

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS NATIVOS DE MUESTRAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON RESIDUOS MINEROS

Arredondo-Solórzano Rodolfo Josué (1), Aguilar-Méndez Mario Josué (2), Noriega-Luna Berenice (3)

1 Licenciatura en Ingeniería Ambiental, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: atroz_12@hotmail.com

2 Departamento de Ingeniería Civil, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: massiodeus@gmail.com

3 Departamento de Ingeniería Civil, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: berenice.noriega@ugto.mx

Resumen

La explotación minera es una actividad económica importante de nuestro país que genera grandes cantidades de residuos sólidos conocidos como jales, los cuales cubren grandes extensiones de terreno y ocasionan muchos problemas ambientales. El propósito de esta investigación fue aislar y caracterizar grupos bacterianos presentes en los residuos mineros con posible aplicación en tecnologías de remediación de suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos. **METODOLOGÍA.** Se colectaron muestras de agua, sedimento y jal en un sitio del distrito minero de Guanajuato. Se realizaron diluciones decimales seriadas de las muestras para cuantificar unidades formadoras de colonias. Se seleccionaron 16 colonias representativas y se caracterizaron tomando en cuenta los siguientes parámetros, forma, borde, elevación y color. Finalmente se tiñeron con la técnica de Gram para conocer la morfología bacteriana. **RESULTADOS.** El análisis morfológico evidencia la presencia de diferentes grupos bacterianos, bacilos, cocos y filamentos, lo que sugiere la presencia de actinobacterias. **CONCLUSIÓN.** Se demostró la presencia de microorganismos resistentes a metales pesados tales como arsénico, mercurio y plata en un ambiente contaminado por la actividad minera.

Abstract

Mining is an important economic activity in our country that generates large amounts of solid waste known as tailings, which cover large tracts of land and cause many environmental problems. The purpose of this research was to isolate and characterize bacterial groups present in mining waste with possible application in remediation technologies of contaminated soils with potentially toxic elements. **METHODOLOGY.** Samples of water, sediment and tailings were collected at a site of the mining district of Guanajuato. Serial decimal dilutions of the samples to quantify colony forming units were made. 16 representative colonies were selected and characterized taking into account the following parameters, shape, edge, elevation and color. Finally they stained with Gram technique to determine the bacterial morphology. **RESULTS.** Morphological analysis showed the presence of different bacterial groups, bacilli, cocci and filaments, suggesting the presence of actinomycetes. **CONCLUSION.** The presence of microorganisms resistant to heavy metals such as arsenic, mercury and silver was demonstrated in a polluted by mining environment.

Palabras Clave

Jales mineros; Morfología colonial; Morfología bacteriana; Bacilos; Filamentos

INTRODUCCIÓN

Los residuos mineros, también conocidos como relaves o jales mineros, son el producto de la trituración y molienda del mineral una vez recuperados los metales comerciales [1]. La composición química y mineralógica de los jales es diversa [2], entre los elementos comúnmente reportados en la composición de los jales se encuentran arsénico, cadmio, cobre, plomo, mercurio, cromo, selenio y zinc [3], los cuales se caracterizan por su alta toxicidad. Estos elementos potencialmente tóxicos (EPTs), presentes en los jales, representan un riesgo ambiental por su capacidad de lixiviación e incorporación a cuerpos de agua, así como por su movilización a otros ecosistemas por dispersión eólica o hídrica generando grandes extensiones de suelo contaminado.

Actualmente existen diferentes tecnologías para la remediación de suelos contaminados. Por ejemplo, las tecnologías tradicionales para la recuperación de suelos contaminados con EPTs utilizan métodos de ingeniería y tratamientos químicos sin embargo, estas alternativas tienen limitaciones económicas y de riesgo. No obstante, los métodos biológicos para la recuperación de suelos contaminados por metales pesados y metaloides representan una alternativa de bajo costo y con enormes ventajas ambientales [4].

