

Detección de genes de resistencia a Cd, Pb y As en *Pseudomonas aeruginosa* aislada del Fraile en Taxco de Alarcón

TORRES-LEDEZMA, Ana Patricia*†, TORIBIO-JIMÉNEZ, Jeiry, ROMERO-RAMÍREZ, Yanet, REYNA-FLORES, Luis Fernando

* Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología y Genética Microbiana. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, UAGro.

† Laboratorio de Investigación en Genética Microbiana del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos. Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. México. Tel. 4719310 ext.4525.

Recibido Mayo 23, 2013; Aceptado Noviembre 25, 2013

Resumen

La minería en Taxco de Alarcón, Guerrero fue una actividad económica que contribuyó al desarrollo del País durante 1523-1810, sin embargo su explotación durante más de 450 años dio lugar a la formación de jales. En la zona minera de Taxco de Alarcón se localizan los jales "El fraile", en éste lugar se ha reportado concentraciones de metales y metaloides de 455-22,900mg/Kg de Pb, 201-2,052900mg/Kg de As y 427-22,200 900mg/Kg de Zn, afectando la salud de la población, el desarrollo y equilibrio de la flora y fauna de la región. Sin embargo existen en el ambiente microorganismos, principalmente bacterias capaces de resistir concentraciones de metales pesados y metaloides en los sitios contaminados (Armienta et al., 2003), estas bacterias llevan a cabo esta capacidad mediante mecanismos de resistencia, siendo tres los principales: a) captura de iones en la célula bacteriana, b) transformación mediada por enzimas y c) expulsión de iones metálicos. En cada uno de los mecanismos de resistencia están involucradas diversas proteínas (CadA, ArsRBC, PbrB) y enzimas (cromato reductasa, mercurio reductasa, ArsC, ATPasas tipo P) cuya función es mantener la homeostasis para hacerle frente a la toxicidad de metales pesados y metaloides. Estas enzimas y proteínas son codificadas en genes, los cuales generalmente se encuentran localizados en cromosoma o en elementos móviles como los plásmidos. Los genes responsables de la resistencia a As están codificados en dos tipos de operones, uno de ellos presenta cinco genes (arsRDABC) y otro tres genes (arsRBC). Para la resistencia de Pb los genes se encuentran codificados en el operón pbrTRABCD y para Cd se ha asociado a la presencia del gene cadA. Contribuyendo considerablemente en la adaptación a corto plazo de las comunidades microbianas en ambientes contaminados por metales (Martínez et al., 2010). Estos genes se han descrito en diferentes especies bacterianas principalmente en *Escherichia coli*, *Cupriavidus metallidurans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Genes, *Pseudomonas Aeruginosa*, Taxco de Alarcón.

Abstract

Mining in Taxco de Alarcón, Guerrero was an economic activity that contributed to the development of the country during 1523-1810, however his farm for over 450 years resulted in the formation of tailings. In the mining area of Taxco tailings "The friar" in this place has been reported concentrations of metals and metalloids of 455-22,900mg / kg Pb, 201-2,052900mg / Kg of As and 427- are located 22,200 900mg / kg of Zn, affecting the health of the population, development and balance of flora and fauna. However microorganisms exist in the environment, mainly bacteria can withstand concentrations of heavy metals into contaminated sites (Armienta et al., 2003), these bacteria carry out this capacity through resistance mechanisms, with three main: a) ion capture into the bacterial cell, b) and c enzyme mediated transformation) removal of metal ions. In each of the resistance mechanisms are involved various proteins (CadA, ArsRBC, PBRB) and enzymes (chromate reductase reductase mercury, ARSC, type ATPases P) whose function is to maintain homeostasis to cope with the toxicity of heavy metals and metalloids. These enzymes and proteins are encoded genes which are generally located on chromosome or moving elements such as plasmids. The genes responsible for resistance to As are encoded in operons two types, one has five genes (arsRDABC) and another three genes (arsRBC). For Pb resistance genes are encoded in the operon pbrTRABCD and Cd has been associated with the presence of the gene cadA. Contributing significantly in the short-term adaptation of microbial communities in contaminated environments metals (Martínez et al., 2010). These genes have been described primarily in different bacterial species *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Cupriavidus metallidurans*.

