



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

“Identificación y caracterización genética de bacterias reductoras de mercurio asociadas a la rizósfera de *Malus domestica*”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta: I.A. Camille Ughette Calzada Urquiza

Dirigida por: Dr. Juan Campos Guillén

Santiago de Querétaro, Qro. Septiembre 2016



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Especialidad en Ciencia y Tecnología Ambiental

Identificación y caracterización genética de bacterias reductoras de mercurio asociadas a la rizósfera de *Malus domestica*.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

I.A. Camille Ughette Calzada Urquiza

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

SINODALES

Dr. Juan Campos Guillén
Presidente

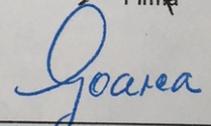
Dr. Miguel Angel Ramos López
Secretario

Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez
Vocal

Dr. Andrés Cruz Hernández
Suplente

M en C Gustavo Pedraza Aboytes
Suplente


M. en S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Querétaro.
Septiembre 2016
México

RESUMEN

En este trabajo se aislaron bacterias resistentes a mercurio asociadas a la rizosfera de *Malus domestica*, que crece en suelo con alta concentración de mercurio (637 ± 51 mg kg⁻¹) en la localidad de Nuevo San Joaquín, localizado en el municipio de San Joaquín, Querétaro. De 23 aislados bacterianos, se seleccionaron cinco por su capacidad de volatilizar mercurio a través del método de rayos X no radiactivo, y se identificaron como *Bacillus muralis* y *Bacillus simplex* a través de 16S rDNA y MALDI-TOF MS. Así mismo, en las cinco cepas a través de PCR se detectaron los genes *merR* y *merA* involucrados en la volatilización de mercurio, y por secuenciación solo se logró identificar el gen *merR* de *Bacillus simplex*, este gen fue altamente similar a otras secuencias reportadas de bacterias como *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Este es el primer trabajo que reporta el aislamiento de cepas de *Bacillus* resistente a mercurio de manzana, así como la primera secuencia del gen *merR* obtenido en esta área.

(**Palabras clave:** contaminación por mercurio, genes *mer*, MALDI-TOF, San Joaquín).

ABSTRACT

In this work, mercury-resistant bacterial strains were isolated from the rhizosphere of apples that grow in soils with high levels of mercury Nuevo San Joaquin, Queretaro State, Mexico (637 ± 51 mg kg⁻¹) Bacteria were identified as *Bacillus muralis* and *Bacillus simplex* through the proteomic technique of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and 16S rDNA. All strains showed the ability to catalyze the volatilization of Hg as measured via the non-radioactive X-ray method. In all strains *merR* and *merA* genes were detected by PCR. Nucleotide sequence analysis show that *merR* from *Bacillus simplex* is 435 bp in length and was highly similar to those of other *merR* sequences reported from diverse bacteria such as *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* and *Serratia*. To our knowledge, this is the first report of mercury-resistant *Bacillus* strains isolated from the rhizosphere of apples as well as the first *merR* gene sequence obtained in this area.

(Keywords: MALDI-TOF, mercury contamination, *mer* genes, San Joaquín).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado a través de la beca 391070 durante la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por el apoyo brindado durante mi estancia como estudiante,

A mi director de tesis Dr. Juan Campos Guillén, por compartir conmigo sus conocimientos y muy buenos momentos, por orientarme y por enseñarme que las oportunidades hay que tomarlas y que una buena actitud lleva lejos.

A los miembros de mi comité de tesis, Dr. Miguel Angel Ramos López, Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez, Dr. Andrés Cruz Hernández y al M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes, por su valiosa contribución en revisión y mejoramiento de esta tesis.

A mis compañeros de maestría y de laboratorio, por todos los buenos momentos compartidos, por los ánimos otorgados y la ayuda necesaria.

A mi familia muy en especial, por tanto cariño y comprensión, por ayudarme a valorar las cosas importantes en la vida y lograr mis metas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	5
2.1 Minería en San Joaquín.....	5
2.2 Características fisicoquímicas del mercurio.....	7
2.3 Contaminación por mercurio.....	8
2.4 Riesgo a la salud por exposición al mercurio.....	10
2.5 Consecuencias de la acumulación de metales pesados en plantas.....	11
2.6 Rizósfera.....	12
2.7 Métodos de remoción de Hg.....	15
2.8 Mecanismos utilizados por bacterias en la remoción de mercurio.....	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	24
IV. HIPÓTESIS.....	26
V. OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo general.....	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
5.2.1 Aislar y caracterizar bacterias resistentes a mercurio de rizósfera de <i>M. domestica</i>	27

5.2.2	Identificar por métodos moleculares los géneros bacterianos resistentes a mercurio obtenidos de la rizósfera de <i>M. domestica</i> ...	27
5.2.3	Identificar los genes <i>merA</i> y <i>merR</i> de los géneros bacterianos aislados de la rizósfera de <i>M. domestica</i>	27
VI.	METODOLOGÍA.....	28
6.1	Aislamiento de colonias.....	28
6.1.1	Muestreo.....	28
6.1.2	Sembrado por extensión de la rizósfera de <i>M. domestica</i>	29
6.1.3	Técnica de rayos X para la detección de volatilización de mercurio por cepas bacterianas resistentes a mercurio.....	29
6.1.4	Resistencia de las cepas bacterianas a distintos metales.....	30
6.1.5	Resistencia de las cepas bacterianas a distintos antibióticos.	30
6.2	Identificación de géneros bacterianos resistentes a mercurio.....	32
6.2.1	Amplificación del gen 16S rDNA.....	32
6.2.2	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	33
6.2.3	Transformación en <i>E. coli</i>	33
6.2.4	Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS.....	34
6.2.4.1	Preparación de células.....	34
6.2.4.2	Lisis celular.....	34
6.2.5	Identificación de Aislados Bacterianos por MALDI-TOF MS....	35
6.3	Identificación por PCR de los genes <i>merA</i> y <i>merR</i>	37
6.3.1	Identificación por PCR del gen <i>merR</i>	37
6.3.2	Identificación por PCR del gen <i>merA</i>	37
VII.	RESULTADOS.....	39
7.1.	Obtención de aislados bacterianos.....	39
7.1.1	Prueba de volatilización.....	39
7.1.2	Prueba de resistencia a distintos metales.....	41

7.1.3 Evaluación de multiresistencia antibióticos.....	43
7.2 Identificación de aislados bacterianos de rizósfera de <i>M. domestica</i>	45
7.2.1 Identificación de aislados bacterianos mediante amplificación de PCR 16S rDNA.....	45
7.2.2 Identificación de aislados bacterianos mediante MALDI-TOF MS.....	47
7.3 Identificación de <i>merA</i> y <i>merR</i> por PCR.....	47
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51
IX. CONCLUSIONES.....	56
X. REFERENCIAS.....	57
XI APENDICE.....	64
11.1 Apéndice I Soluciones utilizadas.....	69
11.2 Apéndice II Valores de resistencia a los antibióticos utilizados.....	71
11.3 Apéndice III Vectores utilizados.....	75
11.4 Apéndice IV Artículo publicado.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos inorgánicos de mercurio.....	7
Cuadro 2. Especies Hg y daños a la salud.....	10
Cuadro 3. Genes involucrados en operón <i>mer</i> y funciones específicas.....	22
Cuadro 4. Antibióticos y concentraciones utilizadas.....	31
Cuadro 5. Resistencia a metales.....	42
Cuadro 6. Bacterias identificadas mediante herramienta BLAST.....	46
Cuadro 7. Bacterias identificadas mediante MALDI-TOF MS	47
Cuadro 8. Solución I	69
Cuadro 9. Solución II	69
Cuadro 10. Solución III	70
Cuadro 11. Cepa 9 valores de resistencia a distintos antibióticos	71
Cuadro 12. Cepa 15 valores de resistencia a distintos antibióticos	71
Cuadro 13. Cepa 16A valores de resistencia a distintos antibióticos	72
Cuadro 14. Cepa 16B valores de resistencia a distintos antibióticos	73
Cuadro 15. Cepa 22 valores de resistencia a distintos antibióticos	73
Cuadro 16. <i>E. coli</i> TOP10.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bocamina y parcela en Nuevo San Joaquín.	6
Figura 2. Ciclo del mercurio.....	9
Figura 3. Zona de la rizósfera.....	15
Figura 4. Operón mer	21
Figura 5. Aislados Bacterianos de rizósfera de <i>M. domestica</i>	39
Figura 6. Placa de volatilización de mercurio.....	40
Figura 7. Histograma de perfil de Antibióticos.....	44
Figura 8. Amplificación del gen 16S	45
Figura 9. Amplificación <i>merR</i> y <i>merA</i>	49
Figura 10. Dendrograma de relación filogenética de <i>merR</i>	50
Figura 11. Mapa del vector pJET1.2	76

1. INTRODUCCIÓN.

La contaminación con metales pesados se ha convertido en uno de los más serios problemas que amenazan los ecosistemas y a la vida humana por su toxicidad y su tendencia a concentrarse en cadenas alimenticias, el mercurio (Hg) es uno de los metales más tóxicos, y su dispersión a través de diferentes matrices ambientales representa un alto riesgo en la salud (WHO, 2013).

Los principales yacimientos de Hg se localizan en países como España, Italia, Yugoslavia, Turquía, China, Japón, Filipinas, Estados Unidos, México, Chile, Colombia, Brasil y Perú. (PNUMA, 2005; Li y col., 2014). En México los yacimientos de Hg más importantes se encuentran localizados en los estados de San Luis Potosí, Zacatecas, Querétaro, Durango y Guerrero (Langenscheidt, 2006). En el estado de Querétaro en la zona conocida como la Sierra Gorda ésta actividad ha sido relevante desde la época prehispánica, debido a que hay evidencias se realizaban explotaciones a cielo abierto desde el siglo XII a.ne. y subterráneas desde el siglo X a.C., para la extracción de cinabrio (sulfuro de mercurio HgS), que se utilizaba principalmente debido a su coloración roja, similar a la sangre para decorar muros, cerámica y tintura de piel. Durante la Colonia se explotaron en la región yacimientos de plata y plomo que dieron lugar a la fundación de pueblos mineros como San Pedro Escanela, El Doctor, Pinal de Amoles, Río Blanco, Plazuela, San Joaquín y Maconí. En la década de los setentas inicia el auge del mercurio, que colocó a Querétaro como primer

productor nacional y cuarto a nivel mundial, con San Joaquín, Peña Miller y Pinal de Amoles como los principales municipios de extracción, con una producción estimada de 140 toneladas mensuales (SGM, 2011, Langenscheidt, 2006).

En el municipio de San Joaquín la explotación de cinabrio está prohibida, sin embargo la extracción por varios años HgS dejó a este municipio con altas concentraciones de mercurio en bocaminas, terrenos y jales expuestos a corrientes de agua y viento, que lo dispersan y que hacen que haya un elevado nivel de contaminación (Hernández-Silva, 2009, Martínez-Trinidad, y col., 2013). Además el suelo, agua y cultivos han sido contaminados con Hg presentando niveles por arriba de los límites máximos permitidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés), y en el caso de suelos, el nivel excede el límite establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

En San Joaquín para que las familias tuvieran posibilidad de obtener ingresos, se implementaron por parte de la Secretaria de Desarrollo Agropecuario (SEDEA) programas de ayuda para el aprovechamiento del suelo, promoviendo la fruticultura. Ya que la agricultura es de temporal y los afluentes de agua son inadecuados para una producción agrícola de mayor escala. Son entonces los huertos de manzano, *Malus domestica* (Rosaceae), parte fundamental de los

ingresos económicos, con una producción de 560 toneladas anuales, siendo las variedades cultivadas Red Delicious y Golden Delicious (SAGARPA, 2014).

La remediación del suelo contaminado con Hg es una necesidad evidente en los sitios mineros con altas concentraciones de esta especie química. Por esto en las últimas tres décadas se han desarrollado tecnologías para la remediación de suelos, que pueden *ser in situ o ex situ*, que se pueden clasificar como métodos físicos, electroquímicos, biológicos fitoremediación y biorremediación (de la Rosa y col., 2007). Sin embargo algunos de estos procesos para sanar los suelos contaminados con Hg, son poco accesibles para la mayoría de la gente debido a los altos costos que pueden representar y a que algunas de estas metodologías no son accesibles en el país. En el afán de encontrar alternativas que sean viables para la descontaminación de suelos, la biorremediación es una opción que da varias vertientes debido a que considera tanto la fitorremediación, como el empleo de microorganismos (Volke y col., 2005). En este sentido se han identificado microorganismos principalmente bacterias y hongos con capacidad para biodegradar moléculas de compuestos orgánicos o para bioacumular metales pesados, entre ellos al mercurio (Zawiercha y Malina, 2011).

Es por esto que es importante la identificación de microorganismos que muestren resistencia y actividad reductora de metales, con la finalidad de poder acoplar sistemas, de plantas y microorganismos, para disminuir la concentración

de metales en suelo y agua, bajo diversas condiciones (Clark, 1977; Ren y col., 2015).

