

# Presencia del gen bmtA y resistencia al plomo en bacterias del género *Pseudomonas* aisladas del río Medellín, Antioquia-Colombia

Bedoya González Lina-María<sup>1</sup>; Vázquez A. Neil<sup>2</sup>; Ochoa Agudelo Susana<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

<sup>3</sup> Grupo de investigación Biociencias. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia

**Resumen.** Existe un gran interés en el uso alterno de tecnologías sostenibles y viables en procesos de biorremediación que permitan impactar en diferentes ambientes contaminados con estos metales, principalmente mercurio, plomo y cobre. *Pseudomonas* sp. es un microorganismo que ha sido identificado tolerante y resistente a diferentes concentraciones de metales pesados. Este trabajo se enfocó en la búsqueda del gen bmtA en diferentes especies de *Pseudomonas* sp. con el fin de relacionar su presencia a mecanismos de resistencia en presencia de plomo. Se tomaron muestras de agua y suelo de dos puntos cercanos a la desembocadura del río Medellín, aledaños a zonas industriales. Previamente, en el sector, se registró un contenido de plomo de 0.53mg/L. Se obtuvieron 39 aislados microbianos a partir de siembras diluidas en medios selectivos y posteriormente su identificación se realizó por pruebas bioquímicas por VITEK y moleculares a partir del gen 16S rRNA. Cada uno de los aislados se expuso a dos niveles de solución de plomo (50 y 500 ppm) y se identificó el gen bmtA. De los aislados obtenidos, se seleccionaron dos, identificados como *P.aeruginosa* y *P. fluorescens* por pruebas bioquímicas. Ambos aislados fueron sometidos a una curva de crecimiento para analizar el comportamiento en presencia de plomo, e identificar su tolerancia al plomo y asociar los datos obtenidos con la presencia del gen bmtA. La presencia de metalotioneinas (gen bmtA), juegan un papel importante en la inmovilización de metales pesados tóxicos, como el plomo, protegiendo así sus procesos metabólicos en géneros de *Pseudomonas* sp.

**Palabras clave:** Plomo, resistencia, metalotioneínas, microorganismos

## **Introducción.**

Existe un gran interés por los investigadores para eliminar el plomo de los ecosistemas, debido a su alta toxicidad, incluso en bajas concentraciones, ya que no puede ser degradado de forma físico-química en la naturaleza por pertenecer al grupo de los metales no esenciales (Maguiña & Bonifacio 2019), además es bioacumulativo y se considera peligrosos para la mayoría de los organismos. Sin embargo, se ha identificado que algunos organismos unicelulares (Jarosawiecka & Piotrowska 2014) y pluricelulares (Vazquez Valle 2018; Prieto et al. 2009) son tolerantes o resistentes al plomo, con capacidad de inmovilizarlos, incluso pueden ser usados como biosorbentes del metal. Se han identificado géneros de bacterias como *Ralstonia*, *Acidobacillus* y *Pseudomonas* como agentes remediadores, ya que son capaces de interactuar con el metal y por ende algunos pueden ser utilizados en la recuperación de metales y para el tratamiento de efluentes industriales. (Marrero et al. 2010; Reyes et al. 2016; Londoño et al. 2016; Ramírez et al. 2017, Zanardini et al. 1997). Adicionalmente, uno de los mecanismos de resistencia reportados para estas bacterias se relaciona con la presencia de genes codificantes de metalotioneínas o metalorreguladoras, pequeñas proteínas ricas en cisteína (Cys) e histidina (His), que confieren la capacidad para unirse a iones metálicos, y tienen la habilidad de unir varios iones de metales pesados (produciendo complejos de menor toxicidad), acumulándolos a nivel intracelular y contribuyendo a mantener concentraciones mínimas de estos iones en el citoplasma (Gómez, M. Á. R. 2016), permitiendo la detoxificación del medio, (Naik et al. 2012, Jaroslawiecka & Piotrowska. 2014, Shi et al., 1992; Blindauer et al., 2001). Estas metalotioneínas se han identificado en cianobacterias, *Pseudomonas*, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, y firmicutes (Blindauer, C. A. 2011). La protección simultánea contra la toxicidad química del plomo por estas proteínas puede ser valiosa para el desarrollo de una batería de bacterias para implementar en procesos de biorremediación. De esta manera, en

este trabajo se evaluó la resistencia al plomo en *Pseudomonas* sp. aisladas del río Medellín, Antioquia, a partir de la presencia del gen bmtA.

