

# RESISTENCIA DE AISLADOS MICROBIANOS RESISTENTES A CO Y ZN

Anguiano Morales Miriam (1), Vázquez Banda María del Refugio (2), Díaz Pérez D.C. César (3)

1 [Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencias biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila] | [miriam\_am19@hotmail.com]

2 [Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Guanajuato] | [cookiezvazquezbanda@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

En estudios anteriores se lograron obtener aislados bacterianos de sitios contaminados del estado de Zacatecas. El objetivo del presente trabajo fue conocer la concentración máxima inhibitoria de MPs de 18 aislados microbianos seleccionados de una colección obtenida de un sitio contaminado con As y Pb. Los metales usados en este estudio fueron cobalto, cromo, cadmio, cobre, mercurio y zinc. De los resultados obtenidos se encontró que los aislados S114-1A y S401-B fueron multiresistentes, ya que crecieron en los MPs probados. Se realizó una segunda confrontación a dos MPs, Co y Zn, en medio líquido, mediante curvas de susceptibilidad con el fin de comprobar que presentan resistencia a Co y Zn. Los datos obtenidos indicaron que en presencia de Co a 0.05 mM, tiene un efecto benéfico para el aislado S401-B, ya que tiene un incremento en su crecimiento a comparación del control sin metal, a comparación del aislado S114-1A donde se inhibió su crecimiento. En el caso del Zn se observó un cambio en la morfología de los aislados y la producción de una biopelícula que le otorga protección contra el Zn a ambas cepas, el cual es un mecanismo de resistencia compartido por ambos aislados.

## ABSTRACT

In previous studies, heavy-metal resistant Bacteria has been isolated from contaminated sites from Zacatecas. In this work, minimum inhibitory concentration experiments were done in 18 selected bacteria from a collection obtained from an As and Pb contaminated site. Cobalt, chromium, cadmium, copper, mercury and zinc were used to confront the bacterial isolate collection. It was found that two isolates bacteria, S114-1A and S401-B, showed multi-resistant to all heavy metal used. A second round of experiments in liquid medium were done to corroborate the results. It was showed that a concentration of 0.05 mM of Co was necessary for isolate S401-B optimal growth, however, isolate S114-1A was susceptible to Co. In Zn confrontation, bacterial isolates changed their morphology and produce a biofilm that protects the bacteria from toxic heavy metal. This resistance mechanism is present in both bacterial isolates.

### Palabras clave

Metales pesados; Bacterias; Cobalto; Zinc; Resistencia

## INTRODUCCIÓN

Son considerados como metales pesados (MPs) aquellos metales que tienen una densidad mayor a  $5 \text{ gr/cm}^3$  (De lima *et al.*, 2012). Estos se encuentran de manera natural en el ambiente, sin embargo, se consideran contaminantes cuando se acumulan en concentraciones excesivas debido a la acción del hombre. Las fuentes antropogénicas, como la minería, las estaciones de energía, la aplicación de algunos tipos de pesticidas y fertilizantes, así como lodos de depuradoras, tienden a ser de los principales responsables de la contaminación ambiental por metales pesados (Samanta *et al.*, 2012).

A lo largo de la historia, los microorganismos han desarrollado mecanismos, los cuales les permitieron tener tolerancia a MPs, como los son la formación de complejos, reducción de los iones o bien como aceptores finales de electrones durante la respiración anaerobia (Samanta *et al.*, 2012).

Las bacterias resistentes, que además crecen en presencia de MPs, tienen un rol importante en el ciclo biogeoquímico de esos iones metálicos (Samanta *et al.*, 2012). Diversos estudios se han realizado sobre la tolerancia de plantas y bacterias a MPs, entre las bacterias que se han reportado se encuentran *Pseudomonas putida*, *P. mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*. Se ha reportado que dichas bacterias pueden resistir concentraciones de 90 ppm de Cr, As y Pb (Mendoza *et al.*, 2010). A diferencia de estas, *Bacillus sp.* se reportó con una resistencia mayor, ya que tolera hasta 1.0 mg/ml (Samanta *et al.*, 2012).

En el estado de Zacatecas a lo largo de los años se han presentado diversas alteraciones en los ecosistemas, esto se debe a la actividad minera, algunos de los factores de selección para los microorganismos presentes pueden ser resistentes a MPs de los sitios en los que se encuentran. En estos sitios los MPs que se han reportado son principalmente Ag, Pb, Zn, Cu, Cd. (Panorama Minero del Estado de Zacatecas, 2016).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de 18 aislados con mayor resistencia a MPs.