Los avances en los métodos moleculares han permitido analizar la interacción que tienen las plantas y los microorganismos presentes en el suelo y en la rizósfera, siendo algunos de los métodos más empleados para la identificación y secuenciación de bacterias el de Reacción en cadena de Polimerasa (por sus siglas en inglés PCR), 16S Ribosomal y MALDI-TOF MS y el método bioquímico BIOLOG para la identificación bacteriana, con los que se han logrado generar bases de datos más amplias, que han permitido mayores avances en el diagnóstico microbiano, así como identificaciones más rápidas de genes de importancia ambiental. Por lo que en este proyecto se utilizaron las técnicas de PCR 16S rDNA y MALDI-TOF para la identificación y caracterización de bacterias asociadas a la rizósfera de *M. domestica* en la localidad de Nuevo San Joaquín, y la determinación de los genes *mer* de las bacterias involucradas en el proceso.

2.FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

2.1 Minería en San Joaquín

San Joaquín es un municipio que se encuentra al noreste del estado de Querétaro, colinda con los municipios de Jalpan, Cadereyta y Pinal de Amoles, la temperatura media anual es de 14°C y en invierno desciende hasta -3°C, la temporada de lluvias es entre los meses de mayo y agosto, con una precipitación anual de 1,150 milímetros, cuenta con una altura de 2,400 metros sobre el nivel del mar (Ramírez, 2007).

Éste municipio presenta una geología muy particular, en donde existen de manera natural abundantes yacimientos de mercurio, haciendo que la obtención de este elemento sea relativamente sencillo. La extracción de este metal en San Joaquín data desde el siglo IV a.n.e. por hallazgos de herramientas utilizadas para obtener cinabrio o sulfuro de mercurio (HgS). Desde entonces la minería de Hg ha pasado por distintas etapas a través de los siglos conforme a la demanda de éste (Hernández-Silva, 2009).

Gracias a estudios arqueológicos se conoce que desde el periodo clásico de 200-900 los pobladores de esta zona explotaban el cinabrio para comercialarlo con Teotihuacán. Para los años 800 y 900 los habitantes fueron desplazados por cazadores recolectores. La fundación de San Joaquín fue en 1682 por Jerónimo

de Labra y al padre Ochoa. En el periodo virreinal, la producción del metal era contante pero sin llegar a volúmenes altos (Langenscheidt, 2006).

La extracción minera de mercurio aumento de 1870 a 1930 para la obtención de obtener plata por medio de amalgación. En el periodo de 1950 a 1970 la demanda de mercurio hizo que la explotación de mercurio se retomara, alcanzando un auge importante, ya que la extracción fue intensiva, esta actividad se abandonó hasta 1990, en donde México ocupó el cuarto lugar de producción a nivel mundial, aumentando la contaminación por mercurio (Martínez-Trinidad y col., 2013). Las repercusiones de tantos siglos de explotación se manifiestan en las bocaminas y jales que contienen grandes depósitos de este elemento, expuestos a las condiciones climáticas de viento y agua para la dispersión del Hg en toda la región (Figura1.)



Figura 1. Izq. Bocamina moderna para la explotación de minerales (actualmente se utiliza como basurero). Der. Parcela de manzanos que se encuentra a 15m de la bocamina.

2.2 Características fisicoquímicas del mercurio.

El Hg es considerado como metal tóxico y el único que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente, es de color plata brillante, volátil y se solidifica a una presión de 7.640 atmosferas, con un punto de fusión de -38°C y punto de ebullición de 357°C . Metal de transición que le confiere buena conducción de electricidad y de calor, su número atómico es el 80, con una masa atómica de 200.59 u. Además de mercurio elemental (Hg^0), puede existir en forma de mercurio (iónico Hg^{1+} y Hg^{2+}) (Wotruba y col., 2000). Además de la formación de compuestos inorgánicos (Cuadro 1.).

Cuadro 1. Compuestos inorgánicos de Hg (Wotruba y col., 2000).

Compuestos inorgánicos	Formula química
Sulfuros	HgS
Óxidos	HgO
Compuestos con halógenos	Hg_2Cl_2 , HgF_2 , HgBr_2
Cianuros y Thiocianatos	$\text{Hg}(\text{SCN})_2$

Éste metal pesado es reconocido como un contaminante tóxico para la mayoría de los organismos, es introducido en el ambiente por fuentes tanto

naturales como antropogénicas. El Hg puede transportarse a grandes distancias en la atmósfera, y depositarse en suelo y agua, además de bioacumularse en forma de metilmercurio (Barkay y col., 2003; Li, 2014). Como fuente natural se tienen erupciones volcánicas, desgasificación de corteza terrestre, erosión de las rocas que emiten bajas concentraciones de metales pesados, entre ellos el Hg^0 que es volátil e insoluble en agua. En la atmósfera el Hg^0 cambia a Hg^{2+} , que lo hace soluble en agua (Bradl, 2005).

2.3 Contaminación por mercurio

La contaminación antropogénica con mercurio se debe a que se usa en una amplia gama de productos, en plantas de cloro-álcali con tecnología de células de mercurio, minería de oro artesanal, quema de carbón y procesado de metales, además de utilizarse para productos como: termómetros y manómetros, interruptores eléctricos y baterías, como biosidas en semillas, y abrillantador de pinturas entre otros. Alrededor del 70% de las emisiones de mercurio provienen de la combustión estacionaria de combustibles fósiles y de la incineración de materiales de desecho (Unep, 2008, Li, 2014).

El mercurio como subproducto es el que se genera durante el proceso de producción de otros metales, esto quiere decir que está presente en cantidades mínimas, el mercurio primario es cuando se extrae con el fin de utilizar éste metal para actividades como las mencionadas anteriormente, el mercurio secundario es el que se recupera de productos al final de la vida útil, o como residuo en procesos

industriales que utilizan Hg. México tiene importantes reservas de Hg secundario como consecuencia de métodos ineficientes de amalgamación de la plata utilizados en la producción de este metal. Entre los años de 1,545-1,900, se estima que fueron descargadas unas 73,000 toneladas de mercurio a suelos y cuerpos de agua (Castro, 2013). Las especies principales de mercurio que resultan de estos procesos son el Hg^0 y dimetilmercurio $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, la transformación a otros compuestos como Hg^{2+} unida a grupos SH, sucede en el ciclo biogeoquímico (Figura 2) (Kaschack y col., 2013, Barkay y col., 2003). La transformación de Hg inorgánico a orgánico, ocurre en sitios con alta actividad bacteriana, con la aparición de bacterias reductoras de sulfatos, que hacen disponible el metilmercurio (Baldi, 1993).

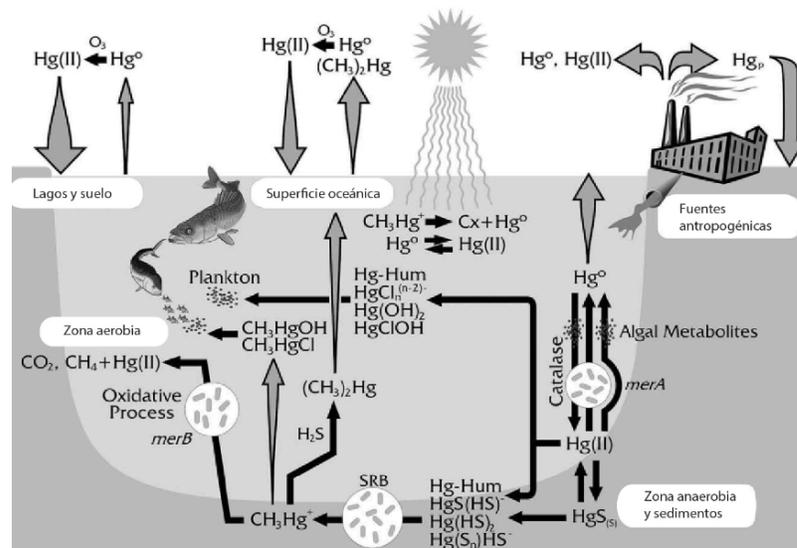


Figura 2. Ciclo del mercurio (Barkay, 2003) En donde las bacterias sulfatoreductoras juegan un rol importante para la transformación de mercurio

2.4 Riesgo a la salud por exposición a mercurio.

El metilmercurio se vuelve disponible para la acumulación en la cadena alimenticia. con un potencial riesgo a la salud para seres humanos. El nivel de toxicidad en seres humanos y otros organismos varía según la forma química, la cantidad, vía de exposición así como la vulnerabilidad de la persona expuesta (Cuadro 2.). El metilmercurio es un neurotóxico, que puede provocar efectos perjudiciales especialmente en el cerebro en formación, traspasa con facilidad la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica, esto hace preocupante la exposición durante el embarazo (Unep, 2008. Llop y col., 2012).

Cuadro 2. Especies de Hg y daños a la salud (PNUMA, 2005)

Especie de Mercurio	Vía de exposición	Daños causados
metilmercurio	Consumo de pescados y mariscos	Neurotóxico, especialmente en mujeres embarazadas y niños
mercurio elemental	Inhalación de vapores y amalgamas dentales	A tejidos pulmonares, penetrando barrera de sangre del cerebro, con trastornos neurológicos

La intoxicación con metilmercurio, es conocida como la enfermedad de Minamata, llamada así por la Bahía de Minamata en Japón, donde en 1956 se detectó la primera epidemia de recién nacidos que presentaban trastornos neurológicos mayores, debido al consumo de pescado contaminado que ingirieron sus madres en el embarazo, ésta fue la primera vez que se presentó la neurotoxicidad del mercurio en poblaciones no expuestas en el ámbito laboral (De Miguel y col. 2013). La enfermedad de Minamata fue descrita por primera vez en 1959 como una enfermedad del sistema nervioso causada por el consumo de pescado y mariscos. Síntomas de esta enfermedad incluyen impedimento de escucha y habla, temblores, y falta de coordinación, que llevan finalmente a daños en la corteza cerebral (Ekino y col. 2007, Llop y col. 2012).

2.5 Consecuencias de la acumulación de metales pesados en plantas.

El mercurio ingresa a las plantas a través del mismo proceso utilizado para la toma de nutrientes, aún cuando estas han desarrollado mecanismos de selección de acceso de nutrientes, estos pueden fallar y es cuando sustancias no deseadas como el Hg entran al organismo. La cantidad de metales que pueden absorber va estar sujeto a la movilidad que tenga el elemento en la rizósfera, sujeto a la concentración y especie de mercurio en suelo, tiempo de exposición y características edáficas influyen en la biodisponibilidad (González-Mendoza y Zapata-Pérez 2008; Peralta-Pérez y Volke Sepúlveda, 2012).

El mercurio afecta la fotosíntesis y el metabolismo oxidativo porque interfiere con el transporte de electrones en cloroplasto y en mitocondria, además inhibe la actividad de las acuaporinas y reduce el consumo de agua (Sas-Nowosielska y col. 2007). Sin embargo las plantas tienen la habilidad de sobrevivir suelos contaminados con metales pesados, y esto se manifiesta en una interacción entre el genotipo y el medio, diversos estudios genéticos han demostrado que esto es gracias a una multitolerancia o cotolerancia. Sin embargo éstas se ven afectadas por diferentes tipos de estrés que genera la acumulación de metales pesados como son la deficiencia de nutrientes, estrés oxidativo de semillas durante la germinación, y estrés metabólico (Wu y col. 2006).

Por lo que existen diferentes mecanismos de tolerancia a metales pesados como son las micorrizas extracelulares y los exudados como protectores. La membrana plasmática también participa en la reducción de la toma de metales pesados en el flujo de los iones metálicos. En el protoplasto las proteínas y moléculas quelantes como ácidos orgánicos y aminoácidos, almacenan metales tóxicos en las vacuolas, alejándolos de los procesos metabólicos (Sas-Nowosielska y col. 2007; Moreno y col. 2009).

La secreción de ácidos orgánicos aumenta la absorción radicular y movilización de metales pesados, se conoce que un 40% de los metales se encuentran asociados a moléculas orgánicas en suelo. Algunos trabajos demuestran que la presencia de ácido acético y succinato presentes en la rizósfera

del trigo son los responsables de la acumulación de Cd (Yan-de y col. 2007). Es además gracias a estos procesos que las plantas pueden realizar fitorremediación, que es mediante remoción, transformación, degradación o estabilización de contaminantes.

2.6 Rizósfera

En 1904, un agrónomo alemán, Lorenz Hiltner, utilizó el término de rizósfera por primera vez para describir la interface entre planta-raíz y suelo, como un área alrededor de las raíces de las plantas habitadas por una población única de microorganismos. Se divide en tres zonas, la endorizósfera que incluye la porción de córtex y endodermis en la que la microbiota y cationes pueden tomar el espacio que existe entre células (espacio apoplástico), el rizoplano que es la zona media y que es directamente adyacente a la raíz, donde se incluye el mucilago, la externa es la ectorizósfera que va del rizoplano al suelo (Figura 3). La rizósfera no tiene un tamaño o forma sino consiste más bien de un gradiente de propiedades químicas, biológicas y físicas (McNear, 2013).

El término de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) se utilizó por primera vez con Kloepper y Schrot, en 1980. Estas bacterias habitan en la rizósfera y estimulan el crecimiento y la salud vegetal, especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas* se encuentran dentro de las BPCV.

En 1985 Newman examinó una variedad de especies que liberan de entre 10 a 250 mg de carbón C por gramo de raíz, liberándolo en formas orgánicas e inorgánicas, siendo la mayoría las primeras y que influyen en los procesos rizosféricos. Los productos de la raíz se conocen como rizodepositos, clasificados de acuerdo a su composición química, modo de liberación o función y se puede incluir las células de los bordes, mucilago y exudados. El mucilago es viscoso, con alto peso molecular, insoluble y rico en polisacáridos, provee lubricación y previene sequia, además de asistir en la toma de nutrientes, así como la unión de partículas de suelo, logrando una buena calidad aumentando la infiltración de agua y aireación (Nihorimbere y col. 2010).

