

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

“CAMPUS TUXTEPEC”



TESIS

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A PLOMO EN BACTERIAS
AISLADAS DE EFLUENTES CONTAMINADOS.**

Presentado por:

JADE ALEJANDRINA GALICIA APOLINAR

Para obtener el título de:

LICENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Directora de tesis:

DRA. LETICIA GUADALUPE NAVARRO MORENO

Co-directora:

Q.B.P. MIRIAM JUÁREZ JUÁREZ

ESTE TRABAJO DE TESIS FUE APOYADO
ECONÓMICAMENTE POR EL PROGRAMA DE
MEJORAMIENTO DEL PROFESORADO CON NÚMERO
DE REGISTRO **PROMEP 103.5/09/5694**
**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON
LA RESISTENCIA A METALES PESADOS EN ZONAS
CONTAMINADAS DE LA REGIÓN DE TUXTEPEC,
OAXACA”**. FOLIO UNPA-PTC-023

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, por darme la oportunidad de superarme y por toda la facilidad que me brindó durante la licenciatura para que siguiera adelante sin truncar mis estudios.

De manera general quiero expresar mis agradecimientos a las personas que han constituido parte de este trabajo de manera directa como a los que forman parte de mi motivación para seguir en este camino tan largo que es el conocimiento.

Y muy especialmente:

Agradezco a la Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno por aceptarme a ser parte de este gran proyecto de investigación, fungiendo como mi asesora, profesora y como esa gran persona que me apoyó para la realización de esta tesis. De igual manera agradezco a mi coasesora la Q.B.P. Miriam Juárez Juárez por aceptarme en la UPIBI brindándome su paciencia y conocimientos para la realización de las pruebas bioquímicas.

De igual manera quiero agradecer a los Doctores investigadores (Laura Patricia Ramirez Coutiño, Blanca Estela Barrera Figueroa y Enrique Villalobos Amador) que fungieron como sinodales para poder lograr el mejoramiento de este trabajo, mediante sus críticas constructivas y la revisión del mismo. También agradezco a los profesores que estuvieron involucrados durante mi formación académica, por el conocimiento, la paciencia y el empeño por enseñar ciencia, pero sobre todo por lograr que hoy este aquí dedicándoles estas líneas. Así mismo expreso mis agradecimientos a los técnicos de laboratorio (Leticia Saldaña y Luz del Carmen Quevedo) que se encontraron presentes durante las sesiones de trabajo en el mismo y que fueron también parte importante en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Nunca dejare de agradecer a mis padres Alfredo Galicia Agustín y María del Socorro Apolinar Soto, y a mi abuelita Alejandrina Agustín Juan por enseñarme la belleza de la vida. A mis hermanos Francisco, Elionor y María José, por aceptarme como soy y por creer siempre en mí. A toda mi familia ya que siempre mostraron interés en mi educación apoyándome de todas las maneras posibles, a mi tía Abelina Ocampo Agustín y a mis queridos primos (Jessica Cedillo Ocampo y a Juan Edgardo Cedillo Ocampo) porque aun estando lejos nunca dejaron de estar pendientes, por todos sus consejos y apoyo.

Mediante estas líneas quiero expresar mis agradecimientos a mis amigos (Mariazel, Nancy, Yahir y Ana) y compañeros que estuvieron presentes durante mi formación en la licenciatura dentro del salón de clases (Heydi y Beatriz) como fuera del mismo, y más aun a los que estuvieron pendientes en la realización de este trabajo, sin dejar de agradecer infinitamente a Christopher Avendaño Ortiz por su apoyo, sus consejos, su ayuda en el laboratorio y por la paciencia con la que me acompañó durante la realización de las pruebas tratando de comprender el trabajo que realizaba, por ser parte de mi vida, por estas razones y muchas más GRACIAS.

DEDICATORIAS

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE ME MOTIVARON A SEGUIR ADELANTE.

A MIS PADRES ALFREDO GALICIA AGUSTIN Y MARIA DEL SOCORRO APOLINAR SOTO.

A MI TIA ABELINA OCAMPO AGUSTIN.

A CHRISTOPHER AVENDAÑO ORTIZ.

Y MUY ESPECIALMENTE

A MI QUERIDA ABUELITA ALEJANDRINA AGUSTIN JUAN

RESUMEN

El presente trabajo de Tesis se realizó con el objetivo de explorar la idea de las proteínas de los cuerpos de inclusión como una posible respuesta al estrés ocasionado por la exposición a plomo. Se partió del conocimiento de que una proteína que posea la capacidad de expresarse en diferentes organismos en situaciones que representen condiciones adversas puede considerarse una proteína de estrés. Bajo la concepción anterior este trabajo muestra los resultados relacionados con el inicio del estudio del efecto de la exposición a plomo en cepas de bacterias aisladas de diferentes ambientes acuáticos contaminados y no contaminados con metales pesados. En una segunda etapa se estudiará la presencia de las proteínas de cuerpos de inclusión en estos microorganismos.

Las bacterias poseen determinados sistemas de resistencia que les confieren la capacidad de sobrevivir en ambientes adversos. Muchos de estos sistemas se encuentran dentro de plásmidos o material genético definido. Ejemplos de lo anterior los constituyen las bacterias resistentes a cadmio, cobre cromo, mercurio y otros metales. Sin embargo, para el caso del plomo no se han reportado mecanismos que confieran a las bacterias resistencia a este metal.

En este trabajo se aislaron tres cepas provenientes de un ambiente contaminado con metales pesados, un ambiente formado por aguas negras y un ambiente libre de contaminantes. Las cepas fueron caracterizadas e identificadas como *Hafnia alvei*, *Bacillus pumillus* (cepa Eco) y *Bacillus pumillus* (cepa Playa de mono). Los nombres Eco y Playa de mono fueron empleados para diferenciar a cada una de estas cepas bacterianas y hacen referencia tanto a sus características microscópicas como a los lugares de donde fueron aisladas.

RESUMEN

Se realizaron estudios microbiológicos. coloniales y bioquímicos y los resultados obtenidos demostraron que el comportamiento de las bacterias en presencia del metal dependió del medio del cual las bacterias fueron aisladas. *Hafnia alvei*, aislada de un medio natural contaminado con plomo (1.2 ppm) y cromo (2.3 ppm), constituyó la cepa bacteriana que presentó mayor tolerancia a la exposición a concentraciones crecientes de plomo en el medio de cultivo. Lo anterior se reflejó en su comportamiento a lo largo de todos los parámetros determinados en este trabajo.

Se iniciaron los estudios de determinación de la presencia de las proteínas y se observaron algunas de las bandas proteicas en las bacterias, mismas que correspondieron al peso molecular de las proteínas de cuerpos de inclusión (32 KDa). La presencia de las bandas proteicas varió en función de la cepa y la dosis de plomo utilizada.

Este trabajo constituye un aporte al conocimiento del efecto del plomo en tres cepas bacterianas de las que no se tienen antecedentes sobre su comportamiento ante la presencia de este agente tóxico. Los resultados obtenidos nos podrán ayudar a comprender como el plomo puede ocasionar daños a las células bacterianas y como las células responderán ante el rompimiento de su homeostasis ocasionado por la presencia de este metal. Por ello este trabajo tiene el valor de constituir la primera parte de un estudio que pretende comprobar la hipótesis de que las proteínas de estrés (como las que se expresan en los cuerpos de inclusión) podrían constituir un mecanismo de defensa bacteriano contra la intoxicación con plomo.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIAS	III
RESUMEN	IV
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE GRAFICAS	VIII
I.- INTRODUCCION	1
1.2.- METALES PESADOS	3
1.3.-EFECTOS DE METALES PESADOS EN LAS CÉLULAS	6
1.4.- RESPUESTA CELULAR ANTE LA PRESENCIA DE METALES PESADOS	8
1.5.- ALGAS Y METALES PESADOS: UN EJEMPLO DE MECANISMO DE RESISTENCIA	19
1.6.- CONTAMINACIÓN E INTOXICACIÓN POR PLOMO	25
II.- ANTECEDENTES	32
2.1.- TOXICIDAD DE METALES PESADOS EN BACTERIAS	32
2.2.- MECANISMOS DE ENTRADA Y SALIDA DE METALES EN CÉLULAS BACTERIANAS	33
2.3.- RESISTENCIA A METALES PESADOS EN BACTERIAS	37
2.4 RESISTENCIA A PLOMO EN BACTERIAS	45
2.5 IONES METÁLICOS GENERADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN BACTERIAS	46
2.5.1 DEFENSA CONTRA ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>E. coli</i>	48
2.5.2 DEFENSA CONTRA PERÓXIDO DE HIDROGENO EN <i>E. coli</i>	52
2.6 LA IMPORTANCIA DE LA GST EN LAS BACTERIAS	52
III.- JUSTIFICACION	57
IV.- HIPOTESIS	59
V.- OBJETIVOS	60
VI.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	61
6.1 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS	61
6.1.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	61
6.1.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS	61
6.2 CULTIVO DE MICROORGANISMOS	62
6.3 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE COLONIAS BACTERIANAS SENSIBLES Y RESISTENTES A PLOMO MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS	63
6.3.1. CALDO ROJO DE FENOL MÁS SACAROSA	63

6.3.2. AGAR DE HIERRO TRIPLE AZUCAR (TSI)	67
6.3.3. VOGUES-PROSKAUER (VP)	67
6.3.4. ROJO DE METILO (RM)	68
6.3.5. CITRATO DE SIMMONS (CS)	68
6.3.6. MALONATO	69
6.3.7. DESAMINACIÓN DE LISINA (LIA)	69
6.3.8. MOVILIDAD, INDOL, ORNITINA (MIO)	70
6.3.9. MOVILIDAD, INDOL, SULFUROS (SIM)	70
6.3.10. PRUEBA DE LA CATALASA	70
6.3.11. PRUEBA DE LA OXIDASA	71
6.3.12. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN	71
6.3.13. LICUEFACCIÓN DE LA GELATINA	71
6.3.14. MEDIO DE CULTIVO MÁS 7% de NaCl	71
6.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	72
6.5 ENSAYOS CON PLOMO	72
6.5.1 CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA	73
6.5.2 SELECCIÓN DE COLONIAS SENSIBLES Y TOLERANTES A PLOMO	73
6.6 EXAMEN MICROSCÓPICO	74
6.7 ENSAYOS BIOQUÍMICOS	74
6.7.1. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓNS-TRANSFERASA (GST)	74
6.7.2. MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	75
6.7.3. ELECTROFORESIS	75
VII.- RESULTADOS	74

7.1 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS Y ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LAS MUESTRAS	74
7.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA PARA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS	76
7.3 SELECCIÓN DE COLONIAS QUE CRECIERON EN MEDIOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO	77
7.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICO-MICROBIOLÓGICA DE COLONIAS BACTERIANAS RESISTENTES A PLOMO	78
7.5 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO	83
7.6 CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO	86
7.6.1 ANÁLISIS MICROSCÓPICOS DE LAS COLONIAS RESISTENTES A PLOMO	90
7.7 ENSAYOS BIOQUÍMICOS	93
7.7.1 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A PLOMO EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	93
7.7.2 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATION S-TRANSFERASA (GST)	100
7.7.3 MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	100
7.7.4 ELECTROFORESIS	114
VII.- DISCUSION DE RESULTADOS	120
IX.- CONCLUSIONES	129
X.- PERSPECTIVAS	131
XI.- PARTICIPACION EN CONGRESOS Y ESTANCIAS	132
XII.- BIBLIOGRAFIA	133
XVIII APENDICES	146

LISTA DE TABLAS

1.- Factores que inducen la síntesis de metalotioneínas	10
2.- Sistemas de defensa contra el daño oxidativo	14
3.- Efectos tóxicos de los metales pesados en las algas	22
4.- Actividad antioxidante en <i>Escherichia coli</i>	53
5.- Lugares donde se llevará a cabo la recolección de muestras de agua.....	61
6.- Preparación de los geles para electroforesis	72
7.- Ubicación del lugar de recolección de las muestras	74
8.- Análisis microscópico de las muestras de agua de afluentes del río Papaloapan y lugares cercanos	75
9.- Determinación de metales pesados de las muestras de agua a utilizar.....	76
10.- Selección de colonias tolerantes a plomo en placa de acuerdo a sus características	78
11.- Resultados pruebas bioquímicas	79
12.- Imágenes de la pruebas bioquímicas	80
13.- Determinación bacteriana a partir de resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas	82
14.- Concentración mínima inhibitoria a partir de crecimiento bacteriano en tubos con caldo nutritivo más concentraciones crecientes de plomo a partir de turbidez	87
15.- Crecimiento de las bacterias en caldo nutritivo más concentraciones crecientes de plomo	88
16.- Crecimiento bacteriano en placas con agar nutritivo más concentraciones crecientes de plomo	89
17.- Crecimiento macroscópico de las diferentes cepas bacterianas en placas más concentraciones crecientes de plomo	90
18.- Características de las colonias seleccionadas como resistentes a diferentes concentraciones de plomo	91
19.- Efecto de la exposición a plomo en las cepas estudiadas.....	100

