

**CAMBIOS MORFOLOGICOS Y MOLECULARES EN LAS BACTERIAS  
NATIVAS GN04, T07, CG11 Y PB56 BAJO LA PRESENCIA DE PLOMO.**

**RENÉ RICARDO CUÉLLAR RODRÍGUEZ**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
BOGOTÁ  
2006**

**CAMBIOS MORFOLOGICOS Y MOLECULARES EN LAS BACTERIAS  
NATIVAS GN04, T07, CG11 Y PB56 BAJO LA PRESENCIA DE PLOMO.**

**Tesis De Grado Como Requisito Para Optar Al Titulo De Magíster En Microbiología**

**RENÉ RICARDO CUÉLLAR RODRÍGUEZ**

**Director**

**Jenny Dussán**

**Directora del Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC)**

**Profesora Asociada**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
BOGOTÁ  
2006**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos a:

A Dios por darme a mis padres Ricardo Cuéllar y Aura María Rodríguez, quienes me apoyaron en todos los momentos de mi formación profesional y personal.

A la Dra. Jenny Dussán, directora de Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes, quien me acogió dentro del Centro y me brindó todas las oportunidades y condiciones para desarrollar nuevos proyectos, motivando y enriqueciendo el desarrollo científico y personal.

A las microbiólogas Martha Vives y Lucía Lozano por su invaluable apoyo durante la ejecución de esta tesis.

A Paola Andrea Vargas mis más profundos y sinceros agradecimientos por su apoyo sincero y leal durante toda la tesis.

A todos los estudiantes vinculados al Centro de Investigaciones Microbiológicas CIMIC durante la ejecución de esta tesis, por su ayuda desinteresada y aportes, especialmente al grupo de metales pesados conformado por Alejandro Caro, Gina Rodríguez y Paola Vargas.

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar los posibles efectos macroscópicos, microscópicos y moleculares en los aislamientos nativos GN04, T07, CG11 y PB56 bajo la presencia de plomo.

Además se evaluó si la capacidad de resistencia de estos morfotipos se debe a un sistema de detoxificación de tipo eflujo.

Y por último se analizó la capacidad acumulativa de plomo de los morfotipos a partir de cultivos sólidos.

Se determinó inicialmente la mínima concentración inhibitoria (MIC) por mol de plomo para los diferentes aislamientos, con el objetivo de tener claro las concentraciones del metal que se emplearían para el diseño de los posteriores ensayos. Se avalú la expresión de proteínas bajo una concentración de 1mM de plomo en las fracciones celulares de periplasma, membrana y citoplasma. Se determinó la presencia de algún mecanismo similar a las bombas de eflujo de plomo reportados para la cepa de referencia *Ralstonia metallidurans* CH34, mediante la amplificación de los genes *pbrA* y *pbrB*. Finalmente se empleo microscopia electrónica de transmisión para evidenciar la capacidad acumulativa de plomo en los diferentes morfotipos.

## CONTENIDOS

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	7
INTRODUCCION	17
OBJETIVOS	20
1. MARCOTEORICO	21
1.1. METALES PESADOS.	21
1.1.1. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DE LOS METALES PESADOS.	21
1.1.2. TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS.	22
1.1.3. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS METALES PESADOS.	22
1.2. EL PLOMO.	23
1.2.1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL PLOMO	24
1.3. TRANSFORMACIONES MICROBIANAS DE LOS METALES.	25
1.3.1. MECANISMOS DE MOVILIZACIÓN.	26
1.3.1.1. Biolixiviación.	26
1.3.1.2. Oxidación Enzimática.	27
1.3.1.3. Reducción Enzimática.	27
1.3.1.4. Complejación.	27
1.3.2. MECANISMOS DE INMOVILIZACIÓN	27
1.3.2.1. Precipitación	28
1.3.2.2. Biosorción	28
1.3.2.3. Bioacumulación	29
1.3.2.4. Biotransformación	30
1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA MICROBIANA A METALES PESADOS	31
1.4.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA MICROBIANA A PLOMO	31
1.4.1.1. Sistemas de dos componentes.	32
1.4.1.2. Determinante de resistencia a plomo <i>pbr</i> .	32
1.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA	33
1.5.1. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM).	34
1.5.2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (TEM).	35
1.5.3. COLORACION NEGATIVA	35
1.5.4. . ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDX)	36
2. MATERIALES Y METODOS	37
2.1. LOCALIZACION DEL TRABAJO	37

2.2.	CEPAS BACTERIANAS	37
2.3.	CEPAS DE REFERENCIA	37
2.3.1.	<i>R. metallidurans</i> CH 34	37
2.3.2.	<i>R. metallidurans</i> AE 104	38
2.4.	MEDIOS DE CULTIVO	38
2.5.	CARACTERIZACION BACTERIANA	38
2.5.1.	CARACTERIZACION MACRO Y MICROSCOPICA	39
2.5.2.	DETERMINACION DE LA MINIMA CONCENTRACION INHIBITORIA	39
2.5.2.1.	Preparación del inóculo.	39
2.5.2.2.	Preparación del medio mínimo de sales.	39
2.6.	IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	40
2.7.	ANALISIS DEL EFECTO DEL PLOMO EN LA EXPRESION DE PROTEINAS	40
2.7.1.	CONDICIONES DE CULTIVO.	41
2.7.2.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.	41
2.7.3.	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	41
2.7.4.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.	41
2.7.5.	ANÁLISIS DE LOS PERFILES PROTEICOS.	42
2.8.	AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>pbrA</i> Y <i>pbrB</i> ASOCIADOS A LA BOMBA DE EFLUJO DE PLOMO EN <i>R metallidurans</i> CH34.	42
2.9.	MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X	43
3.	RESULTADOS	44
3.1.	CARACTERIZACION MICROBIANA	44
3.2.	DETERMINACION DE LA MINIMA CONCENTRACION INHIBITORIA	45
3.3.	IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS	46
3.4.	EFECTO DEL PLOMO EN LA EXPRESION DE PROTEINAS	46
3.5.	AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>pbrA</i> Y <i>pbrB</i>	54
3.5.1.	Estandarización de las condiciones de amplificación del gen <i>pbrA</i> .	54
3.5.2.	Amplificación del gen <i>pbrA</i> en las cepas nativas.	54
3.5.3.	Estandarización de las condiciones de amplificación del gen <i>pbrB</i> .	55
3.5.4.	Amplificación del gen <i>pbrB</i> en las cepas nativas.	55
3.6.	MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION Y ESPECTROSCOPIA DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	56
4.	. DISCUSION	68
5.	CONCLUSIONES	70
	ANEXOS	76

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Distribución de los elementos en la corteza continental	23
Figura 2. Fuentes comunes de exposición del hombre al plomo.	25
Figura 3. Mecanismos de movilización e inmovilización de los metales por microorganismos.	26
Figura 4. Sitios electronegativos a los cuales puede unirse los metales en el proceso de biosorción.	29
Figura 5. Diagrama del determinante de resistencia al plomo (genes y proteínas) en <i>R. metallidurans</i> CH34.	33
Figura 6. Morfología macroscópica con y sin la presencia de plomo.	44
Figura 7. Electroforesis de proteínas, fracciones celulares: periplasma, citoplasma y membrana del morfotipo GN04	47
Figura 8. Electroforesis de proteínas, fracciones celulares: periplasma, citoplasma y membrana del morfotipo T07	48
Figura 9. Electroforesis de proteínas, fracciones celulares: periplasma, citoplasma y membrana del morfotipo CG11	49
Figura 10. Electroforesis de proteínas, fracciones celulares: periplasma, citoplasma y membrana del morfotipo PB56	50
Figura 11. Análisis de disimilitud de la expresión proteica en la fracción de periplasma.	51
Figura 12. Análisis de disimilitud de la expresión proteica en la fracción de citoplasma.	52
Figura 13. Análisis de disimilitud de la expresión proteica en la fracción de membrana.	53
Figura 14. Electroforesis de los productos de PCR para la estandarización de las condiciones de amplificación del gen <i>pbrA</i> .	54
Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR del gen <i>pbrA</i> en las cepas nativas.	54
Figura 16. Electroforesis de los productos de PCR para la estandarización de las condiciones de amplificación del gen <i>pbrB</i> .	55
Figura 17. Electroforesis de los productos de PCR del gen <i>pbrB</i> en las cepas nativas.	55
Figura 18. Microscopía electrónica del morfotipo GN04.	56
Figura 19. Microscopía electrónica del morfotipo T07	56
Figura 20. Microscopía electrónica del morfotipo CG11.	56
Figura 21. Microscopía electrónica del morfotipo PB56.	57
Figura 22. Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo GN04 crecido bajo la presencia de plomo.	58

Figura 23. Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo GN04 crecido sin la presencia de plomo.	59
Figura 24. Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo T07 crecido bajo la presencia de plomo.	60
Figura 25. Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo T07 crecido sin la presencia de plomo.	61
Figura 26. Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo CG11 crecido bajo la presencia de plomo.	62
Figura 27. Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo CG11 crecido sin la presencia de plomo.	63
Figura 28. Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo PB56 crecido bajo la presencia de plomo.	64
Figura 29. Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo PB56 crecido sin la presencia de plomo.	65



## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Principales transformaciones microbianas de metales pesados.	30
Tabla 2. Características morfológicas de los morfotipos de trabajo.	44
Tabla 3. Mínima concentración inhibitoria a Pb (II) presentada por los morfotipos de estudios y la cepa control.	45
Tabla 4. Morfotipos identificados por la secuenciación del gen codificante para la subunidad 16S del RNA ribosomal (16S rRNA).	46
Tabla 5. Análisis del patrón de bandeo según el peso molecular (KDa) para el morfotipo GN04, de las distintas fracciones celulares (periplasma, citoplasma y membrana), bajo las diferentes condiciones: sin plomo (control) y con plomo a las 12 y 14 horas.	47
Tabla 6. Análisis del patrón de bandeo según el peso molecular (KDa) para el morfotipo T07, de las distintas fracciones celulares (periplasma, citoplasma y membrana), bajo las diferentes condiciones: sin plomo (control) y con plomo a las 12 y 14 horas.	48
Tabla 7. Análisis del patrón de bandeo según el peso molecular (KDa) para el morfotipo CG11, de las distintas fracciones celulares (periplasma, citoplasma y membrana), bajo las diferentes condiciones: sin plomo (control) y con plomo a las 12 y 14 horas.	49
Tabla 8. Análisis del patrón de bandeo según el peso molecular (KDa) para el morfotipo PB56, de las distintas fracciones celulares (periplasma, citoplasma y membrana), bajo las diferentes condiciones: sin plomo (control) y con plomo a las 12 y 14 horas.	50
Tabla 9. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo GN04 crecido bajo la presencia de plomo.	58
Tabla 10. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo GN04 crecido sin la presencia de plomo.	59
Tabla 11. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo T07 crecido bajo la presencia de plomo.	60
Tabla 12. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo T07 crecido sin la presencia de plomo.	61
Tabla 13. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo CG11 crecido bajo la presencia de plomo.	62
Tabla 14. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo CG11 crecido sin la presencia de plomo.	63
Tabla 15. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de difracción de rayos X del	64

morfotipo PB56 crecido bajo la presencia de plomo.	
Tabla 16. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de difracción de rayos X del morfotipo PB56 crecido sin la presencia de plomo.	65
Tabla 17. Tamaños de los picos mostrados por la espectroscopia de difracción de rayos X en los morfotipos cultivados con o sin la presencia del plomo.	67

## INTRODUCCIÓN

Los contaminantes del medioambiente pueden ser muy diversos, desde compuestos orgánicos a compuestos inorgánicos. Su presencia en el ambiente es el resultado del vertimiento de efluentes industriales, aguas residuales domésticas, aguas de minería, desecho de materiales sólidos, percolados de vertederos y vertimientos accidentales.

Los metales pesados son contaminantes inorgánicos de importancia por su toxicidad, siendo generalmente asociados como contaminantes secundarios a una serie de actividades, las cuales incluyen procesos de extracción de hidrocarburos, procesos mineros, fundiciones, galvanizados, combustión de hidrocarburos y actividades agrícolas<sup>1</sup>.

Entre los iones inorgánicos, los metales pesados merecen especial atención, debido a que los microorganismos necesitan cantidades traza de estos elementos para usarlos como nutrientes; sin embargo pueden ser potentes inhibidores para estos organismos a concentraciones relativamente bajas<sup>2</sup>.

El reciente aumento de los metales pesados en el ambiente ha permitido que los microorganismos estén obligados a responder a esta nueva condición; ya sea por una respuesta mediada por mecanismos inespecíficos o específicos. En los mecanismos inespecíficos, los microorganismos son indiferentes a la presencia o ausencia del metal, generalmente está asociado a características fisiológicas o estructurales de tipo constitutivo, o también puede suceder que estos posean una mutación en el sistema transportador por donde normalmente entra el metal pesado, de modo que no puede ser internalizado y por lo tanto no lo puede afectar. Por otro lado, los mecanismos específicos son mecanismos de

---

<sup>1</sup> Scragg, A. Visión general. En: Scragg, A. Biotecnología medioambiental. Madrid. Editorial Acribia S.A. 2001. p. 15 -25.

<sup>2</sup> Atlas, R. & Bartha, R. Interacciones microbianas con contaminantes xenobióticos e inorgánicos. En: Atlas, R. & Bartha, R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Madrid. Addison Wesley. 2001. p. 534 546.

detoxificación específicos para cada ion metálico y que son codificados genéticamente e inducidos por la presencia del metal<sup>3</sup>.

Durante la creación del grupo de investigación de metales pesados en el Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC) de la Universidad de Los Andes en el año 2003, se seleccionaron morfotipos nativos resistentes a plomo. Tres morfotipos a partir de crudo de Arauca. Cinco morfotipos a partir de muestras de suelo tratadas por landfarming de Cundinamarca; las cuales presentaban altos niveles de metales pesados. Y quince morfotipos de un consorcio definido para la biorremediación de suelos y lodos aceitosos del Casanare; este consorcio presento además de su eficiencia para la disminución de TPHs, una disminución de Plomo de 1800 ppm a 80 ppm en un periodo de 3 meses.

Con el fin de eliminar los morfotipos repetidos se tuvieron en cuenta parámetros como morfología macroscópica, morfología microscópica, reacciones bioquímicas, perfiles plasmidicos de bajo y alto peso molecular y la mínima concentración inhibitoria (MIC) de plomo. En esta segunda etapa de selección realizada por el CIMIC (2003) quedaron 11 morfotipos que presentan un mínima concentración inhibitoria (MIC) mayor o igual a 5mM de acetato de plomo, un comportamiento metabólico heterogéneo y/o poseen perfiles plasmídicos diferentes entre si.

Posterior a la identificación de los morfotipos por la secuenciación del gen 16S ribosomal, realizado en Dana Farber Cancer Center y en Microcore Harvard Medical School (Microbiology a molecular department) por la Profesora Martha Josefina Vives (2004). Se descartaron tres morfotipos por su relación con cepas patógenas, dejando ocho morfotipos de estudio; de los cuales “cuatro (GN04, T07 CG11, y PB56) presentaron un alto rendimiento en la remoción de plomo”<sup>4</sup>

---

<sup>3</sup> **Cervantes & Silver**, Systems of resistance to metals in Pseudomonas. Revista Latinoamericana de microbiologia. 1996.38 : 45 – 64.

<sup>4</sup> **Caro, A.** 2004. Acumulación de plomo en aislamientos de bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos utilizando un reactor de lecho empacado. Universidad de los Andes.

## OBJETIVOS

### Objetivos Generales

Determinar los efectos macroscópicos, microscópicos y moleculares en los aislamientos nativos GN04, T07, CG11 y PB56 bajo la presencia de plomo.

### Objetivos Específicos

1. Identificar los morfotipos mediante el análisis de la secuencia del gen de la subunidad 16S del RNA ribosomal (16S rRNA).
2. Determinar la mínima concentración inhibitoria (MIC) por mol de plomo para los aislamientos nativos.
3. Evaluar la expresión de proteínas baja la presencia del plomo en las fracciones celulares de periplasma, membrana y citoplasma en los morfotipos aislados.
4. Amplificar de los genes *pbrA* y *pbrB* de la bomba de eflujo de plomo de *Ralstonia metallidurans* CH34 en las cepas nativas.
5. Evidenciar la capacidad acumulativa de plomo de los morfotipos por microscopia electrónica de transmisión (TEM).

## **1. MARCO TEORICO**

### **1.1. METALES PESADOS.**

Los metales pesados son aquellos elementos cuyas densidades son mayores a los 5 g/cm<sup>3</sup>; dentro de esta definición encontramos los metales de transición (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb y Bi), los semimetales (Ge, As, Sb, Te y Po), los lantánidos (La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Tb y Lu) y los actínidos (Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No y Lr).

#### **1.1.1. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DE LOS METALES PESADOS.**

La explotación de los recursos naturales por el hombre se ha dado como consecuencia de los avances científicos y tecnológicos. Sin embargo, esto ha originado alteraciones en el equilibrio de los ciclos biogeoquímicos, debido a la introducción o a la reubicación de compuestos químicos ajenos del ambiente, que con frecuencia pueden exceder la capacidad de auto limpieza de los ecosistemas y por lo tanto conllevan a la acumulación de estos elementos a niveles tóxicos.

Como consecuencia de la actividad antropogénica se ha dado la contaminación del ambiente con metales pesados, cuya fuente principal son todos aquellos procesos industriales que los utilizan. Además, actividades como la agricultura y la eliminación inadecuada de residuos también contribuyen a este problema; generalmente los contaminantes son descargados en la atmósfera y en los ambientes acuáticos y terrestres, principalmente como solutos o partículas que pueden alcanzar concentraciones elevadas.

### 1.1.2. TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS.

“Los efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente y son de importancia económica y de salud pública. Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran: [Primero], el desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales. [Segundo], “modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos”<sup>5</sup>; por ejemplo los “cationes con altas masas atómicas tienden a unirse fuertemente a los grupos sulfidrilos (SH)”<sup>6</sup> de las proteínas, conllevando a su inactivación. [Tercero], “deterioro de la integridad de biomoléculas. [Cuarto], modificación de otros agentes biológicamente activos”<sup>7</sup>.

### 1.1.3. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS METALES PESADOS.

“La mayoría de los metales son elementos de transición con orbitales d completamente llenos; estos orbitales proveen a los cationes la habilidad de formar compuestos complejos, que pueden tener actividad redox, comportarse como ácidos de Lewis o ambas. Por lo tanto, estas cualidades hacen a los iones de los metales pesados útiles catalizadores en rutas bioquímicas”<sup>8</sup>.