En la rizósfera, las raíces de las plantas tienen una influencia directa en la composición y densidad de la microbiota del suelo, se conoce como efecto rizosférico, este efecto puede verse como la relación entre el número de microorganismos en el suelo de la rizósfera y el número de microorganismos en el suelo alejado de las raíces y se llama relación R/S que generalmente es entre 5 y 20, pero es normal encontrar valores de 100 es decir poblaciones microbianas 100 veces mayores en la rizósfera que en el suelo sin raíces de los alrededores (Morales, 2013). Las raíces que se encuentran rodeadas por microorganismos excretan una cantidad de materiales orgánicos mucho mayor que las raíces estériles. Algunos de estos inhiben a los microorganismos pero la mayoría promueve su crecimiento. Muchas de las bacterias de la rizósfera requieren

aminoácidos para alcanzar su máximo crecimiento y es muy probable que los exudados de las raíces se los proporcionen (Atlas y Bartha, 2002).

El género *Bacillus* es el más abundante en este tipo de ecosistemas, puede beneficiar el desarrollo y la salud vegetal, a través de la producción de compuestos fitoestimulantes como hormonas vegetales o de manera indirecta con la síntesis de compuestos que presentan actividad antibiótica que inhibe el crecimiento de fitopatogenos (Cruz-Medina y col, 2012). Son bacterias Gram positivas con forma bacilar, aerobios estrictos o anaerobios facultativos, en condiciones de estrés forman una endospora central cuya presencia deforma la estructura celular. Confiéndole resistencia altas temperaturas y a desinfectantes químicos. Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de plantas por diversos mecanismos (Cordero y col. 2012).

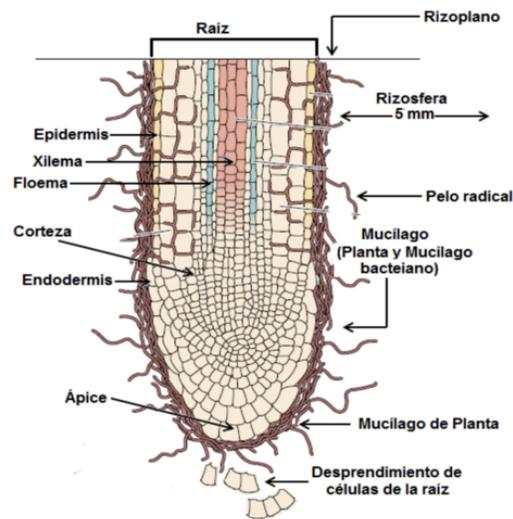


Figura 3. Zona de la rizósfera (Morales, 2013), en donde se aprecia como interactúan la raíz, rizoplasma y rizósfera.

2.7 Métodos de remoción de Hg.

La meta de cualquier tecnología de remediación ya sea *in situ* o *ex situ*, es la remoción de contaminantes o la reducción del riesgo que se asocia a su presencia, es decir limitando la exposición a través de la estabilización. Existen diferentes métodos para la remoción de Hg en suelo, como son fisicoquímicos o tradicionales que incluyen incineración, solidificación/estabilización, lavado, excavación y entierro; y los biológicos. Los primeros pueden ser por mecanismos fotocatalíticos de los iones metálicos, y pueden ser directos e indirectos, en donde la eficiencia de la reducción se puede aumentar agregando agentes químicos reductores, los segundos implican el uso de microorganismos o plantas y son mejor conocidos como métodos de biorremediación (Sas-Nowosielska y col. 2007).

La remoción del mercurio también depende en gran medida del estado en el que se encuentre, por ejemplo en el caso de nitrato de mercurio, se tiene una máxima remoción a un pH alcalino de 10.3-11.2. Se puede tener también una remoción muy buena usando nanopartículas de TiO_2 , la fotorreducción de metilmercurio sólo es posible en presencia de metanol y en ausencia de oxígeno (Mercader y col. 2006).

Como los metales pesados son elementos naturales, la degradación no es posible, por eso los microorganismos han desarrollado estrategias que les permiten hacer frente para transformar el elemento a una forma menos dañina o

ligarlo de manera intra o extra celular, para evitar daños en la célula, también con el transporte activo del metal fuera del citosol (Rouch y col. 1995).

El concepto de biorremediación surge a partir de la observación de la interacción de bacterias con metales y otros compuestos tóxicos y por organismos eucarióticos como hongos y levaduras. Se refiere al proceso de utilizar agentes biológicos para eliminar compuestos tóxicos del medio ambiente. Siendo una alternativa que ofrece la eliminación o reducción de contaminantes incluyendo metales pesados, es una técnica de costo relativamente bajo que tiene alta aceptación que puede ser realizada in situ (Ahemad, 2012). En 1992 el organismo de Encuestas Geológicas de Estados Unidos, en inglés U.S. Geological Survey (USGS) añadió nutrientes en Hanahan SC, para activar especies bacterianas del suelo, en in año el 75% de los compuestos tóxicos fueron removidos. Desde entonces se ha seguido con la labor de mejorar estos procesos a través por ejemplo de los organismos diseñados a través de ingeniería genética.

Existen microorganismos que pueden sobrevivir a elevadas concentraciones de mercurio, debido a diferentes mecanismos de resistencia. Como la reducción enzimática a Hg^0 y la volatilización. El mecanismo de detoxificación en bacterias Gram negativas es el transporte de iones Hg^{2+} hacia el citoplasma (Rojas y Ortiz, 2010).

En 1960 Moore realizó los primeros reportes sobre la resistencia bacteriana a compuestos orgánicos e inorgánicos de Hg en una cepa de *Staphylococcus aureus* que fue aislada en un hospital, en 1964 se hicieron reportes de bacterias

que eran capaces de transformar Hg^{2+} a Hg^0 , y que esta resistencia estaba ligada a plásmidos (Clark, 1977).

2.8 Mecanismos utilizados por bacterias en la remoción de mercurio.

La resistencia a metales es asociada a la resistencia a antibióticos (Belliveau, 1991), y esta puede ser transferida entre bacterias por mecanismos de conjugación y transducción, en algunos casos la resistencia a antibióticos y metales es mediada por el mismo plásmido.

Bacterias, hongos y plantas han evolucionado diferentes mecanismos de resistencia a distintos metales pesados: Hg (II), As (V), Cr (VI), Cd (II). El género bacteriano tiene un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico del mercurio (Barkay, 2003), sus mecanismos de resistencia al mercurio han sido estudiados de manera extensiva.

Existen tres mecanismos para la ligación de los metales a las paredes celulares, que es el intercambio de ion con peptidoglicano y ácido teicoico, precipitación a través de reacciones de nucleación y la formación de complejos con ligandos de nitrógeno y oxígeno. Las bacterias Gram-positivas, particularmente *Bacillus spp.* tienen gran capacidad de absorción debido a su pared de peptidoglicano y contenido de ácido teicoico en sus paredes celulares (Hart y col. 1998; Moraga y col. 2003).

La toxicidad del metilmercurio es mayor en organismos superiores que en algunas bacterias, porque inhibe grupos SH presentes en la mayoría de los procesos enzimáticos, que ocasiona necrosis y muerte celular. Los mecanismos de resistencia a iones de mercurio que presentan las bacterias pueden ser de tres tipos, la síntesis de tioles, que une los compuestos de Hg reduciendo la toxicidad para la célula; la presencia de barrera permeable, que limita la entrada de mercurio a la célula; y el tercer mecanismo es el más interesante es el que está controlado por el operón *mer*, que puede estar localizado en plásmidos, DNA genómico o en integrones (Dash y Das, 2012).

El operón *mer*, es el responsable de conferir resistencia a Hg, puede estar localizado en cromosomas o en plásmidos. Consiste en genes que codifican proteínas funcionales de regulación (*merR*) de transporte (*merT*, *merP* y/o *merC*, *merF*) y de reducción (*merA*) (Osborn y col. 1997; Gupta y col. 1999).

El primer gen en el operón *mer* es *merR*, expresa una proteína metaloregulatoria MerR que regula tanto de manera negativa como positiva la expresión de los genes estructurales, regulando también su propia expresión de manera negativa. Los genes *merT* y *merP* que son de transporte se requieren para la resistencia a Hg (II). El gen *merA* codifica la mercurio reductasa MerA, seguida por genes que codifican transportadores. Diversos estudios han dado a conocer distintos microorganismos ampliamente distribuidos que poseen genes *mer*:

Shigella flexneri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus aureus* (Yu y col, 2014).

Las bacterias llevan a cabo la biotransformación de Hg^{2+} a Hg^0 . En bacterias Gram negativas resistentes al mercurio, una enzima unida a *NADPH*, llamada *reductasa mercúrica*, *MerA*, transfiere dos electrones de Hg^{2+} a Hg^0 , el gen *merA* codifica esta enzima que es una flavoproteína soluble que se localiza en el citoplasma, (Barkay, 2003). Lo producido en esta reacción es volátil, pero lo más importante es que esto previene la acumulación de este metal en su forma más tóxica en la cadena trófica que es metilmercurio. La conversión bacteriana de Hg^{2+} a Hg^0 permite entonces convertir más CH_3Hg^+ en Hg^{2+} . La resistencia al mercurio se ha estudiado intensamente en *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria Gram negativa que posee un plásmido que contiene genes para la resistencia a dicho metal, estos genes llamados genes *mer*, están situados en un operón y están bajo el control de la proteína reguladora *MerR*, éste funciona de represor y también de activador (Madigan y col., 2004).

Los genes que componen éste operón no son uniformes, en general se tiene un gen regulador *merR*, un gen de transporte de mercurio *merT*, un gen de unión al mercurio extracelular *merR* y *merA* el gen de mercurioreductasa, son los genes básicos que se encuentran en todos los operones *mer*, algunos de los genes adicionales y que confieren resistencia a compuestos organomercuriales son gen *merB*, gen *merC* para el transporte de mercurio, *merD* que es un gen de

regulación secundario, *merW* otro gen de transporte así como *merF* y *merG* que confiere la resistencia a fenilmercurio (Barkay y col., 2003; Allen y col. 2012; Dash y Das, 2012)(Figura 4).

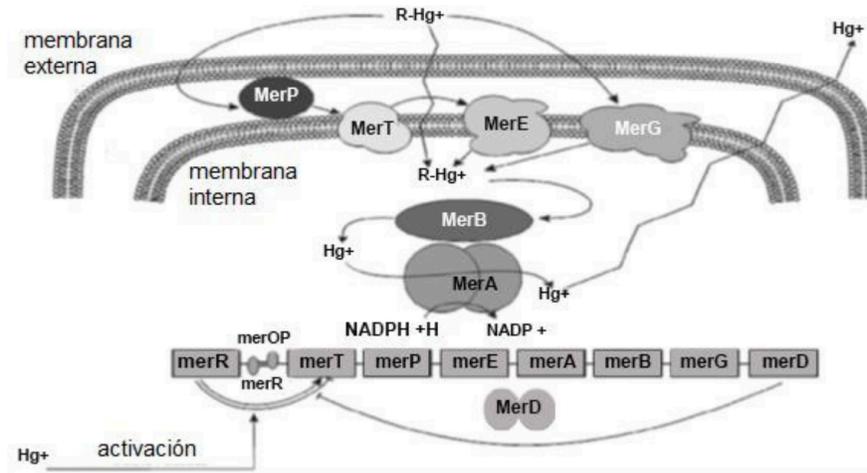


Figura 4. Operón *mer* de amplio espectro (Dash y Das, 2012), mecanismo de genes específicos que se activan ante la presencia de Hg

En ausencia de Hg^{2+} , MerR se une a la región operadora del operón *mer* y realiza la transcripción de genes, cuando esta presente Hg^{2+} el metal forma un complejo con *merR*, que funciona como activador de la transcripción del operón *mer*. La reductasa mercúrica, es producto del gen *merA*, MerD producto del gen *merD*, también cumple una función reguladora, y *merP* codifica una proteína periplásmica captadora de Hg^{2+} . La proteína MerP, se une al Hg^{2+} y lo transfiere a una proteína de membrana MerT, que transporta el Hg^{2+} al interior de la célula

para que sea reducido por la mercurio reductasa. El resultado es la reducción de Hg^{2+} a Hg^0 , que es volátil y es liberado por la célula (Madigan y col., 2004).

Cuadro 3. Genes involucrados en operón mer y funciones específicas (Dash y Das, 2012).

