18 h. Se midió la absorbancia a 590 nm. Los datos fueron graficados en el programa GraphPad Prism 5.

Resultados

Muestreo y caracterización del sitio

Las muestras del suelo fueron colectadas en la comunidad de Francisco I. Madero, ubicada en el municipio de Zacatecas, Zac. El sitio, contaminado con desechos de la actividad minera, está a una altitud de 2250 msnm. Presenta un clima templado subtropical árido con una temperatura promedio de 19 °C. La precipitación anual va de los 200 a los 300 mm. El suelo es pobre en nutrientes con poca retención de humedad. Las muestras fueron tomadas en el mes de junio, en época de lluvias. Se colectó en cinco zonas dentro del sitio, el pH del suelo fue de 4.

Caracterización de los aislados

Se procedió a aislar los microorganismos de las muestras mediante la técnica de diluciones seriadas. Se observó que en las cajas de las diluciones de 10^{-3} a 10^{-5} crecieron colonias aisladas, las cuales se inocularon en agar nutritivo. Se recabaron las características de las colonias aisladas y se determinó su morfología colonial. En total se obtuvieron 81 aislados con morfología colonial diferencial. Una vez obtenidos los aislados, se les efectuó la tinción Gram y se observaron al microscopio para describir su morfología. Se observaron principalmente bacilos y cocobacilos. También se observaron cepas en donde la morfología y el tamaño de las células, asemejan levaduras, además se encontraron nueve aislados que por su morfología fue difícil clasificarlas.

Confrontación de los aislados a MPs

Con el fin de caracterizar la resistencia de los aislados a los MPs, estos se confrontaron con siete MPs distintos: AsV y AsIII, CrVI, CdII, HgII, CuII, ZnII y CoII (Figura 1). Se observó que hubo crecimiento de todas las cepas en al menos un MP, 68 fueron resistentes a dos MPs y 32 fueron resistentes a más de tres MPs.

Una vez que se probó la resistencia de aislados a los MPs, se procedió a determinar la MIC de seis aislados de la colección que eran multirresistentes (Tabla 1). De estos se observó que el aislado S1-05-2 tenía la mayor resistencia a AsV (120 mM), por lo que se decidió caracterizarlo con mayor detalle. Dado que es de nuestro interés a futuro implementar soluciones de biorremediación a As, se procedió a caracterizar la resistencia del aislado S1-05-2.

Caracterización de la resistencia a MPs del aislado S1-05-2

Para este fin se efectuaron curvas de susceptibilidad en medio líquido. Se comprobó que el aislado es resistente a AsV, AsIII, CrVI, CdII, HgII, CoII, CuII y ZnII. Se observó que el aislado S1-05-2 tenía un mejor crecimiento en bajas concentraciones de arseniato que en el medio sin MP (Figura 2). La concentración inhibitoria de crecimiento para AsV fue de 3000 μM , para CdII fue de 5 μM , para HgII fue de 4 μM y para CoII fue de 60 μM . También se observó que este aislado crece en concentraciones superiores a 800 μM de AsIII, 100 μM de CrVI, 500 μM de CuII y 50 μM de ZnII.