Particularmente, las tecnologías biológicas involucran el uso de microorganismos para remover, contener o retener contaminantes ambientales sin causar daño [5]. Estos microorganismos son capaces de desarrollarse en ambientes extremadamente contaminados. Entre los microorganismos que participan en los procesos biológicos del suelo, así como en la transformación de EPTs destacan las bacterias y los hongos. Especialmente, las bacterias representan la mayor diversidad en el suelo y se distribuyen en todos los ambientes vivos. Su rápido crecimiento y metabolismo las ubican como una alternativa importante en el proceso de recuperación. Además, presentan una gran capacidad de acumular metales en su biomasa.

En general, los actinomicetos, los hongos y las cianobacterias constituyen el complejo microbiano de suelos altamente contaminados sin embargo,

existe poca información sobre estos grupos microbianos así como de su participación en los procesos de descontaminación de los EPTs.

En este sentido, la presente investigación tiene como objetivo realizar el diagnóstico microbiológico en los desechos de una de las zonas mineras del Estado de Guanajuato con presencia de arsénico, mercurio y plata. El objetivo del presente estudio fue cuantificar en un jal minero la presencia de microorganismos nativos en estado latente o bajo formas de resistencia. Los resultados indican la presencia de microbiota resistente a metales pesados presentes en los residuos mineros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio. El sitio es un depósito de residuos mineros que en su cercanía están presentes escurrimientos y acumulación de agua. Es un sitio con problemas ambientales y posible movilidad de EPTs. Dentro del sitio se seleccionaron cuatro zonas de interés de estudio con diferentes condiciones físicas las cuales se identificaron con las siguientes claves: Z1, Z2, Z3 y Z4 (tabla 1).

Toma de muestra. Las muestras de agua, sedimento y jal fueron colectadas con espátula estéril y posteriormente almacenadas en tubos Falcón estériles con capacidad de 50 ml.

Diluciones decimales seriadas. Se realizaron diluciones decimales seriadas de cada una de las muestras de agua, sedimento y jal de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4} en solución salina previamente esterilizada (Imagen 1). Se tomó 1 mL de cada dilución seriada y se inoculó en agar nutritivo. Finalmente, se aislaron y caracterizaron las cepas dominantes en el ambiente contaminado.

Tinción de Gram. Se tomó una pequeña muestra de colonia bacteriana con asa bacteriológica, y se colocó en un portaobjetos. Sobre la muestra se adicionó el colorante cristal violeta y se dejó reposar durante un minuto. Posteriormente, se agregó solución yodo-lugol y se dejó reposar durante un minuto, enseguida se realizó un lavado con solución alcohol-acetona. Finalmente, se colocó safranina como medio de contraste (imagen 2).

Tabla 1: Descripción de los sitios de muestreo en el distrito minero de Guanajuato, Gto.

| CLAVE | CARACTERÍSTICAS DE SITIOS DE MUESTREO | | | |
|-------|---------------------------------------|---------------|-----------------|---|
| | COORDENADAS | | TIPO DE MUESTRA | OBSERVACIONES |
| Z1 | 21°02'13.7"N | 101°15'07.0"W | SEDIMENTO-AGUA | INTERIOR DE UNA CUEVA. FLUJO DE CORRIENTE DE AGUA. PROCESOS DE OXIDACIÓN. |
| Z2 | 21°02'08.4"N | 101°15'10.9"W | SEDIMENTO-AGUA | ENTRADA DE LA CUEVA. FLUJO DE CORRIENTE DE AGUA. AUSENCIA DE VEGETACIÓN. |
| Z3 | 21°02'09.1"N | 101°15'10.9"W | SEDIMENTO-AGUA | ARROYO CONTAMINADO |
| Z4 | 21°02'09.4"N | 101°15'09.1"W | JAL | JALES MINEROS. PRESENCIA DE VEGETACIÓN. |

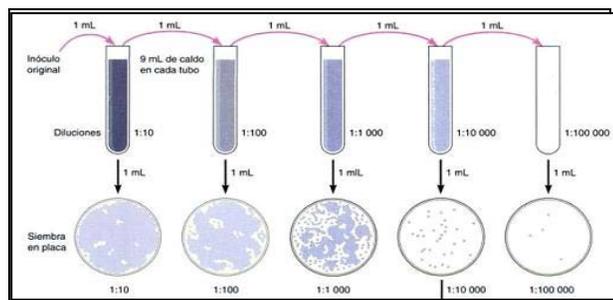


IMAGEN 1: Dilución decimal seriada. [6]