Sin embargo, de todos los metales pesados solo unos pocos tienen importancia biológica como elementos traza, esto se debe a dos motivos: Primero, “la concentración de un metal pesado disminuye mientras su masa atómica aumenta, haciendo que los metales más pesados sean más escasos en el ambiente y por ende más limitado su uso por los

---

<sup>5</sup> Cañizares, R. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología 2000. 42:131-143.

<sup>6</sup> Nies, D. Microbial heavy metal resistance: Molecular biology and utilization for biotechnological processes. Recuperado el 14 de Junio del 2006, en <http://bionomie.mikrobiologie.uni-halle.de/Reviews/Review%201999.html>

<sup>7</sup> Ibid., p. 22

<sup>8</sup> Nies, D., & Brown, N. Two-Component Systems in the Regulation of Heavy Metal Resistance. Recuperado el 14 de Junio del 2006, en <http://bionomie.mikrobiologie.uni-halle.de/Fertige%20Publikationen/Review2kv98.pdf>

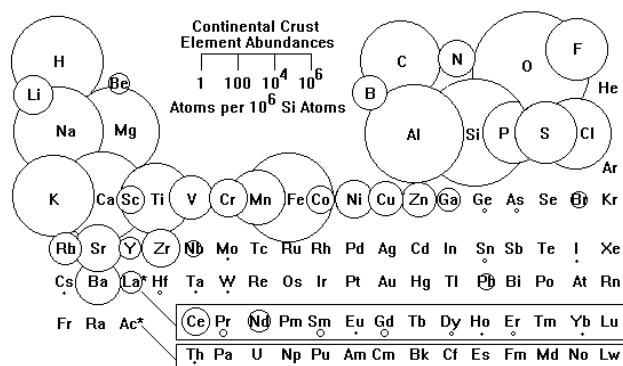
organismos. Segundo, la solubilidad de un ion metálico determina su disponibilidad biológica. Algunos cationes divalentes y todos los cationes trivalentes y tetravalentes son insolubles en valores cercanos al pH neutro, por lo tanto no son disponibles biológicamente”<sup>9</sup>.

No obstante, cationes como el V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, W son componentes importantes de sistemas biológicos, estos son requeridos a bajas concentraciones para el crecimiento y funciones metabólicas; estas funciones involucran la formación de “grupos prostéticos en diversas proteínas y determinan la conformación del sitio activo de las enzimas, sirven como cofactores en algunas reacciones enzimáticas y pueden servir como centros redox en reacciones celulares”<sup>10</sup>

## 1.2. EL PLOMO.

El plomo es un metal pesado, gris y blando, se encuentra en forma natural en la corteza terrestre de un modo relativamente abundante en comparación a otros metales pesados (Figura 1). El plomo es un metal pesado con un peso atómico de 207,2 g/mol, tiene estados de oxidación +2 y +4, y una densidad de 11,35 g/cm<sup>3</sup>.

Figura 1. Distribución de los elementos en la corteza continental



Fuente: <http://www.uwgb.edu/dutchs/PLANETS/Geochem.htm>

<sup>9</sup> Ibid., p. 22

<sup>10</sup> Mills, A. Metal requirements and tolerance. En: Hurst, C et. Al. Manual of Environmental Microbiology. American Society of Microbiology. United States. 2002. Cap 41.



Este mineral fue uno de los primeros metales extraídos por el hombre, a partir de la *galena* (PbS), de la *cerusita* (PbCO<sub>3</sub>) y la *anglesita* (PbSO<sub>4</sub>). “Hasta 1.881, España era el primer productor mundial de plomo gracias a los ricos yacimientos de galena de Jaén, Almería y Murcia. En la actualidad, además de España, los principales productores de plomo son Australia, los Estados Unidos, Canadá, México, Perú, Serbia (parte de la confederación de Serbia y Montenegro), y Rusia”<sup>11</sup>.

Hoy en día, “la mitad de la producción mundial de plomo es destinada a la fabricación de baterías. En algunos casos se usa como aditivo para gasolina y como pigmento para tintas y pinturas”<sup>12</sup>; sin embargo en los últimos tiempos se está reemplazado este por su carácter contaminante. En otros productos como tuberías, tipos de imprenta y cables recubiertos este elemento se ha sustituido por otros materiales de mejores cualidades. “No obstante aun se utiliza abundantemente en revestimientos y en enseres contra las radiaciones, para soldadura (aleado con Sn), en la insonorización de edificios, en la fabricación de perdigones (aleado con As)”<sup>13</sup>, etc. “Sus compuestos también tienen múltiples aplicaciones en la industria del vidrio como aditivo y colorante, en electrónica para la fabricación de tubos de televisión, en tintes, barnices, pinturas anticorrosivas (minio), como estabilizantes en la industria de los plásticos, en la elaboración de algunos insecticidas”<sup>14</sup>, etc.

### 1.2.1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL PLOMO

Este elemento no posee ninguna importancia biológica, debido a su baja solubilidad, pero cuando se encuentra en exceso en el ambiente puede llegar a ser muy tóxico para los organismos. La exposición puede llevarse a través del aire, del suelo, de alimentos y aguas contaminadas con este metal. La exposición del hombre al plomo puede afectar varios sistemas, entre los cuales se encuentran el nervioso, el hematopoyético, urinario,

---

<sup>11</sup> **Cano, J.** Elementos químicos. Educa Madrid. Recuperado el 18 de Septiembre del 2006, en <http://herramientas.educa.madrid.org/tabla/>

<sup>12</sup> Ibid., p 24

<sup>13</sup> Ibid., p 24

<sup>14</sup> Ibid., p 24

gastrointestinal, renal, reproductivo y el endocrino. En células animales, el plomo se une a grupos sulfhidrilos e interfiere con múltiples enzimas celulares. También se une a las membranas mitocondriales, interfiriendo con la síntesis proteica y la síntesis de ácidos nucleicos<sup>15</sup>.

Figura 2. Fuentes comunes de exposición del hombre al plomo.



Fuente [http://www.montevideo.gub.uy/ambiente/documentos/infoamb2\\_04.pdf](http://www.montevideo.gub.uy/ambiente/documentos/infoamb2_04.pdf)

“En bacterias gram negativas los cationes de metales pesados como el plomo se pueden unir al glutatión para formar complejos de bisglutatiónato, estos complejos tienden a reaccionar con oxígeno molecular para formar bisglutatión oxidado (GS-SG), el catión metálico y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)”<sup>16</sup>. “Luego el bisglutatión oxidado tiene que ser reducido de nuevo en una reacción dependiente de NADPH y los cationes metálicos vuelven a unir otras dos moléculas de glutatión, los metales pesados causan un importante estrés oxidativo”<sup>17</sup>.

### 1.3. TRANSFORMACIONES MICROBIANAS DE LOS METALES.

Debido a que la mayoría de los cationes metálicos son insolubles a pH neutro, las transformaciones microbianas de estos cationes juegan un papel importante en la

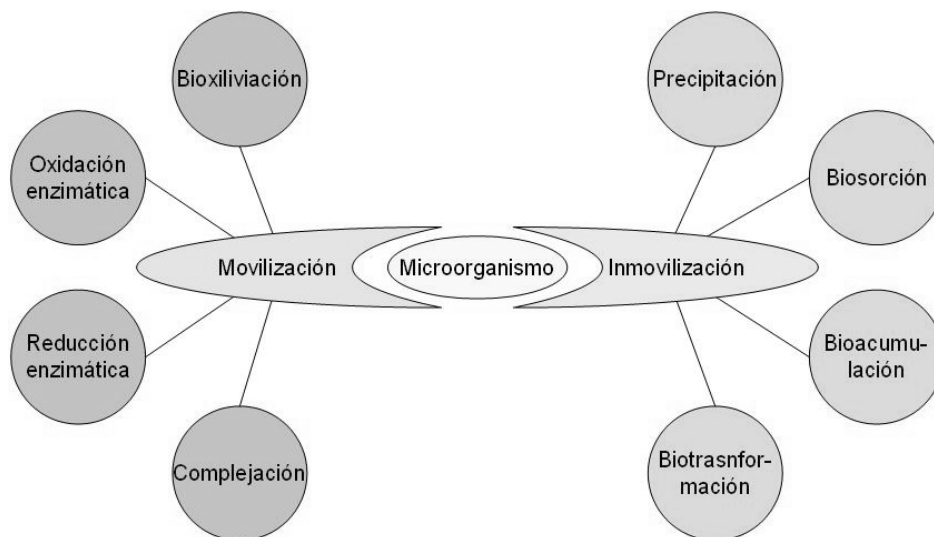
<sup>15</sup> **Lenntech**. Tabla periódica. Recuperado el 14 de Junio del 2006 en <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-periodica/Pb.htm>

<sup>16</sup> **Kachur, V., Koch, J. & Biaglow J. E.** Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. Free Radical Research. 1998. 28 : 259-269

<sup>17</sup> **Nies, D.** Op. cit., 22

solubilidad, movilidad y biodisponibilidad de estos elementos. La figura 3 resume los principales mecanismos involucrados en la movilización e inmovilización de los metales.

Figura 3. Mecanismos de movilización e inmovilización de los metales por microorganismos.



Fuente: Autor

### 1.3.1. MECANISMOS DE MOVILIZACIÓN.

La movilización de un metal es el paso de un estado insoluble a un estado soluble, la disolución de los metales pesados y radionucleotidos es debido a las reacciones de oxido – reducción y a la producción de metabolitos ácidos orgánicos o minerales. Entre los procesos involucrados con la movilización de metales encontramos la biolixiviación, oxidación enzimática, reducción enzimática y la complejación.

#### 1.3.1.1. Biolixiviación.

“Mediante la biolixiviación se da la conversión de metales insolubles (sulfuros de metal como: CuS, NiS y ZnS) a una forma soluble (usualmente sulfatos del metal como: CuSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub> y ZnSO<sub>4</sub> respectivamente), los cuales pueden ser extraídos en fase acuosa”<sup>18</sup>.

<sup>18</sup> Rawlings, D. Heavy metal mining using microbes. Annual Review of Microbiology. 2002. 56 : 65-91

### **1.3.1.2. Oxidación Enzimática.**

“Los compuestos inorgánicos que pueden existir en más de un estado de oxidación y en donde el mayor estado de oxidación es menos soluble, la oxidación enzimática puede ser un mecanismo útil para la remoción de estas especies inorgánicas”<sup>19</sup>.

### **1.3.1.3. Reducción Enzimática.**

“Para el caso de compuestos inorgánicos que pueden hallarse en más de un estado de oxidación y donde el estado reducido es menos soluble, la reducción enzimática puede ser un mecanismo útil para la remoción de las especies”<sup>20</sup>.

### **1.3.1.4. Complejación.**

“Los agentes complejantes pueden ser útiles en la movilización de compuestos inorgánicos tóxicos. Los agentes complejantes microbianos pueden ser ácidos orgánicos de bajo peso molecular, ligandos de alto peso molecular, sideroforos y compuestos de unión a metales tóxicos. Los compuestos de bajo peso molecular como varios ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácidos tricarbóxicos) tienen una habilidad para la complejación de los metales”<sup>21</sup>.

## **1.3.2. MECANISMOS DE INMOVILIZACIÓN**

La inmovilización de un metal es el paso de un estado soluble a uno insoluble. Este cambio puede ser logrado por medio de diferentes procesos como: “la biosorción, la bioacumulación, la precipitación y la biotransformación; en general los microorganismos logran inmovilizar el metal cuando lo unen a sus componentes estructurales. Este

---

<sup>19</sup> **Lajos, G.** The key processes in the removal of toxic metals and radionuclides from environment. Central European journal occupational and environmental medicine. 2001. Vol. 7. Nos 3-4. : 178-185

<sup>20</sup> Ibid., p. 27

<sup>21</sup> Ibid., p. 27

mecanismo ha recibido una considerable atención por su potencial en los tratamientos de biorremediación de metales pesados”<sup>22</sup>.

### **1.3.2.1. Precipitación**

Este mecanismo involucra aquellas reacciones que llevan a la formación de un depósito insoluble del metal. “Los microorganismos son capaces de precipitar ciertos metales como carbonatos, fosfatos e hidróxidos”<sup>23</sup>. “Un ejemplo de esto es la degradación de órgano fosfatos a orto fosfatos, permitiendo la precipitación del metal a través de la formación de metal fosfatos, especialmente en valores de pH superiores a 7”<sup>24</sup>..

“La localización de estos precipitados pueden presentarse en la membrana celular, en el espacio periplasmático, en la pared celular, en el citoplasma, extracelularmente por liberación de ciertas sustancias, en materiales asociados a la célula como polisacáridos, mucílago, cápsula, etc”<sup>25</sup>.

### **1.3.2.2. Biosorción**

“La biosorción de metales tóxicos esta basado en procesos no enzimáticos, donde se da la unión de metales pesados de forma casi inmediata a sitios electronegativos (carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo de ciertos polisacáridos y proteínas. Figura 4) expuestos en la membrana celular, pared celular y espacio periplasmático”<sup>26</sup>.

---

<sup>22</sup> Ibid., p. 27

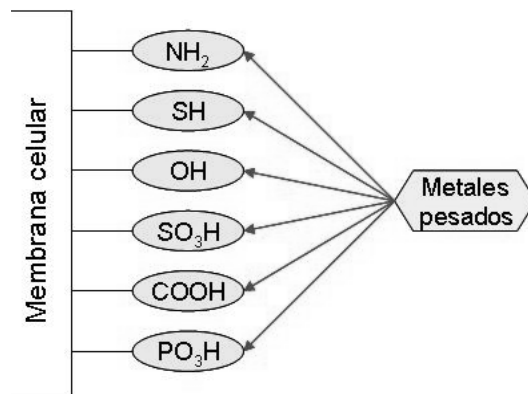
<sup>23</sup> **Vullo, D.** Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. QuímicaViva. 2003. Vol. 2. No 3, Recuperado el 14 de Junio del 2006, en <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>

<sup>24</sup> **Lajos, G.** Op. cit., p. 27

<sup>25</sup> **Cañizares, R.** Op. cit., p. 22

<sup>26</sup> **Vullo, D.** Op. cit., p. 28

Figura 4. Sitios electronegativos a los cuales puede unirse los metales en el proceso de biosorción.



Fuente: Lajos, G. 2001.

“Las paredes celulares bacterianas son un eficiente biosorbente, ya que es capaz de unir grupos cargados. Las paredes celulares de bacterias gram positivas unen grandes cantidades de metales tóxicos en comparación de las paredes celulares de bacterias gram negativas”<sup>27</sup>.

### 1.3.2.3. Bioacumulación

Debido a que los cationes divalentes de metales pesados son estructuralmente similares a algunos cationes esenciales y a que su radio iónico difiere en solo 14% de estos, los sistemas de toma de iones de metales pesados tendrían que unir estos iones estrechamente si se quiere diferenciar entre una pareja de iones estructuralmente similares. Sin embargo, esta unión conllevaría a costos en cuanto a energía y tiempo, por lo tanto la mayoría de las células resuelven este problema usando dos sistemas de toma de iones metálicos: uno es rápido, inespecífico y constitutivamente expresado (transportadores de fósforo y azufre que permiten la entrada continua de los metales sin regulación alguna), Estos mecanismos rápidos son usualmente direccionados por un gradiente quimiosmótico a través de la membrana citoplasmática de la bacteria. El segundo mecanismo de toma de iones tiene una alta especificidad por el sustrato, es lento y usualmente utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía, algunas veces acoplado a gradientes quimiosmóticos y solo producidos cuando la célula lo necesita o bajo alguna situación metabólica específica que lo induzca<sup>28</sup>.

<sup>27</sup> Lajos, G. Op. cit., p. 27

<sup>28</sup> Nies D., & Silver, S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. Journal Industrial Microbiology. 1995. 14 : 186-199

Sin embargo, ciertas bacterias pueden acumular algunos iones metálicos hasta cierta concentración sin perder su viabilidad, para esto “la acumulación se da en compartimentos especializados similares a vacuolas, donde la concentración del metal permanece por debajo de los niveles tóxicos; cuando los niveles del metal se acercan a los niveles letales se activan ciertos sistemas especializados como complejos enzimáticos que transforman la especie metálica tóxica en una menos tóxica [(biotransformación)], o sistemas de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos que enlazan los metales [(complejación)], llamadas metalotioneínas”<sup>29</sup>.

#### 1.3.2.4. Biotransformación

“Las transformaciones de los metales pueden ser divididas en dos grandes categorías, conversiones redox de formas inorgánicas y conversiones de formas inorgánicas a formas orgánicas y viceversa (típicamente la metilación y la demetilación). La Tabla 1 lista los metales y sus posibles transformaciones mediadas por bacterias”<sup>30</sup>.

Tabla 1. Principales transformaciones microbianas de metales pesados.

Transformación	Metales
Reducción	As (V), Fe (III), Hg(I), Hg(II), Mn (IV), Se (IV), Te (IV)
Oxidación	As (III), Fe (0), Fe (II), Mn (II), Sb (III)
Metilación	As (II), Cd (II), Hg (II), Pb (II), Sn (IV), Te (IV)
Demetilación	RHg(II)

Fuente: Summers, 1978.

Estas transformaciones están mediadas por enzimas y “pueden dar como resultado compuestos poco solubles o compuestos volátiles. Algunas de estas biotransformaciones son de carácter beneficioso para la célula como la reducción de cromo hexavalente a cromo trivalente, ya que el Cr (III) es 100 veces menos tóxico que el Cr (VI). Sin embargo no

<sup>29</sup> **Suares, P., & Reyes, R.** La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia par el ambiente. *Interciencia*. 2002. 27 : 160-164.

<sup>30</sup> **Summers, A.** Microbial transformations of metals. *Annual Review Microbiology*. 1978. 32 : 637 -672

todas las biotransformaciones microbianas son benéficas, como en el caso de la reducción del arsenato a arsenito, ya que éste último es más tóxico y más soluble”<sup>31</sup>

#### **1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA MICROBIANA A METALES PESADOS**

Hay tres posibles mecanismos de resistencia a metales pesados. “Primero, la acumulación del ion respectivo mediado por sistemas de eflujo [(sistema de bombeo activo de iones metálicos desde la célula)]. Segundo, los cationes afines a los grupos sulfhidrilo, pueden ser segregados por medio de compuestos ricos en moléculas con grupos thiol. Tercero, algunos iones metálicos pueden ser reducidos a un estado de oxidación menos tóxico. Finalmente, para muchos metales, la resistencia y la homeostasis envuelven la combinación de dos o tres procesos antes mencionados”<sup>32</sup>.