Gen	Producto del gen	Localización	Función
<i>merA</i>	mercurio reductasa	Citoplasma	Conversión de Hg^{2+} a Hg^0
<i>merB</i>	Organomercurio liasa	Citoplasma	Lisis de la unión C-Hg ⁺
<i>merP</i>	Proteínas periplasmáticas de unión al mercurio	Periplasma	Transferencia de Hg^{2+} a membrana de proteínas
<i>merT</i>	Proteínas de transporte	Membrana interna	Transporte de mercurio
<i>merD</i>	Proteínas reguladoras	Citoplasma	Regulación negativa del operón <i>mer</i>
<i>merR</i>	Proteínas	Citoplasma	Regulación

	reguladoras		positiva del operón
			<i>mer</i>
<i>merC</i>	Proteínas de transporte	Membrana interna	Transporte de mercurio
<i>merF</i>	Proteínas de transporte	Membrana interna	Transporte de mercurio
<i>merG</i>	Proteína resistente a fenilmercurio	Periplasma	Resistencia a fenilmercurio
<i>merE</i>	Proteína de transporte de metilmercurio	Membrana interna	Recolección de organo-mercuriales al citoplasma

3. JUSTIFICACIÓN

En México, y en particular en el estado de Querétaro se sigue realizando el proceso de extracción y beneficio de mercurio, bajo condiciones por lo general artesanales, lo que ha propiciado que en las zonas mineras del país y del estado, la contaminación del suelo y del agua por Hg represente un riesgo serio a la salud de las poblaciones expuestas, como Nuevo San Joaquín en la que se han encontrado concentraciones hasta de 4164 mg kg^{-1} debido principalmente a los residuos de la actividad minera (PNUMA 2005; Martínez-Trinidad y col., 2013).

Por lo anterior, se requiere la implementación de sistemas que puedan disminuir la contaminación del suelo y agua, como son técnicas fisicoquímicas, así como de biorremediación. Las primeras son poco accesibles debido a los altos costos que ésta representan. Por tal motivo, una alternativa importante es la biorremediación, la cual incluye el uso de microorganismos como las bacterias (Urdaneta y col. 2008; Sas-Nowosielska y col. 2007).

En consecuencia, el aislamiento de bacterias de sitios contaminados con Hg, permite obtener poblaciones de microorganismos con diferente grado de adaptación a mezclas de metales pesados, entre ellos el mercurio (Barkay y col., 2003). La identificación y caracterización de estas poblaciones de bacterias que biotransforman las formas tóxicas de Hg debido a los genes *mer* que transforman el metilmercurio (CH_3Hg) a mercurio con estado de oxidación de dos (Hg^{2+}) y éste, a su vez, a un estado de oxidación de cero (Hg^0) el cual es volátil, por lo que

puede ser capturado o inmovilizado. Así mismo, el uso de estas bacterias puede ser posteriormente un recurso para ser implementado en sistemas acoplados de remoción de mercurio en matrices como son el suelo y agua

4. HIPÓTESIS.

En la zona minera de San Joaquín, en la rizósfera de *Malus domestica* existen bacterias que se han adaptado a medios contaminados con metales tóxicos y que tienen la capacidad para reducir el mercurio, debido a que poseen genes *mer* que están involucrados en el proceso.

5.1 OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Determinar la capacidad metabólica de bacterias, asociadas a la rizósfera de *Malus domestica*, de la zona minera de San Joaquín, Querétaro, para la reducción del mercurio e identificar los genes *mer* de las bacterias involucradas en el proceso.

5.2 Objetivos específicos.

5.2.1 Aislar y caracterizar bacterias resistentes a mercurio de rizósfera de *M. domestica*.

5.2.2 Identificar por métodos moleculares los géneros bacterianos resistentes a mercurio obtenidos de la rizósfera de *M. domestica*.

5.2.3 Identificar los genes *merA* y *merR* de los géneros bacterianos aislados de la rizósfera de *M. domestica*.

6. METODOLOGÍA.

El presente trabajo se realizó en Laboratorio de Ciencias Ambientales, Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro, asignado a la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental de la Facultad de Química.

6.1 Aislamiento de colonias bacterianas de rizósfera de *M. domestica*.

6.1.1 Muestreo:

Se hizo el muestreo en la localidad de Nuevo San Joaquín del municipio de San Joaquín en el estado de Querétaro ubicada a una altitud de 2440 m sobre el nivel del mar con las coordenadas geográficas iniciales latitud: 21° 07' 00", longitud: 99° 22' 00". Debido a trabajos previos en donde se determinó que los suelos tienen una concentración de 637±51 mg kg⁻¹ de Hg y en el fruto de la manzana de 15.44±4.33 mg kg⁻¹ de Hg (Sánchez-Fuentes, 2013).

Se colectaron muestras de suelo de un 1 kg en cada una de las parcelas muestreadas, a una profundidad de 30 cm (Volke y col. 2005). Se realizó un muestreo sistemático en las parcelas en zigzag por el método de cuarteo.

Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico. Con una adecuada identificación (NMX-AA-132-SCFI-2006). Éstas se llevaron al Laboratorio de Ciencias Ambientales, campus Aeropuerto, con el cuidado adecuado para no dañarlas. Se secaron las muestras de rizósfera y suelo adherido en charolas independientes de plástico correctamente lavadas y desinfectadas así como

etiquetadas. Se tomaron 10 g de rizósfera con suelo adherido y se almacenaron en tubos estériles de 50 mL 8 (Stangoulis, 2009).

6.1.2 Sembrado por extensión de la rizósfera de *M.domestica*

A la rizósfera de *M. domestica* almacenada en los tubos, se le adicionaron 500 μ L de caldo de soya tripticasa en tubos eppendorf. Las muestras se sembraron por extensión en medio nutritivo selectivo de soya tripticasa con agar (TSA) al que se le añadieron 50 μ g mL⁻¹ de HgCl₂. Después se introdujeron en la cámara de incubación a 37°C. Se hizo una selección de aislados con fenotipos diferentes. Estos fueron resembrados por método de estría en cajas Petri (Madigan y col. 2004). Los aislados que se obtuvieron se almacenaron en glicerol al 20% y en congelación.

6.1.3 Técnica de rayos X para la detección de volatilización de mercurio por cepas bacterianas resistentes a mercurio.

Se utilizó la metodología de rayos X de Nakamura y Nakahara (1990) para la selección de géneros bacterianos con capacidad de reducción de mercurio. En medio nutritivo de soya tripticasa con 50 μ g mL⁻¹ de HgCl₂, las 23 cepas axénicas se sembraron y se incubaron durante 16 horas a 36°C. Posteriormente, se utilizaron placas de micro título de 96 pozos, a cada uno de estos pozos se le añadieron 100 μ L de Buffer de volatilización con aislado bacteriano, previamente incubado, se cubrieron con placas de rayos X fotosensibles de nitrato de plata

Amersham Hyperfilm™ de 8 x 12.3 cm, se colocó la tapa sobre la placa y esta se reforzó con broches de presión colocando en una caja para conservarla en condiciones de oscuridad (Takeuchi, 2003). Después del periodo de incubación de 10-12 horas a 37°C, se realizó el revelado de la placa en cuarto oscuro bajo las siguientes condiciones:

1. Tres minutos en solución reveladora (Kodak Developer)
2. Dos minutos en solución de lavado (Agua destilada)
3. Tres minutos en solución fijadora (Kodak Fixer)
4. Cinco minutos en solución de lavado (Agua destilada)

6.1.4 Resistencia de las cepas bacterianas a distintos metales

De los 5 aislados que fueron seleccionados por la técnica de rayos X, se probó además la resistencia a distintos metales pesados Pb, Co, Cu, Cd, Cr y Hg. Los aislados bacterianos se inocularon en medio sólido Luria Bertani (LB) al 50% y se incubaron 24 horas a 36°C. Más tarde se tomó una asada que se resuspendió en medio líquido LB tomando 100 µL de cada cultivo y se extendieron en placas de LB 50% sólido. Cada metal se probó en concentraciones distintas partiendo desde 50 µg mL⁻¹ hasta una concentración de 700 µg mL⁻¹.

6.1.5 Resistencia de las cepas bacterianas a distintos antibióticos

Los aislados bacterianos se inocularon en medio líquido de soya. Se incubaron en agitación 24 horas a 37°C hasta que la suspensión alcanzó una densidad óptica de 0.4 a 600 nm. Se tomó 100 µL de cada cultivo y se extendieron

en placas de medio sólido de soya. Por medio del método Kirby-Bauer se usaron papeles filtro estériles de 6 mm de diámetro impregnados cada uno con 5 μ L de cada uno de los antibióticos, a diferentes concentraciones (Cuadro 4.) se colocaron en la placa de agar y se incubaron a 37°C por 10-12 horas. Después se midieron los diámetros de las zonas de inhibición y fueron registradas. Todas las pruebas se hicieron por triplicado y la acción antibacterial se expresó en mm. Los resultados se normalizaron y se hicieron análisis con el software R package versión 3.2.1. De los antibióticos utilizados 5 afectan síntesis de proteínas: Kanamicina, Cloranfenicol, Espectinomicina, Estreptomycin, Tetraciclina; dos afectan la síntesis de pared celular: Ampicilina y Carbencilina; uno afecta la síntesis de RNA: Rifampicina.

Cuadro 4. Antibióticos y concentraciones utilizadas

Antibiótico	Abreviación	Concentración (μ g/mL)		
Carbencilina	CB	50	100	150
Tetraciclina	TC	20	40	80
Rifampicina	RIF	20	40	80
Cloranfenicol	CL	5	25	50
Kanamicina	KM	5	20	50

Espectinomicina	SP	25	50	75
Estreptomicina	ST	150	300	450
Ampicilina	AMP	2	10	20
Polimixina	PX	5	10	30

6.2 Identificación de géneros bacterianos resistentes a mercurio.

6.2.1 Amplificación del gen 16S rDNA

Para la identificación de los género bacterianos de los aislados que presentaron capacidad de volatilizar el mercurio, se llevó a cabo la amplificación del gen 16s rDNA para cada uno de los aislados. Los oligos que fueron empleados son: FD1: 5'- CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G y RD1: 5'- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC, ampliando un segmento del gen aproximadamente 900 pb (Weisburg, 1991; Negoro y col. 2013). El PCR se hizo en un volumen total de 30 μ L se utilizó una mezcla Platinum PCR Supermix High Fidelity de Invitrogen y 3 μ L de cada primer FD1 y RD1. Se llevó a cabo en un C1000 Thermal Cycler Bio-Rad, usando las condiciones de:

94°C por dos minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 40 segundos y 72°C por dos minutos y finalmente 5 minutos a 72°C.

Al finalizar la reacción de PCR, se verificaron los productos en un gel de agarosa al 1% con la técnica de electroforesis, las muestras se cargaron 1:2 μL con colorante GelRed a 80V por 40 minutos. El producto de amplificación fue ligado al vector pJet 2.1 y transformado a *Escherichia coli* de la siguiente manera.

6.2.2 Preparación de células competentes de *E. coli*

Se tomó una asada de bacterias de la cepa Top10. Se inoculó en un matraz con 20 mL de caldo LB y se incubó por 18 horas a 37°C con una agitación de 120 rpm junto con otro matraz conteniendo únicamente 20 mL de caldo LB. Se tomó después 1 mL del cultivo de 18 horas y se inoculó en otro matraz, siguiendo con las mismas condiciones de temperatura y agitación, a este inóculo se le tomaron lecturas de densidad óptica con un espectrofotómetro con el haz de luz ajustado a 600 nm de longitud de onda, para poder observar el crecimiento bacteriano hasta alcanzar una densidad óptica de 0.540 unidades, se hizo la alícuota de 1 mL de las células en tubos eppendorf de 1.5 mL y se colocaron en hielo durante 10 minutos, después se centrifugaron a 13000 rpm durante cinco minutos para la obtención de la pastilla celular, se eliminó todo el sobrenadante y se resuspendió en 100 μL de CaCl_2 0.1M a 4°C y se utilizó en las transformaciones.

6.2.3 Transformación en *E. coli*

Se tomaron las alícuotas de 100 μL de células competentes de *E. coli* Top10 en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se les agrego 5 μL de reacción de ligación a 0°C. Se incubaron en hielo durante 20 minutos y posteriormente las células

fueron sometidas a un choque térmico a 42°C por dos minutos, se colocaron inmediatamente en hielo por dos minutos y se les agregaron 500 µL de caldo LB. Se incubaron las células a 37°C en agitación durante 30 minutos, al concluir se centrifugaron a 13000 rpm por dos minutos. La pastilla bacteriana se resuspendió en 100 µL de caldo LB y se sembraron en medio de cultivo LB con Carbencilina 100 µg mL⁻¹

6.2.4 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS

6.2.4.1 Preparación de células

Se inoculó una colonia transformante en 5 mL de caldo LB con Carbencilina 100 µg mL⁻¹, se incubó a 37°C durante un periodo de 18 horas en agitación vigorosa 120 rpm. Se tomaron al concluir este tiempo 1.5 mL del cultivo vertiéndose en tubos eppendorf, se centrifugaron a 13000 rpm durante dos minutos para obtener una pastilla bacteriana, el sobrenadante se extrajo con una micropipeta para dejar únicamente la pastilla.

6.2.4.2 Lisis celular

La pastilla celular se resuspendió en 150 µL de Solución I con agitación vortex, después se agregaron 300 µL de Solución II, mezclando gentilmente por inversión y se dejó actuar por un minuto, posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló una vez más por inversión y se dejó actuar por un minuto. Se agregaron 200 µL de Solución III, se agitó vigorosamente en vortex por tres segundos y se incubó en hielo durante tres minutos, posteriormente se centrifugó

durante dos minutos a 12000 rpm, se recuperó la fase acuosa, es decir el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo, evitando transferir trazas de la fase sólida e inferior. Se agregó un volumen de 750 μ L de isopropanol, se mezcló en el vortex y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm, el siguiente paso fue eliminar el isopropanol se agregó 1 mL de etanol al 70% para lavar la pastilla y se centrifugó por dos minutos a 12000 rpm. Se decantó el etanol con cuidado para evitar la pérdida de la pastilla, ésta se seco a 65°C durante 10 minutos. Se resuspendió en 30 μ L de agua libre de RNAsa y se le agregó 5 μ L de RNAsa.