LISTA DE FIGURAS

1.-	Tabla periódica de elementos químicos.....	4
2.-	Arroyo Moctezuma San Juan Bautista Tuxtepec.....	5
3.-	Daño generado por metales pesados en el riñón.....	8
4.-	Motivo estructural de la metalotioneína dividida en dos dominios α y β	9
5.-	Motivo estructural de la fitoquelatina.....	9
6.-	Biosíntesis de fitoquelatinas.....	11
7.-	Reacciones en las que se generan especies reactivas de oxígeno a partir de iones metálicos.....	12
8.-	Estructura de la vitamina C o ácido L-ascórbico.....	15
9.-	Estructura química de los tocoferoles y los tocotrienos.....	16
10.-	La vitamina A, conocida también como retinol.....	17
11.-	La vitamina D ₂ o ergocalciferol.....	17
12.-	Mecanismos de interacción entre los metales pesados y microorganismos.....	19
13.-	Efectos directos e indirectos de la exposición a plomo en seres vivos	29
14.-	ATPasas transportadoras de iones metálicos en <i>Escherichia coli</i>	35
15.-	ATPasas tipo P microbianas transportadoras de metales.....	37
16.-	Captación y flujo de salida del cadmio en <i>Staphylococcus aureus</i>	39
17.-	Proteínas para el transporte de cobre, resistencia en <i>Pseudomonas</i> y <i>E. coli</i>	40
18.-	Mecanismo de resistencia bacteriana a Hg.....	43
19.-	Transporte y toxicidad del Cromato en la célula bacteriana.....	45
20.-	Árbol filogenético construido usando miembros representativos de todas las clases de GST conocidas.....	47
21.-	Estructura del proyecto general de investigación “Fenómenos de la intoxicación con plomo y las proteínas de cuerpos de inclusión PCI	54
22.-	Sembrado de colonias bacterianas en placa.....	57
23.-	Extendido de frotis bacteriano.....	62
24.-	Crecimiento en diferentes concentraciones de plomo.....	63
25.-	Crecimiento de <i>Bacillus</i> em diferentes médios com diferentes concentraciones de plomo.....	92
26.-	Análisis microscópico de los frotis bacterianos de <i>Bacillus</i> <i>pumillus</i>	92
27.-	Gel 1, <i>Hafnia alvei</i> , más concentraciones crecientes de plomo.....	114
28.-	Gel 2, <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) más concentraciones crecientes de plomo.....	116
29.-	Gel 3, <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) más concentraciones crecientes de plomo.....	117
30.-	Gel 4, Corrimiento electroforético comparación de las tres cepas.....	118
31.-	Corrimiento electroforético en <i>Hafnia alvei</i> , <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) y <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuesta a 5.66 mM de plomo en función del tiempo.....	119

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Cinética de crecimiento de <i>Hafnia alvei</i> (Gráfica representativa de 2 exposiciones).....	83
Gráfica 2. Cinética de crecimiento de <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) (Gráfica representativa de 2 exposiciones).....	84
Gráfica 3. Cinética de crecimiento de <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) (Gráfica representativa de 2 exposiciones).....	85
Gráfica 4. Comparación de la cinética de crecimiento de las colonias (Grafica representativa de 2 exposiciones).....	86
Gráfica 5. Concentración de proteínas totales en <i>Hafnia alvei</i> (Papaloapan 1) sin exposición a Pb (n=3) en función del tiempo.....	94
Gráfica 6. Concentracion de proteínas totales en <i>Hafnia alvei</i> expuesta a 0.32 mM de Pb (n=3) en función del tiempo.....	94
Gráfica 7. Concentración de proteínas totales en <i>Hafnia alvei</i> expuesta a 0.629 mM de plomo en función del tiempo.....	94
Gráfica 8. Concentración de Proteínas totales en <i>Hafnia alvei</i> expuesta a 1.95 mM de plomo en función del tiempo.....	94
Gráfica 9. Concentración de proteínas totales en <i>Hafnia alvei</i> expuesta a 5.66 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	95
Gráfica 10. Concentración de proteínas totales en <i>Hafnia alvei</i> expuesta a 6.59 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	95
Gráfica 11. Concentracion de proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) sin exposición a Pb en función del tiempo (n=3).....	96
Grafica 12. Concentración de proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) expuesto a 0.32 mM de Pb en función del tiempo (promedio de 2 mediciones).....	96
Gráfica 13. Proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) expuesto a 0.629 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	96
Gráfica 14. Proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) expuesto a 1.95 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	96

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 15. Concentración de proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) expuesto a 5.66 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	97
Gráfica 16. Concentración de Proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) expuesto a 6.59 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	97
Gráfica 17. Proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) sin exposición a Pb en función del tiempo (n=3).....	98
Gráfica 18. Proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuestas a 0.32 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	98
Gráfica 19. Concentración de proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuestas a 0.629 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	99
Gráfica 20. Concentraciones de proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuestas a 1.95 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	99
Gráfica 21. Proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuestas a 5.66 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	99
Gráfica 22. Proteínas totales en <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuestas a 6.59 mM de Pb en función del tiempo (n=3).....	99
Gráfica 23. Actividad GST en la cepa <i>Hafnia alvei</i> sin exposición a Pb (n=3 y n=2 respectivamente).....	101
Gráfica 24. Actividad GST en la cepa <i>Hafnia alvei</i> más concentraciones crecientes de plomo (n=3).....	101
Gráfica 25. Actividad GST en la cepa <i>Hafnia alvei</i> más 0.32 mM de Pb (n=3 y n=2 respectivamente).....	102
Gráfica 26. Actividad GST en la cepa <i>Hafnia alvei</i> más 0.629 mM de Pb (n=3 y n=2 respectivamente).....	102
Gráfica 27. Actividad GST en la cepa <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) sin exposición a Pb (n=3 y n=2 respectivamente).....	103
Gráfica 28. Actividad GST en la cepa <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) más concentraciones crecientes de plomo (n=3).....	103

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 29. Actividad GST en la cepa <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) más 0.32 mM de Pb (n=3 y n=2 respectivamente).....	103
Gráfica 30. Actividad GST en la cepa <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) más 0.629 mM de Pb (n=3 y n=2 respectivamente).....	103
Gráfica 31. Actividad GST en la cepa <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) sin exposición a Pb (n=3 y n=2 respectivamente).....	104
Gráfica 32. Actividad GST en la cepa <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuesta a concentraciones crecientes de plomo (n=3).....	104
Gráfica 33. Actividad GST en la cepa <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) más 0.32 mM de Pb en función del tiempo (n=3 y n=2 respectivamente).....	104
Gráfica 34. Actividad GST en la cepa <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) más 0.629 mM de Pb en función del tiempo (n=3 y n=2 respectivamente).....	104
Gráfica 35. Comparación de las 3 cepas sin exposición a plomo (n=3).....	105
Gráfica 36. Comparación de las 3 cepas expuestas a 0.32 mM de plomo (n=3).....	105
Gráfica 37. Comparación de las 3 cepas expuestas a 0.629 mM de plomo (n=3)....	106
Gráfica 38. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en <i>Hafnia alvei</i> sin exponer a plomo.....	107
Gráfica 39. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Hafnia alvei</i> en presencia de concentraciones crecientes de plomo (n=3).....	107
Gráfica 40. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en <i>Hafnia alvei</i> en presencia de 0.32 mM de plomo (n=3).....	107
Gráfica 41. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en <i>Hafnia alvei</i> crecidas en medio más 0.629 mM de plomo (n=3).....	107
Gráfica 42. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Bacillus Pumillus</i> (Playa de mono) sin exposición a plomo.....	108
Gráfica 43. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) más concentraciones crecientes de plomo.....	108
Gráfica 44. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Bacillus Pumillus</i> (Playa de mono) expuesta a 0.32 mM.....	109

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 45. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono) expuesta a 0.629 mM.....	109
Gráfica 46. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) sin exposición a plomo plomo (n=3).....	110
Gráfica 47. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) en presencia de concentraciones crecientes de plomo (n=3)....	110
Gráfica 48. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuestas a 0.32 mM de plomo en función del tiempo (n=3)....	110
Gráfica 49. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria <i>Bacillus pumillus</i> (Eco) expuestas a 0.629 mM de plomo (n=3).....	110
Gráfica 50. Comparación de especies reactivas ácido tiobarbitúrico en las tres cepas, sin exposición a plomo.....	111
Gráfica 51. Comparación de especies reactivas de oxígeno en las tres colonias bacterianas expuestas a 0.32 mM de plomo.....	111
Gráfica 52. Comparación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en las tres colonias bacterianas expuestas a 0.629 mM.....	112

I. INTRODUCCION

1.1.- LA CONTAMINACIÓN Y LOS METALES PESADOS.

El término contaminación ambiental era desconocido como tal hasta hace algunas décadas, actualmente se le reconoce como un término que engloba todas las formas que el ser humano ha desarrollado para dañar el medio en el cual habita. Los agentes contaminantes son todos aquellos elementos, compuestos o sustancias que no tienen un papel funcional en los seres vivos y su clasificación puede hacerse dependiendo de sus características físicas, químicas y biológicas. Entre los agentes que contaminan al medio ambiente se encuentran los metales pesados. Se ha calculado que la contaminación mundial anual por metales pesados excede a la contaminación combinada por desechos radiactivos y orgánicos (Nriagu-Pacyna, 1988).

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos es estrictamente dependiente de la capacidad de formación de complejos entre éstos y los componentes del medio así como su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno. Los metales pesados constituyen especies químicas no biodegradables, por tal motivo una vez presentes en el medio ambiente, pueden distribuirse en aire, agua y suelo. Muchas veces los metales cambian su estado de oxidación sedimentando en los lodos, o incorporándose a los seres vivos. Los procesos de adsorción y formación de complejos en medios naturales son responsables de que la mayor parte de metales pesados se acumulen en los sólidos en suspensión incorporándose, rápidamente, a los sedimentos donde se presentan los mayores niveles de concentración de estos contaminantes. Como resultado de las interacciones anteriores, los sedimentos juegan un papel muy importante en la regulación de la calidad del agua. Por su parte las aguas intersticiales en contacto directo con los sedimentos actúan como fuente o sumidero de estos contaminantes y en ellas se observan concentraciones intermedias entre las aguas superficiales y los sedimentos (Vullo, 2003).

I. INTRODUCCION

Debido a lo anterior, las características físicas o químicas del agua podrían sufrir un cambio perjudicial el cual influiría nocivamente en el desarrollo de la vida en la biósfera (Manahan, 2007). El aire y la tierra cursan por la misma situación, debido a la existencia de los ciclos biogeoquímicos, los cuales funcionan al interrelacionarse entre sí.

Lo anterior implica que el problema de contaminación ambiental y todos los daños que esta ocasiona conforman un tema de gran importancia, por lo cual su estudio ha incrementado con el paso del tiempo.

La contaminación ambiental es un fenómeno que afecta directa e indirectamente la salud de las poblaciones al alterar el equilibrio de los ecosistemas. Sin embargo actualmente se sabe que la mayoría de los organismos pueden residir en áreas donde la contaminación ambiental es superior a los límites establecidos como saludables ya que, muchos de ellos, han adquirido la capacidad de adaptarse y desarrollar tolerancia a las concentraciones existentes de los distintos contaminantes, entre ellos los metales pesados. Lo anterior se encuentra determinado, en su mayoría, por componentes genéticos que pueden conferir propiedades de tolerancia, mismas que se manifiestan en forma de diferentes procesos celulares y bioquímicos cuya finalidad es disminuir la concentración de los elementos tóxicos.

Los mamíferos y las plantas constituyen sistemas biológicos complejos que están organizados en diversos niveles, desde el molecular-celular hasta el conformado por fluidos, tejidos y órganos. Todos constituyen sistemas abiertos, los cuales intercambian materia y energía con su medio ambiente a través de numerosas reacciones bioquímicas que se encuentran en un estado estacionario dinámico dentro de la célula. Cuando este estado se pierde, como consecuencia de la exposición a diversos agentes tóxicos (como los metales pesados), la célula trata de disminuir la concentración de los mismos.

I. INTRODUCCION

Uno de los mecanismos de defensa celular más estudiados relacionado con la exposición a metales pesados es la interacción de éstos con macromoléculas proteicas como las metalotioneínas (Silbergeld, 2000) y las fitoquelatinas (Herranz, 2010).

Los microorganismos de vida libre, también pueden presentar tolerancia a metales pesados. Uno de los ejemplos más estudiados lo constituye *Euglena gracilis* un protista de vida libre que puede desarrollar mecanismos de tolerancia a concentraciones altas de cadmio, mercurio y plomo, entre otros metales, ya que es capaz de desarrollar resistencia a concentraciones tóxicas de estos elementos, empleando diferentes mecanismos como la inducción de fitoquelatinas (proteínas ricas en grupos sulfhídrico) que pueden unir concentraciones elevadas de cadmio (Navarro, 1995).

Lo anterior refleja la elevada preocupación por la presencia de contaminantes químicos en el medio ambiente mismos que pueden incluir compuestos orgánicos e inorgánicos procedentes de fuentes industriales, agrícolas y de desechos urbanos.

En el presente trabajo nos enfocaremos al problema de contaminación del agua reflejado como el efecto del plomo sobre el metabolismo de bacterias aisladas de diferentes efluentes de la Cuenca del Papaloapan, México.

1.2.- METALES PESADOS.

Se definen como “metales pesados” aquellos elementos químicos que presentan una densidad mayor a la del agua (1.8 g/ml) cuando están en forma elemental o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos).