##### **1.4.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA MICROBIANA A PLOMO**

Se han propuesto diferentes mecanismos de resistencia a plomo en bacterias, la mayoría de estos actúan de forma inespecífica a excepción del mecanismo que involucra las bomba de eflujo específica para este metal. “El primer mecanismo reportado es la metilación, donde se observó la formación de plomo tetrametilado por microorganismos aislados de sedimentos, teniendo como sustrato nitrato de plomo inorgánico o acetato de plomo trimetilado; los microorganismos aislados y relacionados con este proceso fueron especies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Aeromonas*”<sup>33</sup>. El segundo mecanismo es la complejación, donde “cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* utilizan el citrato como agente quelante en operaciones de descontaminación, formando complejos móviles citrato-metal altamente recalcitrantes”<sup>34</sup>. El tercero es la biosorción de iones metálicos de plomo, por los sitios electronegativos de ciertos polisacáridos y

---

<sup>31</sup> Spain, A. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. Reviews Undergraduate Research. 2003. 2: 1-6.

<sup>32</sup> Nies, D. Op. cit., 22

<sup>33</sup> Summers, A. Op. cit., 30

<sup>34</sup> Lloyd, J. & Lovley, D. Microbial detoxification of metals and radionuclides. Current Opinion in Biotechnology. 2001. 12: 248-253



proteínas expuestas en la membrana celular y pared celular de *Pseudomonas aeruginosa* PU21<sup>35</sup>. Y el cuarto mecanismo es la “acumulación mediada por bombas de eflujo y la precipitación de plomo como fosfato de plomo en la cepa *Ralstonia* sp. CH34<sup>36</sup>”.

#### **1.4.1.1. Sistemas de dos componentes.**

“Los sistemas de dos componentes son mecanismos de resistencia, inducidos bajo la presencia de una concentración específica de un ión metálico. La información genética para estos sistemas generalmente reside en plásmidos, ocasionalmente en transposones, y en rara vez en el cromosoma<sup>37</sup>. En la mayoría de los casos los determinantes genéticos de resistencia codifican para un sistema de dos componentes, donde hay una proteína sensora capaz de sensar la concentración de iones metálicos en el medio y una proteína reguladora que activa la expresión de un operón; estos operones pueden codificar para diferentes tipos de proteínas, generalmente codifican para bombas de eflujo (ATPasa tipo-P), cuya función es sacar los iones metálicos de vuelta al ambiente<sup>38</sup>”.

#### **1.4.1.2. Determinante de resistencia a plomo *pbr*.**

“*R. metallidurans* CH 34 fue aislada a fines de los años 70’s en los sedimentos de un tanque de decantación de una fabrica de zinc en Bélgica. Se encontró a esta cepa altamente resistente a Zn(II), Cd (II), Co (II), Ni (II), Cu (II), Cr(VI), Hg (II) y Pb (II). Contiene al menos siete determinantes que codifican para la resistencia a metales pesados tóxicos, localizados en alguno de los dos megaplasmidos endogenos, pMOL 28 (~180 Kb) y pMOL30 (~250 Kb)<sup>39</sup>”.

---

<sup>35</sup> **Chang, J., Law, R. & Chang, CH.** Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Science @ Direct*. 1997. No 31: 7 : 1651-1658

<sup>36</sup> **Nies, D.** Op. cit., 22

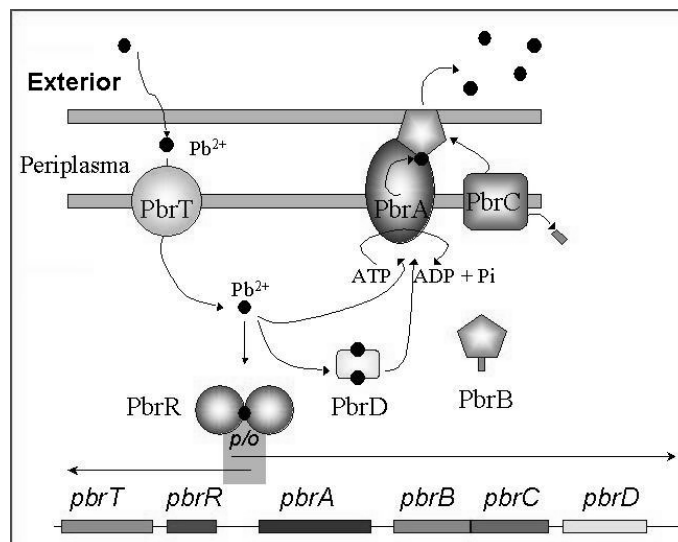
<sup>37</sup> **Cervantes, C., & Silver, S** Op. cit.,18

<sup>38</sup> **Nies, D., & Brown.** Op. cit., 21

<sup>39</sup> **Taghavi, S. et. al.** *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment. *Research in Microbiology*. 1997. No 6. 148 : 459-556.

Un ejemplo de esto es el determinante *pbr* de *R. metallidurans* CH34, codificado en el megaplasmido pMOL30, que confiere la resistencia a plomo. Este determinante contiene los siguientes genes estructurales de resistencia: (i) *pbrT*, que codifica para una proteína que capta Pb (II) [de 69 KDa]; (ii) *pbrA*, que codifica para una ATPasa de eflujo de tipo-P [de 84 KDa]; (iii) *pbrB*, que codifica para una proteína integral de membrana de función desconocida [de 12 KDa]; y (iv) *pbrC*, que codifica para una poliproteína peptidasa señal [de 19 KDa]. Corriente debajo de los genes *pbrC*, el gen *pbrD* gene, codifica para una proteína que une Pb (II) [de 26 KDa], esta fue encontrada en el citoplasma y es esencial para el secuestro eficaz del plomo. La transcripción de *pbrABCD* es inducible y dependiente de Pb (II) desde el promotor *PpbrA*; este promotor es regulado por la proteína PbrR [de 16 KDa], la cual pertenece a la familia de las proteínas sensoras de iones metálicos de MerR<sup>40</sup>.

Figura 5. Diagrama del determinante de resistencia al plomo (genes y proteínas) en *R. metallidurans* CH34.



Fuente: (Borremans, et al. 2001).

## 1.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA

“El poder de magnificación de un microscopio óptico está limitado por la longitud de onda de la luz visible, en cambio el microscopio electrónico utiliza electrones para iluminar un

<sup>40</sup> Borremans, B. et. al. Cloning and Functional Analysis of the *pbr* Lead Resistance Determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. Journal of Bacteriology. 2001.183: p. 5651–5658.

objeto y debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas<sup>41</sup>.

Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón de electrones que emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características. Por último, todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema que registra o muestra la imagen que producen los electrones<sup>42</sup>.

Hay dos tipos básicos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión (Transmisión Electron Microscope, TEM) y el microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope, SEM).

### **1.5.1. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM).**

Esta microscopia crea imágenes tridimensionales realistas de la superficie de un objeto y con una magnificación de 200.000 veces o más. No es necesario cortar el objeto en capas para observarlo con un SEM, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos. El SEM explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario que el TEM, que examina una gran parte de la muestra cada vez. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios; estos electrones son recogidos y contados por un dispositivo.<sup>43</sup>

---

<sup>41</sup> **Raisman, A. y Gonzales, A.** Hipertextos del área de la biología. Universidad nacional del nordeste .Recuperado el 2 de agosto del 2006, en <http://www.biologia.edu.ar/microscopia/meb.htm>

<sup>42</sup> Ibid., p. 34

<sup>43</sup> Ibid., p. 34

### 1.5.2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (TEM).

Esta microscopia permite la observación de muestra en cortes ultrafinos y con una magnificación de hasta un millón de veces. Un TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Para utilizar un TEM debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada.<sup>44</sup>

### 1.5.3. COLORACION NEGATIVA

Esta técnica fue descubierta por Brenner y Horne en 1959. El procedimiento consiste en rodear las partículas con material electroopaco y el espécimen permanece transparente debido a que el colorante no reacciona con macromoléculas; además permite establecer las formas a nivel molecular, preserva la estructura molecular y minimiza el daño del espécimen por irradiación. La introducción y estandarización de este método, se conoce como microscopia electrónica directa (DEM), evitando la realización de cortes ultrafinos.<sup>45</sup>

Esta técnica es útil en la investigación de la estructura y función de virus, bacterias y sus componentes, de mitocondrias, de membranas biológicas y artificiales, de cilios y flagelos, de anticuerpos, de microtubulos, complejos de enzimas, entre otros.<sup>46</sup>

---

<sup>44</sup> Ibid., p. 34

<sup>45</sup> **Romero, G.** Microscopia electrónica de transmisión (MET) área biomédica: teoría y practica. Bogotá. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales colección Julio Carrizosa Valenzuela. 2003. p. 179 – 183.

<sup>46</sup> Ibid., p. 35

#### 1.5.4. ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDX)

Los microscopios electrónicos de transmisión cuentan con un analizador de espectro de rayos X, puede analizar los rayos X de alta energía que produce el objeto al ser bombardeado con electrones. Dado que la identidad de los diferentes átomos y moléculas de un material se puede conocer utilizando sus emisiones de rayos X, los analizadores de sonda de electrones no sólo proporcionan una imagen ampliada de la muestra, como hace un microscopio electrónico, sino que suministra también información sobre la composición química del material<sup>47</sup>.

La microscopia electrónica de transmisión tiene sus límites de detección para analizar elementos del sodio al uranio de una región del diámetro de 100-200 nm, varia entre  $10^{-14}$  y  $10^{-19}$  g. La producción baja de rayos X hace difícil su detección y de cuantificación. Debido principalmente a la propagación lateral de la prueba de electrones como pasa a través del espécimen.<sup>48</sup>

---

<sup>47</sup> Raisman, A. y Gonzales, A. Op. cit., p. 34

<sup>48</sup> Raisman, A. y Gonzales, A. Op. cit., p. 34

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. LOCALIZACION DEL TRABAJO**

El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio del Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC) del departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

### **2.2. CEPAS BACTERIANAS**

Los microorganismos que fueron objeto de estudio se escogieron en base a los resultados reportados por Alejandro Caro en el 2004, donde los morfotipos GN04 (aislado de lodos aceitosos, Casanare), T07 (aislado de lodos aceitosos, Casanare), CG11 (aislado de lodos aceitosos, Casanare), y PB56 (aislado de suelo en proceso de biorremediación por landfarming, Cundinamarca) presentan la mayor eficiencia de remoción de plomo en lecho empacado alimentado.

### **2.3. CEPAS DE REFERENCIA**

Como control positivo y negativo para los ensayos de mínima concentración inhibitoria (MIC), perfiles proteicos por fracciones celulares y para la amplificación de los genes *pbrA* y *pbrB* se utilizaron las cepas bacterianas *Ralstonia metallidurans* CH34 (control positivo) y *R. metallidurans* AE104 (control negativo)

#### **2.3.1. *R. metallidurans* CH 34**

Donada por el Dr. Max Mergeray. Vlaamse Instelling loor Technologisch Onderzoek (VITO), Environmental Technology, Boeretang 200, B2400 Mol, Bélgica.

*R. metallidurans* CH34 contiene los megaplasmidos pMOL28 y pMOL30 que confieren resistencia a Zn, Cd, Co, Pb, Cu, Hg, Ni y Cr.

### **2.3.2. *R. metallidurans* AE 104**

Donada por el Dr. Max Mergeray. Vlaamse Instelling loor Technologisch Onderzoek (VITO), Environmental Technology, Boeretang 200, B2400 Mol, Bélgica. *R. metallidurans* CH34 no contiene los megaplasmidos pMOL28 y pMOL30 que confieren resistencia la resistencia a metales pesados.

## **2.4. MEDIOS DE CULTIVO**

Para el aislamiento, identificación y recuento de las cepas bacterianas se utilizo el medio Standard Plate Count (SPC). El mantenimiento de las cepas se hizo en el medio Luria – Bertani agar (LB) (Anexo 1) mas acetato de plomo (concentración final 1mM de Pb (II)). Para los ensayos de la mínima concentración inhibitoria se empleo un Medio Mínimo de Sales (Anexo 2) mas acetato de plomo (concentración final 15mM de Pb (II)). Para la identificación las bacterias fueron cultivadas en LB agar. Los cultivos para la extracción de proteínas se realizaron en MMS más un suplemento de 2 g/litro de Bacto – Triptona y 1 g/litro de Extracto de Levadura, junto con la adición de acetato de plomo (concentración final 1 mM de Pb (II)). Los extractos crudos para la amplificación de los genes pbrA y pbrB se realizaron a partir cultivos over night (ON) de LB agar mas acetato de plomo (concentración final 1 mM de Pb (II)).

## **2.5. CARACTERIZACION BACTERIANA**

La caracterización de los morfotipos de trabajo se llevo a cabo por técnicas clásicas de descripción de morfología macroscópica y microscópica. Adicionalmente los aislamientos se caracterizaron según la mínima concentración inhibitoria de plomo (II).

### **2.5.1. CARACTERIZACION MACRO Y MICROSCOPICA**

A partir de cultivos puros en agar nutritivo se examinaron los siguientes parámetros: color, forma, tamaño, textura y pigmentos difusibles de las colonias aisladas, y características microscópicas con respecto al patrón de coloración de Gram y la forma de las células.

### **2.5.2. DETERMINACION DE LA MINIMA CONCENTRACION INHIBITORIA**

Para la determinación de la mínima concentración inhibitoria, los ensayos se repitieron cinco veces como eventos separados. Para esto, a cada uno de los tubos de ensayo con medio mínimo de sales mas acetato de plomo se les retiró 0.05 mL del medio y se adicionó este mismo volumen de la suspensión preparada ( $\approx 1 \times 10^6$  células/mL); dejando así inoculado cada uno de los tubos con  $\approx 1 \times 10^4$  células/mL; los tubos se incubaron a 30°C por 48 horas.

Al termino de este tiempo se sembró en placa 0.1 mL del medio en SPC, se incubó a 30°C por 24 horas, y se determinó la mínima concentración inhibitoria como la concentración de plomo (II) en la cual no hubo crecimiento microbiano.

#### **2.5.2.1. Preparación del inculo.**

Todas las bacterias fueron cultivadas en LB agar e incubado a 30°C por 16 horas. Luego, para cada una de las cepas se realizó una suspensión de  $\approx 1 \times 10^6$  células/mL.

#### **2.5.2.2. Preparación del medio mínimo de sales.**

Para cada cepa se preparó un juego de 15 tubos con 5mL medio mínimo de sales, a los cuales se les retiró el medio correspondiente al volumen de la solución de acetato de plomo



que se colocaría para dar origen a las diferentes concentraciones del ensayo (0, 0.4, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 mM de Pb (II)).

## **2.6. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

Los morfotipos GN04, T07 CG11, y PB56 se identificaron a nivel de género y en algunos casos hasta especie mediante el análisis de la secuencia del gen codificante para la subunidad 16S del RNA ribosomal (16S rRNA). Para lo anterior, este gen se amplificó por PCR, primero con los primers externos GM3F (5'agagttgatcmtggc3') y GM4R (5'aagtcgtaacaaggta3') y luego con los primers internos 357F (5`actcctacgggagggcagca3`) y 1087R (5`gggttaagtcccgaacgag 3`). Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el algoritmo BLAST (Basic Alignment Search Tool) para determinar la identidad de las cepas.

## **2.7. ANALISIS DEL EFECTO DEL PLOMO EN LA EXPRESION DE PROTEINAS**

Se realizo el cultivo de las cepas en MMS suplementado para tener un buen crecimiento celular y bajo la presencia de plomo para ver el efecto en la expresión proteica. Se tuvieron cultivos de 12 y 24 horas para ver los cambios en la expresión de proteínas en el tiempo bajo la presencia del metal

Se hizo la extracción de proteínas para las fracciones celulares de membrana, citoplasma y periplasma. Las muestras resultantes de la extracción se corrieron en geles de poliacrilamida y se tiñeron con Azul de Coomasie. El análisis de los perfiles proteicos se realizo teniendo en cuenta la presencia y ausencia de las bandas en las diferentes fracciones celulares y en los diferentes tiempos de cultivo con respecto al control.

### **2.7.1. CONDICIONES DE CULTIVO.**

Las cepas se cultivaron en 100mL de MMS (suplementado triptona y extracto de levadura), y acetato de plomo (concentración final 1mM de Pb (II)) en fiolas de 250 mL, a 30°C por 12 y 24 horas. El control negativo se realizo en el mismo medio suplementado pero sin la adición de acetato de plomo, a 30°C por 24 horas.

### **2.7.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.**

Los cultivos fueron centrifugados a 8.490 r.p.m. a 4°C por 10 minutos. Posterior a esto se siguió el protocolo para la extracción de proteínas de membrana, citoplasma y periplasma. (Anexo 3).

### **2.7.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS**

Los productos de las extracciones se corrieron por SDS- PAGE en geles de poliacrilamida (Gel de concentración (4 %) y Gel de separación (10 %) (Anexo 4)) a 90 voltios por 1 hora y 45 minutos. Los geles se tiñeron con Azul de Coomasie por 15 minutos en agitación y se decoloraron con acido acético al 10 % por 24 horas en agitación.

### **2.7.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.**

Para las muestras de la fracciones de citoplasma y periplasma se tomaron 15 uL y se mezclaron con 10 uL del buffer de de muestra (Anexo4), y para la fracción de membrana se tomaron 10 uL y se mezclaron con 15 uL del buffer de de muestra. Luego las muestras se llevan a hervir por 5 minutos antes de servir las en el gel.

### 2.7.5. ANÁLISIS DE LOS PERFILES PROTEICOS.

Para el análisis de los perfiles proteicos se hizo una plantilla a mano con una resolución de 1mm, luego se calcularon los pesos moleculares en KDa con respecto al marcador de peso modular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen), permitiendo sacar una matriz de presencia (1) o ausencia (0) de los patrones de bandeado para cada cepa y para cada fracción celular que fueron analizados con el programa Syntax 2000.

### 2.8. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *pbrA* Y *pbrB* ASOCIADOS A LA BOMBA DE EFLUJO DE PLOMO EN *R metallidurans* CH34.

Para la amplificación del gen *pbrA* en las cepas nativas, se usaron los primers pbrAiz (5'tcgagttcaatctggtgcag3') y pbrAde (5'ggcctttagatccagcca3'). Se uso una concentración de 0.2mM de dNTPs y 2U de Taq polimerasa como estándar. Se estandarizaron las condiciones de concentración de MgCl<sub>2</sub> entre 2, 2.5 y 3mM, y la temperatura de “annealing” entre 55.9°C y 57.2°C con la cepa de referencia *R metallidurans* CH34, esperando obtener un productos de amplificación de 937 pb.