Una vez purificado el producto se envió a Macrogen Inc en Seúl Corea, las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de Ribosomal Database Project (RDP) en la sección classifier con la finalidad de determinar el género bacteriano al que corresponden las secuencias con el banco de datos del NCBI, con el programa Blast, buscando similitudes con secuencias de organismos ya reportados (Zhang y col., 2000).

6.2.5 Identificación de Aislados Bacterianos por MALDI-TOF MS

Adicionalmente se identificaron los aislados bacterianos mediante la técnica de MALDI-TOF MS que es una metodología de ionización suave, se utiliza en espectrometría de masas y con su alta sensibilidad es capaz de identificar identificación cuantitativa y cualitativamente mezclas de sustancias. Se ha utilizado en el área de diagnóstico microbiológico principalmente por el tiempo, exactitud y confiabilidad.

Los patrones de proteínas se detectan directamente de la bacteria, la muestra que se analizó es una mezcla que contiene otros componentes llamada matriz, esta se aplicó a un plato de metal que se irradió con laser. La matriz absorbe la luz laser y se vaporiza, se ioniza y los campos eléctricos los separan de acuerdo a la carga de la masa, finalmente la cantidad de cada ion se determina y después se realiza la detección.

Se tomó una asada de aislado bacteriano y se trató con 2 μ L de la matriz de MALDI, que es una solución saturada de α -ciano-4-hidroxicinamínico en 50% de acetonitrilo y 2.5% de ácido trifluoroacético. La espectrometría de masas MALDI-TOF se hizo con espectrómetro MicroFlex LT (Burker Daltonics, Alemania) de acuerdo a los protocolos del proveedor. El espectro se analizó utilizando el Biotyper 2.0 y biblioteca (versión 2.0, 3,740; Burker Daltonics). El criterio de identificación es a través de un puntaje en donde ≥ 2.000 indica identificación a nivel de especie, entre 1.700 y 1.999 indica una identificación a nivel de genero y < 1.700 se interpreta como no identificado.

Las proteínas ribosomales conservan una huella peptídica y conservan su estructura a lo largo del tiempo, esto se puede comparar con bases de datos y de esta manera identificar los microorganismos (Trapnell y col., 2010).

6.3 Identificación por PCR de los genes *merA* y *merR*

6.3.1 Identificación por PCR del gen *merR*

La detección de gen *merR* que pertenece al operón *mer* se realizó sometiendo las cepas bacterianas a un choque térmico a 65°C por 5 minutos y a -4°C por 5 minutos. Se utilizó la mezcla de reacción con la enzima Phusion High-Fidelity PCR Master Mix usando los primers específicos:

991: 5'CTAAGGCATAGCCGAACCTGCC 3'

5702: 5'GGAAGGAGATATACATATGGAAAACAATTTGGAGAACC 3'

Los ciclos para la amplificación fueron: 94°C por dos minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 40 segundos y 72°C por dos minutos y finalmente 5 minutos a 72°C.

6.3.2 Identificación por PCR del gen *merA*

Para la identificación del gen *merA*, que codifica la mercurio reductasa, fue amplificado usando los primers degenerados:

A1s-n.F: 5'TCCGCAAGTNGCVACBGTTGG3'

A5-n.R (5'ACCATCGTCAGRTARGGRAAVA3')

Que amplifican segmento del gen de aproximadamente 300 pares de bases. Las reacciones de PCR se hicieron con Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (2X) y Los ciclos para la amplificación fueron: 94°C por tres minutos, 30 ciclos de 94°C por 10 segundos, 45°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y finalmente 5 minutos a 72°C. Los productos de esta amplificación fueron

purificados usando el Kit de limpieza de ADN de Zymo Research. Y se clonó en el vector de clonación pJET 1.2/blunt de Thermo Scientific. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por MacroGen Corea por la técnica de Sanger.

7. Resultados

7.1 Obtención de aislados bacterianos

Se obtuvieron un total de 23 aislados bacterianos de las muestras de rizósfera de *M. domestica* correspondientes a la localidad de Nuevo San Joaquín en el municipio de San Joaquín en la zona minera de Querétaro. Todos ellas capaces de resistir $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de HgCl_2 , los cuales fueron seleccionados para pruebas posteriormente realizadas. El aislamiento se basó en la selección de colonias con diferencias fenotípicas, rugosidad, brillantez, color y forma (Figura 5).

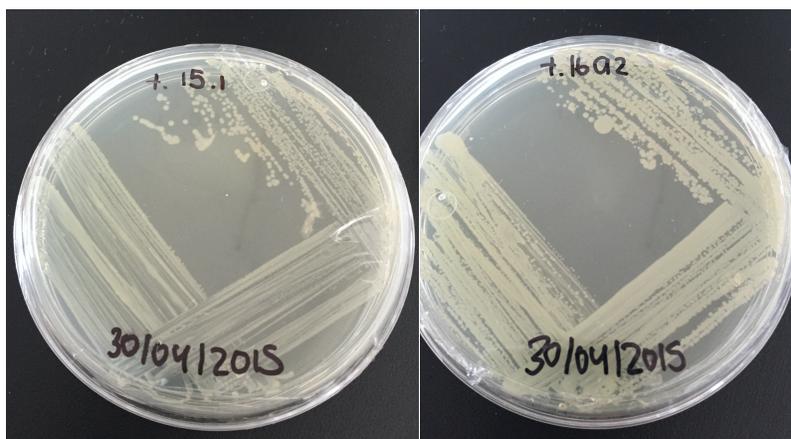


Figura 5. Aislados bacterianos crecidos en medio soya tripticasa con agar y adicionado con 50 mg mL^{-1} de HgCl_2

7.1 .1 Prueba de volatilización

De los 23 aislados bacterianos obtenidos de la rizósfera de *M. domestica*, se identificaron seis como capaces de volatilizar el mercurio de acuerdo al protocolo de Nakamura y col. (1990), debido a la coloración oscura formada en la

placa de nitrato de plata, esto ocurre ya que al reaccionar con el mercurio gaseoso se forma nitrato de mercurio y se tiene como resultado la pigmentación en tonos que van de gris tenue a negro.

En la (Figura 6) se pueden observar estas tonalidades, el primer pozo que se utilizó como testigo, es decir el buffer de volatilización sin aislado bacteriano fue el C3, a partir de C4 comenzó la numeración de los aislados. No obstante a que la prueba es cualitativa, puede apreciarse que hay bacterias con mayor capacidad de volatilizar/reducir el mercurio, siendo E4 donde se aprecia más intensa la coloración, F10 y D8 con una coloración intermedia, así como D4 con un tono de menor intensidad.

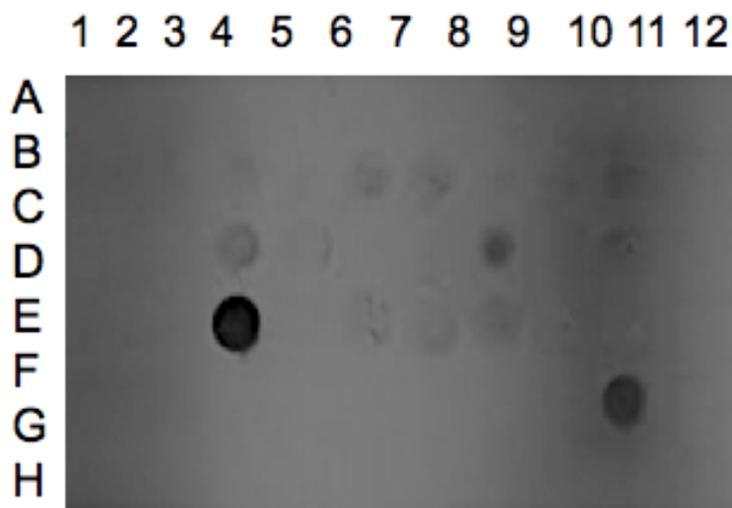


Figura 6. Placa de volatilización de mercurio. La circunferencia oscura indica la oxidación de nitrato de plata provocada por la reacción con mercurio volátil (Hg^0)

Esto sugiere que las bacterias que volatilizaron el mercurio podrían contar con el gen *merA* en su genoma, que codifica la enzima mercurio reductasa. Un gran número de los aislados no fue capaz de realizar la volatilización, lo que sugiere que pudieran contar con mecanismos de resistencia distintos al mercurio.

7.1 .2 Prueba de resistencia a distintos metales

De los seis aislados que mostraron capacidad de volatilización, cinco de ellos fueron seleccionados en base a su capacidad de resistencia y crecimiento en HgCl_2 para determinar la capacidad de resistencia de los aislados bacterianos a otros metales.

Se observó que los cinco aislados tienen capacidad de multirresistencia (resistencia a cuatro o más metales) a otros metales, en base a las Concentraciones Mínimas Inhibitorias CMI siendo diferente para cada uno de los aislados. Estos resultados sugieren la presencia de diversos mecanismos que confieren la capacidad de resistencia (Cuadro 5).

La cepa CA9 presentó resistencias altas a todos los metales exceptuando al cloruro de cadmio en donde fue de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, la cepa CA15 presentó resistencias similares a CA9 únicamente tuvo menor resistencia a cloruro de cromo con $300 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Las cepas CA16A y CA16B presentaron las mismas CMI, con valores elevados de resistencia $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ de resistencia a HgCl_2 , teniendo mayor

sensibilidad a cloruro de cadmio y de cloruro de cromo con CMI de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, presentando resistencia de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ a las sales de cobalto, cobre y plomo.

La cepa CA22 fue la única que no tuvo valor de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ en cloruro de mercurio, presentando aún así un valor elevado de resistencia de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ para HgCl_2 . Con sensibilidad a cloruro de cadmio y cloruro de cromo a 200 y $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

Se obtuvieron CMI a través de zonas claras que indicaban la inhibición de crecimiento. Estudios previos muestran que la resistencia bacteriana ocurre para un rango de iones metálicos (Bruins y col, 2000). Sin embargo los resultados CMI pueden no ser comparables al variar la disponibilidad o el estado en el que se encuentren dichos metales.

Cuadro 5. Resistencia a metales. Las concentraciones son en $\mu\text{g mL}^{-1}$

	HgCl_2	CoCl_2	CuCl_2	CdCl_2	PbCl_2	CrCl_2
CA 9	400	500	500	200	500	400
CA 15	400	500	500	200	500	300
CA 16A	400	500	500	300	500	300
CA 16B	400	500	500	300	500	300
CA 22	300	500	500	200	500	300

7.1 .3 Evaluación de multiresistencia antibióticos

Las cepas de *Bacillus* mostraron multiresistencia (resistencia a más de un antibiótico) a los antibióticos utilizados por medio de la técnica de Kirby-Bauer (Figura 7).

Se observó respuesta general de resistencia en todas las cepas a Polimixina y Espectinomina. Diversas respuestas se obtuvieron con los antibióticos que tienen efecto en la síntesis de proteínas. Las mayores inhibiciones de crecimiento se observaron con Estreptomicina y Tetraciclina. Para todas las cepas Kanamicina mostró inhibición de crecimiento a altas concentraciones, pero de las 5 cepas que se probaron CA 16A fue la más resistente a este antibiótico. Cuando se probó el antibiótico que afecta la síntesis de proteínas, la Rifampicina, solamente CA 15 mostró resistencia a todas las concentraciones, las demás únicamente mostraron inhibición moderada de crecimiento a Rifampicina. Las cepas CA9 y CA22 mostraron inhibición moderada de crecimiento a ampicilina y Carbencilina a altas concentraciones.

Se obtuvieron 135 perfiles de antibióticos. Todas las pruebas se hicieron por triplicado y la acción antibacteriana se expresó en mm haciendo la medición del halo de inhibición. Los resultados se normalizaron con el valor más alto y se hicieron análisis con el software R package versión 3.2.1, los valores de 0: rojo indica resistencia, 1: blanco indica sensibilidad (Figura 7).