I. INTRODUCCION

Por lo general estos metales resultan tóxicos a los seres vivos debido a que no presentan ningún papel celular que contribuya al mantenimiento de la integridad de las funciones que definen la vida. En general se trata de elementos cuyo aumento en el medio ambiente es consecuencia de las actividades (industrial y minera principalmente) del hombre, quien los extrae del subsuelo o los produce en exceso desechándolos al ambiente de manera no controlada. En menor porcentaje, el exceso de elementos metálicos puede deberse a fenómenos geológicos (Ndzangou, 2005). La figura 1 muestra los metales pesados más estudiados los cuales originan perturbaciones y pérdida del equilibrio natural. En menor porcentaje, el exceso de elementos metálicos puede deberse a fenómenos geológicos. En las últimas décadas se ha incrementado la contaminación de la atmósfera, los ríos, los océanos y los suelos por metales pesados como consecuencia de la actividad industrial, la explotación minera y el desecho de pilas alcalinas al medio ambiente (Carabias, 1999).

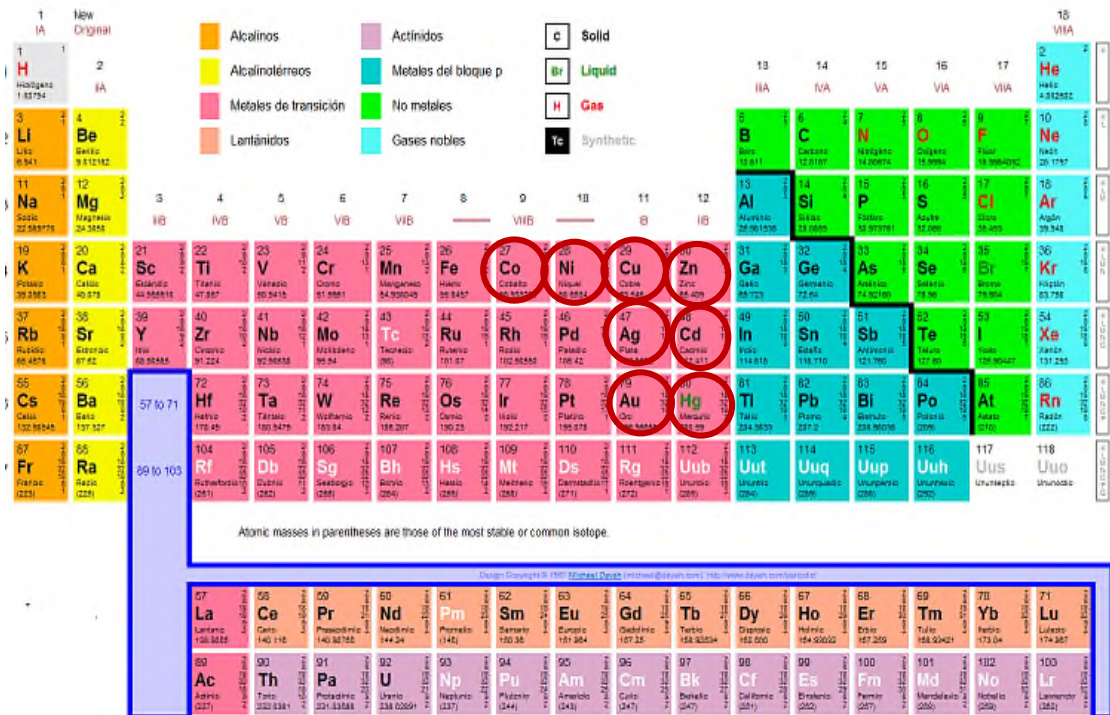


Figura 1. Tabla periódica de elementos químicos (los círculos señalan los metales pesados más estudiados) (www.ptable.com, 2012).

I. INTRODUCCION

Particularmente, en la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, localidad donde se realizó este trabajo, se ha incrementado la contaminación del importante caudal del río Papaloapan, el cual forma la segunda cuenca hidrológica del país, mismo que atraviesa esta localidad. Lo anterior se debe a la alta actividad industrial y la mala disposición de los desechos orgánicos e inorgánicos. Además, las aguas negras del arroyo Moctezuma (figura 2), el cual recoge los desechos de casas habitación y hospitales, llegan a este importante caudal, aumentando el grado de contaminación por incremento de sustancias tóxicas. Se han detectado metales pesados como mercurio (Hg), plomo (Pb) y cadmio (Cd) en muestras de agua de este arroyo.



Figura 2. Arroyo Moctezuma localizado en la zona centro de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca (acervo personal).

Debido al exceso de los metales pesados en la naturaleza, estos pueden incorporarse a los organismos mediante absorción ya sea por vía cutánea, respiratoria o gastrointestinal. Una vez dentro de la célula pueden competir con metales esenciales y ocasionar alteraciones estructurales y funcionales en muchas macromoléculas vitales (Calderon, 2008).

Según Nieboer y Richardson (1980), los metales pueden dividirse en tres clases de acuerdo con su reactividad con los grupos funcionales de las biomoléculas. Estas clases se mencionan a continuación.

I. INTRODUCCION

- ❖ Clase A: Metales que reaccionan con el oxígeno (O₂), como el aluminio (Al), el calcio (Ca), el estroncio (Sr) y el bario (Ba).
- ❖ Clase B: Metales que reaccionan con el azufre (S), como el cobre (Cu), el mercurio (Hg) y la plata (Ag).
- ❖ Clase C: Se encuentran los metales con afinidad intermedia como el hierro (Fe): el cobalto (Co), el níquel (Ni), el zinc (Zn), el antimonio (As), el cadmio (Cd), el plomo (Pb), y el cobre (Cu).

Para la mayoría de los seres vivos la exposición a niveles bajos o elevados de metales pesados (entre los que se pueden mencionar cadmio, mercurio, cromo, níquel y plomo) puede resultar extremadamente tóxica. Estos metales pueden formar iones metálicos con valencias de 1⁺ a 3⁺. Estas especies son las que resultan extremadamente tóxicas y suelen entrar a la célula a través de los mismos sistemas de captación que utilizan los iones metálicos fisiológicamente importantes como calcio, magnesio, cobre y zinc (Moreno-Sánchez, 1999).

1.3.-EFECTOS DE METALES PESADOS EN LAS CÉLULAS.

Los metales pesados (por ejemplo cadmio, mercurio, cromo y plomo) desencadenan fenómenos citotóxicos debido a que por lo general este tipo de elementos no son requeridos para ninguna función biológica (Valle, 1972). En los organismos vivos, los efectos de la exposición a metales pesados se pueden manifestar en cualquiera de los diferentes niveles de organización biológica incluyendo macromoléculas, organelos subcelulares, células, tejidos, sistemas y organismos completos. Lo anterior origina que entre los principales daños ocasionados por la exposición a metales pesados; ya sea como contaminantes únicos o formando mezclas, se encuentren: la alteración de la estructura y función de las proteínas, el estrés oxidativo y el daño al material genético (Walter, 2001; Gordon, 2000).

I. INTRODUCCION

La intensidad del daño depende, entre otros factores, de las características fisicoquímicas del metal en cuestión y de las propias del organismo afectado. Entre las primeras se incluyen el estado físico, las propiedades iónicas y moleculares (entre las que se encuentran el tamaño del ión, la geometría, el estado de oxidación y la electronegatividad) así como la reactividad (misma que se refleja como la tendencia a formar enlaces covalentes o enlaces iónicos; la formación de complejos y su estabilidad, así como la formación de radicales), la solubilidad y el tamaño de partícula. De la misma manera influyen algunos fenómenos biológicos como la compartimentalización, la biodisponibilidad, el tiempo de residencia biológica y la resistencia del huésped (Nieboer, 1996).

Todo lo anterior ha determinado la relevancia del estudio del efecto de los metales dentro de los diferentes niveles de organización celular incluyendo microorganismos, plantas, animales y humanos. Como ejemplo de lo anterior, se puede mencionar que cuando algunas sales de metales son ingeridas por mamíferos, estas se absorben por el organismo preferentemente por las vías digestiva y respiratoria, acumulándose fácilmente y afectando principalmente los sistemas gastrointestinal, nervioso, muscular y renal. A su vez se ha observado que pueden existir diferentes formas de daño originadas por exposición a metales pesados. Uno de los casos más estudiados lo constituye el riñón, órgano donde los metales pueden dañar la estructura de los túbulos proximales generando cambios morfológicos que se caracterizan por la degeneración de las células epiteliales ocasionando, en la mayoría de los casos, falla renal caracterizada por filtración glomerular disminuida, fibrosis intersticial y alteraciones vasculares severas (Figura 3).

I. INTRODUCCION

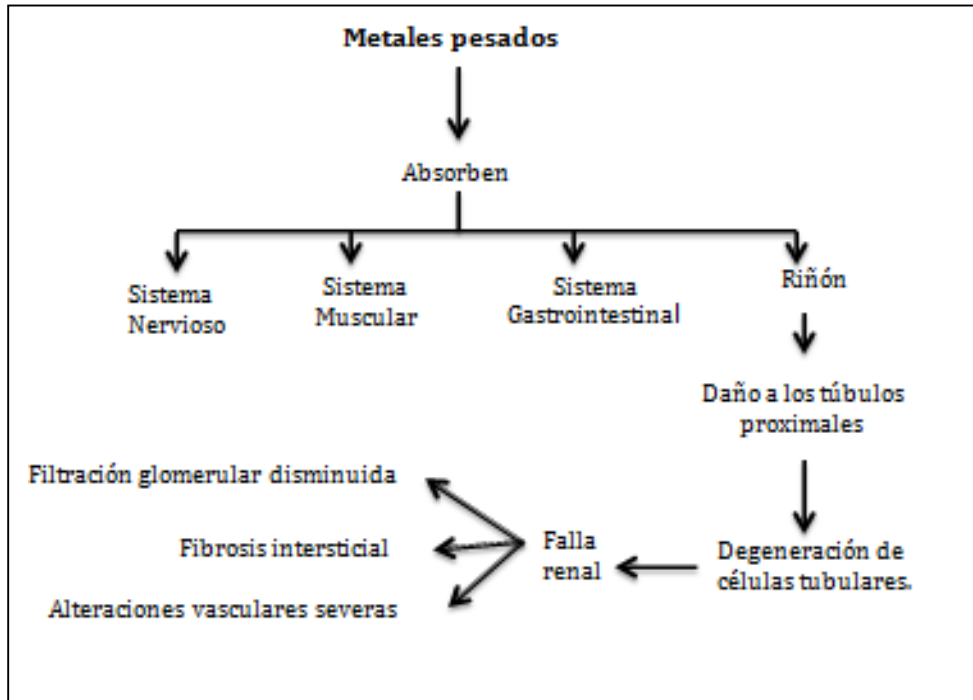


Figura 3. Daño generado por metales pesados en el riñón. (Modificado de Diamond, 1998)

1.4.- RESPUESTA CELULAR ANTE LA PRESENCIA DE METALES PESADOS.

A) HUMANOS, ANIMALES Y PLANTAS.

En general muchas de las respuestas que desencadenan las células expuestas a metales pesados tienen como principal objetivo reducir la concentración de los mismos, en forma de iones libres, con el fin de prevenir o limitar sus interacciones con macromoléculas biológicas sensibles. Uno de los mecanismos de protección celular más estudiada está relacionado con la disminución de la concentración de los metales tóxicos en forma de iones. Este mecanismo se ha asociado con un fenómeno caracterizado por unión de estos elementos a pequeñas moléculas de naturaleza diversa, cuya estructura les confiere propiedades de quelación. De la misma manera, los metales se pueden unir a macromoléculas funcionales como las proteínas.

I. INTRODUCCION

En cualquiera de los casos se tiene como resultado ya sea la acumulación intracelular o la excreción de complejos ión-quelante. Se ha observado que muchos de los compuestos quelantes adquieren esa característica debido a su composición molecular, sin que necesariamente su función normal se involucre en los procesos de detoxificación. Por otro lado existen mecanismos bien definidos cuyo papel es, precisamente, la protección celular. Bajo este contexto varios estudios en células de mamíferos han demostrado que uno de los mecanismos de defensa celular, más común durante la intoxicación por metales pesados, es su unión con diversas proteínas. Como principales ejemplos de este mecanismo de secuestro proteico se encuentran las metalotioneínas (MT) (Figura 4) sintetizadas por células de animales y las fitoquelatinas (FQ) (Figura 5) sintetizadas por plantas y algunos microorganismos como las algas verdes. Ambas tienen la propiedad de ser inducidas cuando hay presencia de iones como zinc o cadmio y ambas poseen una vía de síntesis celular, la cual se encuentra perfectamente regulada (Moreno-Sánchez, 1999). Lo anterior no implica que solo existan dos proteínas, ya que se han encontrado otras proteínas implicadas en diversos mecanismos de defensa celular contra metales pesados, como se explica a continuación.

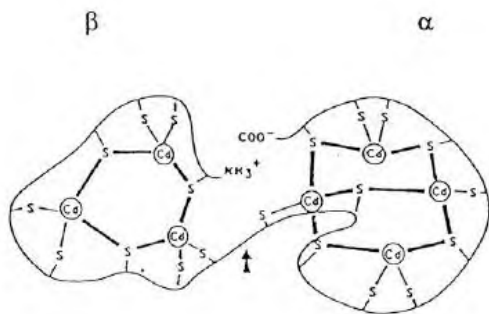


Figura 4. Motivo estructural de la metalotioneína dividida en dos dominios α y β (Tomado de Kägi y Kojima, 1987).

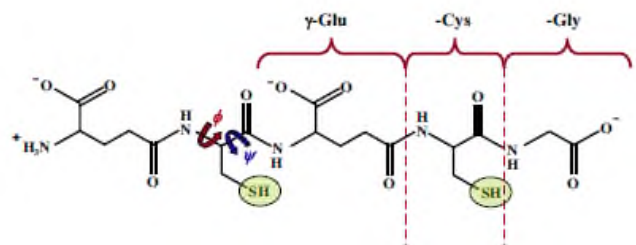


Figura 5. Motivo estructural de la fitoquelatina. Se indican los ángulos que conforman un plano peptídico y los grupos sulfhídrico (Tomado de Herranz, 2010).