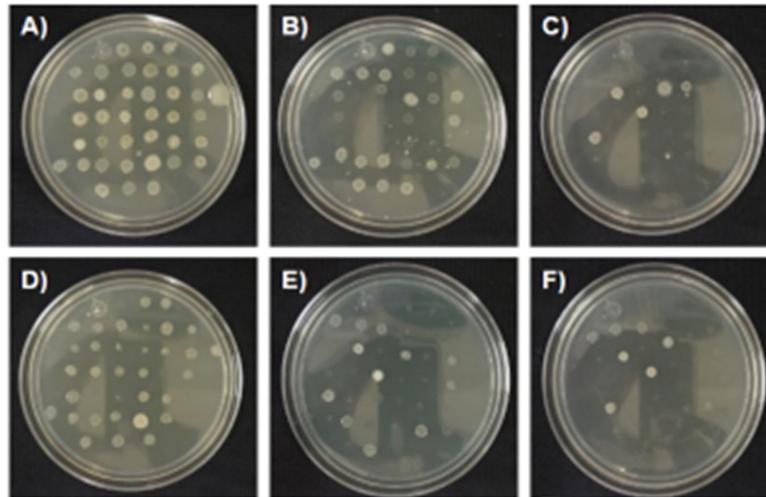


Figura 1. Crecimiento de las cepas aisladas en presencia de metales pesados. A) Control sin MPs, B) AsV 40 mM, C) Coll 0.5mM, D) CrVI 0.1mM, E) Cull 2.0mM, F) ZnII 0.5mM.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de los ocho metales probados contra los aislados.

Aislado	Concentración mínima inhibitoria (mM)							
	AsV	AsIII	CrVI	CdII	HgII	Coll	Cull	ZnII
S1-02-1	100	5	0.5	0.2	0.1	0.5	3	2
S1-02-2	100	5	0.4	0.2	0.2	0.5	3	2
S1-04-2	40*	3*	0.5	0.5	0.1*	0.5	1	1
S1-05-2	120	5*	0.5	ND	0.1*	0.5	1	1
S1-07	100	5	ND	ND	0.2	0.5	2	1
S1-08	100	5	ND	0.2	0.1	0.5	2	1