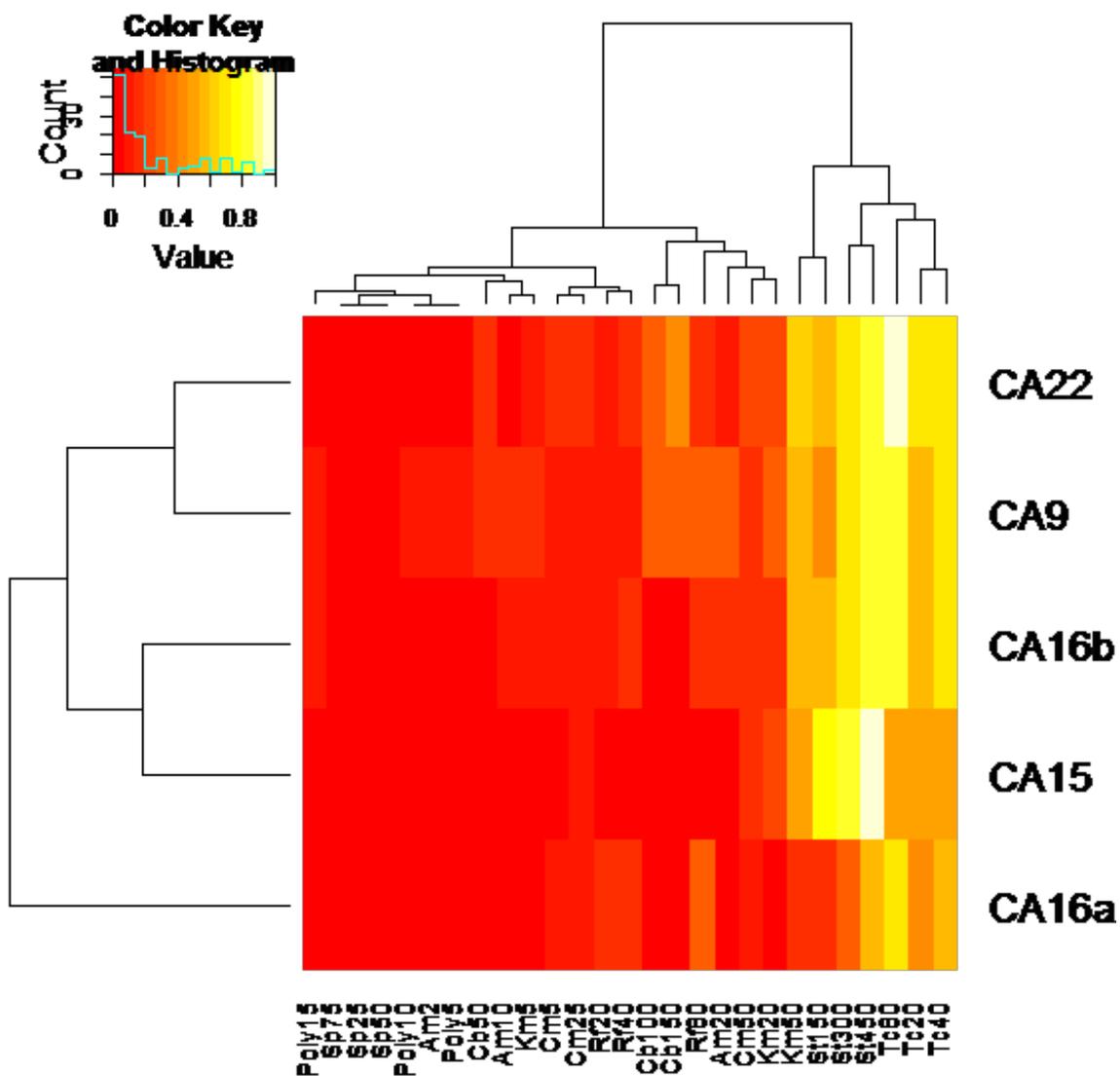


Figura 7. Histograma de perfil de antibióticos en donde se aprecia que la cepa CA 16a es la que presenta mayor resistencia.

7.2 Identificación de aislados de rizósfera de *M. domestica*

7.2.1 Identificación de aislados bacterianos mediante amplificación de PCR 16S rDNA

Para identificar los aislados se hizo una amplificación por PCR del gen 16S rDNA. Como se aprecia en la figura, esto de acuerdo al marcador molecular que corresponde al gen 16S, se logró amplificar un producto único con un tamaño aproximado de 1000 pares de bases (Figura 8). Para comprobar la amplificación del PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%, se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se cubrió con una solución amortiguadora TAE 1X

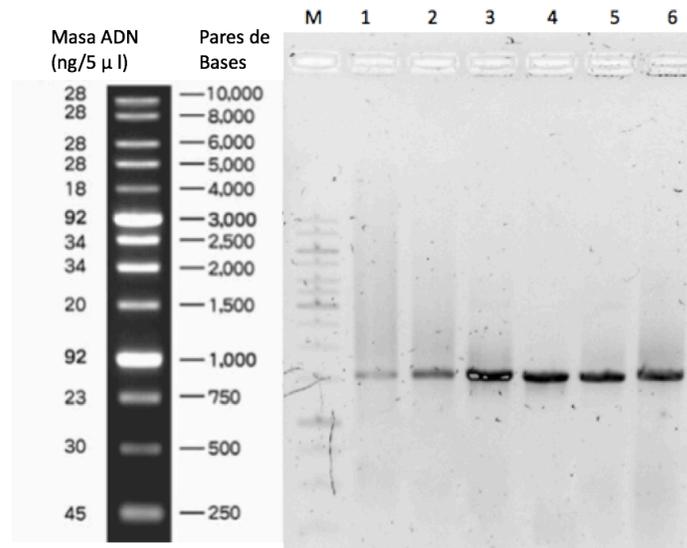


Figura 8. Amplificación del gen 16S en gel de Agarosa al 1% donde se observan productos de aproximadamente 1000 pares de bases

Este producto de amplificación se clonó en el plasmido pJET1.2 se transformó en una cepa de *E.coli* seguido de esto se purificó el plásmido y se mandó secuenciar a Macrogen Inc. Los resultados de identificación fueron los siguientes:

Cuadro 6. Bacterias identificadas mediante herramienta BLAST

Aislado	Especie bacteriana
9	<i>Bacillus spp</i>
11	No hubo coincidencia
15	<i>Escherichia coli</i>
16 a	<i>Bacillus megaterium</i>
16 b	<i>Bacillus spp</i>
22	No hubo coincidencia

7.2.2 Identificación de aislados bacterianos mediante MALDI-TOF MS

Debido a las irregularidades presentadas por el método de 16S rDNA fue necesario implementar MALDI-TOF MS que es una metodología de ionización suave, se utiliza en espectrometría de masas y con su alta sensibilidad es capaz de la identificación cuantitativa y cualitativa de mezclas de sustancias (Cuadro 7).

Cuadro 7. Bacterias identificadas mediante MALDI-TOF MS

Aislado	Especie bacteriana	Puntaje
9	<i>Bacillus muralis</i>	1.957
15	<i>Bacillus simplex</i>	1.969
16 a	<i>Bacillus simplex</i>	1.984
16 b	<i>Bacillus muralis</i>	1.938
22	<i>Bacillus simplex</i>	1.954

7.2 Identificación de *merA* y *merR* por PCR

Para conocer si la volatilización estaba relacionada a la presencia de genes *mer*, a partir de la identificación de las especies bacterianas *Bacillus simplex* y *Bacillus muralis* se llevó a cabo la identificación del gen *merA*, que pertenece al operón *mer* y codifica la mercurio reductasa. Se amplificó usando primers específicos.

El gen *merR* que igualmente pertenece al operón *mer* y que codifica un activador de transcripción fue amplificado usando primers específicos, en base a secuencias previamente reportadas, la amplificación del gen debe dar una banda con un peso aproximado de 500 pares de bases (Figura 9).

Los productos de esta amplificación fueron purificados usando el Kit de limpieza de ADN de Zymo Research. Y se clonó en el vector de clonación pJET 1.2/blunt de Thermo Scientific. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por MacroGen Corea por la técnica de Sanger.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas por la herramienta BLAST (Altschul y col, 1990) contra secuencias obtenidas de GenBank y con la base de datos de KEGG GENES (Carver y col. 2009). La alineación de las secuencias se llevó a cabo con el programa ClustalW y la reconstrucción filogenética se hizo vía máxima comparación con el programa MEGA6.

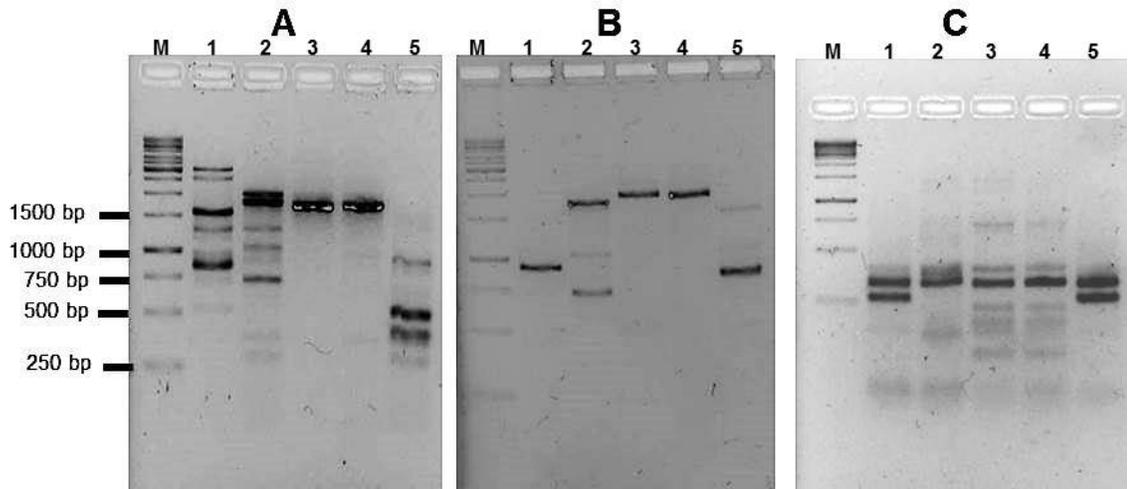


Figura 9. Amplificación del gen *merR* en gel de Agarosa al 1%. El panel A muestra la amplificación a una temperatura de alineación de 45°C para *merR*, el panel B muestra la amplificación a una temperatura de 50°C para *merR*, por último el panel C muestra una temperatura de alineación de 45°C para *merA*. El orden de las cepas fue el siguiente: carril 1:9, 2:15, 3:16a, 4:16b y el quinto carril 22 para cada amplificación.

De la cepa CA22 se obtuvo un fragmento de *merR* de 435 pb, la alineación de éste a la base de datos de Gene Bank reveló alta similitud con secuencias de *merR* de bacterias como *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Figura 10) El número de la secuencia del nucleótido *merR* es BankIt1850974 *merR*-KT585675.

Este alineamiento se importó al programa MEGA4 para la construcción del árbol filogenético (Figura 11) usando el método de Neighbor Joining (NJ) con

valores de bootstrap de 1000 unidades, dichos árboles filogenéticos se modelaron en Interactive Tree Of Life (iTOL) (Letunic y Bork, 2006).

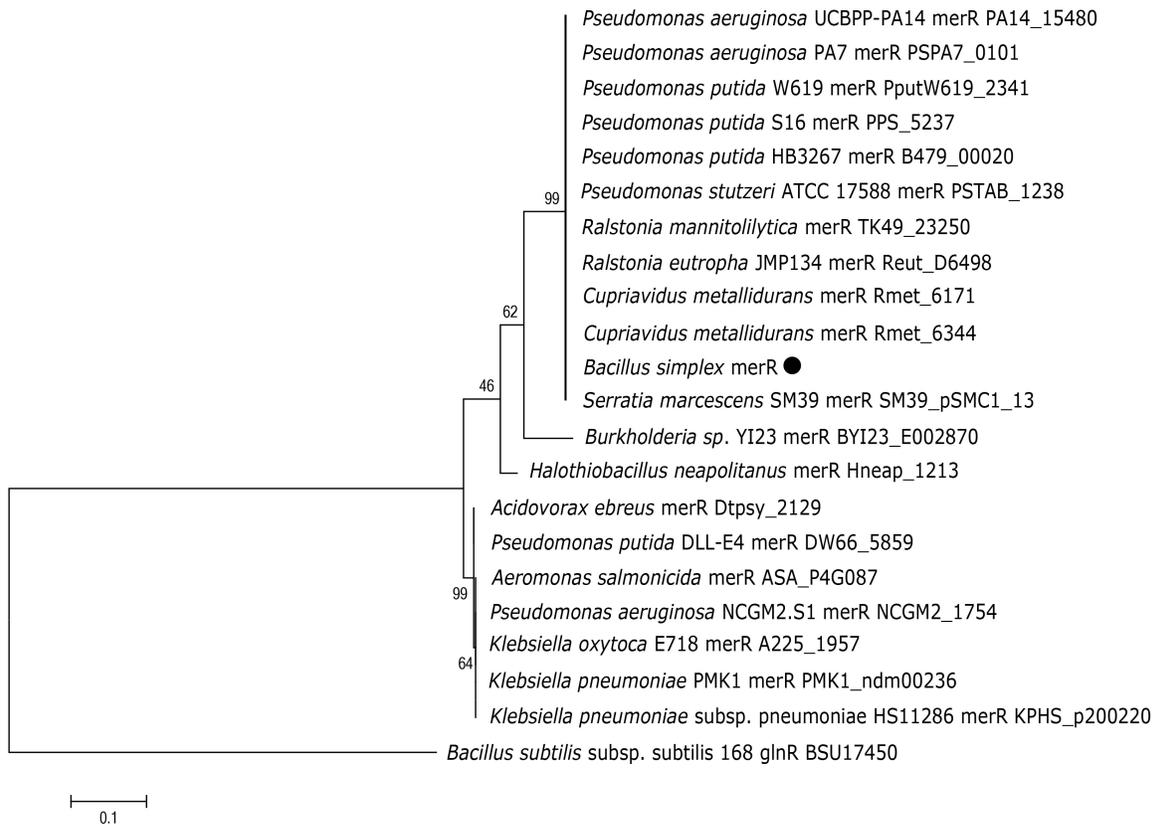


Figura 10. Dendrograma que muestra la relación filogenética de *merR* de distintos géneros bacterianos (●) corresponde a fragmento de *merR* de 435 pb de *Bacillus simplex*.

8. Discusión de Resultados

En este trabajo, se aislaron bacterias identificadas como *Bacillus simplex* y *Bacillus muralis* de la rizósfera de *Malus domestica*, estos aislados mostraron alta resistencia a mercurio y a otros metales. Los suelos de donde provienen las muestras presentan altos niveles de mercurio, que exceden el límite permisible por la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004 de 23 mg kg^{-1} ($637 \pm 51 \text{ mg kg}^{-1}$) (Cruz-Medina y col, 2012).