Genes, *Pseudomonas aeruginosa*, Taxco de Alarcón.

Citación TORRES-LEDEZMA, Ana Patricia, TORIBIO-JIMÉNEZ, Jeiry, ROMERO-RAMÍREZ, Yanet, REYNA-FLORES, Luis Fernando. Detección de genes de resistencia a Cd, Pb y As en *Pseudomonas aeruginosa* aislada del Fraile en Taxco de Alarcón. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 – Abril 2014, 1-1: 354-356

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: patricia_ledezma07@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La minería en Taxco de Alarcón, Guerrero fue una actividad económica que contribuyó al desarrollo del País durante 1523-1810, sin embargo su explotación durante más de 450 años dio lugar a la formación de jales. En la zona minera de Taxco de Alarcón se localizan los jales “El fraile”, en éste lugar se ha reportado concentraciones de metales y metaloides de 455-22,900mg/Kg de Pb, 201-2,052900mg/Kg de As y 427-22,200 900mg/Kg de Zn, afectando la salud de la población, el desarrollo y equilibrio de la flora y fauna de la región. Sin embargo existen en el ambiente microorganismos, principalmente bacterias capaces de resistir concentraciones de metales pesados y metaloides en los sitios contaminados (Armienta et al., 2003), estas bacterias llevan a cabo esta capacidad mediante mecanismos de resistencia, siendo tres los principales: a) captura de iones en la célula bacteriana, b) transformación mediada por enzimas y c) expulsión de iones metálicos. En cada uno de los mecanismos de resistencia están involucradas diversas proteínas (CadA, ArsRBC, PbrB) y enzimas (cromato reductasa, mercurio reductasa, ArsC, ATPasas tipo P) cuya función es mantener la homeostasis para hacerle frente a la toxicidad de metales pesados y metaloides. Estas enzimas y proteínas son codificadas en genes, los cuales generalmente se encuentran localizados en cromosoma o en elementos móviles como los plásmidos. Los genes responsables de la resistencia a As están codificados en dos tipos de operones, uno de ellos presenta cinco genes (arsRDABC) y otro tres genes (arsRBC). Para la resistencia de Pb los genes se encuentran codificados en el operón pbrTRABCD y para Cd se ha asociado a la presencia del gene cadA. Contribuyendo considerablemente en la adaptación a corto plazo de las comunidades microbianas en ambientes contaminados por metales (Martínez et al., 2010). Estos genes se han descrito en diferentes especies bacterianas principalmente en *Escherichia coli*, *Cupriavidus metallidurans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Existen reportes de *Pseudomonas sp* sobre su comportamiento a diferentes concentraciones de metales pesados (Tabla 1).

Descripción	Referencia
0.5-1mM de Cd, 0.5-0.8mM de Co, 2.0-5.0mM de Zn,	Sevgi et al., (2010)
>1.5mM de Pd, >1.5 mM de Cr y 1mM de Cd	Martínez et al., (2010)
6.5mM de As, 7.0 de Cd, 0.7mM de Cr, 0.75mM Hg y 6.0 de Pb.	Raja et al., (2009)
300 µg/ml de Cu	Virender et al., (2010)

Tabla 1 Concentraciones de resistencia a metales pesados del género *Pseudomonas sp*.

Sin embargo *P. aeruginosa* aisladas de los sitios mineros de los jales “El fraile” de Taxco de Alarcón en Guerrero se desconoce su resistencia a Pb, Cd y As así como la presencia de los genes de resistencia que confieran una ventaja ecológica para resistir las adversidades de estos contaminantes en el ambiente lo que conllevaría a emplearlas en la biotecnología.

Objetivo

1. Determinar en *P. aeruginosa* la resistencia a metales pesados (Cd y Pb) y metaloide (As).
2. Determinar la presencia de plásmido en *P. aeruginosa*.
3. Amplificar los genes *cadA*, *pbrA* y *arsA* que confieren resistencia a Cd, Pb y As en *P. aeruginosa*.