I. INTRODUCCION

La vía de síntesis de las metalotioneínas (MT) se induce a nivel transcripcional y las células seleccionadas para tolerancia a metales pesados pueden presentar amplificación de los genes para estas proteínas. Lo anterior se puede originar por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen ciertos metales, hormonas, toxinas y el estrés, siendo los primeros los inductores más potentes, la tabla 1 muestra algunos factores que inducen la síntesis de metalotioneínas.

En mamíferos, la síntesis de la proteína se induce durante el desarrollo normal y la diferenciación, pero también puede inducirse por estrés oxidativo, mientras que este proceso en microorganismos depende de la especie. Por ejemplo en los hongos el cobre parece ser el único metal inductor de metalotioneínas (Ureña, 2007).

Tabla 1. Factores que inducen la síntesis de metalotioneínas (Tomado de Ureña, 2007).

Factores	Ejemplos
Iones metálicos	Cd, Zn, Mg, Hg, Pb, Cr, Bi, Ni, Ag, Co.
Factores de estrés	Temperaturas elevadas, exposición a radiación X y UV, elevada presión parcial de O ₂ , falta de alimento, infección, estrés físico, hipotermia, alteración de la salinidad.
Hormonas y mensajeros secundarios	Glucocorticoides, progesterona, estrógeno, insulina, glucagón, adenosina, Adenina Monofosfato cíclica (AMPc), diacilglicerol.
Agentes inflamatorios	Lipopolisacáridos, dextrano, endotonina.
Agentes citotóxicos	Etanol, butirato, agentes alquilantes, ácidos grasos, cloroformo, tetracloruro de carbono, formaldehido, etionina, uretano, D-penicilamina, estradiol.

La biosíntesis de las fitoquelatinas (FQ) se lleva a cabo en el citoplasma y se inicia al adicionar unidades γ -glutamil-cisteína a glutatión. La presencia de uniones γ -carboximida implica que este enlace no se sintetiza directamente vía ARNm y por ello no se pueden usar los oligonucleótidos de su secuencia para reconocer los genes que originan la síntesis. El proceso requiere de las mismas enzimas que la síntesis de glutatión. La γ -glutamilcisteína sintetasa se inhibe con butionina sulfoximina. En la segunda etapa de la biosíntesis, el glutatión puede ser sustituido por homoglutatión en algunas especies.

I. INTRODUCCION

La enzima $(\gamma\text{-Glu-Cis})_n\text{-Gli}$ sintetasa, o fitoquelatina sintetasa, adiciona residuos $\gamma\text{-Glu-Cis}$ a la cadena ya formada, de este modo las células con más glutatión que $(\gamma\text{-Glu-Cis})_2\text{-Gli}$ producirán más $(\gamma\text{-Glu-Cis})_2\text{-Gli}$, mientras que aquellas que tienen $(\gamma\text{-Glu-Cis})_2\text{-Gli}$ en mayor proporción que el glutatión, elaboran más $(\gamma\text{-Glu-Cis})_3\text{-Gli}$ (Rauser, 1990). La figura 6 muestra la ruta de biosíntesis de las fitoquelatinas.

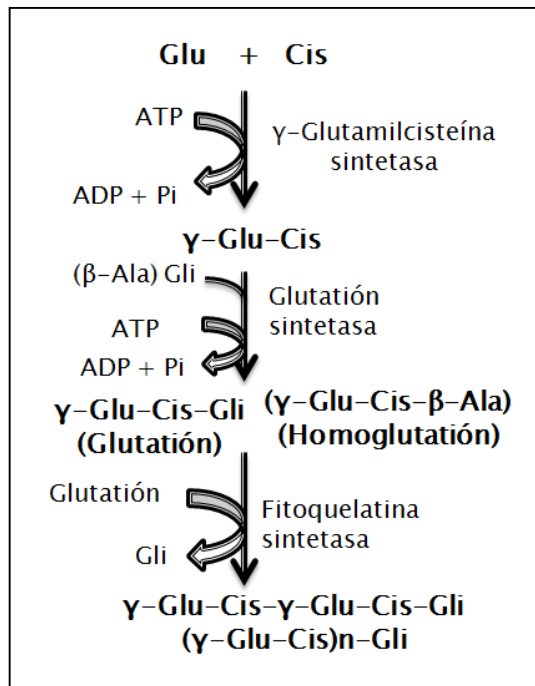


Figura 6. Biosíntesis de fitoquelatinas (Modificado de Moreno-Sánchez, 1999).

Cuando los iones metálicos entran a la célula y no existen mecanismos para eliminarlos, ocurrirán los daños celulares. Entre ellos se encuentra la generación de estrés oxidativo mismo que es desencadenado por un gran número de iones metálicos. Estos pueden llevar a cabo reacciones tipo Fenton y por ello dar origen a la producción de especies reactivas de oxígeno. La figura 7 muestra las reacciones por medio de las cuales se generan especies reactivas de oxígeno a partir de iones metálicos.

I. INTRODUCCION

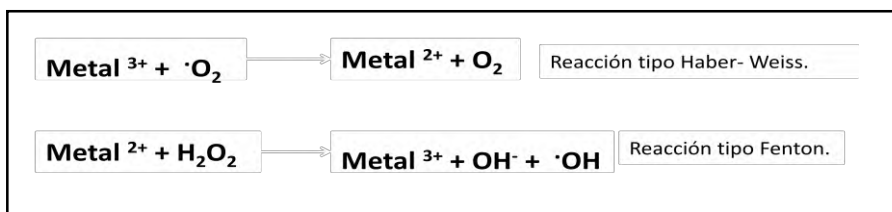


Figura 7. Reacciones en las que se generan especies reactivas de oxígeno a partir de iones metálicos (Tomado de Birben, 2012).

Las metalotioneínas, son proteínas pequeñas, con alto contenido de grupos sulfhidrilo. Por esta razón se han convertido en buenos agentes quelantes de iones metálicos, ya sea de los llamados biometales (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+}) como de los metales tóxicos (Cd^{2+} , Cr^{3+} , As^{2+}). Estas proteínas evitan la participación de los metales señalados en reacciones tipo Fenton y Haber-Weiss (Birben, 2012).

Dentro de los mecanismos antioxidantes proteicos se encuentran también las proteínas con acción enzimática directa sobre los radicales libres y proteínas cuya función no incide dentro del metabolismo del estrés oxidativo, pero que su naturaleza les confiere una participación como defensas antioxidantes indirectas.

Las proteínas que poseen actividad enzimática se consideran la defensa primaria contra los radicales libres (RL), puesto que se localizan intracelularmente en los sitios de producción de estas especies. Dentro de este grupo se encuentran la Superóxido dismutasa, enzima que transforma al radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogeno (H_2O_2); la Catalasa, que transforma H_2O_2 , en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) y la Glutación peroxidasa, que en conjunto con el glutatión elimina al H_2O_2 transformándolo en agua y oxidando consecuentemente al glutatión.

Entre las proteínas que no presentan actividad catalítica se encuentran las siguientes.

I. INTRODUCCION

La melatonina es una molécula que constituye el principal producto de la glándula Pineal la cual participa dentro de muchas funciones fisiológicas debido a su eficacia como depurador de radicales libres y antioxidante indirecto (Reiter, 2001; Tan, 2002; Allegra, 2003; Reiter, 2003). Este compuesto atraviesa fácilmente las membranas biológicas debido a su pequeño tamaño y su lipofilidad, llegando así a todos los compartimentos de la célula. La melatonina también ha demostrado ser un protector eficaz del ácido desoxirribonucleico (ADN) (López-Burillo, 2003.), proteínas y lípidos en la membrana celular (Melchiorri, 1995., Cuzzocrea-Reiter, 2001), así como un antagonista de un gran número de radicales libres endógenos y exógenos durante diversos procesos celulares (Zheng, 1995).

La albúmina es la responsable de más del 35% de la actividad antioxidante del plasma. Su actividad se basa principalmente en la capacidad de unir iones de metales de transición (principalmente los cúpricos y férricos).

La ferritina es el almacén principal del hierro y se encuentra en casi todas las células del cuerpo humano. La ceruloplasmina es el almacén y transporte del cobre celular. La función de estas proteínas, es evitar que los iones de los biometales de transición (Fe^{3+} y Cu^{2+}) participen en reacciones tipo Fenton, que promueven el estrés oxidativo, de acuerdo con las reacciones indicadas en la figura 7.

Adicionalmente los organismos cuentan con defensas antioxidantes exógenas. Dentro de estas se pueden mencionar un grupo de vitaminas conocidas por las letras C, E, A y D. Estas moléculas actúan neutralizando a los radicales libres, retardando los síntomas de envejecimiento y previniendo el desarrollo de enfermedades de tipo crónico degenerativo. Las características de cada una se mencionan en la tabla número 2.

I. INTRODUCCION

Tabla 2. Sistemas de defensa contra el daño oxidativo (Tomado de Morales, 2009).

Sistemas antioxidantes	Antioxidantes										
<p>1. Antioxidantes preventivos o primarios. Suprimen la formación de radicales libres por:</p> <p>a) Descomposición de hidroperóxidos o peróxido de hidrogeno.</p> <p>b) Secuestro de iones metálicos catalíticos por quelación.</p> <p>c) Remoción o depuración de especies reactivas de oxígeno (ERO)</p>	<p>Enzimas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Catalasa (Cat) - Glutación peroxidasa (GPx) <p>Proteínas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Transferrina, ferritina - Ceruloplasmina - Albúmina - Metalotioneínas <p>Enzimas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Superóxido dismutasa (SOD) 										
<p>2. Antioxidantes “atrapadores” de radicales libres. Atrapan radicales para inhibir la cadena de iniciación o romper la cadena de propagación.</p>	<table border="0"> <tr> <td>a) Hidrofílicos</td> <td>b) Lipofílicos</td> </tr> <tr> <td>- Vitamina C</td> <td>- Vitamina E</td> </tr> <tr> <td>- Ácido úrico</td> <td>- Vitamina A y carotenoides</td> </tr> <tr> <td>- Bilirrubina</td> <td>- Melatonina</td> </tr> <tr> <td>- Albúmina</td> <td>- Estrógenos</td> </tr> </table>	a) Hidrofílicos	b) Lipofílicos	- Vitamina C	- Vitamina E	- Ácido úrico	- Vitamina A y carotenoides	- Bilirrubina	- Melatonina	- Albúmina	- Estrógenos
a) Hidrofílicos	b) Lipofílicos										
- Vitamina C	- Vitamina E										
- Ácido úrico	- Vitamina A y carotenoides										
- Bilirrubina	- Melatonina										
- Albúmina	- Estrógenos										
<p>3. Enzimas reparadoras y de síntesis de <i>novo</i> o terciarios. Reparar el daño y reconstituyen las biomoléculas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Enzimas reparadoras de lípidos - Enzimas reparadoras de proteínas - Enzimas reparadoras de ADN 										

1) Vitamina C.

Es una lactona que actúa como un antioxidante natural; tiene la capacidad de donar dos electrones desde su doble enlace de tal forma que puede interactuar con los radicales libres. También actúa regenerando antioxidantes oxidados, como el α -tocoferol y el β -caroteno. La figura 8 muestra la estructura de la vitamina C.

I. INTRODUCCION

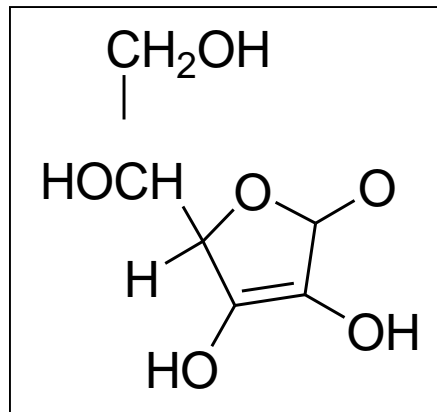


Figura 8. Estructura de la Vitamina C o ácido L-ascórbico (Tomado de Morales, 2009).

2) Vitamina E.

También conocida como α -tocoferol, es un antioxidante lipídico que actúa *in vivo*. Está formada por un grupo de 8 vitámeros. Su estructura consta de 2 partes primarias: un complejo cromano y una larga cadena lateral. Estos 8 vitámeros se dividen en 2 grupos fundamentales: 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles. Esta vitamina bloquea la reacción en cadena de oxidación de los lípidos y en concreto de los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares. Para llevar a cabo esta acción, resulta esencial que su posición se encuentre cercana a las membranas celulares. El anillo cromano es el encargado de la función antioxidante mientras que la cola es la que aporta las características de liposolubilidad y es la responsable de su posición a nivel de las membranas celulares. La figura 9 indica el anillo y la cola característicos de esta vitamina.

I. INTRODUCCION

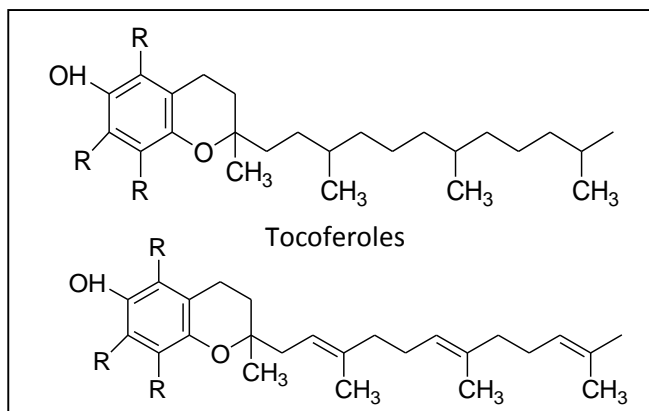


Figura 9. Estructura química de los tocoferoles y los Tocotrienoles
(Tomado de Morales, 2009)

3) Vitamina A y carotenos.