### **Metodología.**

Las muestras fueron tomadas en un municipio de Antioquia de Latitud: N 6 ° 22' 51.868 "; Longitud: O 75 ° 27 ' 2.678 "; Altitud: 1.393msnm; se eligieron dos puntos de muestreo aledaños a una zona industrial, uno en una cuenca hídrica que desemboca en el río Medellín y el otro punto directamente del río Medellín. Se tomaron muestras por duplicado.

**Tratamiento de las muestras.** Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura de 20°C, se sembraron en agar cetrimide (Merck®) mediante siembras en superficie, por diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>; (hasta 10<sup>-4</sup> para muestras de suelo) y se incubaron a 35°C por 48 horas.

**Identificación microbiana.** Luego de 48 horas se evaluó el crecimiento de UFC, se realizó un análisis fenotípico de las colonias. Se aisló por diferencia de morfología (color, tamaño, forma), hasta obtener cultivos puros. Se les realizó tinción de Gram y prueba de oxidasa. El perfil bioquímico se realizó por la técnica semiautomatizada VITEK2 ® (biomerieux®) y la identificación molecular de los aislados se hizo por secuenciación del gen 16S rRNA (Choudhary & Sar, 2009).

**Curva de crecimiento.** Se realizó una curva de crecimiento para analizar el comportamiento de dos especies de *Pseudomonas* sp. en presencia de plomo (dos niveles 50 y 500 ppm). Se realizó seguimiento de crecimiento y viabilidad, por DO<sub>560nm</sub> y recuento de UFC en caja con medio selectivo CETRIMIDE ® (Merck®). Las muestras de cada microorganismo se montaron por duplicado, en shaker a 150 rpm, por cinco días, a temperatura de 30°C (Ramírez et al. 2016).

**Identificación del gen bmtA.** Se utilizó la metodología reportada por Blindawer et al. (2002), luego de aislar el ADN genómico, el producto se utilizó para amplificar el fragmento de iniciadores que flanquean la secuencia variable del gen de interés, utilizando los cebadores P3(5'-GGTGGATCCCCATGAACAGCGAAACCT-3') y P4(5'GGTGAATTCTCAGGGCGAGATCGGGTCGC-3'). Como control negativo se usará el ADN genómico de *E.coli* expuesta al Pb. (Naik et al., 2012). La identificación del gen se realizará antes y después de la exposición a la solución del plomo, en cada uno de los aislados.

**Análisis estadístico.** Los valores medios de OD, determinados después de 2 h de crecimiento de las cepas de cada especie, se compararán mediante la prueba t de Student para analizar la biomasa de cada cepa utilizada. Todas las pruebas se realizarán con  $\alpha = 0.05$ . El análisis de la resistencia al metal, se asociará a la presencia del gen bmtA, relacionando su capacidad de tolerar el metal en el estudio de crecimiento a diferentes concentraciones de este.

### **Resultados preliminares.**

Análisis previo, a una de las muestras de agua se le realizó análisis de plomo por la técnica referenciada del Standard Methods for Examination of Wwater and Wastewater APHA (2005) y se confirmó una concentración de plomo de 0.53mg/L.

**Identificación microbiana:** los aislados se definieron por descripción morfológica asociada a colonias blancas, cremosas, de borde regular, grandes o pequeñas, brillantes, sin pigmento ni fluorescencia, correspondientes a bacilos gran negativos, oxidasa positivos, para un total de 13 aislados. El recuento de UFC/ml de muestras de agua y suelo presentaron una diferencia en su cantidad (Tabla 1). En las muestras del río hubo un alto crecimiento, mientras que en las muestras de la cuenca hubo un crecimiento menor en la siembra directa, sin embargo, la diversidad de *Pseudomonas* sp., se logro obtener con mayor facilidad de las

muestras tomadas del río. La tabla 1, muestra las especies caracterizadas por VITEK ® (Biomerieux), de las cuales inicialmente se seleccionaron las *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*. Todos los aislados obtenidos, serán sometidos a la identificación del gen *bmtA*, antes de exposición a la solución de plomo.