ND= no determinado

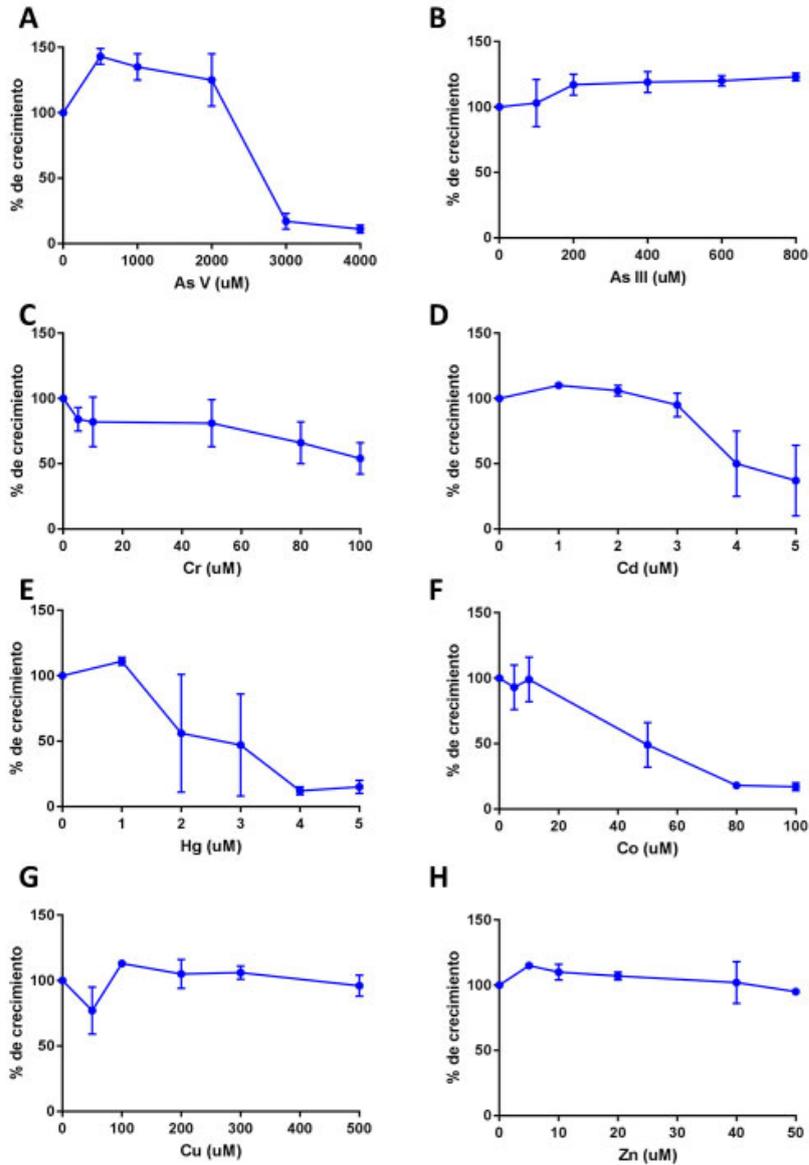


Figura 2. Curvas de susceptibilidad en medio líquido del aislado S1-05-2. A) AsV, B) AsIII, C) CrVI, D) CdII, E) HgII, F) CoII, G) CuI, H) ZnII. Los cultivos se crecieron durante 18 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de MPs que se muestran. Se determinó el crecimiento bacteriano por densitometría a 600nm después de 18 h de crecimiento. Se graficó una $n=3\pm EE$.



Discusión

En el estado de Zacatecas existen un gran número de ecosistemas alterados por la acción de la industria minera. En los sitios contaminados es posible aislar microorganismos que son resistentes que pueden ser usados como herramientas biotecnológicas (Covarrubias & Cabriales, 2017; Pérea *et al.*, 2017; Escamilla *et al.*, 2021). La presa del bote, en el estado de Zacatecas, es uno de los jales mineros contaminados con MPs como As y Hg debido al mal manejo de estos. En este trabajo se lograron aislar 81 aislados de dicho sitio con características bacterianas que fueron resistentes a al menos un MP. Se han encontrado bacterias que son multirresistentes a varios metales pesados (Heck *et al.*, 2015), por lo que se decidió hacer pruebas de resistencia a siete MP (As, Cr, Cd, Hg, Co, Cu y Zn), encontrando que 32 de los 81 aislados fueron resistentes a más de tres MPs (Figura 1). El que se obtuvieron aislados multirresistentes nos sugiere que estos aislados pueden tener más de un mecanismo de resistencia (Zagui *et al.*, 2021). El encontrar diversos aislados multirresistentes nos sugiere que la presa del bote está contaminada con más MPs de los que se ha reportado anteriormente.

El sitio de colecta está contaminado con As, por lo que no es extraño ver que estos aislados resisten altas concentraciones de AsV (40-120 mM) y AsIII (3-5 mM). El aislado S1-05-2 fue el más resistente con una MIC de 120 mM y 5 mM, respectivamente. Este aislado además tiene una MIC de 1 mM para CuII y ZnII, de 0.5 mM para CrVI y CoII, y de 0.1 mM para HgII. Se hicieron curvas de susceptibilidad con este aislado en medio líquido, en estas condiciones los MPs están en mayor contacto con el aislado, por lo que es de esperar que este tenga un menor crecimiento que en medio sólido (Figura 2). Se observó que el S1-05-2 resiste una concentración de 2 mM de AsV, de manera similar a la que se encontró que resiste una cepa de *Vibrio fischeri* aislada de ambientes marinos (Fulladosa *et al.*, 2005). En cuanto a AsIII, este aislado presentó un comportamiento similar a la cepa resistente a As *Anaeromyxobacter dehalogenans* al tolerar una concentración de 800 μ M de este MP (Kudo *et al.*, 2013). Además del As, el aislado S1-05-2 es resistente a 100 μ de CrVI, 3 μ M de Cd, 1 μ M de HgII, 15 μ M de CoII, 500 μ M de

Cull y 50 μM de ZnII, por lo que podemos concluir que este aislado es multirresistente a siete MPs.

Es de resaltar que el aislado S1-05-2 tiene un comportamiento no esperado al ser confrontado en concentraciones bajas de AsV, ya que se observó un incremento significativo de la DO, lo que sugiere que el AsV actúa como un inductor del crecimiento. Aunque ha habido controversias sobre si los microorganismos son capaces de usar el As en lugar de P para su crecimiento (Sengupta & Chattopadhyay, 2011), es poco factible que esto ocurra en este aislado, y que este comportamiento se deba a una inducción inespecífica de los canales de entrada de fosfato.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que, en la presa del bote en el estado de Zacatecas, un sitio contaminado con MPs, es posible obtener aislados con características de bacterias multirresistentes a varios MPs. Además, el aislado S1-05-2 tiene resistencia similar a organismos altamente resistentes, lo que puede ser explotado para proponer estrategias de biorremediación en suelos contaminados con As.