El programa de amplificación para el gen *pbrA* fue el siguiente:

Denaturación inicial:	95° C por 5 minutos
30 ciclos de:	94° C por 1,5 minuto
	55.9°C a 57.2°C por 1,5 minuto
	72° C por 2 minutos
Extensión final:	72° C por 10 minutos

Para la amplificación del gen *pbrB* en las cepas nativas, se usaron los primers pbrBiz (5'attcgctgcagcttcttaa3') y pbrBde (5'aggctaacggtgcgatcc3'). Se uso una concentración de 0.2mM de dNTPs y 2U de Taq polimerasa como estándar. Se estandarizaron las condiciones de concentración de MgCl<sub>2</sub> entre 2, 2.5 y 3mM, y la temperatura de “annealing” entre 58.4°C y 60°C con la cepa de referencia *R metallidurans* CH34, esperando obtener un producto de amplificación de 330 pb.

El programa de amplificación fue el siguiente  
Denaturación inicial: 95° C por 5 minutos  
30 ciclos de: 94° C por 1,5 minuto  
55.9°C a 57.2°C por 1,5 minuto  
72° C por 2 minutos  
Extensión final: 72° C por 10 minutos

## **2.9. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X**

Para este ensayo se realizaron cultivos de los morfotipos de estudio, en BHI agar a 30°C por 3 días, bajo la presencia del metal (1mM de Pb (II)) y sin la presencia de este. De estos cultivos se tomo una colonia y se resuspendió en 200 uL de agua destilada estéril. Con una pipeta Pasteur se deposito una gota de la suspensión sobre la superficie de un papel parafilm. Se coloco cuidadosamente una rejilla de 400 mesh, de modo de que la cubierta de soporte (Formvar y carbón) quede en contacto con la suspensión. Después de 2 minutos se retira la rejilla y con papel filtro se quita el excedente de la suspensión por el borde de la rejilla y se lava con agua destilada.

Luego se coloco una gota de acetato de uranilo sobre la superficie de un papel parafilm. Se coloco la rejilla, de modo de que la cubierta de soporte quede en contacto con el colorante negativo. Después de 30 segundos se retira la rejilla y con papel filtro se quita el excedente del colorante y se deja secar por una hora en vacío.

Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico FEI, a 200 keV. Se tomaron imágenes a una magnificación de 13000X y se realizo para cada muestra su correspondiente espectroscopia de energía dispersiva de rayos X.

### 3. RESULTADOS

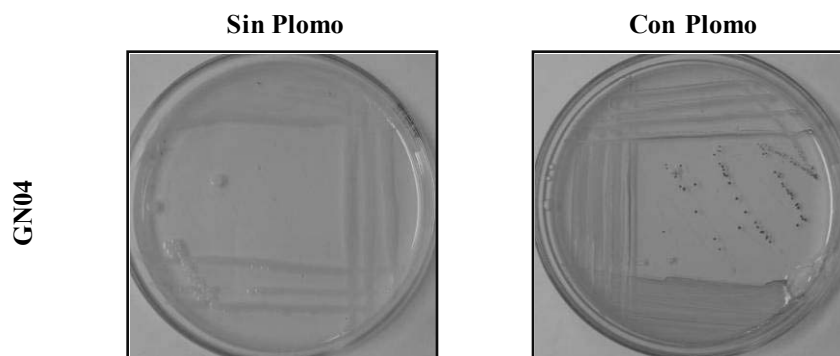
#### 3.1. CARACTERIZACION MICROBIANA

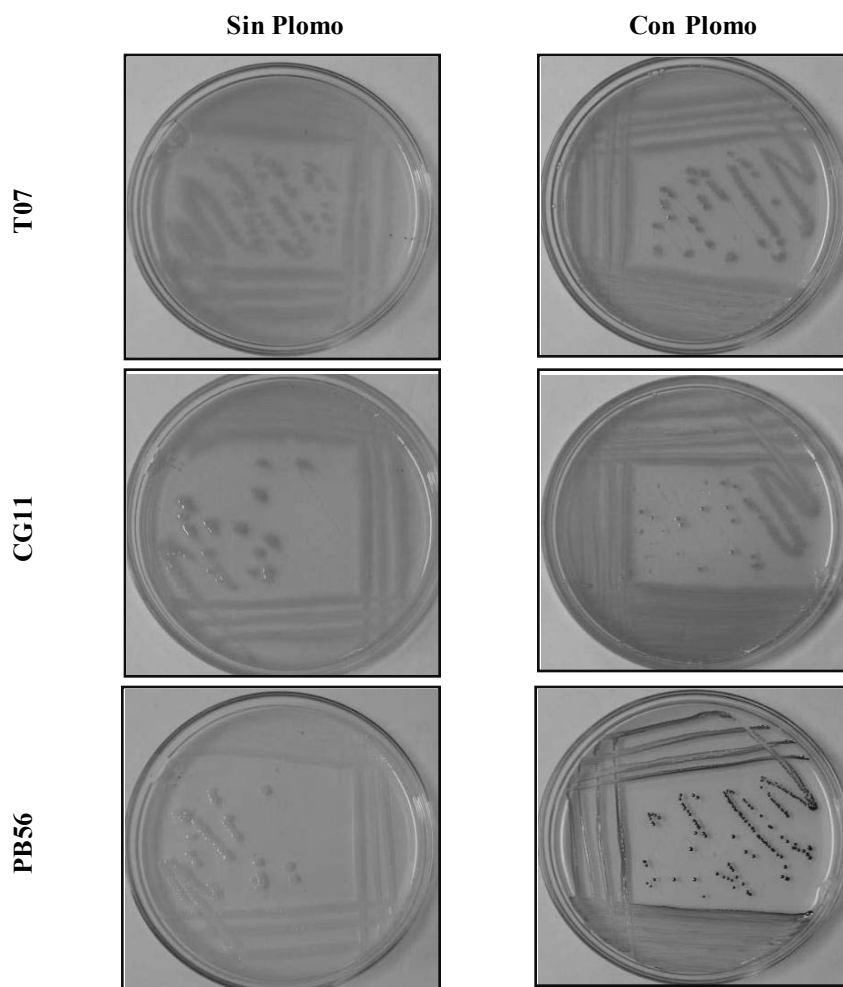
Las características morfológicas macroscópicas y microscópicas que presentan los morfotipos nativos se resumen en la tabla 2. Las características macroscópicas de las bacterias varían cuando son cultivadas bajo la presencia de plomo en cuanto tamaño y color de la colonia. El tamaño de la colonia se ve reducido para todos los morfotipos cuando crecen en presencia del metal, para los aislamientos GN04 y PB56 el color de la colonia se torna café, siendo este más oscuro en Pb56; para los morfotipos CG11 y T07 el color de la colonia se torna a un amarillo quemado. Figura 6.

Tabla 2. Características morfológicas de los morfotipos de trabajo.

Características		Cepas			
		GN04	CG11	T07	Pb56
Macroscópicas	Color	Blanca	Amarilla	Amarilla	Blanca
	Forma	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda
	Tamaño	Pequeña	Pequeña	Pequeña	Pequeña
Microscópicas	Forma	Bacilo corto	Bacilo corto	Bacilo corto	Bacilo corto
	Gram	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Figura 6. Morfología macroscópica con y sin la presencia de plomo.





### 3.2. DETERMINACION DE LA MINIMA CONCENTRACION INHIBITORIA

Las mínimas concentraciones inhibitorias para la cepa control *R. metallidurans* CH34 y los morfotipos de estudio se encuentran relacionadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Mínima concentración inhibitoria a Pb (II) presentada por los morfotipos de estudios y la cepa control.

Morfotipo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Desviación estándar
<i>R. metallidurans</i> CH 34	0.4mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4v	0
GN04	4mM	4 mM	5 mM	4 mM	4 mM	0.4
T07	4 mM	4 mM	4 mM	4 mM	4 mM	0
CG11	4 mM	4 mM	4 mM	5 mM	5 mM	0.49
PB56	4 mM	4 mM	4 mM	5 mM	5 mM	0.49

### 3.3. IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS

La identificación de los morfotipos GN04, T07, CG11 y Pb56 mediante la secuenciación del gen del 16S rRNA, se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Morfotipos identificados por la secuenciación del gen codificante para la subunidad 16S del RNA ribosomal (16S rRNA).

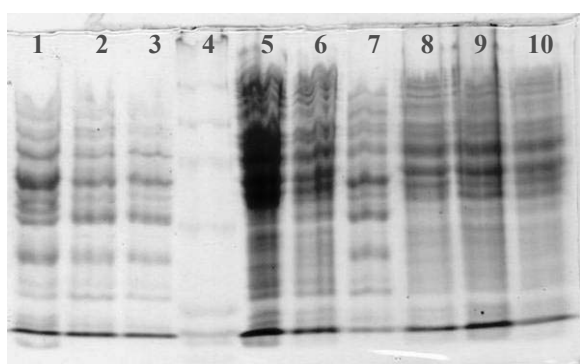
<b>Cepa</b>	<b>Homologo cercano</b>	<b>% Identidad</b>	<b>No de acceso</b>
<b>GN04</b>	<i>Pseudomonas sp.</i>	98.2	AJ002805
<b>T07</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.8	AF137358
<b>CG11</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97.9	AJ249451
<b>PB56</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	97.8	AJ251469

### 3.4. EFECTO DEL PLOMO EN LA EXPRESION DE PROTEINAS

Para todos las cepas bacterianas se observa distintos patrones de bandeo de proteínas en las diferentes fracciones celulares, estos patrones muestran el efecto del plomo sobre la expresión con respecto al control (sin plomo). Las proteínas expresadas bajo la presencia de plomo en etapas tempranas (12horas) o tardías (24 horas) se encuentran resaltadas en naranja. Las proteínas dejadas de expresar por la presencia de plomo se encuentran resaltadas en agua marina. (Ver tablas 5 a la 8).

Todas aquellas proteínas de los morfotipos de estudio que pueden tener alguna relación con las proteínas codificadas por el determinante *pbr* de *R. metallidurans* CH34, según su peso molecular y su ubicación celular se encuentran resaltadas en naranja con entramado blanco.

Figura 7. Electroforesis de proteínas, fracciones celulares: periplasma, citoplasma y membrana del morfotipo GN04



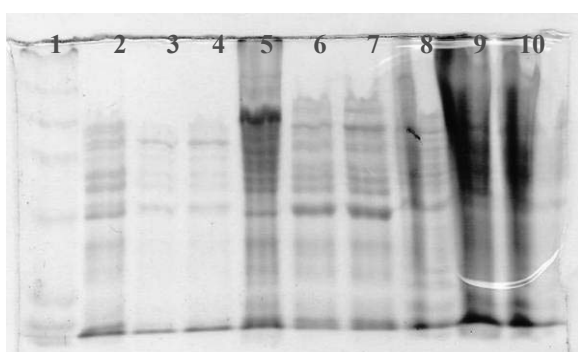
Carriles 1, 5 y 8 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo GN04 cultivado por 24 horas sin plomo. Carriles 2, 6 y 9 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo cultivado por 12 horas con plomo. Carriles 3, 7 y 10 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo cultivado por 24 horas con plomo. Carril 4, Marcador de peso molecular

Tabla 5. Análisis del patrón de bandeado según el peso molecular (KDa) para el morfotipo GN04, de las distintas fracciones celulares (periplasma, citoplasma y membrana), bajo las diferentes condiciones: sin plomo (control) y con plomo a las 12 y 14 horas.

GN04									
Periplasma			Citoplasma			Membrana			
Control	12h	24h	Control	12h	24h	Control	12h	24h	
17,42	17,42	17,42	17,42	17,42	17,42	17,42	17,42	17,42	
18,25			18,68	18,68		18,25	18,25	18,25	
20,98	20,98	20,98	20,98	20,98	20,98	21,98	21,98	21,98	
23,03	23,03	23,03	23,03	23,03	23,03		24,13	24,13	
26,49	26,49	26,49	26,49	26,49		26,49	26,49		
35,02	35,02	35,02		27,75	27,75		30,46	30,46	
38,44	38,44	38,44	33,43	33,43		33,43	33,43	33,43	
40,27	40,27	40,27	36,69	36,69	36,69		38,44	38,44	
46,31	46,31	46,31	38,44	38,44			40,27	40,27	
	50,83	50,83		40,27	40,27	42,19	42,19	42,19	
	54,5	54,5	42,19	42,19	42,19	46,31	46,31	46,31	
58,44	58,44	58,44	46,31	46,31	46,31	50,83	50,83	50,83	
	61,23	61,23	49,66	49,66	50,83	58,44	58,44	58,44	
64,15	64,15	64,15	55,79	55,79	54,5	65,66	64,15	64,15	
67,2	67,2	67,2	58,44	58,44	57,1	70,41	68,79	68,79	
73,76	73,76	73,76	64,15	64,15	64,15	77,28	77,28	77,28	
	84,82	84,82	67,2	67,2	67,2	80,96	80,96	80,96	
				73,76	73,76		84,82	84,82	
			77,28	77,28	77,28	88,86	90,96	90,96	
			84,82	84,82	84,82	93,1	95,29	95,29	
			88,86	88,86		97,53			
			93,1	93,1	93,1				
			97,53						
			Prot. Ex por Pb				Prot. relacionadas a la bomba de flujo		
			Prot. Ex por Pb				Prot. Dejadas de Ex por Pb		



Figura 8. Electroforesis de proteínas, fracciones celulares: periplasma, citoplasma y membrana del morfotipo T07



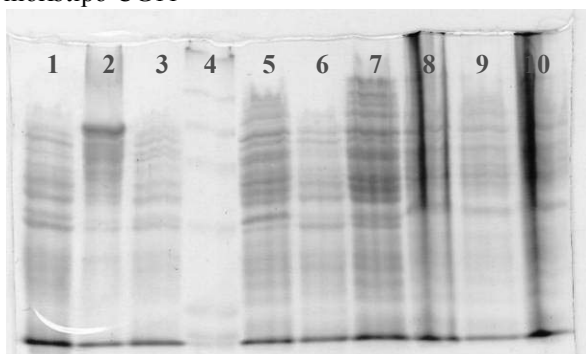
Carriles 2, 5 y 8 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo T07 cultivado por 24 horas sin plomo. Carriles 3, 6 y 9 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo cultivado por 12 horas con plomo. Carriles 4, 7 y 10 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo cultivado por 24 horas con plomo. Carril 1, Marcador de peso molecular

Tabla 6. Análisis del patrón de bandeo según el peso molecular (KDa) para el morfotipo T07, de las distintas fracciones celulares (periplasma, citoplasma y membrana), bajo las diferentes condiciones: sin plomo (control) y con plomo a las 12 y 14 horas.

\* Las proteínas de aproximadamente 96 KDa ubicadas en la membrana pueden corresponder al complejo formado por las proteínas PbrA y PbrB.

T07								
Periplasma			Citoplasma			Membrana		
Control	12h	24h	Control	12h	24h	Control	12h	24h
17,54	17,54	17,54	17,54	17,54	17,54	18,25	18,25	18,25
23,12			18,98	18,98	18,98	18,98	18,98	18,98
29,29			21,79			20,54	20,54	
35,68			24,05	23,58	23,58	21,36	21,36	21,36
37,11	37,11	37,11		27,07	27,07		23,12	23,12
41,77	41,77	41,77	29,29	29,29	29,29	24,05	24,05	
45,2	45,2	45,2	34,3	34,3	34,3	25,51	25,01	
50,88	50,88	50,88		35,68	35,68	28,16	28,16	28,16
52,93	52,93	52,93	38,6			30,47	30,47	30,47
55,06	55,06	55,06		40,16	40,16		31,69	32,33
59,57			41,77			34,3		
61,97				43,45	43,45		35,68	35,68
			45,2			37,11	37,11	37,11
			47,02	47,02	47,02		43,45	43,45
					48,91		45,2	45,2
			50,88			47,02		
				52,93	52,93		48,91	48,91
			55,06	55,06	55,06	50,88	50,88	50,88
				57,27	57,27	52,93		
			59,57	59,57	59,57	55,06	55,06	55,06
			64,46	64,46	64,46	59,57	60,76	59,57
				67,06	67,06	61,97		61,97
			75,48			67,06	67,06	67,06
			81,68				72,56	72,56
						75,48	75,48	75,48
						78,52	78,52	78,52
							81,68	81,68
						84,96	84,96	84,96
							88,38	88,38
							95,64*	95,64*
Prot. Ex por Pb			Prot. relacionadas a la bomba de flujo			Prot. Dejadas de Ex por Pb		
Prot. Ex por Pb			Prot. Ex por Pb			Prot. Dejadas de Ex por Pb		

Figura 9. Electroforesis de proteínas, fracciones celulares: periplasma, citoplasma y membrana del morfotipo CG11

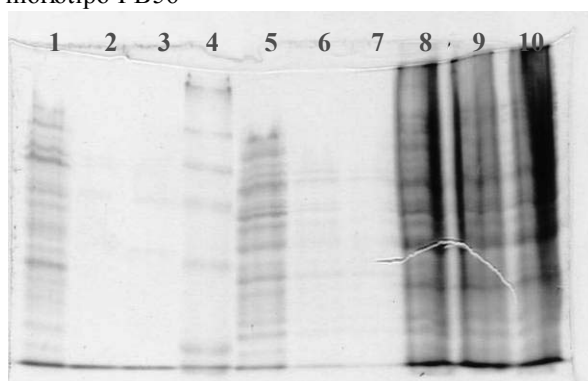


Carriles 1, 5 y 8 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo CG11 cultivado por 24 horas sin plomo. Carriles 2, 6 y 9 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo cultivado por 12 horas con plomo. Carriles 3, 7 y 10 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo cultivado por 24 horas con plomo. Carril 4, Marcador de peso molecular.

Tabla 7. Análisis del patrón de bandeo según el peso molecular (KDa) para el morfotipo CG11, de las distintas fracciones celulares (periplasma, citoplasma y membrana), bajo las diferentes condiciones: sin plomo (control) y con plomo a las 12 y 14 horas.