Aunque existen elevadas concentraciones de Hg en estos suelos, el contenido alto de materia orgánica y el pH del suelo podrían estar ligando al mercurio a éstos y hacerlo menos disponible, logrando el establecimiento del cultivo del manzano en suelos contaminados con Hg (Biester y col. 2002; Sas-Nowosielska y col. 2008; Sánchez-Fuentes, 2013).

Bacterias que se encuentran en el suelo y que se asocian a raíces, las cuales tienen efectos positivos en el crecimiento de plantas, son conocidas como Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV). Estudios recientes de BPCV se enfocan en especies de *Bacillus* (Bai y col, 2002; Hernandez y col, 2009). La distribución extensa de *Bacillus* está relacionada por su capacidad de producir esporas y de su habilidad de generar enzimas, antibióticos y proteínas que le permiten competir contra otros microorganismos, es decir que funcionan como antagonistas para distintos hongos fitopatógenos, bacterias, oomicetos y nematodos compitiendo por nutrientes y espacio (El, 2003).

Avances recientes en técnicas moleculares y microbiológicas han contribuido de manera significativa para entender los mecanismos de cómo los microorganismos interactúan entre ellos, a través de productos y moléculas que funcionan como señales. Los cambios fisiológicos producidos en *Bacillus spp.* pueden verse influenciados por pequeñas moléculas secretadas por otras especies bacterianas u hospederos, como son antibióticos, hormonas vegetales, enzimas entre otros (Nihorimbere y col. 2010).

Se ha reportado que *Bacillus simplex* promueve el crecimiento de diversas plantas, como son trigo, tomate, *Arabidopsis*, kiwi, chícharo entre otras, además de la habilidad de volatilizar mercurio (Schwartz y col., 2013). En este trabajo se encontró la capacidad de *B. simplex* que, por lo que su interacción con *M. domestica* podría ser importante para interferir con la movilización de mercurio en esta planta establecida en suelos contaminados, volviéndose una característica importante como resultado de la expresión de sistemas genéticos que dan como resultado la reducción enzimática de Hg (II). Sin embargo hace falta mayor investigación para conocer si estas cepas en específico tienen características de BPCV y el rol que juegan estas en la movilización del mercurio en el suelo. Se ha reportado además que *B. simplex* produce diversas actividades como son actividad nematocida y bioabsorción de metales pesados (Wang y col, 2015).

En cuanto a *Bacillus muralis* se tiene menor información, pero su genoma ya ha sido secuenciado y se encuentra en la base de datos de NCBI bajo el

número de acceso de LMBV00000000. Ésta fue aislada de pinturas murales de una iglesia Luterana en Alemania llamada Greene-Kreiensen. Esta relacionado de manera cercana a *Bacillus simplex*, y se han encontrado ambas en murales deteriorados (Wang y col, 2016).

Diversos sistemas de resistencia a metales, como plásmidos, transposones o determinantes cromosómicos se han identificado en diversos aislados bacterianos. La resistencia a mercurio en cepas de *Bacillus* se ha localizado en cromosoma y en plásmidos (Gupta y col, 1999; Hart y col, 1998; Narita y col, 2003; Amadio y col. 2009). La prueba de resistencia a metales indicó que las cepas de *Bacillus* aisladas de la rizósfera de *M. domestica* han desarrollado alta resistencia a diversos metales. En estudios previos la resistencia ocurre para un rango de iones metálicos (Bruins y col, 2000). Sin embargo las Concentraciones Mínimas Inhibitorias CMI, podrían no ser comparables cuando hay diferencias en los medios de cultivo y que los mismos componentes de los medios de cultivo podrían ser quelantes de los metales adicionados y no representar la concentración real disponible al microorganismo.

Trabajos previos demuestran como *Bacillus spp* es capaz de resistir un amplio rango de metales tóxicos, incluyendo cobre, hierro, magnesio, oro y plomo (Schwartz y col., 2013). Sin embargo los metales de transición son esenciales para una gran diversidad de procesos biológicos en la célula, que van desde cofactores para reacciones de oxido-reducción, transferencia de electrones,

química ácido-básica e hidrolítica, centros de estructura y estabilización de enrollamiento de proteínas. El zinc Zn(II) posee un doble rol en la célula, como elemento estructural y como cofactor catalítico.

Los metales pesados y metaloides que no juegan ningún rol biológico, como mercurio, cadmio, arsénico, plomo y estaño y son extremadamente tóxicos, ya que forman enlaces covalentes con tioles celulares o ligandos con calcio en el caso de Pb(II). Es por eso que los microorganismos han desarrollado mecanismos para la desintoxicación o eflujo de los no esenciales para hacer uso de los metales esenciales de transición

En la mayoría de las bacterias las proteínas metaloregulatorias controlan la expresión de genes que codifican los transportadores de membrana y las proteínas que secuestran metales, para lograr homeostasis y resistencia. Estos sensores de metales están especializados en proteínas alostéricas, por lo que puede cambiar su especificidad, si hay una determinada concentración de un ligando en el medio, hará que la proteína sea más o menos afín, desplazándose el equilibrio. Es por esto que se puede presentar una multiresistencia a distintos metales, un mecanismo que permite la resistencia a metales, por ejemplo al Zn, es a través de las proteínas de resistencia a Hg. Ya que las proteínas de regulación a Zn y Co metales pertenecen a la misma familia que MerR, la respuesta generada es de menor eficiencia comparada al metal de esta proteína (Reyes y col., 2011).

En cuanto a la prueba de resistencia antibióticos, los aislados mostraron una multiresistencia a estos, lo que sugiere y que además en estudios previos se muestra que el plásmido que confiere la resistencia a metales tóxicos fuera el mismo que el que confiere resistencia a antibióticos. Sin embargo, en este trabajo no se determinó el análisis de plásmidos. Nuestras cepas aisladas mostraron mayor sensibilidad a la tetraciclina, llamada así por su estructura de cuatro anillos, ésta inhibe la síntesis de proteínas, ya que se une al 30S del ribosoma previniendo la unión del tRNA (Belliveau y col. 1991).

En este trabajo, las cinco cepas de *Bacillus* volatilizaron el mercurio, sin embargo las condiciones de amplificación por PCR para la obtención de los componentes del operón *mer* fueron parcialmente exitosas debido a que la amplificación no fue específica y se obtuvieron múltiples bandas de amplificación. Sin embargo, logramos obtener la secuencia de *merR* de la cepa CA22 y mostró similitud al gen *merR* previamente reportado en *Serratia*, *Cupriavidus*, *Ralstonia* y *Pseudomonas* (Wang y col, 2010). Este resultado sugiere que el mecanismo de resistencia a mercurio pudiera provenir de esas especies bacterianas. Es necesario más trabajo para determinar los mecanismos genéticos y moleculares de resistencia a antibióticos y metales en esas cepas de *Bacillus* y demostrar su utilidad en sistemas de remediación en los suelos de Nuevo San Joaquín, Qro.

9. CONCLUSIONES

1. Se logró aislar e identificar bacterias que volatilizan el mercurio de la rizosfera de *M. Domestica* de la región minera de San Joaquín Querétaro, zona que presenta altas concentraciones de Hg (637 ± 51 mg/kg).
2. Se logró obtener la secuencia para el gen *merR*, sin embargo la amplificación y secuenciación de *merA* no fue exitosa en las condiciones de este trabajo.
3. En cuanto a las cepas obtenidas: *Bacillus simplex* y *Bacillus muralis* la importancia de este genero en la rizósfera de *M. domestica* podría ser clave para el establecimiento del cultivo en la zona minera de San Joaquín. Sería importante probar en trabajos futuros la relación de éstas cepas como Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal.

10. REFERENCIAS.

- Ahemad, M. 2012. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: A review. IIOAB Journal
- Allen, R., Tu, Y. Nevarez, M., Bobbs, A., Friesen, J., Lorsch, J., McCauley, J., Voet, J., Hamlett., N. 2012. The mercury resistance (*mer*) operon in a marine gliding flavobacterium, *Tenacibaculum discolor* 9A5. FEMS Microbiol Ecol 1-14
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D 1990. "Basic local alignment search tool." J. Molecular Biology. 215:403-410
- Amadio, A. F., Benintende, G. B., & Zandomeni, R. O. 2009. Complete sequence of three plasmids from *Bacillus thuringiensis* INTA-FR7-4 environmental isolate and comparison with related plasmids from the *Bacillus cereus* group. *Plasmid*, 62(3), 172–82
- Atlas, R., Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson educación, S. A., Madrid, 2002. 97-101
- Bai, Y., D´Aoust, F., Smith, D., Driscoll, B., 2002. Isolation of plant-growth promoting strains from soybean roots nodules. Can. Microbiol. 48: 230-238

- Baldi, F., Pepi, M., Filippelli, M. 1993. Methylmercury resistance in *Sesulfovibrio desulfuricans* strains in relation to methylmercury degradation. *Applied Environmental Microbiology*. 59:2479-2485.
- Barkay, T., Miller S.M., Summers AO. 2003 Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems *FEMS Microbiol Rev* 27:355-384
- Belliveau, B.H., Staradub, M. E., Trevor, J.T. 1991. Ocurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediments. *Microbiology*. 37(5): 13-20.
- Biester H, Muller G, Scholer HF. 2002. Estimating distribution and retention of mercury in three different soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants: Part I. *Sci Total Environ* 284: 177-189.
- Bradl, H.B. 2005. *Interface Science and Technology Vol. 6: Heavy Metals in the Environment*. Elsevier Academic Press. Chapter 2: Interaction of heavy metals.119-122
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Safety* 45: 198-207.
- Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M., & Parkhill, J. 2009. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(1):119–20

- Castro, J. 2013. Evaluación de los suministros de mercurio primario y secundario en México. Procedimientos de revision y aseguramiento de calidad. CEC
- Clark, D.L., Weiss, A., Silver, S., 1977. Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. *J Bacteriol.* 132, 186-196
- Cordero, J.D., López, R., Calderón, C., Figueroa, A.M., Martínez, J.C., Leyva, K.Y., Cervantes, R.G., Maldonado, I.G. 2012. Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México. *Rev. Mex. Biodiv.* 83 (3)
- Cruz-Medina, J.A., Enríquez-Farías, J., Cruz-Hernández, A., García-Martínez, R., Solís-Valdés, S., Hernández-Silva, G., Jones, G.H., Campos-Guillén, J. 2012. Isolation and Characterization of Mercury Resistant *Bacillus sp.* From Soils with an Extensive History as Substrates for Mercury Extraction in Mexico. *Geomicrobiology Journal.* 30: 454-461
- Dash, H., Das, S. 2012. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial *mer* genes. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 75: 207-213
- De la Rosa, D. Teutli, M.M y Ramírez, M., 2007. Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23 (3): 129-138

- De Miguel, E., Clavijo, D., Ortega, M. F., Gómez, A. 2013. Probabilistic meta-analysis of risk from the exposure to Hg in artisanal gold mining communities in Colombia. *Chemosphere*
- El, Y. 2003. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EBI. *Res Microbiology*. 154(6): 409-415
- Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T. 2007. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J Neurol Sci*. 262:131–144
- González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O. 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 82
- Gupta A, Phung L, Chakravarty L, Silver S. 1999. Mercury resistance in *Bacillus cereus* RC607: Transcriptional organization and two new open reading frames. *J Bacteriol*. 181:7080-7086.
- Hart M, Elliott G, Osborn A, Ritchie D, Strike P. 1998. Diversity amongst *Bacillus merA* genes amplified from mercury resistant isolates and directly from mercury polluted soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 27:73-84.
- Hernández-Silva, G. 2009. Mercurio: Impacto en El Hombre y la Naturaleza al Sur de la Sierra Gorda de Querétaro, México. Centro de Geociencias, Campus UNAM-Juriquilla, Qro. México

- Kaschack, E. Knopf, B. Petersen, J. Bings, N. König, H. 2013. Biotic methylation of mercury by intestinal and sulfate-reducing bacteria and their potencial role in mercury accumulation in the tissue of the soil-living *Eisenia foetida*. ScienceDirect. 69: 202-211
- Li, J.S., Chen, G.Q., Hayat, T., Alsaedi, A. 2014. Mercury emissions by Beijing's fossil energy consumption: Based on environmental extended input-output analysis. Renewable and Sustainable Energy Reviews 41: 1167-1175
- Langenscheidt, A. 2006. La minería en la Sierra Gorda. Revista Arqueología Mexicana. 13: 46-53
- Llop, S., Ibarlucea, J., Sunyer, J., Ballester, F. 2012. Estado actual sobre la exposición alimentaria al mercurio durante el embarazo y la infancia, y recomendaciones en salud pública. Gac Sanil. 27(3): 273-278
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J., 2004, BROCK. Biología de los microorganismos, ed. Pearson Prentice Hall, Madrid.
- Martínez-Trinidad, S., Hernández, G., Ramírez, M.E., Martínez, J., Solorio, G., Solís, S., García, R. 2013. Total mercury in terrestrial systems (air-soil-plant-water) at the mining region of San Joaquín, Queretaro, Mexico. Geofísica Internacional. 52(1): 43-58
- McNear, D. 2013. The Rhizosphere-Roots, Soil and Everything in Between. Nature Education Knowledge 4(3):1

Mercader T.F., Herrera, B., Rodríguez, E., de Gyves-M. J. 2006 Validación de un nuevo método de preconcentración y medición de mercurio en sedimentos utilizando materiales sol-gel dopados con extractantes sulfurados. Centro Nacional de Metrología, Dirección de Metrología de Materiales, División Materiales Metálicos. Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria México.