Previenen el envejecimiento celular y la aparición de cáncer, ya que eliminan los radicales libres y protegen al ADN de su acción mutagénica. El β -caroteno, además de tener la característica de convertirse, en parte, en vitamina A dentro del organismo (pro-vitamina A), es también un potente antioxidante. La figura 10 muestra su estructura.

Las vitaminas A, E y C figuran entre los principales antioxidantes así como el zinc, cromo y el selenio.

4) La vitamina D

Se produce mediante fotólisis a partir de esteroides que existen en la naturaleza. Parece tener un papel discreto pero no se debe despreciar que el sistema de defensa antioxidante este formado por casi todas las moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentran presentes en la célula y que estas a su vez tienen participación en los procesos bioquímicos de los organismos (figura 11) (Morales, 2009).

I. INTRODUCCION

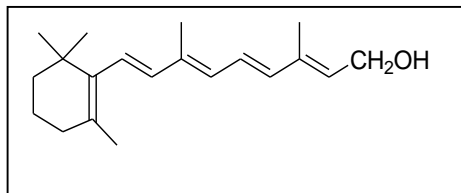


Figura 10. La vitamina A, conocida también como retinol (Tomado de Morales, 2009).

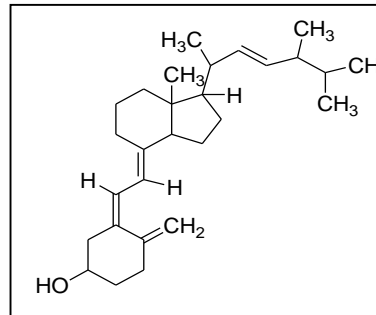


Figura 11. La vitamina D₂ o ergocalciferol (Tomado de Morales, 2009).

B) MICROORGANISMOS

En microorganismos la presencia de metales pesados suele ejercer un efecto inhibitorio en el crecimiento de los mismos pero posibilita la selección de variantes resistentes al efecto tóxico de los iones. En bacterias, por lo general, los determinantes genéticos que confieren resistencia a los iones inorgánicos se localizan en plásmidos y no en el cromosoma (Cervantes, 1991., Silver-Walderhaug, 1992). Estos plásmidos son elementos genéticos móviles que se han encontrado en la mayoría de las especies bacterianas estudiadas hasta la fecha y constituyen un completo patrimonio genético que poseen las bacterias. Las funciones codificadas por los plásmidos por lo común representan propiedades ventajosas para la sobrevivencia de las bacterias en situaciones de emergencia y por ello se consideran elementos importantes en la evolución de estos microorganismos (Cervantes, 1994). Dependiendo del tamaño del plásmido se pueden codificar desde unas cuantas proteínas hasta cientos de ellas. Sin embargo, raramente codifican productos esenciales para el crecimiento celular, tales como la ARN polimerasa o enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. En cambio, los productos de sus genes generalmente dan a las bacterias una ventaja selectiva solo bajo ciertas condiciones. Estos elementos juegan un papel crucial en la evolución y adaptación bacteriana, ya

I. INTRODUCCION

que constituyen mediadores de intercambio de material genético entre poblaciones. La transferencia de la información genética contenida en el plásmido de una bacteria donadora a una receptora se conoce con el nombre de conjugación (Loeza, 2004).

La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos. El primero es la bioabsorción que se caracteriza por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del mismo con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo (Vijayaraghavian, 2008). La bioacumulación constituye el segundo mecanismo, el cual involucra un sistema de transporte de membrana que introduce al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema enzimático protón ATP sintetasa (H^+ -ATPasa). Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma este secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos (entre ellas las metalotioneínas) o puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola (Cervantes, 2001). Como tercer mecanismo se encuentra la biomineralización; en este caso el proceso aparece como consecuencia del funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de protones (H^+) hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado (Vullo, 2003). El cuarto mecanismo lo constituye la biotransformación, proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, (por ejemplo oxidación o metilación). Finalmente la quimioabsorción es el proceso que se relaciona con aquella clase de reacciones en donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario; éste funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del

I. INTRODUCCION

metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización mediado por microorganismo (Páez, 2009). La figura 12 muestra los mecanismos antes mencionados.

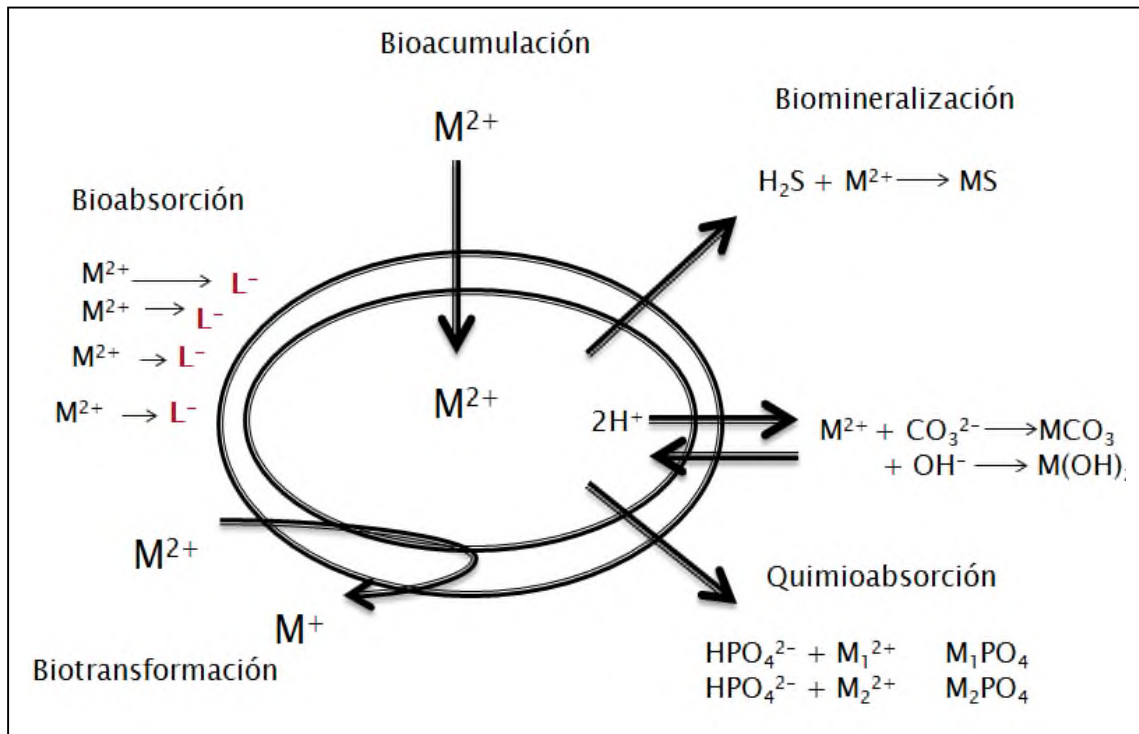


Figura 12. Mecanismos de tolerancia hacia metales pesados en microorganismos (Tomado de Vullo, 2003).

1.5.- ALGAS Y METALES PESADOS: UN EJEMPLO DE MECANISMO DE RESISTENCIA

Debido a que en este trabajo nos enfocaremos a los fenómenos de toxicidad y resistencia de bacterias a metales pesados (específicamente el caso del plomo) a continuación se hablara de las algas como sistemas que poseen mecanismos de resistencia bien caracterizados y de los cuales algunos son semejantes a los de las bacterias, razón por la cual son comentados.

I. INTRODUCCION

Los metales pesados zinc (Zn), cadmio (Cd) y mercurio (Hg) constituyen contaminantes bien conocidos de aguas dulces y marinas. Las algas son productores primarios muy importantes en los diferentes cuerpos de agua, logrando esta producción por el mantenimiento del equilibrio entre la respiración y la fotosíntesis. Un desequilibrio por inhibición en cualquiera de estos procesos probablemente afectará tanto a las algas como a otros organismos en el medio ambiente acuático, alterando así el equilibrio de su entorno.

Las algas son organismos tanto fototrófos como autotrófos que varían en tamaño, desde formas unicelulares menores a 1 μm de diámetro, hasta formas multicelulares marinas que llegan a medir 50 metros. Aunque la mayoría son formas acuáticas, llegan a encontrarse en suelos, nieve, rocas o en asociaciones con hongos, plantas y animales. Algunas clasificaciones incluyen tanto organismos procariontes (por ejemplo algas verdes-azules; *Cyanophyta*, *cyanobacteria*), como eucariontes (por ejemplo *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Phaeophyta*).

Diversos factores biológicos y fisicoquímicos pueden influir en la captación y toxicidad de metales pesados en las algas. Entre los factores que pueden incrementar la captación, y como consecuencia la toxicidad, se pueden mencionar el aumento en la temperatura y la acidificación del medio. Entre los factores que reducen la captación y la toxicidad se incluyen la presencia de cationes monovalentes (K^+ , Na^+) y divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+}), aniones (acetato, fosfato, sulfato), productos extracelulares (ácidos orgánicos polisacáridos, polipéptidos), sólidos suspendidos y en algunos casos, la presencia de duplas de metales pesados (por ejemplo Zn/Cd y Ni/Cu) (De filippis-Pallaghy, 1994).

La captación de metales pesados varía enormemente entre las diferentes especies de algas. Se han encontrado diferencias en la velocidad de acumulación de metales entre las algas del mar negro de acuerdo con su

I. INTRODUCCION

categoría taxonómica: las algas verdes captan preferentemente Al, Cr y Fe; las pardas As y Sr; y las rojas Ag, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se y Zn. La toxicidad de los compuestos mercuriales (y de Cu) en las algas, es directamente proporcional a su liposolubilidad (Florence, 1983), lo cual implica una correlación directa entre el proceso de captación y la toxicidad.

Las microalgas producen diferentes sustancias orgánicas extracelulares ricas en grupos amino, fosforilo, sulfhidrilo y carboxilo, mismos que proveen a la superficie celular una gran variedad de sitios para el intercambio iónico. De esta manera disminuyen la toxicidad de altas concentraciones de metales pesados. Se ha demostrado, por ejemplo, que los polisacáridos de *Phaeodactylum tricornutum* acumulan cantidades importantes de Pb; que el ácido algínico de las algas pardas atrapa el Sr; que la pared celular de *Chlorella* puede unir Pb, Cu, Cd, Ni, Zn, Au, Ag, Hg; y que *Skeletonema costatum* retiene cantidades importantes de Cu (Ramos, 1992). El orden de toxicidad de los metales pesados en las algas es: Hg > Cu > Cd > Ag > Pb > Zn, variando la posición del Cu y Cd en función de la especie (Trevors, 1986). En la tabla 3 se resumen algunas de las funciones metabólicas afectadas en las algas por la exposición a metales pesados.

I. INTRODUCCION

Tabla 3. Efectos tóxicos de los metales pesados en algas (Modificado de Cervantes, 1999).

Efecto	Metal	Organismo
1. Aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática	Ag, Hg	<i>Chlorella</i>
2. Transporte de nutrientes alterado	Cd	<i>Thalassiosira</i>
3. Inhibición del transporte de electrones fotosintéticos	Cu, Zn, Cd, Hg	<i>Ankistrodesmus</i> <i>Euglena</i>
4. Inhibición de la fijación de CO ₂	Cu, Zn, Cd, Hg Cd	<i>Fitoplancton</i> <i>Euglena</i> <i>Laminaria</i>
5. Disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos	Cd, Cu Pb	<i>Chlorella</i> <i>Skeletonema</i>
6. Inhibición de la respiración	Pb Zn, Cd, Hg	<i>Skeletonema</i> <i>Euglena</i>
7. Inhibición de síntesis de proteínas	Cd	<i>Laminaria</i>
8. Desarrollo morfológico anormal	Cd, Zn, Pb, Hg, Cu Zn Cd	<i>Chlorella</i> <i>Cladophora</i> <i>Euglena</i>
9. Cambios ultraestructurales: Hinchamiento mitocondrial Granulación Multigranulación Tamaño del cloroplasto	Cd Cd Cd y Hg Hg y Zn	<i>Algas dulceacuícolas</i> <i>Algas marinas</i> <i>Ankistrodesmus</i> <i>Skeletonema</i>
10. Pérdida de flagelo	Cd, Cu, Hg, Pb	<i>Euglena</i>
11. Inhibición del crecimiento	Zn, Cu, Cd Pb, Cd, Hg, Cu Cu, Cd, Hg, Cr Cd Cu	<i>Selenastrum</i> <i>Chlorophyta</i> <i>Euglena</i> <i>Ochromonas</i> <i>Ectocarpus</i>

Euglena gracilis, constituye un modelo útil y apropiado para llevar a cabo un gran número de estudios bioquímicos, incluyendo los mecanismos de toxicidad y tolerancia a metales pesados, ya que puede producirse bajo condiciones rigurosamente controladas o bien en medios mínimos y además tiene un alto grado de especialización funcional (Vincenzo, 1980).