Los 18 aislados bacterianos que se usaron en este trabajo pertenecen a la colección del laboratorio de Biotecnología y Bioinformática de la sede Salvatierra de la Universidad de Guanajuato. Para su selección se tomaron en cuenta pruebas preliminares, en donde se buscó a los aislados que presentaron un mayor crecimiento en presencia de MPs a los que fueron confrontados.

### Tinción Gram

Para realizar la tinción Gram, se tomó inóculo de tubos crecidos por 18 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  en agitación, se dispersó la muestra con un asa de cultivo y se dejó secar a temperatura ambiente. Primero se agregó cristal violeta y se esperó un minuto después se enjuagó con agua, se agregó lugol y se esperó un minuto, se enjuagó con agua, se agregaron entre 10 y 15 gotas de alcohol acetona con mucho cuidado y se esperó entre 30 segundos y se enjuagó con agua, se agregó safranina y se esperó un minuto, se lavó levemente con agua. Para observar las muestras, se usó un microscopio óptico.

### Pruebas de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) a Co, Cr, Cu, Hg, Zn y Cd.

Se inocularon tubos de caldo nutritivo (CN) de 3 mL, las muestras se tomaron de glicerolos que ya se tenían. Se dejaron crecer por 18 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  en agitación. Se realizó una prueba en medio sólido (AN), adicionando la cantidad de MP necesaria para alcanzar las concentraciones reportadas. En cada una de las cajas con distinta concentración de MP se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de inóculo y se incubaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en una incubadora de convección. Los resultados se recabaron mediante fotografías a las 48 y 120 h.

### Curvas de susceptibilidad en los aislados S401-B y S114-1A.

Se midió la absorbancia que presentaron cada una de las muestras que fueron inoculadas y crecidas por 18 h a 30 °C en agitación, en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 600 nm. El experimento se efectuó por cuadruplicado para hacer un promedio de los resultados obtenidos en los casos. Las curvas de susceptibilidad fueron graficadas en el programa GraphPad Prism 5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de los aislados

De los 86 aislados obtenidos de trabajos previos del grupo de trabajo, se seleccionaron 18 aislados bacteriano las cuales mostraron mayor resistencia en los resultados preliminares reportados anteriormente.

Los aislados fueron recuperados de glicerol, por lo que se llevó a cabo una tinción Gram de los mismos para verificar que se trabajará con cultivos axénicos (Figura 1). Se observó que todos los cultivos eran puros. Los resultados de la tinción y la morfología concordaban con los datos que se tenían de cada aislado, por lo que se procedió a efectuar la caracterización de la resistencia a MPs de los aislados.

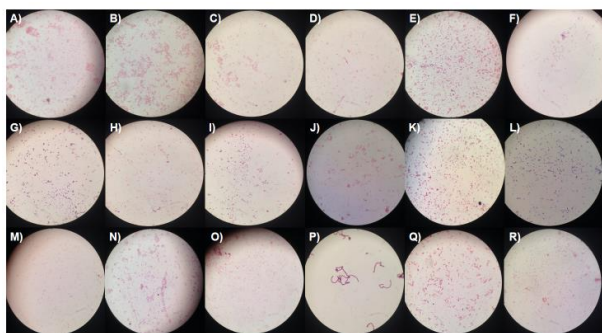


Figura 1. Tinción Gram de los aislados seleccionados. A) S103; B) S106; C) S106-2; D) S106-2A; E) S109-2; F) S110-2; G) S114-1A; H) S114-2; I) S115; J) 203-2A; K) S204-2; L) 302; M) S401-2A; N) S401-A; O) S401-B; P) S404-2, Q) S407-0; R) SL101.

Se pudo observar que no en todas las concentraciones hubo crecimiento, en algunas ninguna muestra resistió estas concentraciones. Se tomó la concentración donde no hubo crecimiento y se reportó como la MIC para cada metal (Tabla 1).

Los resultados mostraron que contamos con aislados multiresistentes a MPs, si bien el sitio de donde se obtuvieron los microorganismos, solo se han reportado altas concentraciones de As y Pb. Este resultado sugiere que hay que mecanismos de resistencia globales contra más de un MP, o que pueden existir islas de resistencia a MP en los genomas de los aislados.

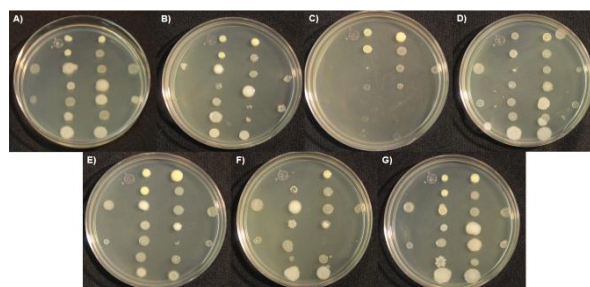


Figura 2. Crecimiento de aislados bacterianos en MPs. A) Control; B) Cd 0.1 mM; C) Co 0.2 mM; D) Cr 0.1 mM; E) Cu 1.0 mM; F) Hg 0.1 mM; G) Zn 0.2 mM.

En este punto, el grupo de trabajo decidió continuar probando los aislados que crecieron más en Co y Zn, dado que se tiene el interés en caracterizar los sistemas de resistencia a estos MPs, por lo que se seleccionaron los aislados S401-B y S114-1A, que presentaron MICs de 0.8 mM en Co y de 0.4 en Zn.

### Caracterización de la resistencia a MPs de las capas S401-B y S114-1A en medio líquido

Dado que se ha reportado ampliamente que la resistencia a MPs disminuye drásticamente en medio líquido, se procedió a probar si los dos aislados bacterianos conservaban su resistencia en este medio, para lo cual se efectuaron curvas de susceptibilidad a Co y Zn. Se midió la absorbancia de los aislados que se confrontaron a

Co y Zn en distintas concentraciones presentes en la (Figura 3-6).

Se observó que, en presencia de Zn, ambos aislados presentaban muy poco crecimiento, pero este se conservaba a medida que aumentaba la concentración de Zn (Figura 3 y 4). Una observación más a detalle del cultivo reveló que los aislados crecían formando agrupaciones por lo que la presencia de Zn provoca un cambio en la morfología de los aislados y la producción de un biofilm.

Tabla 1. MICs de los aislados bacterianos.

Nombre	Cd (mM)	Co (mM)	Cr (mM)	Cu (mM)	Hg (mM)	Zn (mM)
S110-2	1.0	0.4	0.30	2.0	N.d.	0.4
S203-2A	1.0	0.6	0.30	3.0	0.5	0.4
S302	1.0	0.4	0.30	2.0	0.5	0.4
S401-A	0.5	0.4	0.15	2.5	0.5	0.4
S401-B	0.5	0.8	0.30	2.5	0.5	0.4
S204-2	0.5	N.d.	0.15	2.0	0.5	0.4
S401-2A	0.5	0.4	0.15	2.0	0.5	0.4
SL101	0.5	0.4	0.15	2.0	0.5	0.6
S407-0	0.5	0.4	0.30	1.5	0.5	0.4
S115	0.5	0.4	0.20	2.0	0.5	0.4
S114-1A	0.5	0.8	0.30	1.5	0.5	0.4
S103	0.5	0.4	0.15	1.5	0.5	0.4
S404-2	0.5	N.d.	0.30	1.5	N.d.	0.6
S114-2	0.5	N.p	0.30	1.5	N.d.	0.4
S109-2	0.5	0.4	0.30	1.5	0.5	0.4
S106	0.5	0.4	0.30	1.5	0.5	0.4
S106-2	0.5	0.4	0.20	1.5	0.5	0.4
S106-2A	0.5	0.4	0.20	1.5	0.5	0.4

\*N.d. No se determino

En el caso del Co, se observó que el aislado S401B conserva la resistencia (Figura 5) ya que conserva el 50% de su crecimiento en una concentración de 0.1 mM de Co, sin embargo, el aislado S114-1A es sensible a Co, ya que en la menor concentración de Co (0.05 mM) se observó

el decaimiento de su crecimiento. También se obtuvo que el aislado S401B crece incluso mejor en una concentración de 0.05 mM de Co. El Co es un micronutriente, el cual es necesario como cofactor en una gran cantidad de proteínas (Kobayashi y Shimizu, 1999), por lo que muchos organismos lo necesitan para proliferar de manera óptima, lo que parece suceder con el aislado S401B.

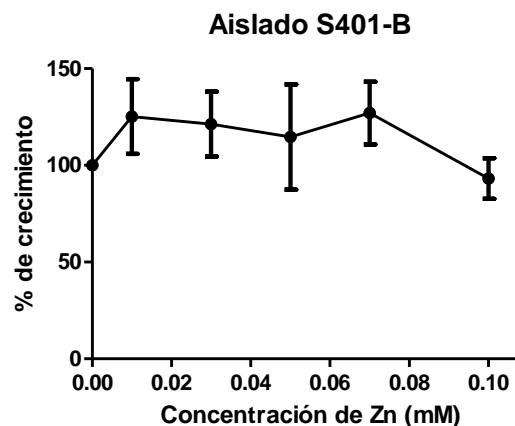


Figura 3. Pruebas de susceptibilidad a Zn del aislado bacteriano S401-B. Los cultivos se crecieron 18 h a 30 °C con agitación constante, utilizando las concentraciones de Zn que fueron indicadas y se determinó el crecimiento bacteriano por la densidad óptica de las muestras a 600 nm.