Moraga, R., Merino, C., Mondaca, M. 2003. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones marinas*. 31 (1)

Moreno, F., Anderson, Ch., Stewart, R., Ronbinson, B., 2009. Analysis of Mercury-Rich plants and mine tailings using the Hydride-Generation AAS method. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.52 (4)

Nakamura, K., Sakamoto, M., Uchiyama, H. & Yagi, O. 1990. Organomercurial-volatilizing bacteria in Mercury- polluted sediment of Minamata Bay, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 304-305

Nakamura, K., Silver, S. 1989. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid. Microbiology*. 27: 17-28

Narita M, Chiba K, Nishizawa H, Ishii H, Huang C, Kawabata Z, Silver S, Endo G. 2003. Diversity of mercury resistance determinant among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. *FEMS Microbiology Letters*. 223: 73-82

- Negoro, E., Iwasaki, H., Tai, K., Ikegaya, S., Takagi, K., Kishi, Sh., Yamauchi, T., Yoshida, A., Urasaki, Y., Shimadzu, M. y Ueda, T., 2013. Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. *International Journal of Infectious Diseases*. 17(4): 271-276
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smarigiassi, M., Thonart, P. 2010. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Base*. 15(2)
- NMX-132-AA-2006. Muestreo de suelos para la identificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra.
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.
- Osborn, A.M., Bruce, K.D., Strike, P., Ritchie, D.A., 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. *FEMS Microbiology*.19: 239-262
- PNUMA, 2005. Evaluación Mundial sobre el Mercurio, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Productos Químicos. Ginebra, Suiza.

- Peralta-Pérez, M. del R., Volke-Sepúlveda, T.L. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química*. 11(1)
- Ramírez. I. 2007. Vegetación y uso del suelo 2000 Estado de Querétaro. En: *Mapoteca de temas selectos del medio ambiente de México*. Ed. Instituto Nacional de Ecología y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México
- Ren, G., Jin, Y., Zhang, Ch., Gu, H., Qu, J., 2015. Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb (II). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.117: 141-148
- Reyes, H., Campanell, G., Giedroc, D. 2011. Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. *Biophys Chemistry*. 156: 103-114
- Rojas, J., Ortiz, Z. 2010. Biorremediación de la contaminación por mercurio en minería informal. *Biomtek Research*.
- Rouch, D.A., Lee, B.T.D. y Morby, A.P. 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiology*. 14:132-141
- SAGARPA. 2014. Producción de manzana en Querétaro. Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo

rural, pesca y alimentación. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>

Sánchez-Fuentes, L.J. 2013. Mercurio en la microcuenca San Joaquín, Querétaro: acumulación en furtos predominantes de importancia económica. Tesis para obtención de grado en Maestra en Gestión Integrada de Cuencas. UAQ

Sas-Nowosielska A, Galimska R, Kucharski R, Zielonka U, Małkowski E, Gray L. 2007. Remediation aspect microbial changes of plants rhizosphere in mercury contaminated soil. *Environ Monit Assess* 137: 101-109.

Schwartz, A., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C., Fujishige, N., Vijanderan, J., Villela, W., Hanamoto, K., Diener, A., Sanders, E., DeMason, D., Hirsch, A. 2013. *Bacillus simplex*- A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity- Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy*. 3:595-620

SGM, 2011. Panorama Minero del estado de Querétaro. Servicio Geológico Mexicano, Coordinación General de Minería.

Stangoulis, J., Sison, C., 2009. Protocolos de Muestreo en Cultivos para Análisis de Micronutrientes. HarvestPlus, Serie de Monografías Técnicas.

- Takeuchi, F., Negishi, A., Maeda, T., Kamimura, K., y Sugio, T., 2003. Volatilization and Recovery of Mercury from Mercury Wastewater Produced in The Course of Laboratory Work Using *Acidithiobacillus ferrooxidans* SUG 2-2 Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95 (3)
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi AM, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold B, Pachter L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology* doi:10.1038/nbt.1621
- UNEP, 2008. El mercurio y la industria. Módulo 2. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- Urdaneta, C., Parra, L-M., Matute, S., Garaboto, M.A., Barros, H., Vázquez, C. 2008. Evaluation of vermicompost as bioadsorbent substrate of Pb, Ni, V and Cr for waste waters remediation using Total Reflection X-ray Fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 63: 1455-1460
- Volke, T., Velasco, A., de la Rosa, D. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. SEMARNAT, INE. 57-115

- Wang, Q., Liu, J., Hu, B. 2015. Integration of copper subcellular distribution and chemical forms to understand copper toxicity in apple trees. *Environmental and Experimental Botany* 123:125-131
- Wang, J., Liu, B., Liu, G., Chen, Q., Pan, Z., Zheng, X., Chen, M. 2016. Draft Genome Sequence of *Bacillus muralis* LMG 20238^T (DSM 16288), a Spore-Forming Bacterium Isolated from Deteriorated Mural Paintings. *Genome Announcements*. 4(1): e01691-15
- Weisburg, WG., Barns, SM., Pelletier, DA., Lane, DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification fro phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173(2): 697-703
- WHO, 2013. El mercurio y la salud. WHO int. Mediacenter.
- Wotruba, H., Hruschka, F., Henstschel, T., Priester, M. 2000. Manejo ambiental en la pequeña minería. Ed. Gama, Lima, Perú.
- Wu CH, Word TK, Mulchandani A, Chen W. 2006. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl Environ Microbiol* 72: 1129-1134
- Yan-de J, Zhen-li H, Xiao-e Y. 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J Zhejiang Univ Sci B* 8: 192-207

Zawiercha, I., Malina, G. 2011. Effects of bioaugmentation and biostimulation on enhancing biodegradation of oil hydrocarbons in Soil Biology. Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol. Springer. 28: 480-494

Zhang, T., Zhang, X.-X., & Ye, L. 2011. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. PloS One. 6(10): 26041.

11. APÉNDICE

11.1 Apéndice I Soluciones utilizadas

Cuadro 8. Solución I

Reactivo	Volumen (mL)	Concentración final
Tris-HCL (pH 8.0) 1M	1.25	25 mM
EDTA 0.25 M	2.00	10 mM
Glucosa 1M	2.50	50 mM
Agua destilada	50.00	

Cuadro 9. Solución II

Reactivo	Volumen (mL)	Concentración final
NaOH 1N	5.00	0.2 N
SDS al 10%	2.50	1.0%

Cuadro 10. Solución III

Reactivo	Volumen (mL)
Acetato de potasio 5 M	60.0
Ácido acético glacial	11.5
Agua destilada	28.5

11.2 Apéndice II Valores de resistencia a los antibióticos utilizados

Cuadro 11. Cepa 9 valores de resistencia a distintos antibióticos

Resistencia (mm de inhibición)				
	Antibiótico	C1	C2	C3
1	Rifamcilina	0.5	0.5	2
2	Tetraciclina	4	5	6
3	Carbenicilina	1	2	2
4	Cloranfenicol**	0.5	0.5	1
5	Kanamicina	1	2	4
6	Espectomicina	0	0	0
7	Estreptomicina	3	5	6
8	Ampicilina	0.5	1	2
9	Polimixina	0.5	0.5	0.5

Cuadro 12. Cepa 15 valores de resistencia a distintos antibióticos

Resistencia (mm de inhibición)				
	Antibiótico	C1	C2	C3
1	Rifamcilina	0	0	0
2	Tetraciclina	3.5	5	5.5
3	Carbenicilina	0	0	0

4	Cloranfenicol	0	0.5	1
5	Kanamicina	0	1,5	3.5
6	Espectomicina	0	0	0
7	Estreptomicina	5.5	6	7
8	Ampicilina	0	0	0
9	Polimixina	0	0	0

Cuadro 13. Cepa 16 A valores de resistencia a distintos antibióticos

		Resistencia (mm de inhibición)		
	Antibiótico	C1	C2	C3
1	Rifamicilina	1	1	2
2	Tetraciclina	3	4	5
3	Carbenicilina	0	0	0
4	Cloranfenicol**	0.5	0.5	0.5
5	Kanamicina	0	0	1
6	Espectomicina	0	0	0
7	Estreptomicina	1	2	4
8	Ampicilina	0	0	0
9	Polimixina	0	0	0

Cuadro 14. Cepa 16B valores de resistencia a distintos antibióticos

		Resistencia (mm de inhibición)		
	Antibiótico	C1	C2	C3
1	Rifamicilina	0.5	1	1
2	Tetraciclina	4	5	6
3	Carbenicilina	0	0	0
4	Cloranfenicol**	0.5	0.5	1
5	Kanamicina	0.5	1	4
6	Espectomicina	0	0	0
7	Estreptomicina	4	5	6
8	Ampicilina	0	0.5	1
9	Polimixina	0	0	0.5

Cuadro 15. Cepa 22 valores de resistencia a distintas concentraciones de antibióticos.

		Resistencia (mm de inhibición)		
	Antibiótico	C1	C2	C3
1	Rifamicilina	0.5	1	1
2	Tetraciclina	5	5	7
3	Carbenicilina	1	2	3

4	Cloranfenicol**	1	1	1.5
5	Kanamicina	0.5	1.5	4.5
6	Espectomicina	0	0	0
7	Estreptomicina	4	5	6
8	Ampicilina	0	0	0.5
9	Polimixina	0	0	0

11.3 Apendice III Vectores utilizados

Cuadro 16. *E. coli* TOP10 vector utilizado

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara</i> <i>leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen

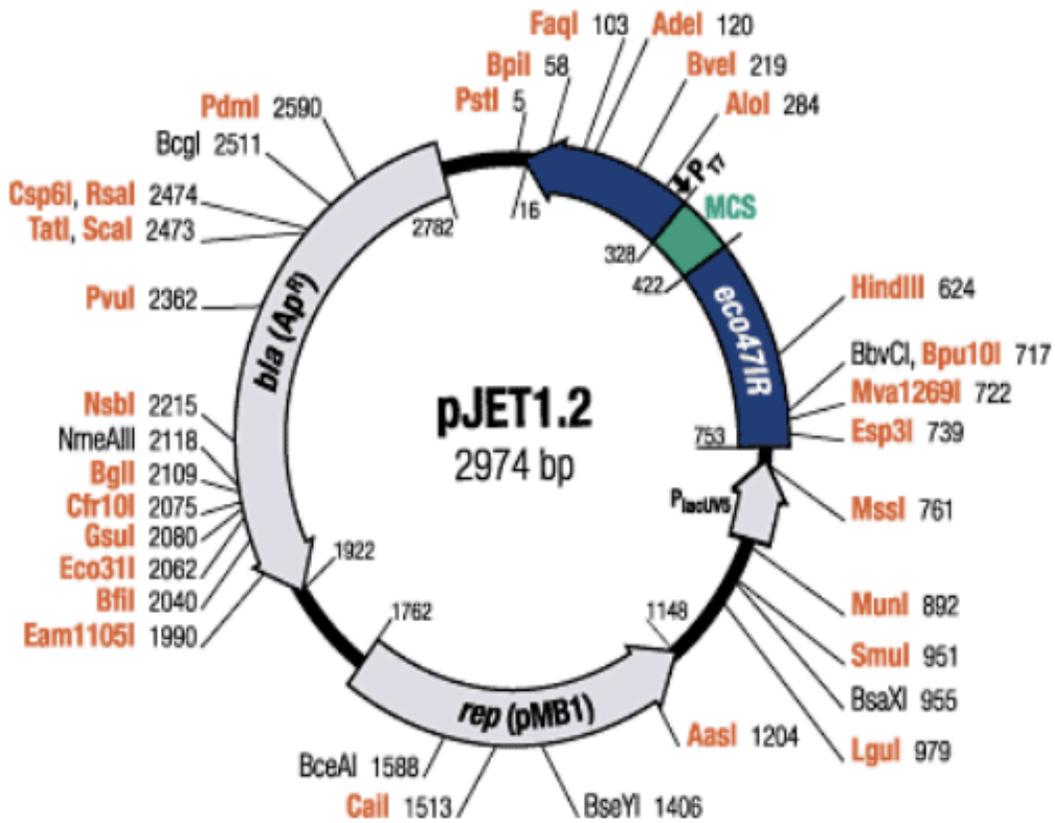


Figura 11. Mapa del vector pJET 1.2. Sistema conveniente para clonación de fragmentos para secuenciación.

11.4 Apéndice IV Artículo publicado

Título:

**“Identification by MALDI-TOF mass spectrometry of mercury resistant
bacteria associated with the rhizosphere of an apple orchard”**

Autores:

Camille Calzada Urquiza¹, Ivan Arvizu Hernández², Julio Alfonso Cruz Medina¹,
Miguel Angel Ramos López¹, Jaime Pérez Cruz¹, Raquel Louvan Rivera Zarazúa¹,
Zyanya Gloria Mena Casas¹, Diana Laura Juarez Arteaga¹, Adriana Anahíd
Contreras García¹, George H. Jones³ and Juan Campos-Guillen^{1*}

Marzo 2016

Revista: Geomicrobiology

Factor de impacto: 1.4