I. INTRODUCCION

El estudio de la toxicidad de tres derivados de mercurio sobre el crecimiento de *Euglena gracilis* Z, muestra que estos elementos químicos actúan de dos formas diferentes: a) inhibición rápida del crecimiento para una concentración peculiar y b) inhibición progresiva que se caracteriza por una fase de latencia (Simeray, 1977). El Zn, Cd y el Hg son inhibidores potentes de la respiración, la fijación del CO₂, el desarrollo morfológico normal, la pérdida del flagelo y la inhibición del crecimiento (Luigi, 1981).

Los efectos que la exposición a diferentes concentraciones de Hg, Cd y Pb puede ocasionar en *Euglena gracilis* se han observado en procesos como crecimiento celular, consumo y producción de oxígeno así como el contenido de clorofila a y b. Se ha observado también que éste protista alcanza una mayor densidad celular cuando crece en presencia de Cd²⁺ en comparación con los otros dos metales. Lo anterior se observó al exponer euglenas al metal por varias generaciones. De esta manera el protista adquirió una mayor adaptación al metal observada como una mayor densidad celular y una mayor capacidad de absorción a metales similares (Navarro, 1995). Lo anterior sugiere la existencia de diferentes mecanismos de detoxificación a metales pesados. Una posible explicación se basa en la idea de que estas células presentan una membrana plasmática con permeabilidad reducida a los iones Cd²⁺, Pb²⁺ y Hg²⁺ o bien una vía de salida activa para los mismos. Del mismo modo, la mayor acumulación de metales pesados sugiere el desarrollo de mecanismos intracelulares tales como la compartimentalización y el aumento de la síntesis de fitoquelatinas. (Devars, 1997).

Las algas presentan diversos mecanismos de resistencia a los metales pesados (Reed, 1989). Algunos se mencionan a continuación.

- A) Secreción de material extracelular, presumiblemente polisacáridos quelantes de metales.
- B) Retención por unión a la pared celular.

I. INTRODUCCION

- C) Disminución en la cantidad de metal internalizado, en donde se ha supuesto la existencia de un mecanismo de exclusión.
- D) Detoxificación interna de acuerdo a cada elemento.
- Plomo: se acumula en el núcleo
 - Cobre: se acumula en la vacuola, el núcleo y es atrapado por polifosfatos.
 - Cadmio: se acumula en el núcleo y cloroplastos.
 - Aluminio y Cadmio: son atrapados intracelularmente por polifosfatos en algunas microalgas eucariontes.
- E) Transformación:
- Reducción química de Hg^{2+} para generar Hg^0 volátil. Se ha observado que cepas de *Chlorella* resistentes a mercurio volatilizan más del doble de este metal que las cepas sensibles. Lo anterior mediante actividad enzimática inducida por la luz.
 - Biometilación de As, Cd, Hg, Pb, Se, y Sn.
- F) Capacidad de sintetizar metalotioneínas (MT) o fitoquelatinas (FQ) cuando se encuentran expuestas a concentraciones tóxicas de metales pesados.

Como ejemplo de lo anterior el fitoflagelado de vida libre *Ochromonas dánica*, expuesto a concentraciones variables de cobre, no presenta un efecto significativo en su metabolismo ni estructura, mientras que con cadmio, al aumentar la concentración del metal, se observó una disminución tanto del crecimiento como la movilidad celular. Se encontró además que en presencia del segundo metal, la célula sintetiza citrato y una glicoproteína la cual tiene una función protectora contra metales. Esta glicoproteína es similar a las metalotioneínas en cuanto a composición de aminoácidos y peso molecular.

I. INTRODUCCION

A lo largo del desarrollo de los párrafos anteriores se ha tratado el tema de la contaminación por metales pesados de manera general, tomando en cuenta sus características y a la vez los efectos que estos causan cuando se encuentran presentes en concentraciones elevadas dentro de los ecosistemas. Con base en lo anterior se puede afirmar que los microorganismos, las plantas y otros organismos superiores pueden desencadenar fenómenos de toxicidad o resistencia ante la presencia de los mismos.

A continuación se hablará de manera particular acerca del plomo como contaminante en el ambiente y su gran impacto negativo, derivado de su relación con la industrialización.

El apéndice 1 narra la historia del plomo y cómo llegó a convertirse en uno de los principales agentes causales de enfermedad y muerte en todo el mundo.

1.6.- CONTAMINACIÓN E INTOXICACIÓN POR PLOMO.

CONTAMINACIÓN POR PLOMO.

El plomo es uno de los metales que más contaminan el medio ambiente como resultado del alto impacto que este elemento ha tenido en la actividad humana a lo largo de su historia. Debido a que éste elemento no puede ser biodegradado se acumula en la atmósfera, el agua, y los alimentos, llegando a los organismos vivos que se encuentran cerca o lejos de las zonas contaminadas (Mahalley, 1997). La acumulación ambiental con este metal se ha acelerado debido a su amplio uso tanto en la industria de la pintura como en el uso de gasolinas con plomo.

El plomo como un tóxico ambiental y ocupacional se ha constituido como uno de los principales agentes causales de daño a órganos vitales ya que tiene la capacidad de afectar una cantidad elevada de procesos metabólicos (Oberley, 1995; Van Den Heuvel, 2001).

I. INTRODUCCION

Entre las características principales del plomo se encuentran las siguientes: metal con número atómico 82, peso molecular 207.19 g/mol, gravedad específica 11.34, dos estados de valencia (+2 y +4) con los que puede formar compuestos orgánicos e inorgánicos. El plomo puede unirse al carbono formando una serie de compuestos como tetraetilo y tetrametilo de plomo que son utilizados como antidetonantes en las gasolinas. Como resultado de la evaporación de la gasolina se han encontrado cantidades elevadas de ambos compuestos en el ambiente. Estos tienen la capacidad de descomponerse dejando el plomo libre como uno de los productos tanto en el líquido residual como en el aire.

INTOXICACIÓN POR PLOMO

El plomo puede absorberse por diferentes vías y una vez dentro del organismo, transformarse en plomo inorgánico con valencia +2 (Pb^{2+}) preferentemente. La toxicidad inducida por este ión se ha explicado de diferentes maneras; las más estudiadas son la competencia con los metales esenciales como el calcio y el zinc; la alta afinidad por los grupos tiol de las proteínas; la producción de especies reactivas de oxígeno (Hus, 1997), y la inducción de lipoperoxidación (Othman, 1998; El-Missiry, 2000; El-Sokkary, 2003; Othman, 2004). A continuación se detalla cada una de ellas.

a) Competencia por metales esenciales.

El calcio es el catión divalente que frecuentemente puede ser sustituido por el plomo debido a que ambos presentan características similares como la electronegatividad, la valencia y el radio iónico. Lo anterior puede explicar algunos de los efectos del plomo, mismos que se enlistan en seguida (Calderón, 2008).

- a) El plomo tiene la capacidad de entrar al organismo por la vía digestiva utilizando preferentemente los transportadores de calcio.

I. INTRODUCCION

- b) El plomo puede entrar por canales y salir por transporte activo de un gran número de células de la misma forma como lo hace el calcio.
- c) El plomo puede acumularse en el hueso sustituyendo al calcio en las sales de fosfato.
- d) El plomo puede activar sistemas dependientes de calcio como la calmodulina (proteína regulatoria que une calcio) de manera más intensa y prolongada que el mismo calcio.
- e) El plomo puede inhibir enzimas como la δ - Aminolevulínico deshidratasa al sustituir al zinc y bloquear la entrada del calcio en algunos canales.

b) Afinidad por proteínas.

Los mecanismos de daño dependen de la interacción del plomo con macromoléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos complejos), y como consecuencia de ello se presenta el aumento o disminución de metabolitos, ya que se afectan funciones de la célula mediante la ausencia o acumulación (generando toxicidad) de los mismos. Se ha observado que la unión del metal a las macromoléculas se puede realizar en tres formas: por unión electrostática, estereoespecífica o covalente. A continuación se menciona un ejemplo de interacción covalente.

Durante la intoxicación por plomo en mamíferos se genera la inducción de cuerpos nucleares en el revestimiento de células de túbulo proximal de riñón de animales expuestos al metal. Estos se presentan como complejos formados por asociaciones plomo-proteína descritos como “cuerpos intranucleares que presentan un cuerpo denso rodeado de microfibrillas”. El análisis químico de las inclusiones indica una constante relación plomo-proteína, lo que sugiere una unión ordenada de plomo por “proteínas de inclusión” (Navarro, 2004). Los cuerpos de inclusión pueden, por tanto, funcionar como un almacén o depósito de plomo intracelular temporal que funciona como un almacén o depósito de

I. INTRODUCCION

plomo intracelular temporal (Goyer, 1970).

c) Inducción de daño oxidativo

Cuando el plomo se encuentra a altas concentraciones se puede acumular en membranas de células con alta densidad de carga, como los eritrocitos. En estas células el metal puede producir una reacción tipo Fenton, generando radicales libres e iniciando procesos de oxidación de lípidos en los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, extendiéndose mediante reacciones en cadena de daño oxidativo. La mayor proporción de daño oxidativo inducido por la exposición a este metal se puede explicar por los mecanismos indirectos, ya que el plomo al reducir la actividad de varias enzimas (ácido δ -Aminolevulínico sintetasa, δ -Aminolevulínico deshidratasa y ferroquelatasa) pertenecientes a la vía de síntesis del grupo hemo (molécula para la formación de hemoglobina y citocromos), genera condiciones de oxidación y auto-oxidación con producción de especies reactivas de oxígeno y produce en conjunto un insulto oxidativo que, dependiendo de los mecanismos de defensa, resultará en una mayor o menor presencia de daño. La figura 13 muestra un esquema detallado de los diferentes efectos que podría generar la exposición a plomo en los seres vivos.

d) Daño a los mecanismos de defensa

El plomo, directa o indirectamente, también puede modificar los mecanismos de defensa. Dentro de la categoría de los antioxidantes proteicos como ya se ha mencionado anteriormente, encontramos proteínas tanto con acción enzimática, como las que no la tienen. Las que poseen acción enzimática, se consideran como la defensa primaria contra los radicales libres, puesto que se localizan intracelularmente en los sitios de producción de estas especies (Morales, 2009). Existen evidencias en algunos sistemas de que el metal inhibe tanto a la enzima antioxidante Superóxido dismutasa como a la Catalasa, provocando una menor defensa antioxidante global.

I. INTRODUCCION

La exposición a plomo provoca además la disminución de cofactores reducidos como glutatión y un gasto excesivo de vitaminas antioxidantes, con lo cual se reduce la capacidad antioxidante exógena y se incrementa el daño oxidativo (Calderón, 2008).

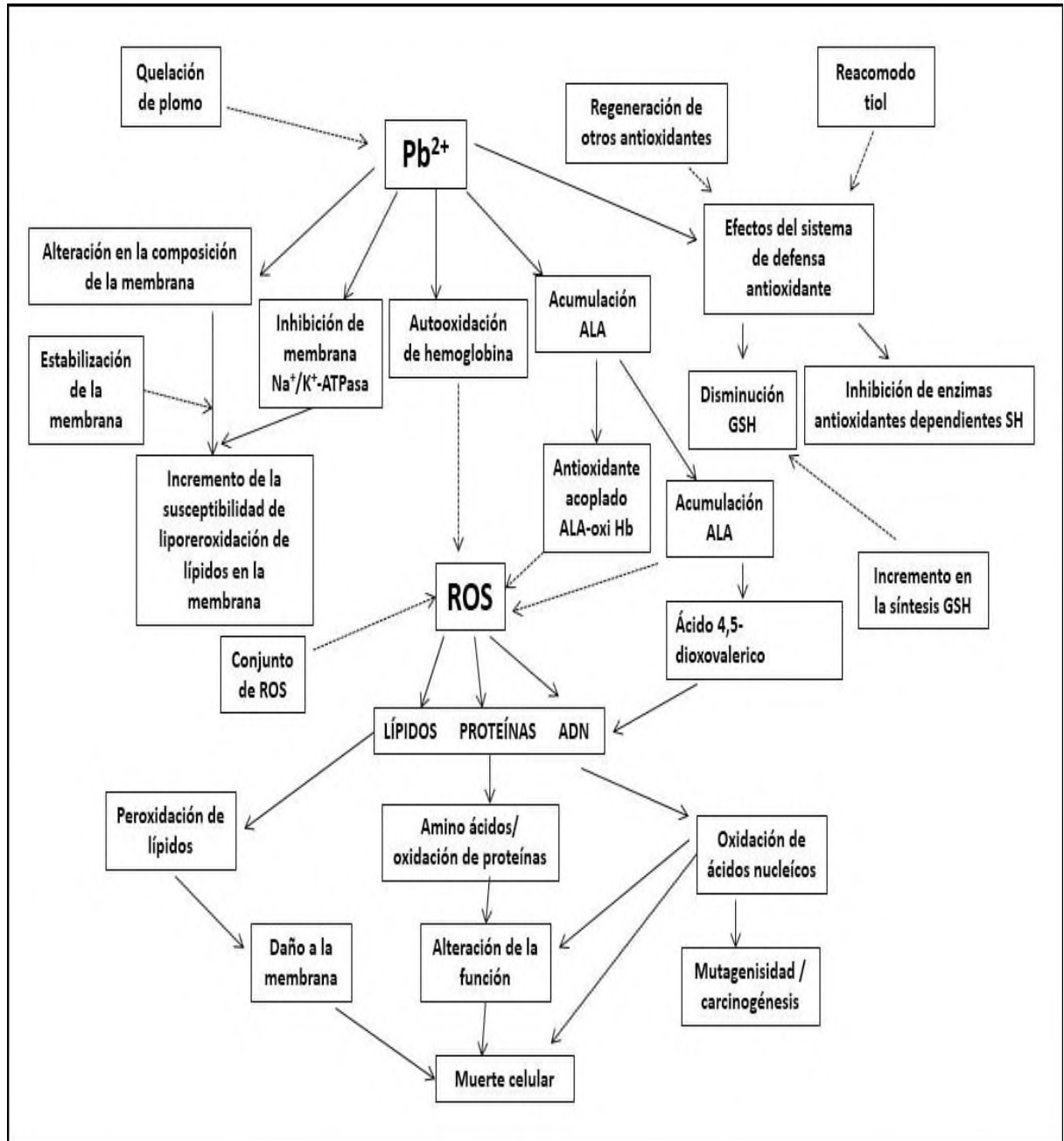


Figura 13. Efectos directos e indirectos de la exposición a plomo en los seres vivos (Tomado de Hande, 2000).