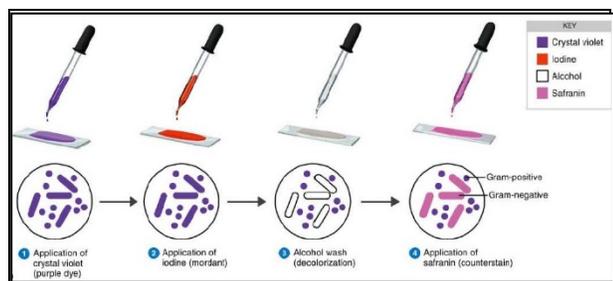


IMAGEN 2 Tinción de Gram. [6]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

16 colonias bacterianas fueron seleccionadas considerando los siguientes parámetros: forma, borde, elevación y color. Los resultados obtenidos

indican que la mayoría de las cepas crecen en colonias con forma irregular y circular. En cuanto a las características del borde, se observan enteros, ondulados y lobulados. Se registran elevaciones planas y convexas. Respecto a la coloración se observan colonias amarillas, blancas, café, crema y gris (tabla 2). Características semejantes de las colonias bacterianas han sido reportadas por otros autores que han demostrado la presencia de actinobacterias en suelos contaminados con EPT.

En cuanto al análisis de morfología bacteriana, las microfotografías obtenidas muestran diversas formas microscópicas, tales como cocos, bacilos y filamentos (tabla 3). Lo anterior hace evidente la presencia de bacterias en el sitio de estudio, previamente caracterizado con presencia de EPTs tales como arsénico, mercurio y plata.

De acuerdo a la bibliografía las bacterias comúnmente aisladas de ambientes contaminados por el hombre con EPTs son *Burkholderia pickettii*, *B. solanacearum* y *Alcaligenes eutrophus*. Por otro lado, las bacterias aisladas de suelos naturalmente contaminados con EPTs, pertenecen a varios géneros. Algunos ejemplos son: *Burkholderia*, *Hafnia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Comamonas* y *Agrobacterium*. Especies Gram positivas también se encuentran en estos ambientes por ejemplo: *Arthrobacter ramosus* y *A. aurescens*. [5]

Particularmente, las bacterias acumulan metales por medio de mecanismos físicos, químicos y biológicos, los cuales incluyen el enlace de los contaminantes a nivel extracelular, producción de metabolitos y biopolímeros, unión a polipéptidos específicos y acumulación dependiente del metabolismo. Sin embargo, uno de los procesos más importantes con relevante potencial en la biotecnología de la descontaminación es la biosorción, proceso de secuestro de metales independientes del metabolismo. Con este proceso, numerosos microorganismos se han empleado como biosorbentes comerciales para la limpieza de aguas contaminadas con EPTs sin embargo, su uso en la recuperación de suelos no se ha explotado, lo que representa una alternativa con alto potencial de uso.[5]

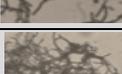
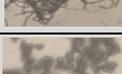
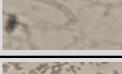
En este contexto, la idea general del proyecto es la búsqueda de microorganismos nativos del sitio, contenidos en jales mineros, con capacidad de

biosorción de metales pesado y con potencial en técnicas de biorremediación.