CG11								
Periplasma			Citoplasma			Membrana		
Control	12h	24h	Control	12h	24h	Control	12h	24h
37,55	36,66	37,55	16,65	16,65	16,65	17,46	17,46	17,46
40,35	39,39	39,39	17,46	17,46	17,46	20,65	20,65	20,65
45,47	44,4	45,47		19,22	19,22	23,84	23,84	23,84
	46,57		20,65	20,65	20,65			27,51
51,25	51,25	51,25	23,27	23,27	23,27			28,86
53,76	53,76	55,06	26,23	26,23	26,23	33,32	33,32	33,32
57,76			28,86	28,86	28,86	38,46	38,46	38,46
	60,59	60,59	36,66	36,66	36,66	40,35	40,35	40,35
63,56	62,06	63,56	38,46	38,46	38,46		46,57	46,57
69,95	71,64	69,95	44,4	44,4	44,4		48,86	48,86
75,15	76,97	76,97	50,04	50,04	48,86	51,25	51,25	51,25
			52,49	52,49	51,25	56,4	56,4	56,4
				55,06	55,06			
			63,56	62,06	62,06	68,29	68,29	68,29
			65,1	65,1	65,1	71,64	71,64	71,64
			68,29	68,29	68,29		76,97	76,97
			73,38	73,38	73,38	82,7	82,7	82,7
				75,15	75,15	86,75	86,75	
			78,84	78,84	78,84	91	91	91
			82,7	82,7	82,7	95,46		95,46
			91	91	91	105,1	105,1	105,1
			95,46	95,46	95,46			
					100,1			
					105,1			
					110,2			
					115,6			
Prot. Ex por Pb			Prot. relacionadas a la bomba de eflujo			Prot. Dejadas de Ex por Pb		
Prot. Ex por Pb			Prot. relacionadas a la bomba de eflujo			Prot. Dejadas de Ex por Pb		

Figura 10. Electroforesis de proteínas, fracciones celulares: periplasma, citoplasma y membrana del morfotipo PB56



Carriles 1, 5 y 8 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo PB56 cultivado por 24 horas sin plomo. Carriles 2, 6 y 9 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo cultivado por 12 horas con plomo. Carriles 3, 7 y 10 fracciones de periplasma, citoplasma y membrana respectivamente, del morfotipo cultivado por 24 horas con plomo. Carril 4, Marcador de peso molecular.

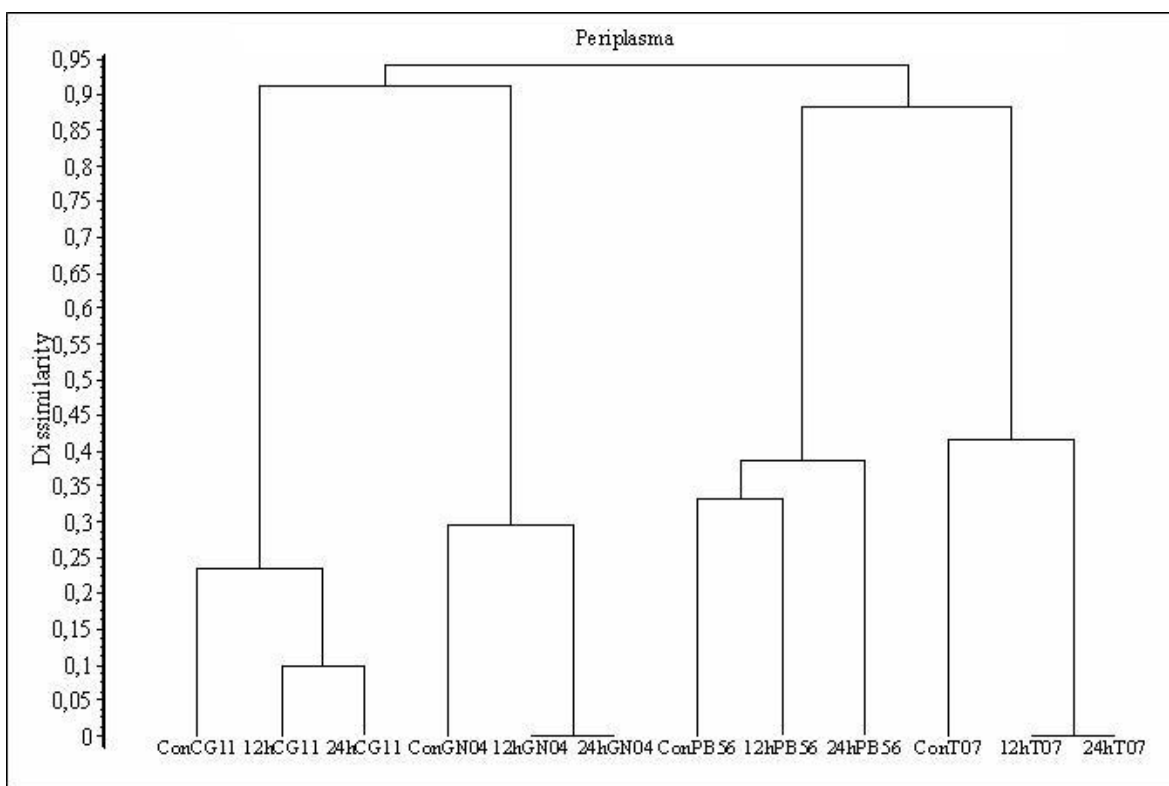
Tabla 8. Análisis del patrón de bandeado según el peso molecular (KDa) para el morfotipo PB56, de las distintas fracciones celulares (periplasma, citoplasma y membrana), bajo las diferentes condiciones: sin plomo (control) y con plomo a las 12 y 14 horas.

PB56								
Periplasma			Citoplasma			Membrana		
Control	12h	24h	Control	12h	24h	Control	12h	24h
19	19	19	18,2			19,83	19,83	19,83
20,25		20,25	19	19	19	21,59	21,59	21,59
24,02			20,69	20,25	20,25	23,52	23,52	23,52
29,11			22,53	22,53	22,53	29,11	29,11	29,74
30,38				24,54	24,54	31,04	31,71	31,71
31,71	31,71	31,04	26,17	25,61	25,61	33,09		
34,53	34,53	34,53		27,9	27,9			34,53
37,61	37,61		29,11	29,11	29,11	37,61	37,61	37,61
40,96	40,96	40,96	31,04	30,38	30,38	39,25	39,25	39,25
44,61	44,61		33,09	33,09	33,8	42,75	42,75	
47,57					37,61	46,56	46,56	46,56
51,8	50,71	50,71	39,25	39,25	39,25	48,59	48,59	
55,23	55,23	55,23	45,58	46,56	46,56	51,8	51,8	50,71
65,51	65,51	65,51	50,71	50,71	50,71			52,92
71,35	71,35	71,35	52,92	52,92	52,92	55,23	55,23	55,23
		76,07			55,23	60,15	60,15	60,15
			61,45	61,45	62,78	65,51	65,51	65,51
			68,37	68,37	68,37	68,37		68,37
			71,35	71,35				74,47
					76,07	77,71	77,71	77,71
			81,1	81,1	84,64	81,1	81,1	
			84,64	81,1	84,64	84,64	84,64	84,64
			92,18					88,33
			96,21					92,18
			100,4					
			104,8					
			109,4					
Prot. Ex por Pb			Prot. relacionas a la bomba de eflujo			Prot. Dejadas de Ex por Pb		
Prot. Ex por Pb			Prot. relacionas a la bomba de eflujo			Prot. Dejadas de Ex por Pb		

Los efectos del plomo en la expresión de proteínas de la fracciones del periplasma fueron distintos entre las cepas, con un porcentaje de disimilitud entre el 87% y 93%. Figura 11.

El análisis de disimilitud de las fracciones de periplasma mostró diferencias entre la misma cepa según las condiciones de cultivo, excepto para el morfotipo y T07, donde los cambios inducidos por el plomo fueron similares a las 12 y 24 horas, sin embargo los mostraron una disimilitud del 30% y 40% en la expresión de proteínas con respecto al control. Los morfotipos CG11 y PB56 presentaron una disimilitud del 10 % y 5 % en la expresión de proteínas entre los tiempos del tratamiento pero mostraron una disimilitud del 15% y 37%.

Figura 11. Análisis de disimilitud de la expresión proteica en la fracción de periplasma de las cuatro cepas con o sin presencia de plomo.

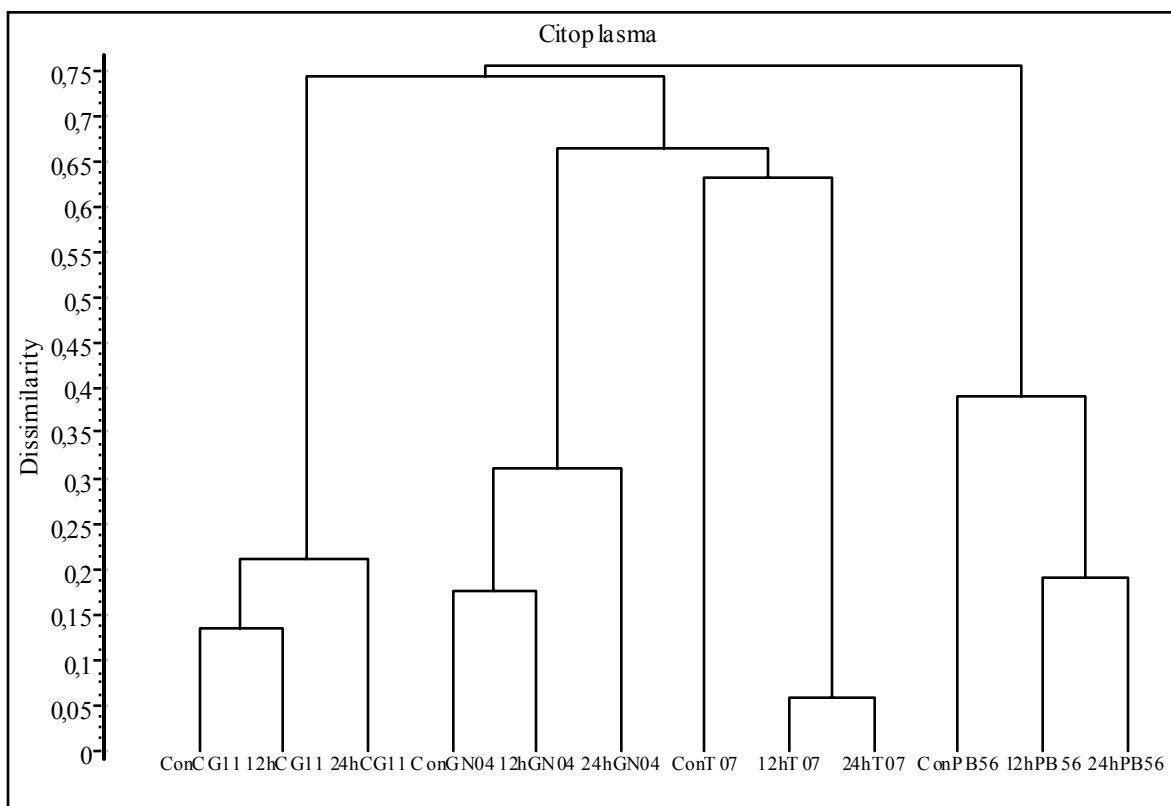


\*Condiciones de cultivo (sin plomo por 24 horas (control (ConGN04, ConT07, ConCG11 y ConPB56), con plomo por 12 horas (12hGN04, 12hT07, 12hCG11 y 12hPB56) y con plomo por 24 horas (24hGN04, 24hT07, 24hCG11 y 24hPB56).

Los efectos del plomo en la expresión de proteínas de la fracciones del citoplasma fueron diferentes entre las cepas, con un porcentaje de disimilitud entre el 67% y 76%. Figura 12.

Se encontraron diferencias en la expresión de proteínas para cada cepa en las fracciones de citoplasma según las condiciones de cultivo. Para los morfotipos CG11 y GN04 el efecto del plomo sobre la expresión de proteínas es mayor a las 24 horas que a las 12 horas, con una disimilitud del 22% y 31% en la expresión de proteínas con respecto al control. Los morfotipos T07 y PB56 mostraron una disimilitud del 6 % y 17 % en la expresión de proteínas entre los tiempos del tratamiento pero mostraron una disimilitud del 60% y 37% con respecto al control.

Figura 12. Análisis de disimilitud de la expresión proteica en la fracción de citoplasma de las cuatro cepas con o sin presencia de plomo.

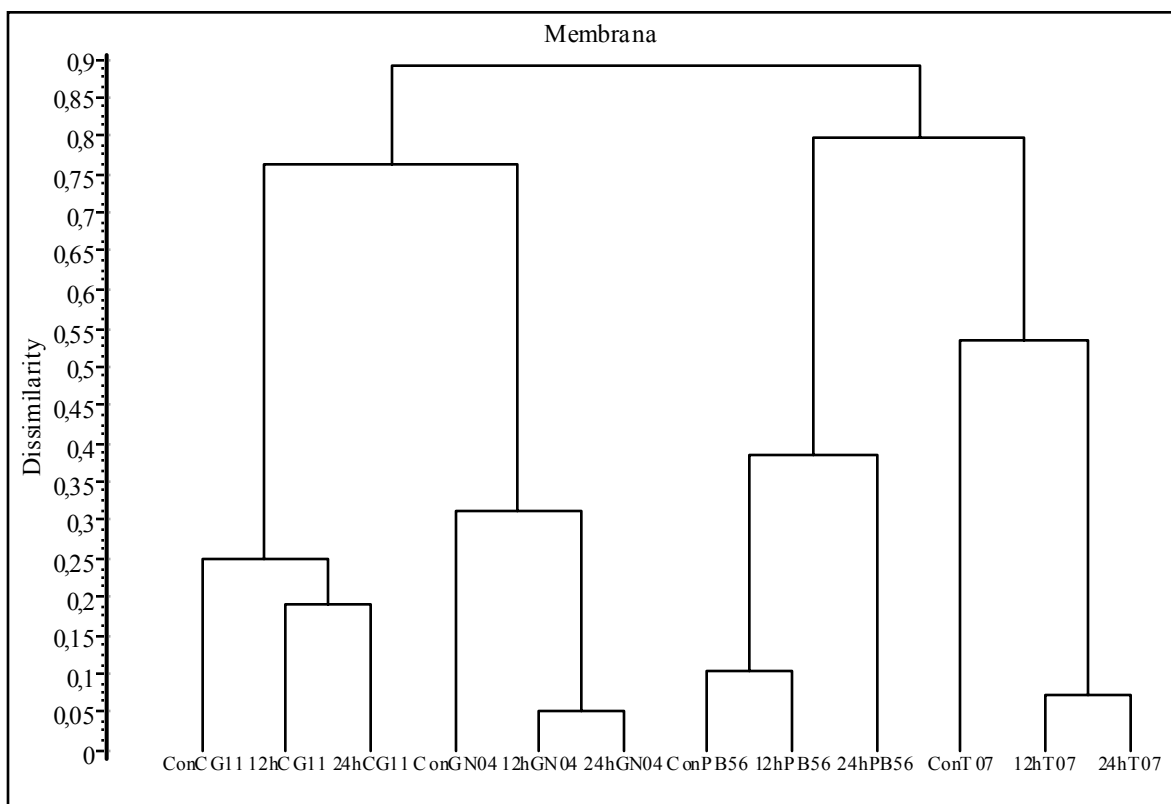


\*Condiciones de cultivo (sin plomo por 24 horas (control (ConGN04, ConT07, ConCG11 y ConPB56), con plomo por 12 horas (12hGN04, 12hT07, 12hCG11 y 12hPB56) y con plomo por 24 horas (24hGN04, 24hT07, 24hCG11 y 24hPB56).

Los efectos del plomo en la expresión de proteínas de la fracciones del membrana fueron diferentes entre las cepas, con un porcentaje de disimilitud entre el 76% y 89%.. Figura 13.

Se encontraron diferencias en la expresión de proteínas para cada cepa en las fracciones de membrana según las condiciones de cultivo. Para el morfotipo PB56 el efecto del plomo sobre la expresión de proteínas es mayor a las 24 horas que a las 12 horas, con una disimilitud del 26 en la expresión de proteínas con respecto al control. Los morfotipos CG11, GN04 y T07 mostraron una disimilitud del 19%, 5 % y 7 % en la expresión de proteínas entre los tiempos del tratamiento pero mostraron una disimilitud del 25%, 31% y 55% con respecto al control.

Figura 13. Análisis de disimilitud de la expresión proteica en la fracción de membrana de las cuatro cepas con o sin presencia de plomo.



\*Condiciones de cultivo (sin plomo por 24 horas (control (ConGN04, ConT07, ConCG11 y ConPB56), con plomo por 12 horas (12hGN04, 12hT07, 12hCG11 y 12hPB56) y con plomo por 24 horas (24hGN04, 24hT07, 24hCG11 y 24hPB56).

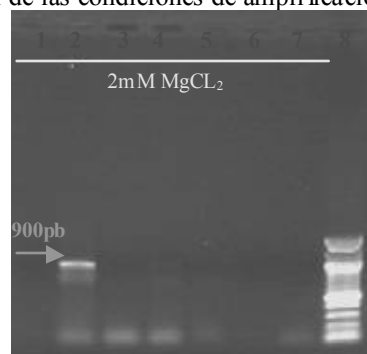
### 3.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *pbrA* Y *pbrB*

#### 3.5.1. Estandarización de las condiciones de amplificación del gen *pbrA*.

Las condiciones para amplificar el gen *pbrA* en la cepa de referencia: Temperatura de “annealing” de 57.1°C y una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2mM, obteniendo un producto de amplificación de aproximadamente 900 pb.

Figura 14.

Figura 14. Electroforesis de los productos de PCR para la estandarización de las condiciones de amplificación del gen *pbrA*.

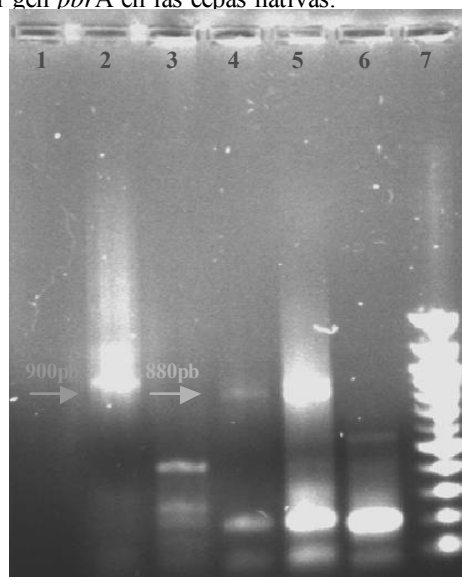


Carriles: 1(57.2°C), 2 (57.1°C), 3 (56.9°C), 4 (56.7°C), 5 (56.4°C), 6 (56.1°C), 7 (56.0°C) y 8 (Marcador de peso (100pb))

#### 3.5.2. Amplificación del gen *pbrA* en las cepas nativas.

La amplificación del gen *pbrA* a una temperatura de annealing de 57.1°C y 2 mM MgCl<sub>2</sub> no se logro, sin embargo se obtuvieron productos de amplificación a una temperatura de annealing de 55.1°C. Solo para el caso de los morfotipos T07 y CG11 se obtuvo un producto de 880pb, el cual es cercano al producto mostrado por la cepa control que es de 900 pb. Sin embargo todos los morfotipos mostraron otros productos de amplificación menores a los esperados. Figura 15.

Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR del gen *pbrA* en las cepas nativas.

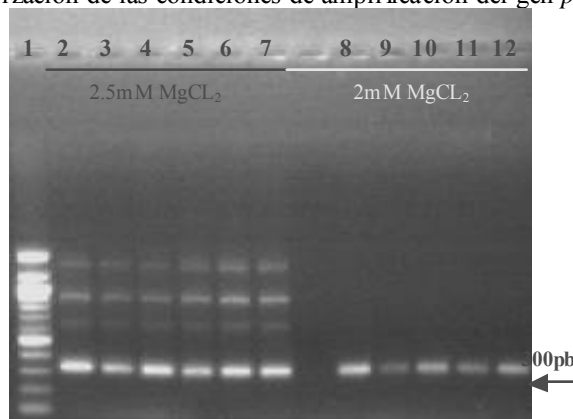


Carriles: 1(control primer), 2 (*R. metaliduras* CH 34), 3 (GN04), 4 (T07), 5 (CG11), 6 (PB56), 7 (Marcador de peso (100pb))

### 3.5.3. Estandarización de las condiciones de amplificación del gen *pbrB* con respecto a la cepa de referencia.

Las condiciones para amplificar el gen *pbrB* en la cepa de referencia: Temperatura de anelamiento de 59.8°C y una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2mM, obteniendo un producto de amplificación de aproximadamente 300 pb. Figura 16.

Figura 16. Electroforesis de los productos de PCR para la estandarización de las condiciones de amplificación del gen *pbrB*.

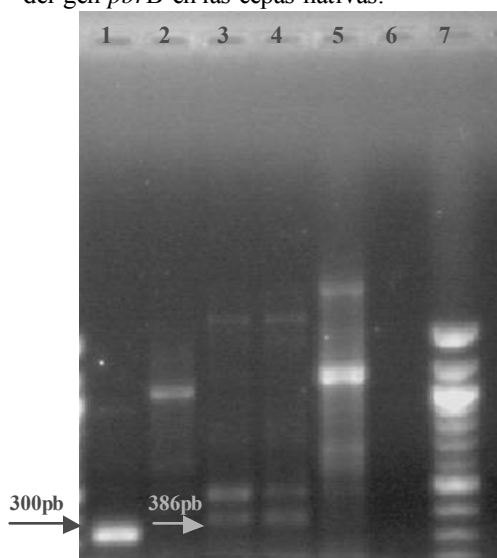


2.5 mM MgCl<sub>2</sub> Carriles del 2-7. Carriles: 2 (60°C), 3 (59.8°C), 4 (59.6°C), 5 (59.2°C), 6 (58.7°C), 7 (58.4°C), y 2 mM MgCl<sub>2</sub> Carriles del 8-12. Carriles: 8 (60°C), 9 (59.8°C), 10 (59.6°C), 11 (59.2°C), 6 (58.7°C), 7 (58.4°C). 1 (Marcador de peso (100pb)),

### 3.5.4. Amplificación del gen *pbrB* en las cepas nativas.

La amplificación del gen *pbrB* a una temperatura de anelamiento de 59.8°C y 2 mM MgCl<sub>2</sub> no se logró, sin embargo se obtuvieron productos de amplificación a una temperatura de anelamiento de 57.8°C. Solo para el caso de los morfotipos T07 y CG11 se obtuvo un producto de 386pb, siendo el producto más cercano al producto mostrado por la cepa control (300 pb). Sin embargo todos los morfotipos mostraron otros productos de amplificación mayores a los esperados. Figura 17.

Figura 17. Electroforesis de los productos de PCR del gen *pbrB* en las cepas nativas.

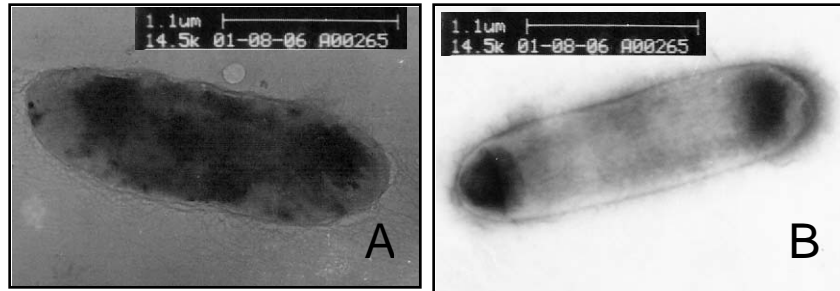


Carriles: 1 (R. metaliduras CH 34), 2 (GN04), 3 (T07), 4 (CG11), 5 (PB56), 6 (control primer), 7 (Marcador de peso (100pb))



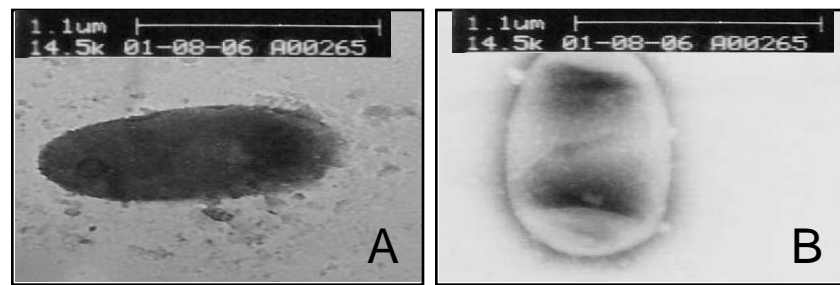
### 3.6. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION Y ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAYOS X

Figura 18. Microscopia electrónica del morfotipo GN04.



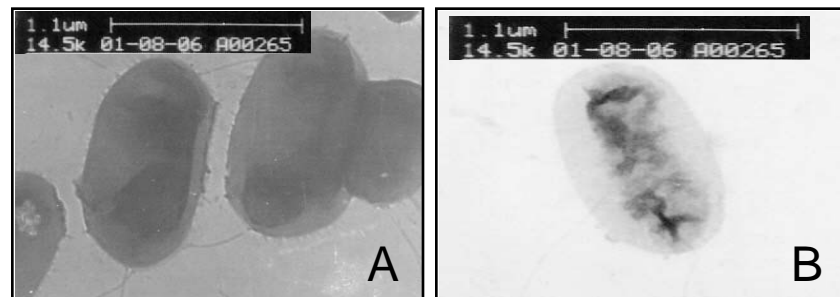
A: Crecido bajo la presencia de plomo. B: Crecido sin la presencia de plomo

Figura 19. Microscopia electrónica del morfotipo T07.



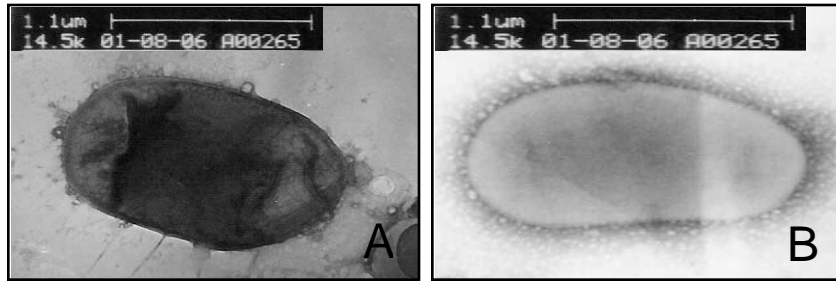
A: Crecido bajo la presencia de plomo. B: Crecido sin la presencia de plomo

Figura 20. Microscopia electrónica del morfotipo CG11.



A: Crecido bajo la presencia de plomo. B: Crecido sin la presencia de plomo

Figura 21. Microscopia electrónica del morfotipo PB56.



A: Crecido bajo la presencia de plomo. B: Crecido sin la presencia de plomo

Figura 22. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo GN04 crecido bajo la presencia de plomo.

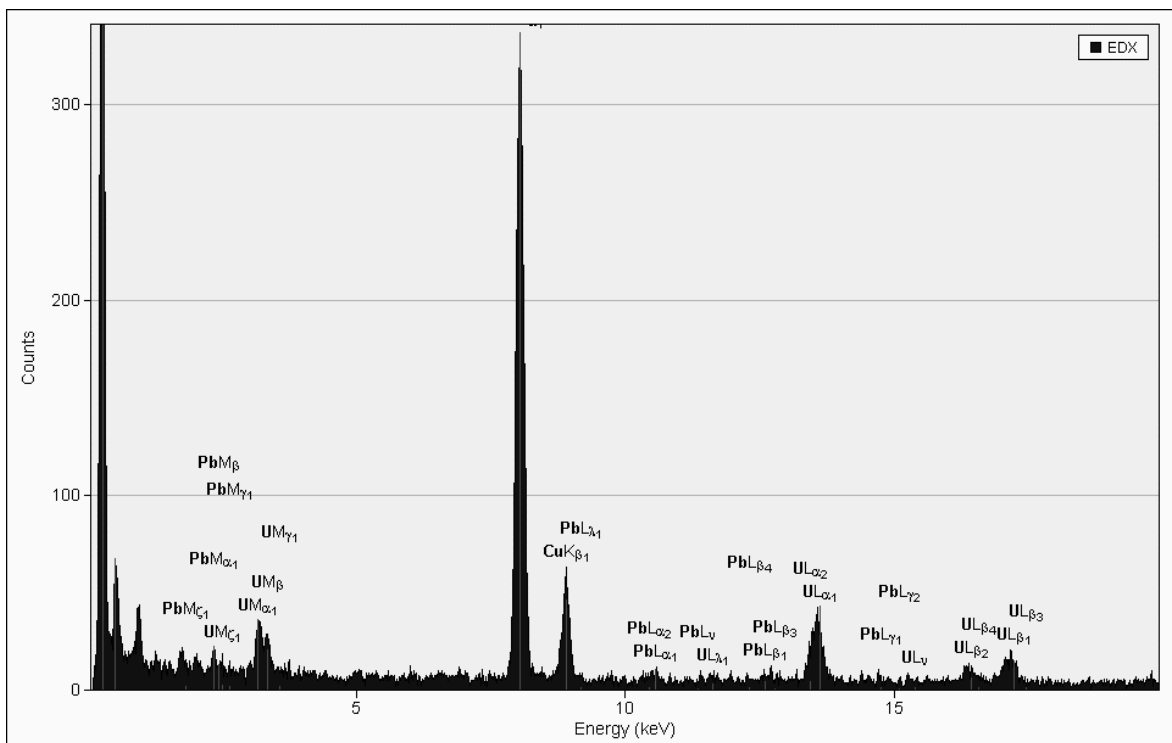


Tabla 9. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo GN04 crecido bajo la presencia de plomo.

RESULTADOS DE CUANTIFICACION					
Detector					
Elemento	% Peso	% Atómico	% Incertidumbre	Corrección	Factor K
C	69.431	96.542	0.877	0.173	6.279
O	3.725	3.111	0.225	0.514	1.980
P	0.120	0.064	0.039	0.873	1.165
Cu	23.428	5.782	0.212	0.997	1.757
Pb	0.000	0.000	100	0.754	112.439
U	0.000	0.000	100	0.754	240.047

Figura 23. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo GN04 crecido sin la presencia de plomo.

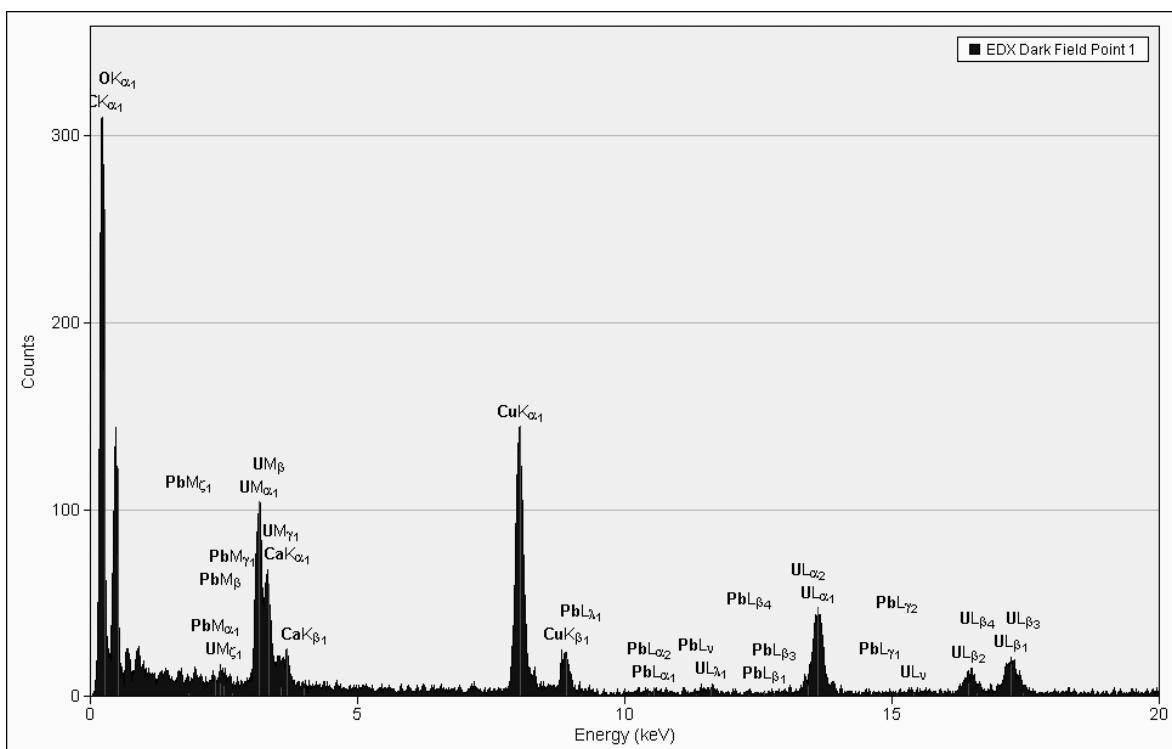


Tabla 10. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo GN04 crecido sin la presencia de plomo.

RESULTADOS DE CUANTIFICACION					
Detector					
Elemento	% Peso	% Atómico	% Incertidumbre	Corrección	Factor K
C	65.021	93.981	0.907	0.173	6.279
O	9.983	9.680	0.191	0.514	1.980
P	0.331	0.166	0.026	0.873	1.165
Ca	1.053	0.407	0.048	0.975	1.148
Cu	23.609	5.763	0.242	0.997	1.757
Pb	0.000	0.000	100	0.754	112.439
U	0.000	0.000	100	0.754	240.047

Figura 24. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo T07 crecido bajo la presencia de plomo.

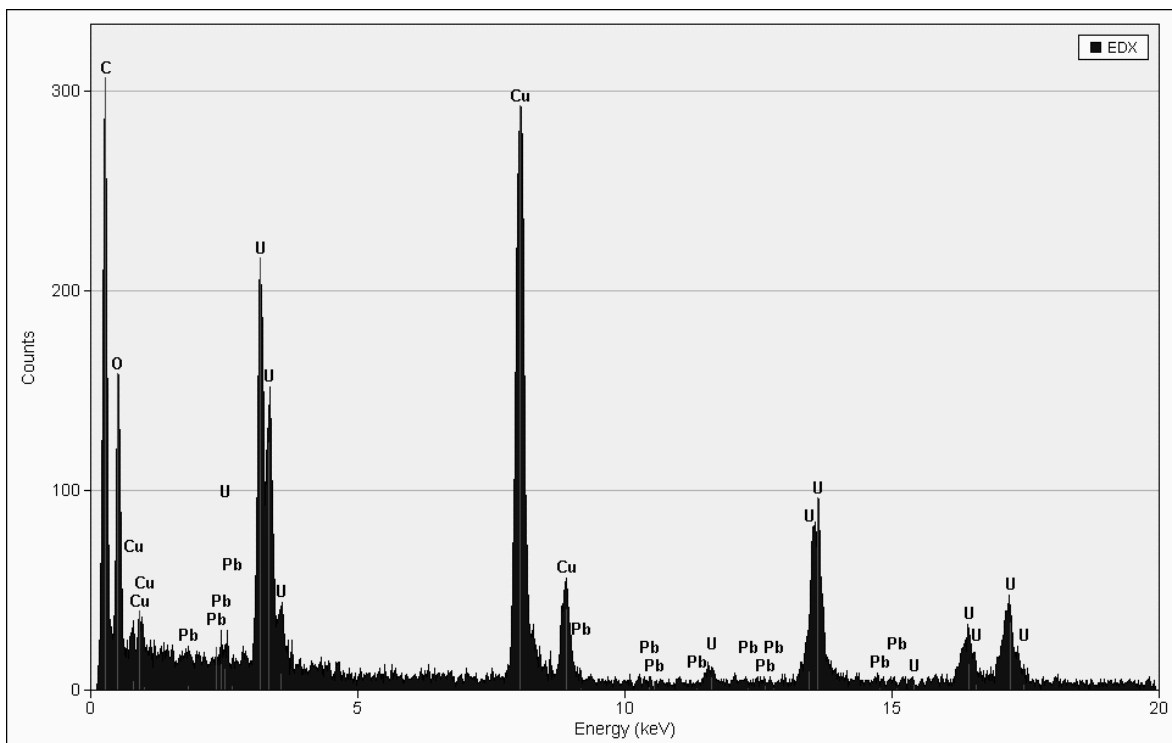


Tabla 11. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo T07 crecido bajo la presencia de plomo.

RESULTADOS DE CUANTIFICACION					
Detector					
Elemento	% Peso	% Atómico	% Incertidumbre	Corrección	Factor K
C	6.012	92.870	1.740	0.173	6.279
O	4.237	3.640	0.288	0.514	1.980
P	0.178	0.081	0.048	0.873	1.165
Cu	19.420	4.230	1.515	0.997	1.757
Pb	0.000	0.000	100	0.754	112.439
U	0.000	0.000	100	0.754	240.047

Figura 25. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo T07 crecido sin la presencia de plomo.