I. INTRODUCCION

e) Incremento en la expresión de enzimas.

Se ha observado que el plomo incrementa la actividad de proteínas quinasas (Markovac, 1998., Long, 1994) y la fosforilación oxidativa. También ha sido recientemente implicado en la activación de factores de transcripción que incrementan la expresión de la enzima Glutación S-transferasa (GST) (Ainbinder, 1997). El incremento de actividad de GST y contenido de glutación (GSH) en riñón seguido de la exposición a plomo puede representar una respuesta adaptativa. La importancia de esta enzima se da debido a que la Glutación S-transferasa cataliza la conjugación del GSH con una amplia variedad de compuestos hidrofóbicos, electrofilicos y tóxicos. Esta familia de enzimas se encuentran generalmente en todos los organismos y su principal función es la detoxificación de compuestos acompañada principalmente por tres tipos de reacciones: (I) Transformación, donde enzimas como la citocromo P450 monooxigenasa introduce grupos funcionales en los sustratos, formando especies solubles en agua, (II) Conjugación, donde enzimas como las UDP-glucosil transferasa y las GST quienes unen al producto con compuestos como el glutación dando como resultado un compuesto menos tóxico y más soluble, (III) Compartimentalización, en la cual ATPasas específicas reconocen los complejos con GSH transportándolos a través de la membrana para su eliminación o transformación adicional (Marrs, 1996).

Se ha observado que el plomo puede ocasionar, en personas expuestas al mismo, cuadros como: disfunción renal, cirrosis hepática, daño al sistema nervioso central y anemia (Sheffield, 2001., Sawicka-Kapusta, 2004). El riñón presenta lesiones toxicológicas marcadas a causa de la disminución de glutación o a la producción incrementada de malondialdehído (MDA) como consecuencia de la exposición a plomo.

I. INTRODUCCION

En base a esta observación se propuso que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos por los cuales el plomo causa toxicidad celular (Hermes-Lima, 1991., Donaldson, 1993., Stohs, 1995). Esta hipótesis se deriva de la disminución observada de GSH y el incremento de productos de peroxidación de lípidos que se observa después de la exposición de sistemas biológicos a concentraciones de plomo (Ribarov, 1981., Lawton, 1991., Nakagawa, 1991., Sugawara, 1991., Sandhir, 1994). Estos resultados dependen de la dosis y el tipo de intoxicación.

Por otro lado, en microorganismos la presencia de metales pesados posibilita la selección de variantes resistentes al efecto tóxico de los iones. En bacterias, los determinantes que confieren esta resistencia se encuentran en plásmidos; estos representan propiedades ventajosas para la sobrevivencia debido a que ellos constituyen un completo patrimonio genético que poseen las bacterias. Por otra parte la resistencia o tolerancia de los microorganismos también puede ser posible gracias a la acción de diferentes mecanismos como la bioadsorción, bioacumulación, biomineralización, quimioabsorción y biotransformación. Cada uno de estos mecanismos tiene como finalidad el generar especies menos tóxicas de iones o complejos metálicos.

II. ANTECEDENTES

En la introducción de este trabajo se ha hablado de los metales pesados en general y del plomo en particular. Se ha puesto énfasis sobre la interacción de este metal en células de humanos, animales, y microorganismos expuestos al mismo y a su vez de los mecanismos de toxicidad y de defensa que pueden presentar las células.

En la siguiente sección se hablará sobre los antecedentes que se relacionan con el presente trabajo, mismos que incluyen el efecto de la exposición a metales y los mecanismos de defensa que presentan las bacterias en general y se pondrá énfasis, en particular, sobre los conocimientos que se han generado en relación a los efectos del plomo en bacterias.

2.1 TOXICIDAD DE METALES PESADOS EN BACTERIAS.

La captación y toxicidad de los metales pesados en bacterias está influida por factores fisicoquímicos y biológicos así como por el tiempo de exposición y la concentración del metal o metales.

Algunos de los factores que intervienen en la toxicidad de los metales pesados al estudiar cultivos bacterianos en medios líquidos o sólidos se mencionan a continuación.

- Forma del metal en agua, misma que puede ser soluble o en partículas como ión complejo, quelato en forma coloidal, precipitado o adsorbido.
- Presencia de otros metales, por ejemplo cationes en forma de sales de calcio y magnesio que afectan la toxicidad de Cu, Zn, Cd y Hg, ya sea por sinergismo o antagonismo.
- Factores que modifican el metabolismo de las bacterias, entre los que se encuentran temperatura, pH, oxígeno disuelto, luz y salinidad.
- Otros factores ambientales, por ejemplo la densidad de la población bacteriana, la cual desencadena fenómenos de competencia y desarrollo de factores de sobrevivencia.

II. ANTECEDENTES

Cuando las bacterias se encuentran en contacto con agentes tóxicos, (entre ellos los metales pesados) se pueden desencadenar dos fenómenos. Por un lado la densidad de la población puede disminuir (como resultado de la toxicidad y la falta de expresión de factores génicos) y por otro, gran número de células podrán sobrevivir al desarrollar algún mecanismo de defensa. Se ha reportado que la mayoría de los mecanismos por los cuales las bacterias son capaces de tolerar cantidades tóxicas de metales pesados se relacionan con los procesos de entrada y salida de los agentes tóxicos a las células (Cervantes, 1999).

2.2 MECANISMOS DE ENTRADA Y SALIDA DE METALES EN CÉLULAS BACTERIANAS.

Las células bacterianas contienen varios sistemas transportadores de membrana con múltiples funciones vitales como el ingreso de nutrientes, la excreción de sustancias tóxicas y el mantenimiento de la homeostasis. (Scatamburlo, 2004). Una característica particular de estos sistemas es su ubicuidad. Existen sistemas que solo se expresan en algunas cepas de una misma especie bacteriana, aun cuando la mayoría de los sistemas se encuentren dentro del genoma de todos los individuos pertenecientes a dicha especie (Saier, 1998).

Las bombas de eflujo representan a los transportadores de membrana involucrados, generalmente, en la extrusión de sustancias tóxicas desde el interior de las células hacia el medio externo. Estas proteínas se encuentran presentes en microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos y eucariotas. Los sistemas de eflujo están agrupados en familias de proteínas transportadoras basadas en homología de las secuencias de aminoácidos, el tamaño y las estructuras secundarias (Scatamburlo, 2004).

Filogenéticamente las bombas de eflujo pertenecen a cinco superfamilias enlistadas a continuación (Marchetti, 2011).

II. ANTECEDENTES

- 1) Familia de la sección de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés, ATP Binding Cassette).
- 2) Superfamilia del facilitador mayor (MFS, major facilitator superfamily).
- 3) Familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, multidrug and toxic-compound extrusión).
- 4) Familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, small multidrug resistance).
- 5) Familia de resistencia a división por nodulación (RND, resistance nodulation división).

ABC y MFS constituyen las familias con mayor número de miembros y se piensa que pueden tener un origen común. Las bombas de la superfamilia ABC constituyen transportadores primarios presentes en las células eucariotas, eubacterias y archaeobacterias (Sanders, 1997). Estas poseen gran importancia en el transporte de metales pesados.

El proceso de entrada de metales en las células bacterianas se encuentra influido por factores como la composición de la membrana celular, los transportadores, los componentes orgánicos y el pH.

Entre los mecanismos que han sido reportados en diferentes bacterias se pueden citar los siguientes.

a) ATP sintetasas (ATPasas) transportadoras de iones metálicos en *Escherichia coli*. Estas proteínas se clasifican en dos clases dependiendo del ión a transportar.

Clase 1.- Para As (V): La Bomba Pst-ATPasa, miembro de la súper-familia de ATPasas transportadoras ABC. Los sistemas de transporte tipo ABC (ATP Binding Cassette), utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP para transportar sustratos a través de las membranas celulares. Típicamente,

II. ANTECEDENTES

estos sistemas son específicos para ciertos ligandos como iones inorgánicos, aminoácidos, glúcidos o polipéptidos (Higgins, 1992). En procariontes se han identificado diversos sistemas de transporte ABC, y en cada caso, los análisis de la estructura de los componentes relacionados funcionalmente ponen de manifiesto que forman una familia de proteínas homólogas. Todos estos sistemas proteicos están compuestos por sistemas con una organización estructural similar, incluyendo al menos una proteína periplásmica de unión al ligando y un componente translocador. Este último consta de un elemento transmembranal localizado en la membrana citoplasmática y de un elemento asociado a la cara interna de la misma membrana la cual contiene algún dominio (o sección) de unión al ATP (Fath y Kolter, 1993). La figura 14 muestra los sistemas de transporte ABC para As (V), Zn (II) y Cu (I) en la bacteria *Escherichia coli*.

Clase 2.- Para Sb (III) y As (III). ArsA-ATPasa y transportadores de Poliol GlpF, (también presentes en eubacterias, arqueas, hongos, plantas y animales) (Rosenberg, 1987).

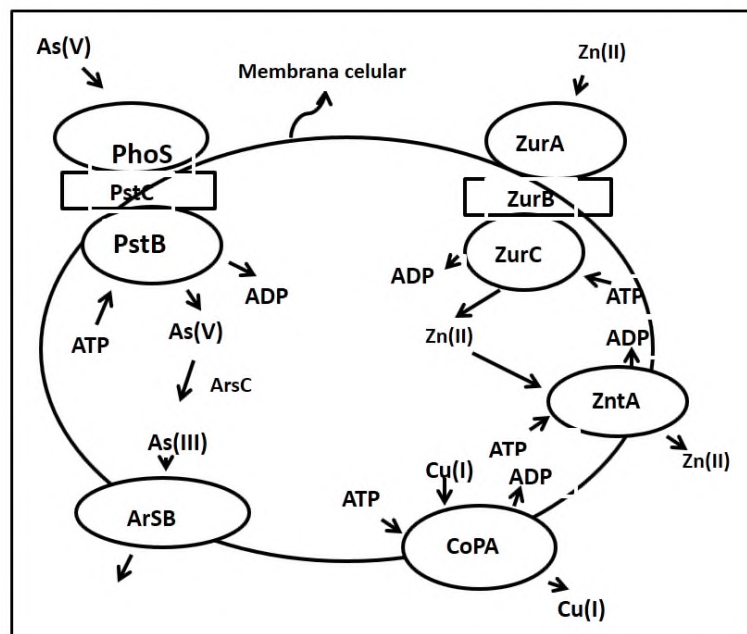


Figura 14. ATPasas transportadores de iones metálicos en *Escherichia coli* (Tomado de Rosenberg, 1987).

II. ANTECEDENTES

b) ATPasas tipo P (P-ATPasa) de bacterias que transportan metales. Estas presentan las siguientes características.

- Su función normal la constituye el transporte de sustratos cargados, a través de la membrana.
- Presentan ocho dominios transmembranales.
- El aminoácido aspartato es necesario para llevar a cabo la fosforilación en el ciclo de translocación.

Estas enzimas también son conocidas como ATPasas tipo P de transporte de metales blandos que se encuentran generalmente en forma de sales. Estos sistemas enzimáticos se dividen en dos grupos. El primer grupo se encuentra constituido por ATPasas translocadoras de Cu (II)/ Ag (I), quienes incluyen a CopA que es responsable del transporte de Cu^{2+} en *Escherichia Coli*, *Enterococcus hirae* y *Helicobacter pylori*. El segundo grupo está formado por ATPasas translocadoras de Zn (II)/Cd (II)/Pb (II). Este grupo incluye Znt A, una ATPasa de tipo P responsable del transporte de Zn^{2+} y Cd^{2+} en *E. coli* y CadA también ATPasa de tipo P responsable de la resistencia al Cd^{2+} en *Staphilococcus aureus* (Beard y Rensing, 1997) (Figura 15).

c) ATPasas tipo P (P-ATPasa) transportadoras de iones H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Muchos de estos transportadores comparten un origen filogenético común. Un ejemplo se muestra en la figura 15, donde se puede observar la relación general entre las bombas transportadoras de metales con estados de oxidación I y II. El mayor porcentaje de homología se establece entre transportadores con el mismo estado de oxidación, el cual se encuentra en las cepas pertenecientes a la misma bomba transportadora, por ejemplo la de Zn (II), Pb (II) y Cd (II). De igual manera se distingue una mayor relación entre las ATPasas tipo P que conforman la bomba de Cu (I) y Ag (I). Entre ambas bombas existe un porcentaje de relación del 11%.