Tabla 2: Morfología colonial de cepas aisladas

| CLAVE | MORFOLOGÍA COLONIAL DE CEPAS AISLADAS | | | | |
|-------|---------------------------------------|----------|-----------------|-----------|-------------|
| | FORMA | BORDE | COLOR DE MARGEN | ELEVACIÓN | COLOR |
| J1 | CIRCULAR | ENTERO | BLANCO | PLANA | CAFÉ |
| J2 | CIRCULAR | ONDULADO | BLANCO | CONVEXA | CAFÉ |
| J3 | CIRCULAR | ENTERO | BLANCO | PLANA | CREMA |
| J4 | CIRCULAR | ENTERO | BLANCO | CONVEXA | CAFÉ CLARO |
| J5 | CIRCULAR | ENTERO | BLANCO | CONVEXA | CAFÉ |
| J6 | CIRCULAR | ENTERO | BLANCO | PLANA | CENTRO CAFÉ |
| J7 | CIRCULAR | ENTERO | BLANCO | PLANA | BLANCO |
| J8 | CIRCULAR | ENTERO | CREMA | CONVEXA | CAFÉ CLARO |
| J9 | CIRCULAR | ONDULADO | BLANCO | PLANA | BLANCO |
| J10 | CIRCULAR | ENTERO | BLANCO | PLANA | CAFÉ ROJIZO |
| J11 | CIRCULAR | ENTERO | GRIS | CONVEXA | GRIS |
| LL1 | CIRCULAR | ENTERO | TRANSPARENTE | PLANA | AMARILLO |
| LL2 | IRREGULAR | LOBULADO | TRANSPARENTE | PLANA | BLANCO |
| LL3 | PUNTIFORME | ENTERO | TRANSPARENTE | PLANA | CREMA |
| LL4 | CIRCULAR | ENTERO | BLANCO | PLANA | CREMA |
| LL5 | CIRCULAR | ENTERO | TRANSPARENTE | PLANA | CAFÉ CLARO |

Tabla 3: Morfología bacteriana de cepas aisladas

| CLAVE | MORFOLOGIA BACTERIANA | | |
|-------|-----------------------|-----------------|---|
| | TINCIÓN DE GRAM | DESCRIPCIÓN | MICROGRAFÍA |
| J1 | POSITIVOS | FILAMENTO |  |
| J2 | NEGATIVOS | FILAMENTO |  |
| J3 | NEGATIVOS | BACILOS |  |
| J4 | POSITIVOS | FILAMENTO |  |
| J5 | POSITIVOS | FILAMENTO |  |
| J6 | POSITIVOS | FILAMENTO |  |
| J7 | X | X |  |
| J8 | NEGATIVOS | BACILOS |  |
| J9 | NEGATIVOS | ESTREPTOBACILOS |  |
| J10 | POSITIVOS | FILAMENTO |  |
| J11 | NEGATIVOS | COCOS |  |
| LL1 | NEGATIVOS | COCOS |  |
| LL2 | NEGATIVOS | BACILOS |  |
| LL3 | NEGATIVOS | BACILOS |  |
| LL4 | X | X |  |
| LL5 | NEGATIVOS | BACILOS |  |

CONCLUSIONES

En las cuatros zonas de estudio se registró crecimiento microbiano sin embargo, en dos zonas se registraron las bacterias más representativas del estudio, la zona de los jales mineros y una zona cercana a ellos.

En las cepas aisladas se encontraron formas filamentosas, lo que presume la posible presencia de actinobacterias.

Actividades complementarias al estudio permitirán la identificación taxonómica de las bacterias con potencial en técnicas de biorremediación

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo a la Universidad de Guanajuato para la realización de este verano de investigación.

Se agradece el apoyo a la Dra. Alma Hortensia Serafín Muñoz por todo el apoyo brindado en el laboratorio de Ingeniería Sanitaria.

Asimismo se agradece a la Dra. Myrna Sabanero López y a la M.C. Lérida Liss Flores Villavicencio por el apoyo en la realización de la pruebas de extracción de ADN.

REFERENCIAS

- [1] Aurora M., Villaseñor G., y Romero F. (2005). Propuesta de estrategia metodológica para la evaluación de la peligrosidad de jales mineros en México. AIMMGM XXVI Convención Internacional de Minería. 12-15
- [2] Tania Volke Sepúlveda, Juan A. Velasco Trejo y David A. de la Rosa Pérez. (2005) Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Primera Ed., México.
- [3] Ramos Y., y col (2004). Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del Distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas, v. 21, núm. (2) 268-284.
- [4] Cunningham, S.D. y C.R. Lee. (1995). Phytoremediation: Plant-based remediation of contaminated soils and sediments. In: Bioremediation: Science and applications. Special Publication 43. Soil Science Society of America. Madison, WI.

- [5] González-Chávez, Ma. del Carmen Ángeles. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. Terra Latinoamericana, 23 (1) 30-33
- [6] Tortora, Gerard J., Berdell Funke y Christine Case. (2007). Introducción a la microbiología (9th ed.) Madrid, España: Editorial medica Panamericana.