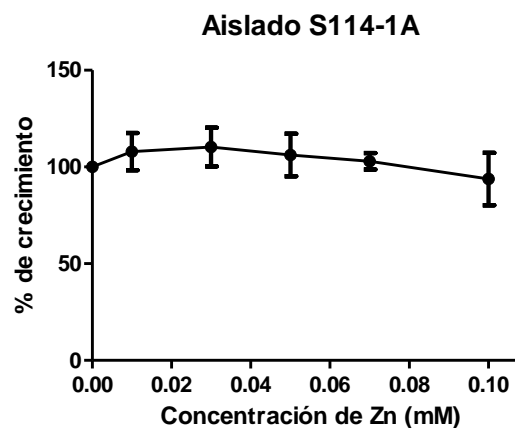
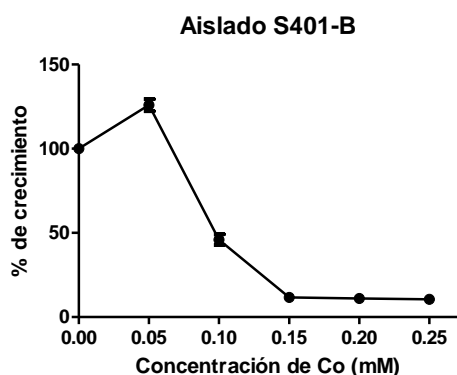


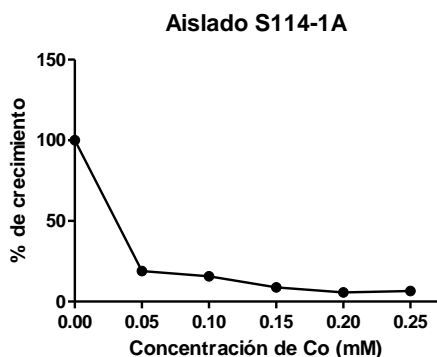
Figura 4. Pruebas de susceptibilidad a Zn del aislado bacteriano S114-1A. Los cultivos se crecieron 18 h a 30 °C con agitación constante, utilizando las concentraciones de Zn que fueron indicadas y se determinó el crecimiento bacteriano por la densidad óptica de las muestras a 600 nm.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que se cuenta con aislados multiresistentes, además de que los aislados S401-B y S114-1A fueron los aislados con mayor resistencia a Co en medio sólido. Se encontró que el aislado S401-B conserva su resistencia a Co en medio líquido y que requiere cantidades extra de Co para un crecimiento óptimo. En el caso del Zn, los dos aislados producen biopelículas las cuales no permitían una homogeneidad, lo que nos sugiere que comparten un mecanismo de resistencia a este metal.



**Figura 5.** Pruebas de susceptibilidad a Co del aislado bacteriano S401-B. Los cultivos se crecieron 18 h a 30 °C con agitación constante, utilizando las concentraciones de Co que fueron indicadas y se determinó el crecimiento bacteriano por la densidad óptica de las muestras a 600 nm.



**Figura 6.** Pruebas de susceptibilidad a Co del aislado bacteriano S114-1A. Los cultivos se crecieron 18 h a 30 °C con agitación constante, utilizando las concentraciones de Co que fueron indicadas y se determinó el crecimiento bacteriano por la densidad óptica de las muestras a 600 nm.

## AGRADECIMIENTOS

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

## REFERENCIAS

-De Lima A., Ribeiro M., De Souza S., Teixeira P., Da Silva R., Meirelles C., Melo C., & Hofer H. 2012. Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolates from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*: 1620-1631.

-Kobayashi, M., & Shimizu, S. (1999). Cobalt proteins. *The FEBS Journal*, 261(1), 1-9.

-Mendoza J. C., Perea Y. S., Pretelin C., Silveti A., Martínez M. A., Pérez G., Espinosa B. & Arriola J. 2010. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 1(2): 67-73.

-Samanta A., Bera P., Khatun M., Sinha Ch., Pal P., Lalee A. & Mandal A. 2012. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2 (1):178-189

-Servicio Geológico Mexicano, Panorama Minero del Estado de Zacatecas, 2016.