II. ANTECEDENTES

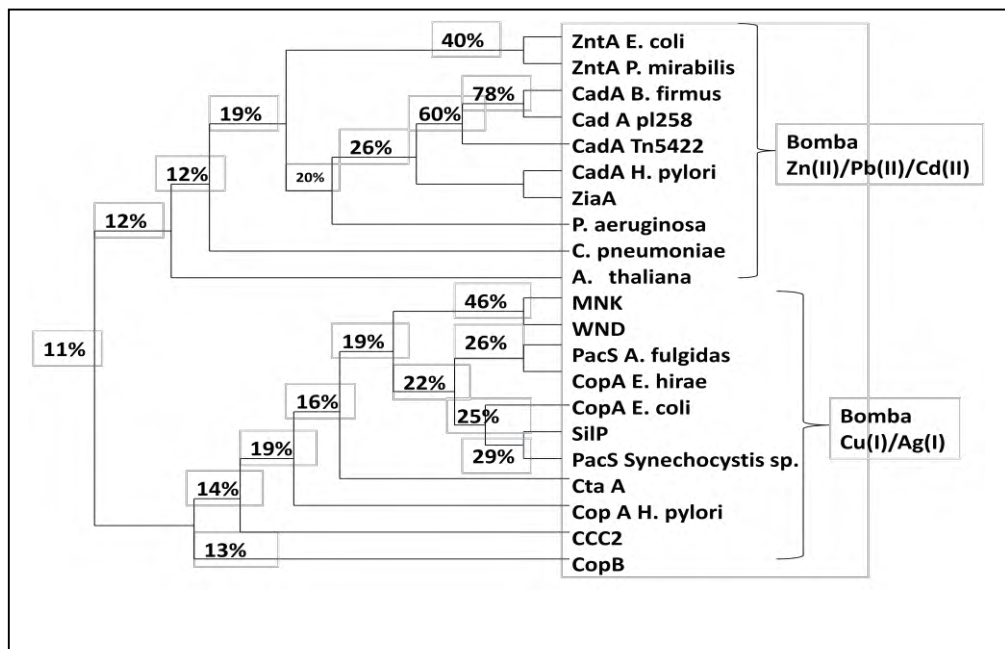


Figura 15. Árbol filogenético de ATPasas tipo P microbianas transportadoras de metales (Tomado de Rosenberg, 1987).

2.3.- RESISTENCIA A METALES PESADOS EN BACTERIAS.

Existen en las bacterias algunos plásmidos que codifican la resistencia a los iones de metales tóxicos, incluyendo Ag^{2+} , AsO_2^{2-} , AsO_4^{2-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , TeO_3^{2-} , Ti^{2+} y Zn^{2+} . La función de los sistemas de resistencia se basa en la energía dependiente del flujo de iones tóxicos. Algunos sistemas de flujo están constituidos por ATPasas y otros por antiportadores quimiosmóticos catión/protón. Los determinantes cromosómicos de resistencia a algunos metales tóxicos son conocidos. La distinción entre los plásmidos y los genes de los cromosomas se ha disipado, lo cual indica que para algunos metales (por ejemplo mercurio y arsénico) los determinantes plasmídicos y cromosómicos resultan ser básicamente los mismos (Silver, 1996). Otros sistemas, como las ATPasas de transporte de cobre, solo se conocen a partir de los genes cromosómicos.

II. ANTECEDENTES

La función de la resistencia del sistema al metal depende de la energía de salida de iones tóxicos. Algunos sistemas de salida de metales están constituidos por ATPasas y/o antiportadores catión/ protón (Cn^+/H^+).

En los párrafos siguientes se mencionan algunos casos reportados relacionados con la resistencia bacteriana a diferentes metales pesados.

a) Resistencia a Cadmio

El cadmio es un importante contaminante ambiental y un tóxico potencial para bacterias, algas y hongos. El cadmio es muy dañino para los organismos ya que cuando se encuentran expuestos a él éste origina severa inhibición de la mayoría de los procesos fisiológicos como el crecimiento y el desarrollo, a la par también puede causar aberraciones en la división celular (Trevors, 1986). Los mecanismos de toxicidad del cadmio y la resistencia son variables dependiendo de la cepa. La forma en que se presenta el metal en el medio ambiente juega un papel importante, ya que de ello dependerán los efectos y/o respuestas en los microorganismos. Los intervalos de concentración de cadmio pueden ser usados para designar la resistencia en los organismos.

En relación a los determinantes genéticos de resistencia en algunas bacterias se encuentran plásmidos. Las bacterias Gram-negativas poseen diferentes mecanismos de resistencia entre los que se encuentran la activación de plásmidos que vuelven a las bacterias resistentes al metal. Un ejemplo lo constituye el plásmido pGU100 aislado de *Pseudomonas putida* a partir del suelo, el cual confiere la resistencia por un mecanismo que implica una captación disminuida, aparentemente debida a la expulsión acelerada del metal (Horitsu, 1986). En otras bacterias los plásmidos que codifican la resistencia al metal ya se encuentran contenidos en las células. Otro mecanismo de resistencia bacteriana a cadmio, no conferido por plásmidos, se basa en la síntesis de proteínas ricas en cisteína capaces de captar al metal, dichas proteínas se han encontrado también en *P. putida*.

II. ANTECEDENTES

Estas macromoléculas son similares a las metalotioneínas presentes en células animales, las cuales son capaces de capturar iones, disminuyendo así su efecto tóxico (Higham, 1984).

La figura 16 muestra los sistemas de captación y flujo de salida del Cd^{2+} en *Staphylococcus aureus*. En este caso el plásmido resistente a Cd^{2+} puede controlar el flujo de salida del metal mediante el intercambio de metal por protones (Silver, 1996).

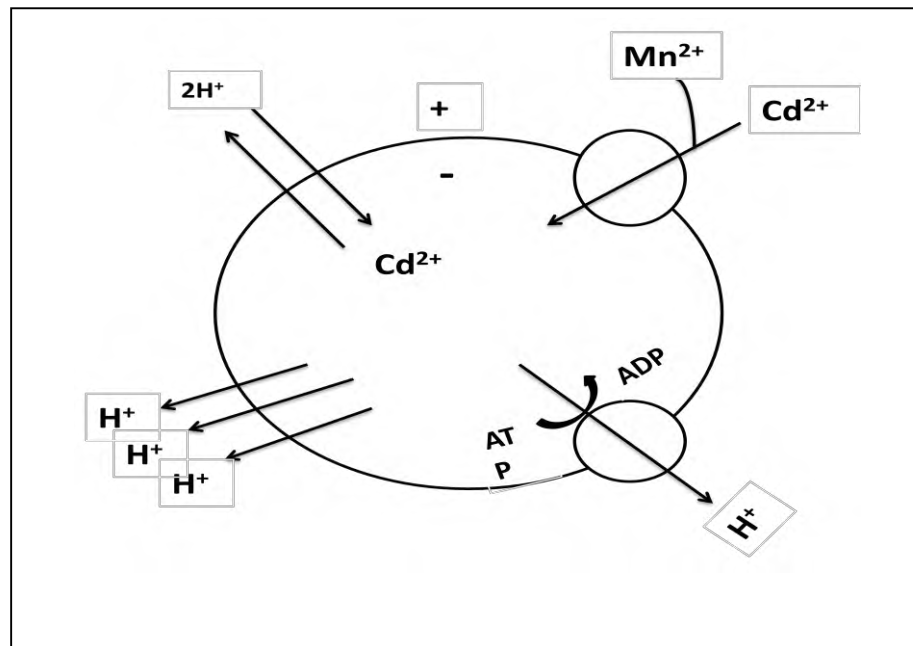


Figura 16. Captación y flujo de salida del cadmio en *Staphylococcus aureus* (Tomado de Trevors, 1986).

b) Resistencia a Cobre

Se han reportado mecanismos de resistencia a cobre (Cu) en bacterias y hongos. El cobre es un micronutriente esencial y un metal pesado. La presencia de concentraciones altas de iones cúpricos en el medio ambiente promueve la selección de microorganismos que poseen determinantes genéticos para la resistencia al mismo. Algunos ejemplos de posibles mecanismos de resistencia reportados se encuentran en cromosomas y

II. ANTECEDENTES

plásmidos. Los genes relacionados con el metabolismo del cobre residen en los cromosomas mientras que los genes de resistencia se localizan en plásmidos. Lo anterior se puede observar en la Figura 17. Los mecanismos de resistencia bacteriana a cobre se relacionan con la reducción del transporte del mismo y, por otra parte, con el eflujo de iones cúpricos o la complejación de cobre por algunos componentes celulares. La tolerancia a cobre en hongos ha sido relacionada con diversos mecanismos como los que involucran envolvimiento y atrapado del metal por los componentes de la pared celular, alteración de la salida del cobre, quelación extracelular o precipitación por metabolitos excretados y la complejación intracelular por metalotioneínas y fitoquelatinas (Cervantes, 1994).

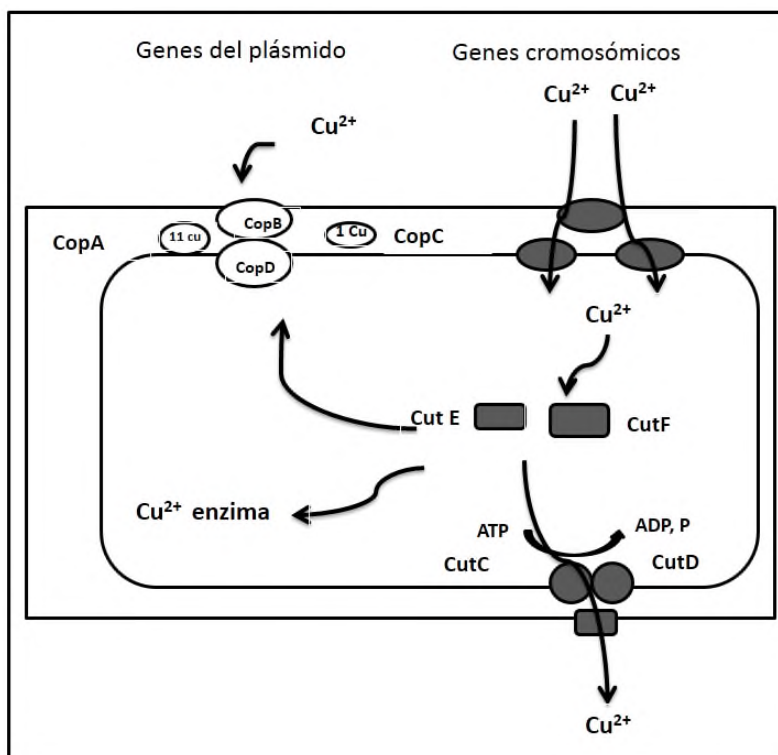


Figura 17. Proteínas involucradas en el transporte de cobre, como mecanismo de resistencia en *Pseudomonas* sp. y *Escherichia coli* (Tomado de Silver, 1994)

II. ANTECEDENTES

c) Resistencia a Cobalto, Zinc y Níquel

Los cationes divalentes cobalto, zinc y níquel son nutrientes esenciales para algunas bacterias ya que estas los requieren a concentraciones del orden nanomolar (por lo cual son micronutrientes). Algunas concentraciones micro o milimolar de Co^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} resultan tóxicas. Estos cationes son transportados hacia el interior de las células por constituyentes expresados para cationes divalentes como los sistemas de transporte de Mg^{2+} .

La reducción química de Co^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} en células bacterianas no ocurre, por lo cual el exceso de estos iones podrá ocasionar fenómenos de estrés. Sin embargo los mecanismos básicos de resistencia a estos iones pueden llevarse a cabo mediante procesos como la complejación intracelular tanto en eucariotas y como en procariotas. Todos los sistemas de flujo de cationes en bacterias están caracterizados por la presencia de plásmidos e inducidos por diferentes acoplamientos de energía y por diferentes tipos de proteínas presentes en el transporte y la regulación (Nies, 1992). Los determinantes de resistencia más estudiados son los plásmidos de *Alcaligenes eutrophus* CH34; cepa que contiene dos plasmidos: pMOL28, para resistencia a níquel y a cobalto, y pMOL30 el cual proporciona resistencia a zinc, cadmio y cobalto (Mergeay, 1985).

d) Resistencia a Níquel

Las bacterias resistentes al níquel han sido aisladas de ecosistemas contaminados por metales pesados en aguas residuales, minas y aguas de refrigeración de industrias. Algunas de las bacterias identificadas en estos sitios son: *Ralstonia groupand*, *Ralstonia eutropha*, *Achromobacter Denitrificans*, *Alcaligenes xylosoxydans*, *Klebsiella oxytoca*, *Hafnia alvei* 5-5 y *Ralstonia metallidurans*. Algunas de estas bacterias se han estudiado en detalle. *Hafnia alvei* 5-5, fue aislada de los suelos bajo árboles hiperacumuladores de níquel y seleccionados mediante cultivo de enriquecimiento aeróbico diseñado para enterobacterias resistentes a níquel.

II. ANTECEDENTES

Esta bacteria es muy resistente a concentraciones altas del metal (30 mM) en forma de Ni y NiCl₂. Los determinantes de resistencia se encuentran en el plásmido pEJH501. Este es transferible también a las bacterias níquel-sensibles: *Escherichia coli* H11 y *Serratia marcescens*. Por otro lado *Ralstonia metallidurans* es un quimiolitótrofo facultativo que alberga un plásmido pMOL28 (180 Kb) el cual posee un operón responsable de la resistencia inducible a cobalto y a níquel, que codifica para un sistema de flujo de salida dependiente de energía (Jeong, 2003).

e) Resistencia a Mercurio

El fenómeno de resistencia se debe a la reducción del mercurio inorgánico (Hg²⁺) a la forma metálica, menos tóxica y volátil, (Hg⁰). