

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CON CARACTERÍSTICAS DE PROMOCIÓN EN LA ABSORCIÓN DE METALES PESADOS EN EL ESTADO DE ZACATECAS

Daniel Perea de Ávila,
 Lenin Sánchez-Calderón,
 Víctor E. Balderas-Hernández*
 LABORATORIO DE BIOLOGÍA INTEGRATIVA
 DE PLANTAS Y MICROORGANISMOS, UNIDAD
 ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS,
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS,

*Autor responsable
balderas.victor@gmail.com

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS WITH PROMOTING ACTIVITY FOR ABSORPTION OF HEAVY METALS IN THE STATE OF ZACATECAS.

R E S U M E N

El estado de Zacatecas es uno de los principales productores de plata en México y el mundo, sin embargo su larga historia de actividad minera, los procesos de extracción a cielo abierto y la falta de acciones de remediación, han causado la acumulación y la dispersión de metales pesados (MP) en suelo, agua y aire, a lo largo del estado, imponiendo un alto riesgo para el ecosistema. Haciéndose necesario la búsqueda de estrategias para la remediación de sitios contaminados; como por ejemplo la biorremediación utilizando microorganismos con características de promoción en la absorción/fijación vegetal de MP. El objetivo de este trabajo fue el aislamiento de cepas de hongos y bacterias a partir de sitios derivados de actividades mineras en el estado de Zacatecas, y su caracterización en cuanto a su tolerancia a concentraciones tóxicas de Pb^{2+} y Zn^{2+} , así como el posible efecto promotor de estos en la absorción/fijación de MP por parte de *Arabidopsis thaliana*. Del total de cepas de hongos aisladas, 50 cepas se cultivaron en concentraciones tóxicas de Pb^{2+} y Zn^{2+} , de las cuales 14 cepas mostraron tolerancia a 500 ppm de Pb^{2+} , y solo 6 aislados fueron tolerantes a 500 ppm de Zn^{2+} . Se identificaron 5 aislados fúngicos con tolerancia a Pb^{2+} y Zn^{2+} . Con referencia a las cepas de bacterias aisladas, 74 aislados toleraron 1500 $\mu\text{g/mL}$ Pb^{2+} , mientras que 13 aislados toleraron 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} , y 13 cepas bacterianas resultaron tolerantes a Pb^{2+} y Zn^{2+} . De estas últimas, 6 cepas bacterianas al inocularlas en la raíz de plántulas de *A. thaliana* crecidas en presencia de 100 μM de Pb^{2+} causaron un efecto de mayor desarrollo en la parte aérea como en la raíz principal de la planta, en comparación con plántulas no inoculadas. Estos resultados sugieren que las cepas de bacterias aisladas de sitios contaminados con MP tienen el potencial de utilizarse como agentes promotores de fitorremediación.

Palabras clave:

Suelos contaminados, plomo, zinc, simbiosis, hongos tolerantes

ABSTRACT: The state of Zacatecas is the main silver producer in Mexico and worldwide. However the long history of mining activity, the predominant open pit mining processes and the scarce remediation actions; have caused the accumulation and dispersion of heavy metals (HM) in soils, water and air, across the state; imposing a high risk for the ecosystem. The search for new strategies for remediation of contaminated sites is required, such as bioremediation using microorganisms with characteristics to promote the absorption/fixation of HM by plants. The aims of this work were the isolation of fungal and bacterial strains from sites with mining activities in the state of Zacatecas, their characterization to tolerate toxic concentrations of Pb^{2+} and Zn^{2+} , and the evaluation of their possible activities to promote the absorption/fixation of HM by *Arabidopsis thaliana*. From the total of isolates, 50 fungal strains were cultivated in presence of toxic concentrations of Pb^{2+} and Zn^{2+} . From this characterization only 14 strains showed tolerance to 500 ppm of Pb^{2+} , 6 isolates to 500 ppm of Zn^{2+} , and 5 strains were identified to show tolerance to both Pb^{2+} and Zn^{2+} . Concerning to the isolated bacterial strains, 74 bacterial isolates were tolerant to 1500 $\mu\text{g/mL}$ of Pb^{2+} , 13 bacterial isolates were tolerant to 1000 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} , and 13 bacterial strains were tolerant to both Pb^{2+} and Zn^{2+} . From this last set, 6 bacterial isolates caused an improved development of the aerial part and the primary root of *A. thaliana* cultured in presence of 100 μM of Pb^{2+} , in comparison with the non-inoculated plantlets. These results suggest that the isolated bacterial strains from sites contaminated with HM have the potential to be used as phytoremediation promoters.

Key words:

Contaminated soils, Pb, Zn, symbiosis, tolerant fungi

I N T R O D U C C I Ó N

El estado de Zacatecas tiene una larga tradición minera, convirtiendo a esta actividad en un pilar importante en la economía del estado. Sin embargo los procesos rudimentarios y malas prácticas mineras, aunadas a los escasos eventos de remediación de pasivos ambientales derivados de la minería, han causado la acumulación y dispersión de elementos metálicos como As, Hg, Cd, Cr, Ni, Zn, Cu y Pb entre otros, en suelo, aire y cuerpos de agua a lo largo del estado, encontrándose en concentraciones que exceden los valores de referencia permisibles, representando un riesgo para el ecosistema por la integración de los MP a la cadena trófica (Wang y Chen, 2009; Ortega-Larocea *et al.*, 2007; Navarro-Noya *et al.*, 2010; Mireles *et al.*, 2012). La presencia de MP en concentraciones tóxicas en un organismo provocarán daño a múltiples niveles moleculares e incluso muerte celular (González y González-Chávez, 2006). Sin embargo, algunos organismos; tales como plantas, algas, bacterias, hongos, levaduras, han desarrollado diversos mecanismos de tolerancia a ambientes con elevados contenidos de MP (Khan, 2005). Por ejemplo la biomasa inactiva o muerta de algunos microorganismos puede ligar iones metálicos a través de mecanismos fisicoquímicos (Wang y Chen, 2009). Estos organismos y sus mecanismos asociados con la tolerancia a MP, se han

utilizado para el desarrollo de procesos eficientes para la biorremediación de sitios o materiales contaminados (Cañizares-Villanueva 2000). Por ejemplo, la simbiosis establecida entre plantas y hongos ha mostrado ser eficiente al disminuir la concentración de (MP) en diferentes especies vegetales, constituyéndose en una herramienta potencial para el manejo de plantas cultivadas bajo estas condiciones (Wang y Chen, 2009). Resulta entonces de gran importancia la caracterización de microorganismos que presenten características de tolerancia a MP. En el presente trabajo se tuvieron como objetivos: (i) el aislamiento de micro-organismos (cepas de hongos y bacterias) procedentes de sitios derivados de actividad, (ii) su caracterización de tolerancia a concentraciones tóxicas de Pb^{2+} y Zn^{2+} , y (iii) el posible efecto promotor en la absorción/ fijación vegetal de MP por parte de *Arabidopsis thaliana*.

M E T O D O L O G Í A

SITIOS DE COLECTA DE MUESTRAS.

Las muestras se colectaron de los municipios de Guadalupe, Ojo-caliente, Vetagrande y Sombrerete, todos en el estado de Zacatecas. Se consideraron sitios de colecta aquellos derivados de procesos mineros (presas de jales, tiros de mina, lugares cercanos a minas, cuerpos de agua) posiblemente contaminados con metales pesados. Se colectaron muestras de rizósfera de plantas silvestres de los sitios de colecta, así mismo de estas plantas se tomaron muestras de tallo y hojas. Las muestras colectadas se colocaron en bolsas de plástico tipo ziploc para su transporte al laboratorio.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS, OBTENCIÓN DE LAS CEPAS DE MICROORGANISMO Y SU PRESERVACIÓN.

Las muestras sólidas (10 g sólidos) se resuspendieron en solución salina (NaCl 0.85%). Del sobrenadante se tomaron las alícuotas necesarias para hacer diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Posteriormente, se tomaron 100 μ L de cada dilución y se sembraron en placas de medio papa dextrosa agar (PDA) con 100 μ g/mL de kanamicina y 250 μ g/mL de estreptomycin, para el aislamiento de hongos. De igual forma se utilizó medio tripticasa de soya (TCA) para el aislamiento de bacterias. Las cajas Petri se incubaron a 30°C, hasta que se presentó desarrollo de colonias de microorganismos. A partir de las diferentes cepas de bacterias y hongos obtenidos se realizaron re-siembras hasta obtener cultivos con morfologías únicas. De los microorganismos aislados se realizaron cultivos líquidos (caldo papa dextrosa para hongos y caldo tripticasa de soya) para la preparación de stocks de glicerol para la preservación de cada cepa aislada de hongo a -80°C.

CARACTERIZACIÓN DE LA TOLERANCIA DE LAS CEPAS DE MICROORGANISMOS AISLADOS A Pb^{2+} Y Zn^{2+} .

Se inocularon las cepas de hongos seleccionadas (utilizando un sacabocados de 0.5 cm de diámetro) en medio PDA suplementado con concentraciones de 100, 250 y 500 ppm de Pb^{2+} ($PbCl_2$) o Zn^{2+} ($ZnCl_2$). Las placas Petri se incubaron a 30°C durante 8 días, en los cuales se dio seguimiento al crecimiento radial de las cepas de hongos utilizando el software Image J 1.48. Posteriormente se construyeron las cinéticas de crecimiento-inhibición para cada tratamiento. Las cepas bacterianas aisladas se crecieron en agar nutritivo suplementado con concentraciones crecientes hasta 1500 $\mu g/mL$ de Pb^{2+} ($PbCl_2$) o Zn^{2+} ($ZnCl_2$). Las cepas bacterianas se cultivaron a una densidad óptica de 0.5 OD600nm a partir de preinóculos crecidos en placas de 96 pozos. Las cajas Petri se incubaron a 30°C durante 8 días.

EVALUACIÓN DEL EFECTO PROMOTOR EN LA ABSORCIÓN/FIJACIÓN DE Pb^{2+} POR PARTE DE *A. thaliana*.

Las semillas de *A. thaliana* se esterilizaron con etanol al 70% durante 5 min, seguido por inmersión en una solución al 20% de cloro durante 7 min, las semillas fueron lavadas cuatro veces con agua destilada estéril. Posteriormente las semillas fueron estratificadas por 48 h a 4°C en oscuridad, después fueron sembradas en medio Murashige & Skoog (MS) y transferidas a una cámara de crecimiento (16h luz, 8h oscuridad a 22°C) incubadas durante 6 días. Posteriormente las plántulas se transfirieron a placas Petri conteniendo medio MS sin sacarosa suplementado con 100 μM de Pb^{2+} (5 por caja). Para el caso de las cepas de hongos seleccionados, se inocularon (con un sacabocados de 0.5 cm de diámetro) a 2 cm de distancia de la raíz de *A. thaliana*. Con respecto a las cepas bacterianas seleccionadas, se inocularon en las raíces de las plántulas de *A. thaliana* a una concentración de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Las placas Petri se incubaron en cámara de fotoperiodo (16h luz, 8h oscuridad) por 15 días, midiendo el crecimiento de la raíz principal y el desarrollo de raíces laterales.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N**AISLAMIENTO DE CEPAS DE BACTERIAS Y DE HONGOS.**

A partir del procesamiento de las distintas muestras colectadas a lo largo del estado de Zacatecas se obtuvieron 724 cepas de hongos y 663 cepas de bacterias. De las cuales se tienen cultivos puros y se encuentran almacenados a -80°C.

Caracterización de la tolerancia de las cepas de microorganismos aislados a Pb^{2+} y Zn^{2+} . Del total de cepas fúngicas aisladas, 50 cepas se cultivaron en 100, 250 y 500 ppm de Pb^{2+} o Zn^{2+} . 23 cepas mostraron tolerancia a un metal en específico. De estas 23 cepas, 14 hongos fueron tolerantes a 500 ppm de Pb^{2+} , mostrando un crecimiento mayor al 50% con respecto al cultivo control. En referencia a Zn^{2+} , resultó ser más tóxico ya que 500 ppm del MP causaron la inhibición del 90% de las cepas evaluadas, con ello únicamente 6 cepas fueron consideradas tolerantes a 500 ppm del metal. De manera interesante, 5 cepas bacterianas fueron tolerantes a las concentraciones tóxicas de ambos metales. Por ejemplo, en las figuras 1 y 2 se presenta el crecimiento de la cepa de hongo MR5-5b en presencia de las distintas concentraciones evaluadas de Pb^{2+} (figura 1) y Zn^{2+} (figura 2). Se puede observar que el crecimiento de la cepa MR5-5b es muy similar en presencia de 100 y 250 ppm de MP comparada con el cultivo control, mientras que en presencia de 500 ppm de Pb^{2+} o Zn^{2+} se observó una inhibición del crecimiento del 30% con respecto al cultivo control.

Con respecto a las cepas bacterianas, 384 aislados se cultivaron en agar nutritivo adicionado con concentraciones crecientes hasta 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pb^{2+} (figura 3).

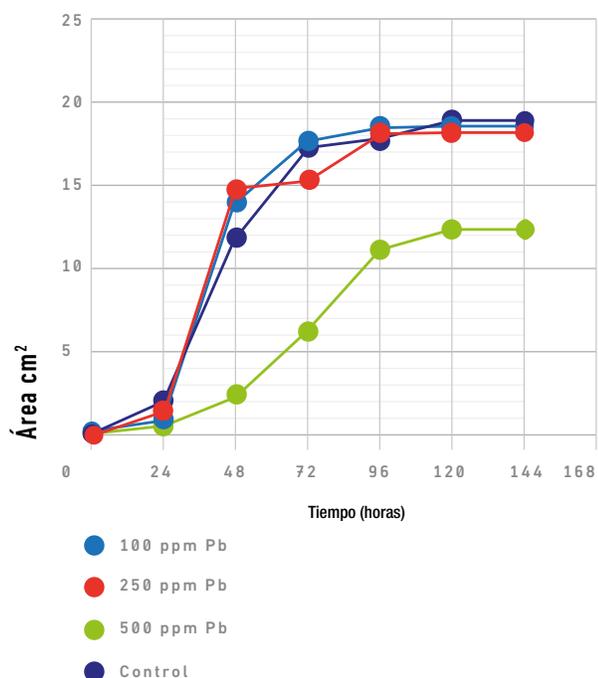


FIGURA 1.

Crecimiento de la cepa MR5-5b en medio PDA suplementado con 100, 200, y 500 ppm de Pb^{2+} ($PbCl_2$).

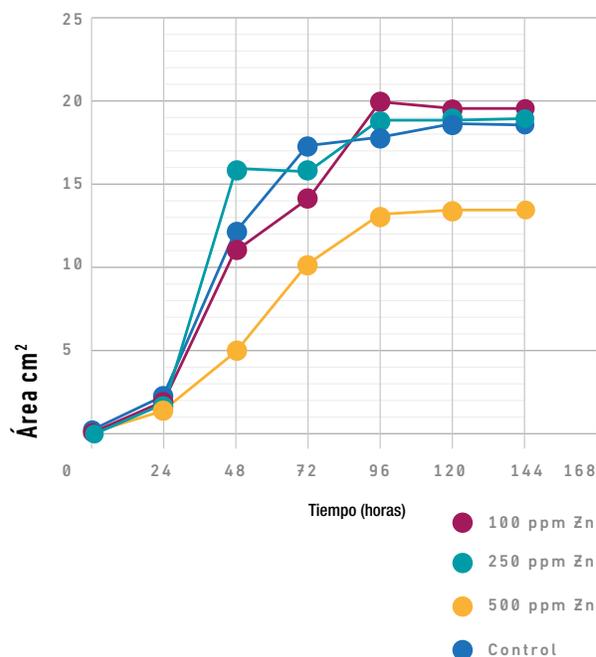
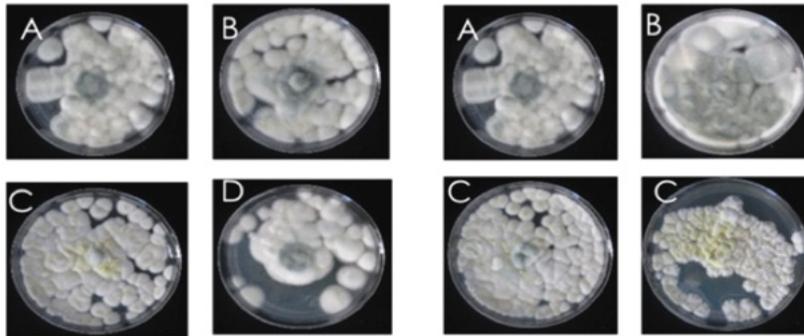


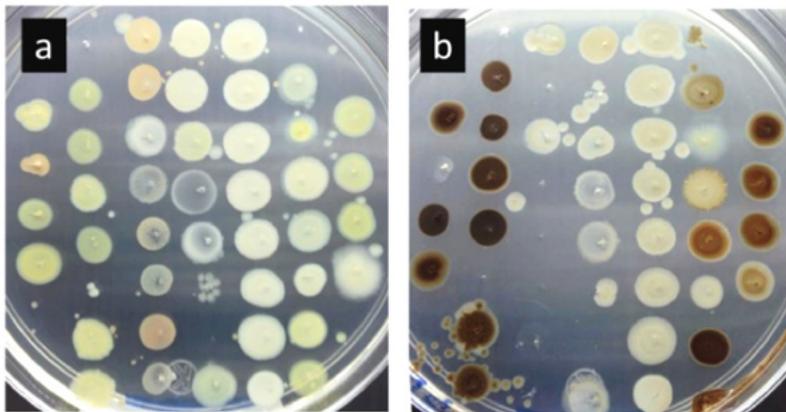
FIGURA 2.

Crecimiento de la cepa MR5-5b en medio PDA suplementado con 100, 200, y 500 ppm de Zn^{2+} ($ZnCl_2$).

**FIGURA 3.**

Ceba MR5-5b crecida en medio PDA en presencia de MPs Pb o Zn. En panel de la izquierda, en A, medio PDA; en B, 100; en C, 250; y en D, 500 ppm de Pb. En panel de la derecha, en A, medio PDA; en B, 100; en C, 250, y en D, 500 ppm de Zn.

(PbCl_2) o Zn^{2+} (ZnCl_2). 74 aislados toleraron $1500 \mu\text{g/mL Pb}^{2+}$, mientras que 13 aislados toleraron $1000 \mu\text{g/mL de Zn}^{2+}$, y un grupo de 13 cepas bacterianas resultaron tolerantes a concentraciones tóxicas de Pb^{2+} y Zn^{2+} . Algunas de las cepas tolerantes a Pb^{2+} presentaron una coloración café al exponerse a $1000 \mu\text{g/mL}$ del metal, con respecto a los cultivos control (figura 4).

**FIGURA 4.**

Cepas bacterias cultivadas en (a) agar nutritivo, y (b) en presencia de $100 \mu\text{g/mL}$ de Pb^{2+} .

Evaluación del efecto promotor en la absorción/fijación de Pb^{2+} por parte de *A. thaliana*. De las 13 cepas bacterianas con tolerancia a concentraciones tóxicas de Pb^{2+} y Zn^{2+} , se inocularon en raíces de plántulas de *A. thaliana* crecidas en presencia de $100 \mu\text{M}$ de Pb^{2+} . 6 aislados bacterianos causaron un efecto de mayor desarrollo en la parte aérea como en la raíz principal de la planta, en comparación con las plántulas no inoculadas. El efecto promotor del crecimiento en la planta puede deberse en parte a la síntesis por la bacteria de ácido indolacético o sideróforos, característica que ya ha sido bien documentada en otros ejemplos de bacterias (Huang *et al.*, 2016)

AGRADECIMIENTOS

A los apoyos obtenidos del FORDECYT-Doctores-174509, y del Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC-PROMEPA-UAZ-PTC-189.

C O N C L U S I O N E S

Las cepas de bacterias y hongos aisladas de sitios contaminados con MP en el estado de Zacatecas tienen el potencial de utilizarse como agentes promotores de fitorremediación.

R E F E R E N C I A S

- CAÑIZARES-VILLANUEVA R.O. (2000) Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev Latinoamericana de Microbiología* 42:131-143.
- GONZÁLEZ RC, González-Chávez MC. (2006) Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ Pollut.* 144(1):84-92.
- HUANG J., Liu Z., Xu B., Yang Y., Sun H. (2016) Isolation and engineering of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* for enhanced cadmium bioremediation. *J Gen Appl Microbiol* 25:258-265.
- KHAN, A.G. (2005). Role of soil microbes in the rhizosphere of plant growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Trace Elements Medicine Biol.* 18:355-364.
- MIRELES F., Dávila J.I., Pinedo J.L., Reyes E., Speakman R.J., Glasco M.D. (2012) Assessing urban soil pollution in the cities of Zacatecas and Guadalupe, México by instrumental neutron activation analysis. *Microchemical J.* 103:158-164.
- NAVARRO-NOYA Y., Jan-Roblero J., González-chávez M.C., Hernández-Gama R., Hernández-Rodríguez C. (2010) Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Baahia xylopoda* and *Viguiera linaris*) growing on heavy metals-contaminated soils. *Antonie van Leeuwenhoek* 97:335-349.
- ORTEGA-LAROCEA MP., Siebe C., Estrada A., Webster R. (2007). Mycorrhiza inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for various lengths of time, as affected by heavy metals and available P. *Appl. Soil Ecol.* 37, 129-138.
- WANG J., Chen C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Bio-technol. Adv.* 27, 195-226.