						Microorganismos aislados	Probabilidad ID VITEK	
RIO	Muestra	Directo	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>			
	C1	21	30	0	0	<i>P. aeruginosa</i>	98%	
	C2	30	0	0	0	<i>P. fluorescens</i>	98%	
	R1	Incontable	Incontable	5300	5000	<i>P. stutzeri</i> , <i>P. alcaligenes</i>	98% / 98%	
	R2	Incontable	Incontable	4100	14000	<i>P. stutzeri</i> o <i>P. fluorescens</i>	50% / 50%	
SUELO	Muestra	Directo	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
	CS1	7	0	0	0	0	<i>P. mendocina</i> ,	98%
	CS2	2	0	0	0	0	<i>P. putida</i> o <i>P. fluorescens</i>	50% / 50%
	RS	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	510.000		

**Tabla 1.** Recuento de microorganismos asociados a aguas y suelos aledaños al río Medellín e Identificación de diferentes especies de *Pseudomonas* sp. C1 y C2: muestra de agua de la cuenca que desemboca en el río Medellín; R1 y R2: muestra de agua directa del río Medellín; CS1 y CS2: muestra de suelo de la cuenca cercana a la desembocadura del río Medellín; RS: muestra de suelo (lodo) de la cuenca cercana a la desembocadura del río Medellín.

## Conclusiones.

Según la procedencia de la muestra, las poblaciones bacterianas cambian según el número de individuos. Se observó la diferencia entre el crecimiento de microorganismos aislados de la cuenca de agua vs. los aislados obtenidos directamente del agua de río. Se aislaron diferentes especies de *Pseudomonas*, microorganismo de interés para este estudio, de los cuales un 70% se recuperaron de agua de río, el otro 30% del suelo, asociadas a especies: *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes* y *P. fluorescens*. Evaluar si la presencia del

metal induce la producción de metalotioneínas (gen bmtA) será relevante en el análisis de resistencia al plomo, por consiguiente, es la siguiente fase de esta investigación.

## **Bibliografía.**

- Blindauer, C. A. (2011). Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 1011.
- Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Parkinson, J. A., Bowness, P. W., Sadler, P. J., & Robinson, N. J. (2002). Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1421-1432.
- Cabuk, A., Akar, T., Tunali, S., & Gedikli, S. (2007). Biosorption of Pb (II) by industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on the biomatrix of cone biomass of *Pinus nigra*: equilibrium and mechanism analysis. *Chemical Engineering Journal*, 131(1-3), 293-300.
- Choudhary, S., & Sar, P. (2009). Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Cd}^{2+}$ ) sequestration. *Bioresource Technology*, 100(9), 2482–2492. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.015>
- Gómez, M. Á. R. (2016). La adaptación a la deficiencia de zinc en cianobacterias. Papel de treonil-tRNA sintetasas duplicadas. (Tesis de doctorado). Universidad de Sevilla.
- Escobar Freire, J. J. (2019). Estudio de la biodiversidad microbiana en las aguas de la laguna del Quilotoa, provincia Cotopaxi-Ecuador (Tesis de grado). UCE.
- Jaroslwiecka, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Lead resistance in microorganisms. *Microbiology*, 160(1), 12-25
- Maguiña, H., & Bonifacio, R. (2019). Bioacumulación de metales pesados procedentes de la contaminación minera en tejidos de trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) de los centros de producción en jaulas flotantes. Puno, 2018

Naik, M. M., Pandey, A. & Dubey, S. K. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 from Mandovi estuary possesses metallothionein to alleviate lead toxicity and promotes plant growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 129–133.

Ramírez Cando, L. J., Guerra Guevara, S. P., & Reinoso Molina, G. A. (2016). Evaluación *in vitro* de la remoción de plomo en aguas residuales por *Photobacterium damsela*. *Revista de Ciencias de la Vida*, 26(2), 155-162.