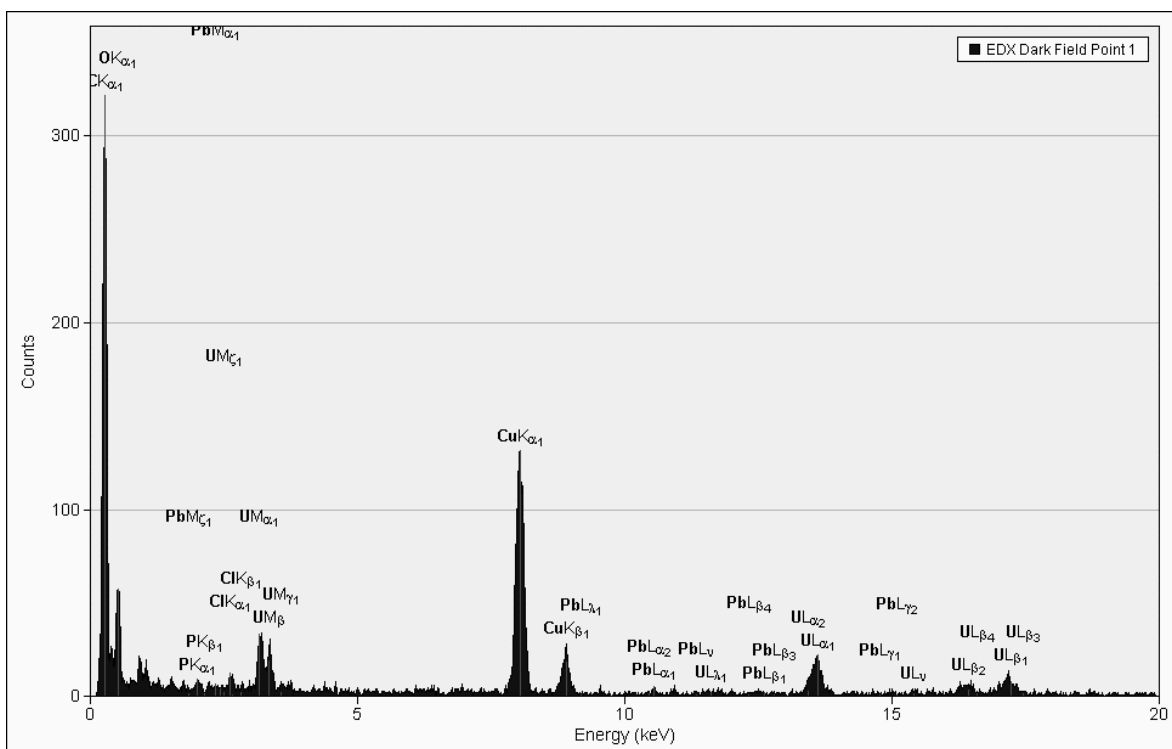


Tabla 12. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo T07 crecido sin la presencia de plomo.

RESULTADOS DE CUANTIFICACION					
Detector					
Elemento	% Peso	% Atómico	% Incertidumbre	Corrección	Factor K
C	73.082	90.716	1.738	0.173	6.279
O	4.014	3.740	0.231	0.514	1.980
P	0.271	0.130	0.038	0.873	1.165
Cl	0.553	0.232	0.046	0.936	1.138
Cu	22.078	5.179	0.440	0.997	1.757
Pb	0.000	0.000	100	0.754	112.439
U	0.000	0.000	100	0.754	240.047

Figura 26. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo CG11 crecido bajo la presencia de plomo.

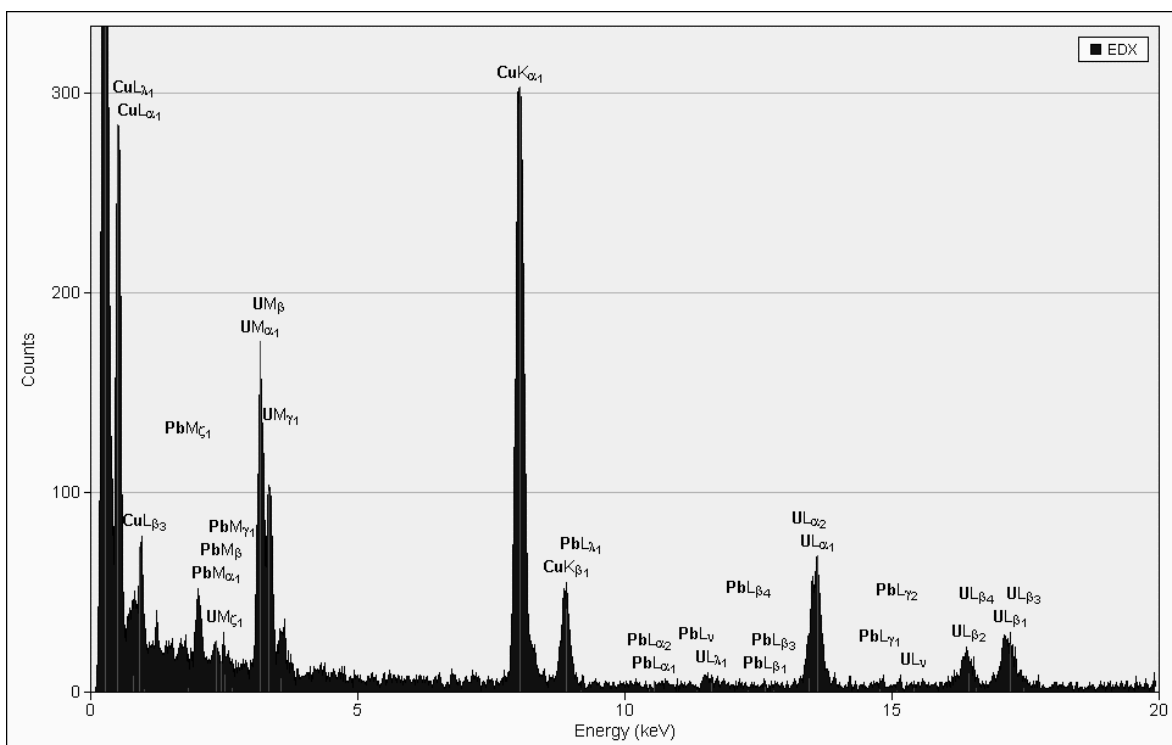


Tabla 13. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo CG11 crecido bajo la presencia de plomo.

RESULTADOS DE CUANTIFICACION					
Detector					
Elemento	% Peso	% Atómico	% Incertidumbre	Corrección	Factor K
C	6.724	94.870	1.840	0.173	6.279
O	4.127	3.420	0.298	0.514	1.980
P	0.158	0.071	0.042	0.873	1.165
Cu	20.420	4.890	1.665	0.997	1.757
Pb	0.000	0.000	100	0.754	112.439
U	0.000	0.000	100	0.754	240.047

Figura 27. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo CG11 crecido sin la presencia de plomo.

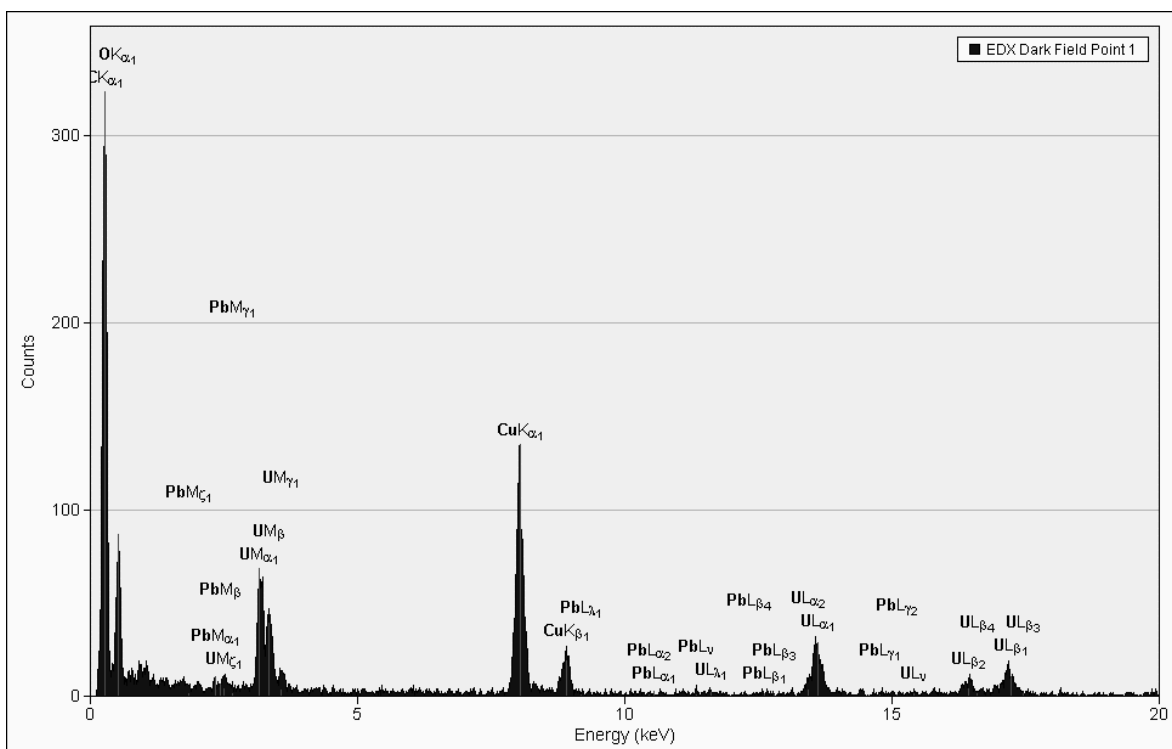


Tabla 14. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo CG11 crecido sin la presencia de plomo.

RESULTADOS DE CUANTIFICACION					
Detector					
Elemento	% Peso	% Atómico	% Incertidumbre	Corrección	Factor K
C	82.468	93.704	1.747	0.173	6.279
O	3.905	3.331	0.245	0.514	1.980
P	0.167	0.073	0.040	0.873	1.165
Cu	13.458	2.890	0.355	0.997	1.757
Pb	0.000	0.000	100	0.754	112.439
U	0.000	0.000	100	0.754	240.047



Figura 28. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo PB56 crecido bajo la presencia de plomo.

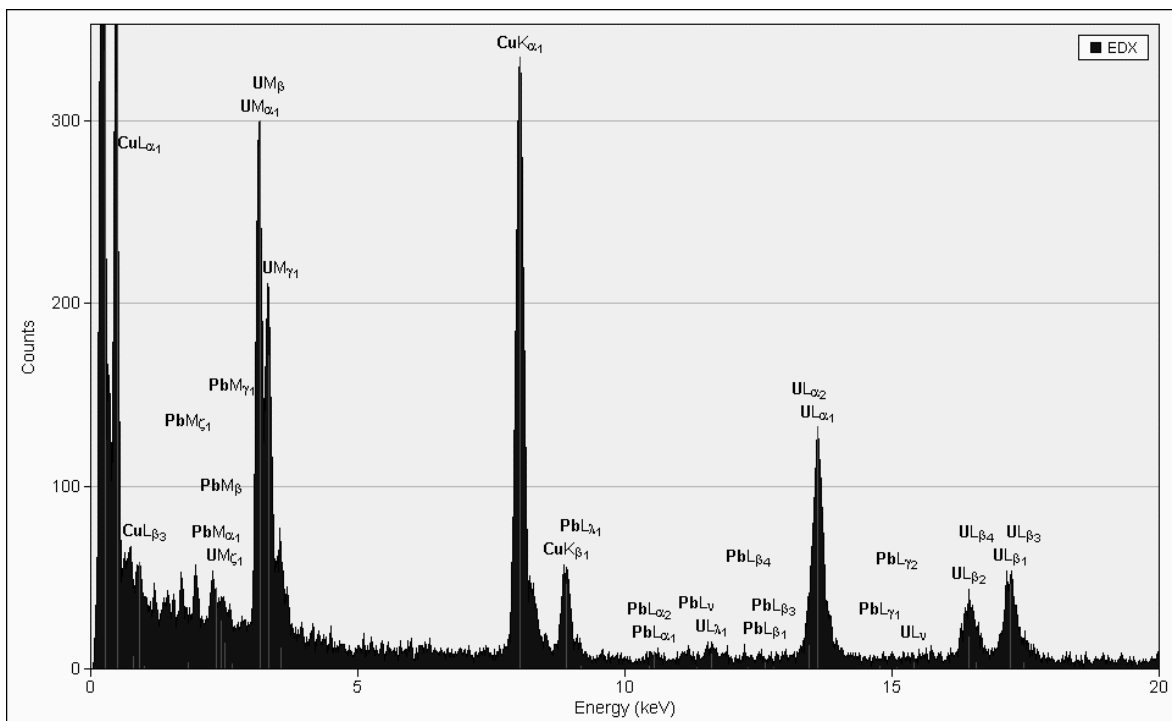


Tabla 15. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo PB56 crecido bajo la presencia de plomo.

RESULTADOS DE CUANTIFICACION					
Detector					
Elemento	% Peso	% Atómico	% Incertidumbre	Corrección	Factor K
C	7.24	96.870	1.640	0.173	6.279
O	4.234	3.730	0.307	0.514	1.980
P	0.178	0.082	0.039	0.873	1.165
Cu	20.720	4.991	1.875	0.997	1.757
Pb	0.000	0.000	100	0.754	112.439
6.724	94.870	1.840	0.173	6.279	6.724

Figura 29. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo PB56 crecido sin la presencia de plomo.

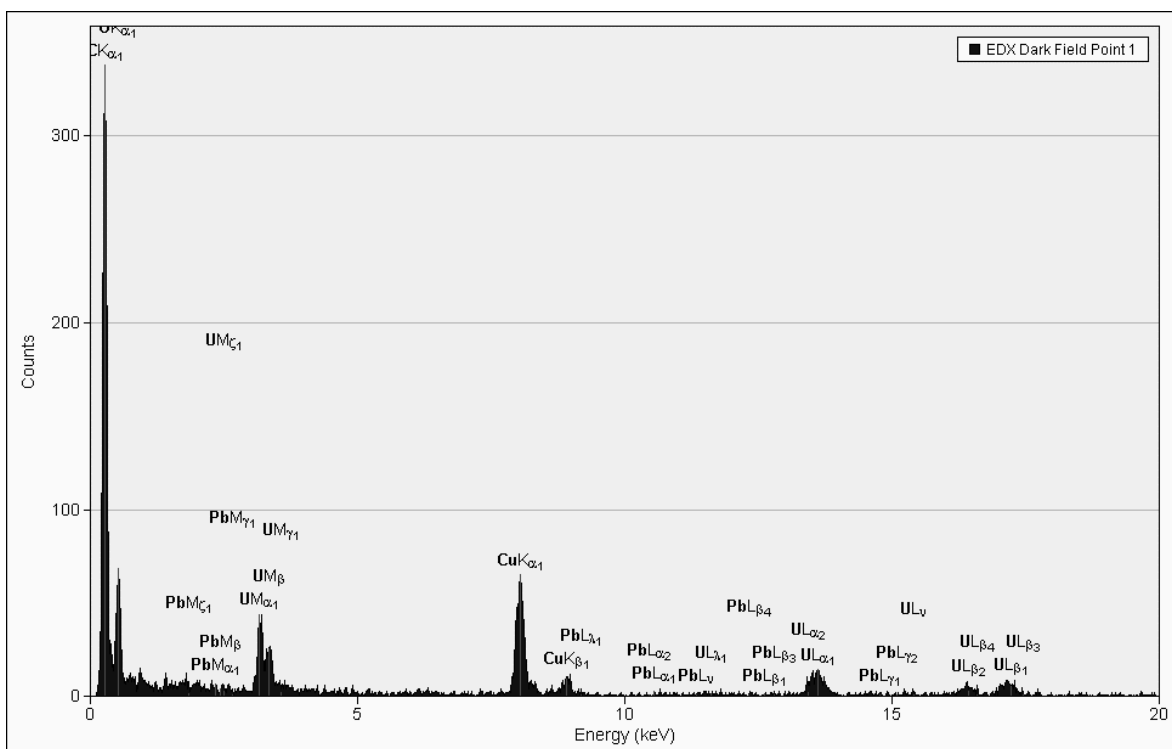


Tabla 16. Resultados de la cuantificación de elementos por Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X del morfotipo PB56 crecido sin la presencia de plomo.

RESULTADOS DE CUANTIFICACION					
Detector					
Elemento	% Peso	% Atómico	% Incertidumbre	Corrección	Factor K
C	86.196	94.589	1.855	0.173	6.279
O	4.133	3.405	0.268	0.514	1.980
Cu	9.669	2.005	0.291	0.997	1.757
Pb	0.000	0.000	100	0.754	112.439
U	0.000	0.000	100	0.754	240.047

Las imágenes de las microscopías electrónicas de transmisión muestran cuerpos electrodensos en la periferia y al interior de las bacterias que fueron crecidas bajo la presencia de plomo en comparación a las que no fueron crecidas bajo esta condición; siendo mas evidente en los morfotipos GN04, T07 y PB56. También se observa la elongación en las bacterias que fueron crecidas sin la presencia de plomo en comparación a las que no fueron crecidas bajo la presión del plomo.

Las espectroscopia de energía dispersiva de rayos X de todos los morfotipos de estudio muestran el mismo patrón de picos Figura 22 a la 29. Estos corresponden a los elementos que están en mayor cantidad en la muestra como lo son carbono, oxígeno, cobre y uranilo. Los picos de cobre son debido a la rejilla que sirve de soporte para la muestra y que es de este elemento. Los picos de uranilo provienen de la tinción negativa que es en base a acetato de uranilo. En general, también se observa que los picos mostrados en las espectroscopias de energía dispersiva de rayos X son más robustos en las muestras provenientes a los morfotipos cultivados bajo la presencia del metal.

Las muestras correspondientes a los morfotipos cultivados en plomo, muestran pequeños picos en relación a los demás elementos, indicando que su presencia es muy poca en las muestras. Sin embargo se observan también picos en los controles negativos (morfotipos cultivados sin plomo); no obstante en todos los casos los picos relacionados a plomo son mayores en las muestras de los morfotipos cultivados en presencia de este metal.

Los resultados de cuantificación muestran una relación positiva entre los picos y las cantidades de estos elementos, Para el caso del plomo también se obtienen valores de cero en la cuantificación, lo cual se relaciona positivamente con los picos insipientes durante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X.

Los picos  $PbM_{\alpha 1}$ ,  $PbM_{\beta 1}$  y  $PbL_{\alpha 1}$  de las espectroscopias de energía dispersiva de rayos X son los que mas muestran mayor relación con la posible acumulación del plomo. Tabla 17.