Materiales y métodos

Se obtuvieron de un banco de cepas 19 *P. aeruginosa*, a las cuales se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para Pb (NO₃)₂, Cd (NO₃)₂ y As⁵⁺ el cual consiste en establecer la concentración de las sales metálicas a la cual se inhibe el crecimiento de cada una de las cepas, posteriormente a cada una de las cepas se hizo la extracción de ADN plasmídico por la técnica de Kieser et al., 1984.

Basándonos en la expresión del fenotipo de resistencia a las sales metálicas se seleccionaron 4 cepas y se buscó amplificar por PCR los genes *arsA*, *pbrA* y *cadA* con oligos específicos.

Resultados

21% de las cepas mostraron un patrón similar en la CMI al resistir concentraciones de 16mM de Pb, mientras que el 78% manifestaron una resistencia en As de 16 mM, sin embargo en Cd no hubo resistencia basándonos en la resistencia mostrada por la PAO1 (control +). El 15% de las cepas de *P. aeruginosa* presentaron plásmidos, los cuales mostraron tamaños de 12.93 Kb-41.55 Kb. Se seleccionaron 4 cepas basándonos en el fenotipo que expresaron en la CMI y mediante PCR se logró amplificar los genes *cadA* y *pbrA* en las cepas PAO1, PD1, PD12 y J2 (Fig. 1).

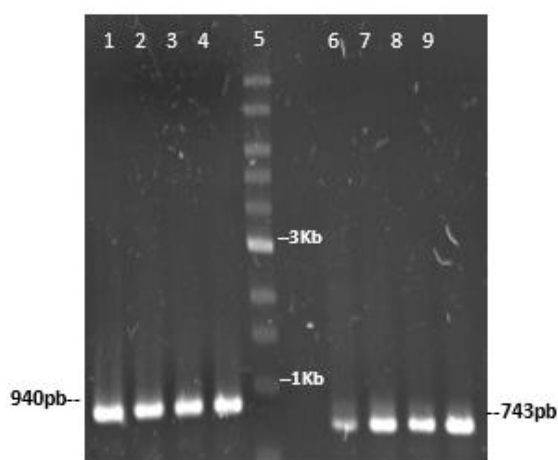


Figura 1 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR para la amplificación del gen *pbrA* carril 1-4: cepas PAO1, PD1, PD12 y J2. Carril 5: Marcador de PM. Amplificación del *cadA* carril 6-9: cepas PAO1, PD1, PD12 y J2.

Discusión

La resistencia que presentó *P. aeruginosa* ante Pb, Cd y As, la presencia de plásmidos en el 15% de las cepas y la amplificación de los genes *cadA* y *pbrA* en *P. aeruginosa* nos permite conocer más sobre la interacción microorganismo-metal indicando que es un posible candidato para ser utilizado en la biorremediación en suelos mineros contaminado con metales.

Conclusión

P. aeruginosa aisladas de los jales “El Fraile” mostraron resistencia a Cd y Pb, algunas presentan plásmidos y se observó la presencia de los genes *pbrA* y *cadA*. Esto contribuye al conocimiento de los mecanismos de adaptación de las bacterias en sitios extremos, perfilándose así como potenciales candidatas para estudios de biorremediación.

Referencias

- Sevgi, E., Coral, G., Gizir, M., Sangun, K. (2010). Investigation of heavy metal resistance in some bacterial strains isolated from industrial soils. *Turk J Biol.* Vol. 34. 423-431
- Armienta, M., Talavera, O., Morton, O., Barrera, B. (2003). Geochemistry of Metals from Mine Tailings in Taxco, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (71) 387-393.
- Virender, C., Tyagi, A., Kumar, A., Kumar, V. (2010). Isolation and Antibiogram pattern of *E. coli* isolates having heavy metals tolerance. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* Vol.1 (3).
- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, Ma. Salgado, I., Olivares, S., Lima, L. et al., (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almeyda. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.* Vol. 4. 1-10.