Referencias

- Alvarez, C. C., Gómez, M. E. B., & Zavala, A. H. (2021). Hexavalent chromium: Regulation and health effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 65, 126729.
- Covarrubias, S. A., & Cabriales, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33, 7-21.
- Escamilla, R. A., Carlos, H. S., & Díaz, J. L. (2021). Evidence of resistance of heavy metals from bacteria isolated from natural waters of a mining area in Mexico. *Water*, 13(19), 2766.
- Fulladosa, E., Murat, J., & Villaescusa, I. (2005). Effect of cadmium (II), chromium (VI), and arsenic (V) on long-term viability-and growth-inhibition assays using *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 49(3), 299-306.



Heck, K., De Marco, É. G., Duarte, M. W., Salamoni, S. P., & Van Der Sand, S. (2015). Pattern of multiresistant to antimicrobials and heavy metal tolerance in bacteria isolated from sewage sludge samples from a composting process at a recycling plant in southern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 1-11.

Kudo, K., Yamaguchi, N., Makino, T., Ohtsuka, T., Kimura, K., Dong, D. T., & Amachi, S. (2013). Release of arsenic from soil by a novel dissimilatory arsenate-reducing bacterium, *Anaeromyxobacter* sp. strain PSR-1. *Applied and environmental microbiology*, 79(15), 4635-4642.

Lugun, O., Singh, R., Jha, S., & Pandey, A. K. (2022). Impact of heavy metals on different ecosystems. In *Environmental Toxicology and Ecosystem* (pp. 139-164). CRC Press.

Nanda, M., Kumar, V., & Sharma, D. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. *Aquatic toxicology*, 212, 1-10.

Pérea, Á. D., Sánchez, C. L., & Balderas, H. V. E. (2017). Aislamiento y caracterización de microorganismos con características de promoción en la absorción de metales pesados en el estado de Zacatecas. *Bioteología y Sustentabilidad*, 2(1).

Sengupta, D., & Chattopadhyay, M. K. (2011). Controversy over the report on a bacterium that feeds on arsenic. *Journal of biosciences*, 36, 555-557.

Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology advances*, 27(2), 195-226.

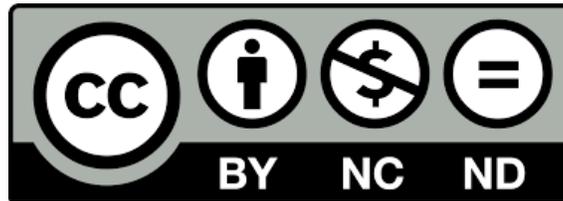
Zagui, G. S., Moreira, N. C., Santos, D. V., Darini, A. L. C., Domingo, J. L., Segura-Muñoz, S. I., & Andrade, L. N. (2021). High occurrence of heavy metal tolerance genes in bacteria isolated from wastewater: A new concern? *Environmental Research*, 196, 110352.



D. R. © UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Excepto donde se indique lo contrario esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución No comercial, No derivada, 4.0 Internacional (CC BY NC ND 4.0 INTERNACIONAL).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



ENTIDAD EDITORA

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Av. Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México.

FORMA SUGERIDA DE CITAR:

Díaz-Pérez, C., Castro-Moreno, P., Gómez-Luna, B. E., Ramírez-Granados, J. C., Chávez-Avilés, M. N., y Sánchez-Calderón, L. (2023). Aislamiento de bacterias resistentes a metales pesados de lechos de minas. *MEMORIAS DEL CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA (CONATEC)*, Año 6, No. 6, septiembre 2023 - agosto 2024. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

https://tecnicosacademicos.cuautitlan.unam.mx/CongresoTA/memorias2023/Mem2023_Paper19-E.html