Tabla 17. Tamaños de los picos mostrados por la espectroscopia de energía dispersiva de rayos X en los morfotipos cultivados con o sin la presencia del plomo.

Picos consenso mostrados por espectroscopias de difracción de rayos X	MORFOTIPOS DE ESTUDIO											
	GN04			CG11			T07			PB56		
	Tamaño (mm)		Relación de la tamaño (2/1)*	Tamaño (mm)		Relación de la tamaño (2/1)*	Tamaño (mm)		Relación de la Tamaño (2/1)*	Tamaño (mm)		Relación de la Tamaño (2/1)*
	Sin plomo (1)	Con plomo (2)		Sin plomo (1)	Con plomo (2)		Sin plomo (1)	Con plomo (2)		Sin plomo (1)	Con plomo (2)	
PbM <sub>ε1</sub>	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,5	3,0
<b>PbM<sub>α1</sub></b>	<b>5,0</b>	<b>11,5</b>	<b>2,3</b>	<b>5,0</b>	<b>13,5</b>	<b>2,7</b>	<b>0,0</b>	<b>11,0</b>	<b>11,0</b>	<b>2,0</b>	<b>21,0</b>	<b>10,5</b>
<b>PbM<sub>β1</sub></b>	<b>3,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,3</b>	<b>2,0</b>	<b>4,0</b>	<b>2,0</b>	<b>0,0</b>	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	<b>1,0</b>	<b>6,0</b>	<b>6,0</b>
PbM <sub>γ1</sub>	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,0	1,0	1,0	0,5	1,0	2,0
PbL <sub>λ1</sub>	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
PbL <sub>α2</sub>	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
<b>PbL<sub>α1</sub></b>	<b>2,0</b>	<b>5,5</b>	<b>2,8</b>	<b>1,0</b>	<b>3,0</b>	<b>3,0</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>	<b>4,0</b>	<b>8,0</b>
PbL <sub>η</sub>	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
PbL <sub>β4</sub>	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
PbL <sub>β1</sub>	1,0	2,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	0,5	1,0	0,5	1,5	3,0
PbL <sub>β3</sub>	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
PbL <sub>γ1</sub>	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
PbL <sub>γ2</sub>	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0

\* Relación de diferencia de tamaño entre los picos presentados entre los morfotipos cultivados con plomo (2) y los que no son cultivados con plomo (1). Se obtiene dividiendo 2/1.

#### 4. . DISCUSION

Los morfotipos GN04, T07, CG11 y PB56 son de gran interés biotecnológico ya que pueden resistir altas concentraciones de plomo (5mM), siendo concentraciones superiores o casi similares a las reportadas por otros autores (*R. metallidurans* CH34 (0.4mM de Pb (II))). Además en estudios anteriores se observó que estos aislamientos presentan una alta eficiencia (tiempo y cantidad) del metal removido de una fase líquida (Caro 2004). También 3 de los 4 aislamientos provienen de un consorcio degradador de hidrocarburos, siendo factible el uso de estos microorganismos para remediaciones mixtas.

La secuenciación del gen del 16S rRNA, se encontraron que tres morfotipos pertenecen al género *Pseudomonas*, de las cuales dos son *P aeruginosa*; el morfotipo restante es *Enterobacter cloacae*. Todas ellas son bacterias gram negativas perteneciente a la rama g de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias. Las *Pseudomonas* son un género cosmopolita, capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos como sustrato para crecer, ya sean tóxicos o no; además están asociados a diferentes mecanismos de resistencia a metales pesados. *E cloacae* es un microorganismo asociado a infecciones por resistencia a antibióticos y esta asociado a la resistencia a metales pesados por mecanismos de acumulación y quelación como lo ha descrito Luzaro, et al. 2004<sup>49</sup> y Hernández, et al. 1998<sup>50</sup>.

La exposición de los morfotipos al plomo causa cambios en la expresión proteica. En el caso del morfotipo T07 se podría estar induciendo un sistema de detoxificación de tipo de eflujo, ya que la amplificación los genes *pbrA* y *pbrB* fue positiva y los perfiles proteicos

---

<sup>49</sup> **Luzaro, F. et al.** Emergence in *klebsiella pneumoniae* and *enterobacter cloacae* clinical isolates of the vim-4 metallo-β-lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004. 2: 648–650

<sup>50</sup> **Hernández, A. Et al.** Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *escherichia hermannii* and *enterobacter cloacae*. *Applied and environmental microbiology*, 1998. 64: 4317 - 4320

mostraron proteínas con un peso y ubicación similar a las reportadas para la bomba de eflujo de *R. metallidurans* CH34.

No obstante, los cambios presentados en los perfiles proteicos pueden estar relacionados con el sistema de detoxificación de eflujo de *R. metallidurans* CH34, estos cambios pueden estar interrelacionados a otros sistemas de detoxificación o a proteínas inducidas por el stress que ejerce el metal. Un ejemplo de esto son los morfotipos GN04 y PB56 cuya amplificación los genes *pbrA* y *pbrB* fue negativa, pero se observó la inducción de nuevas proteínas bajo la presencia del metal.

En el morfotipo CG11 se logró la amplificación de los genes *pbrA* y *pbrB*, sin embargo los perfiles proteicos no mostraron proteínas relacionadas con la bomba de eflujo de *R. metallidurans* CH34 según su peso y ubicación celular. Esto puede indicar de que este morfotipo puede tener un sistema de eflujo que guarda alguna similitud al presentado en *R. metallidurans* CH34 y que es lo suficientemente diferente para no encontrar proteínas relacionadas con este sistema del mismo peso molecular en comparación dentro de los tiempos de expresión..

La espectroscopia de energía dispersiva de rayos X mostró picos insipientes y cuantificaciones de plomo con valores de cero, esto puede ser debido a la baja concentración en el medio de cultivo del metal (1mM) y al tratarse de una matriz sólida, la biodisponibilidad del metal es menor a comparación de que si se tratara de un cultivo líquido; por lo tanto el plomo en las células estaría fuera del rango de detección de la técnica. Sin embargo los picos  $PbM_{\alpha 1}$ ,  $PbM_{\beta 1}$  y  $PbL_{\alpha 1}$  muestran la relación del tamaño de los picos con la presencia de plomo en las células.

Los picos  $PbM_{\alpha 1}$ ,  $PbM_{\beta 1}$  y  $PbL_{\alpha 1}$  en el morfotipo PB56 fueron los más pronunciados, esto guarda relación con el hecho de que este morfotipo toma una coloración oscura cuando es cultivado con el metal e indicando que este morfotipo puede estar llegando a acumular este metal.

## 5. CONCLUSIONES

Los morfotipos GN04, T07, CG11 y PB56 presentan cambios macroscópicos en el color, tamaño y textura de las colonias, y cambios microscópicos en cuanto a su morfología cuando son cultivados en presencia del plomo.

Se obtuvo una mínima concentración inhibitoria de 4mM de Pb(II) para los morfotipos GN04, T07, CG11 y PB56, la cual es superior a la cepa de referencia internacional *Ralstonia metallidurans* CH34 (0.4mM de Pb(II)).

Tres de los cuatro aislamientos de estudio pertenecen al género *Pseudomonas*, dos de ellos *Paeruginosa* y el morfotipo restante es *Enterobacter cloacae*.

La presencia de nuevas proteínas en los perfiles proteicos de las diferentes fracciones celulares de los morfotipos es consecuencia del plomo, ya sea por la expresión de un mecanismo específico de detoxificación o por la inducción de proteínas que solo se activan en condiciones de estrés.

El morfotipo T07 es el aislamiento que presenta mayores cambios en la expresión de proteínas cuando está bajo la presencia de plomo, con una disimilitud de 42% en la fracción de periplasma, 60% en la fracción de citoplasma y 47% en la fracción de membrana.

El morfotipo T07 muestra que las proteínas 27.7KDa en el citoplasma y de 20.5KDa en la membrana, y que puedan tener alguna relación con las proteínas del sistema de detoxificación de dos componentes de *R. metallidurans* CH34 según su peso molecular y su ubicación.

El morfotipo GN04 muestra que las proteínas 27.7KDa en el citoplasma y de 84.4KDa en el periplasma y la membrana, y que puedan tener alguna relación con las proteínas del sistema de detoxificación de dos componentes de *R. metallidurans* CH34 según su peso molecular y su ubicación

Se amplificaron los genes *pbrA* y *pbrB* en las cepas nativas T07 y CG11, lo cual puede indicar que estas cepas tienen un sistema de detoxificación de tipo de eflujo similar al presentado por *R. metallidurans* CH34 o pueden presentar variaciones en la secuencia blanco de los primers.

Los perfiles de proteínas y las amplificaciones de los genes *pbrA* y *pbrB* indican que el morfotipo T07 tiene un sistema de detoxificación de tipo de eflujo; y que el morfotipo CG11 puede presentar el mismo sistema y en donde algunos de sus componentes pueden tener modificaciones o guardar cierta similitud con el de la cepa de referencia.

Según los resultados de las amplificaciones de los genes *pbrA* y *pbrB* y los perfiles proteicos, la resistencia de los morfotipos GN04 y PB56 al plomo se deba a otro mecanismo diferente a las bombas de eflujo.

La biodisponibilidad del plomo en el medio de cultivo parece ser la principal causa de que se registraran pequeños picos asociados al plomo y que las cuantificaciones del metal sean nulas.

Los picos  $PbM_{\alpha 1}$ ,  $PbM_{\beta 1}$  y  $PbL_{\alpha 1}$  de las espectroscopia de energía dispersiva de rayos X parecen mostrar la presencia de plomo en las células, ya que estos son los que aumentan si se comparan las células que no fueron cultivadas en plomo con las que si.

Según la microscopia electrónica de transmisión y la espectroscopia de energía dispersiva de rayos X, el morfotipo PB56 muestra la mayor capacidad bioacumulativa de plomo, lo cual se relaciona con los cambios macroscópicos presentados cuando crece bajo la presencia de este metal.



La capacidad de biacumulación de plomo mostrada por la TEM y su EDX del morfotipo PB56, se relacionan con los resultados obtenidos por Caro (2004), donde este morfotipo presenta la mayor capacidad remoción de plomo con respecto a su peso seco.

## REFERENCIAS

**Atlas, R. & Bartha, R.** Interacciones microbianas con contaminantes xenobióticos e inorgánicos. Madrid. Addison Wesley.2001. p. 534 546.

**Borremans, B., et. al.** Cloning and Functional Analysis of the *pbr* Lead Resistance Determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. Journal of . Bacteriology. 2001.183: 5651–5658.

**Cañizares, R.** Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología 2000. 42:131-143.

**Caro, A.** Acumulación de plomo en aislamientos de bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos utilizando un reactor de lecho empacado. Universidad de los Andes. 2004.

**Cervantes & Silver,** Systems of resistance to metals in *Pseudomonas*. Revista Latinoamericana de microbiología. 1996.38 : 45 – 64.

**Chang, J., Law. R. & Chang, CH.** Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. Science @ Direct. 1997. No 31: 7 : 1651-1658

**Hernández , A. Mellado, R. Martinez, J.** Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. Applied and environmental microbiology, 1998. 64: 4317 - 4320

**Kachur. V., Koch. J. & Biaglow J. E.** Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. Free Radical Research. 1998. 28 : 259-269

**Lajos, G.** The key processes in the removal of toxic metals and radionuclides from environment. Central European journal occupational and environmental medicine. 2001. Vol. 7. Nos 3-4. : 178-185

**Lenntech.** Tabla periódica. Recuperado el 14 de Junio del 2006 en <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-periodica/Pb.htm>

**Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A.** Emergence in klebsiella pneumoniae and enterobacter cloacae clinical isolates of the vim-4 metallo- $\beta$ -lactamase encoded by a conjugative plasmid. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004. 2: 648–650

**Lloyd, J. & Lovley, D.** Microbial detoxification of metals and radionuclides. Current Opinion in Biotechnology. 2001. 12 : 248 -253

**Mills, A.** Metal requirements and tolerance. En: Hurst, C et. Al. Manual of Environmental Microbiology. American Society of Microbiology. United States. 2002. Cap 41.

**Nies, D.** Microbial heavy metal resistance: Molecular biology and utilization for biotechnological processes. Recuperado el 14 de Junio del 2006, en <http://bionomie.mikrobiologie.uni-halle.de/Reviews/Review%201999.html>

**Nies, D., & Brown, N.** Two-Component Systems in the Regulation of Heavy Metal Resistance. Recuperado el 14 de Junio del 2006, en <http://bionomie.mikrobiologie.uni-halle.de/Fertige%20Publikationen/Review2kv98.pdf>

**Nies, D. & Silver, S.** Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. Journal Industrial Microbiology. 1995.14 : 186-199

**Raisman, A. y Gonzales, A.** Hipertextos del área de la biología. Universidad nacional del nordeste . Recuperado el 2 de agosto del 2006, en <http://www.biologia.edu.ar/microscopia/meb.htm>

**Rawlings, D.** Heavy metal mining using microbes. Annual Review of Microbiology. 2002. 56 : 65-91

**Romero, G.** Microscopia electrónica de transmisión (MET) área biomédica: teoría y práctica. Bogotá. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales colección Julio Carrizosa Valenzuela. 2003. p. 179 – 183.

**Scragg, A.** Visión general. En: Scragg, A. Biotecnología Medioambiental. Madrid. Editorial Acribia S.A. 2001. p. 15 -25.

**Spain, A.** Implications of microbial heavy metal tolerante in the enviroment. Reviews Undergraduate Research. 2003. 2: 1-6.

**Suares, P., & Reyes, R.** La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia par el ambiente. *Interciencia*. 2002. 27 : 160-164.

**Summers, A.** Microbial transformations of metals. *Annual Review Microbiology*. 1978. 32 : 637 -672

**Taghavi, S. et. al.** *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the enviroment. *Research in Microbiology*. 1997. No 6. 148 : 459-556.

**Vullo, D.** Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*. 2003. Vol. 2. No 3, Recuperado el 14 de Junio del 2006, en <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### COMPOSICION DEL MEDIO LURIA - BERTANI (LB)

REACTIVOS	CONCENTRACION	TIPO DE MEDIO
Bacto - Triptona	10 g/litro	Líquido
Extracto de levadura	5 g/litro	
NaCl	10 g/litro	
Agar	1.5 %	Sólido

## ANEXO 2

### COMPOSICION DEL MEDIO MINIMO DE SALES (MMS)

Reactivo	Concentración
Tris	6.06 g/L
NaCl	4.68 g/L
KCl	1.49 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	1.07 g/L
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.43 g/L
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.2 g/L
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.03 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	0.05 g/L
FeCl <sub>3</sub>	0.005 g/L
Solución SL7	1.0 mL/L
Gluconato de Na	2.0 g/L

Solución SL7	
Reactivo	Concentración
HCl 25%	1.3 mL/L
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	144 mg/L
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	100 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62 mg/L
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	190 mg/L
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	17 mg/L
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	24 mg/L
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	36 mg/L

### ANEXO 3

#### PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA, CITOPLASMA Y PERIPLASMA\*\*

1. Resuspender el pellet en 1 mL de solución de Tris-Sacarosa.
2. Adicionar 10 uL de EDTA pH 8,0 0,5M.
3. Adicionar 100 uL de Lisozima de una solución fresca de 2,5 mg/ml.
4. Incubar en hielo por 1 hora.
5. Adicionar 20 uL de cloruro de calcio de una solución stock 1 M.
6. Adicionar 20 uL de cloruro de sodio de una solución stock de 5 M.
7. Centrifugar a 12.000 r.p.m por 20 minutos a 4°C.
8. Pasar el sobrenadante a otro tubo y marcar como fracción periplasmática (P).
9. Resuspender el pellet en 0,5 ml de la solución A.
10. Centrifugar a 12.000 r.p.m por 20 minutos.
11. Pasar el sobrenadante a otro tubo y marcar como fracción citoplasmática (C).
12. Resuspender el pellet en 50 uL de la solución B \*
13. marcar como fracción de membrana (M).
14. Adicionar KCl para quedar a una concentración de 0.15M
15. Adicionar glicerol para quedar a una concentración del 10%

\* Para este trabajo la fracción de membrana se resuspendió en 50 uL de la solución B

---

\* Comunicación personal. con Jenny Dussan. Directora del Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC) del departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

- **SOLUCIÓN TRIS-SACAROSA \*\***

30mM      Tris HCl pH 8,0

20%        Sacarosa

**\*\*La lisozima, el EDTA, el CaCl<sub>2</sub> y el NaCl se preparan en la solución Tris-Sacarosa.**

- **SOLUCIÓN A**

30mM      Tris HCl pH 8.0

5 mM       MgCl<sub>2</sub>

1 ug/mL    DNAsa

- **SOLUCIÓN B**

30mM      Tris HCl pH 8.0

1 mM       EDTA pH 8,0



## ANEXO 4

### COMPOSICION Y REACTIVOS PARA LA PREPARACION DE LOS GELES DE POLICRILAMIDA

#### MINIGELES DE POLICRILAMIDA AL

	<i>Geles Separación 10%</i>	<i>Stacking 4%</i>	
<b>Reactivos</b>	Acrylamida	1.72 ml	0.6 ml
	Buffer separación	3.46 ml	1.75 ml
	Agua destilada	1.55 ml	1.02ml
	APS	185ul	89.65 ul
	SDS 10%	70 ul	35 ul
	TEMED	16 ul	7 ul
	<b>Volumen final</b>	7 ml**	3.5 ml**

\*\* : Para un minigel

- **Buffer para gel de separación.**

Trizma base                      9,1 g

Ajustar el pH a 8,8 con ácido clorhídrico y completar a 100 ml con agua destilada.

- **Buffer para gel de concentración (stacking).**

Trizma base                      3,03 g

Ajustar el pH a 6,8 con ácido clorhídrico y completar a 100 ml con agua destilada.

- **Acrilamida para gel de separación**

Acrilamida	400 g
Bisacrilamida	7.3g
Agua Destilada	1 L

- **Acrilamida de concentración (stacking)**

Acrilamida	40 g
Bisacrilamida	2 g
Agua Destilada	200 ml

- **Buffer de Muestra (5x)**

Tris HCl pH 6,8 1M	3 ml
Glicerol	2,7 ml
SDS	0,5 g
2 b-mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	punta de espátula

Completar a 10 ml con agua destilada.

- **Buffer de corrida pH 8,3 (5x)**

Trizma base	75 g
Glicina	361 g
SDS	25 g

Completar a 5 litros con agua destilada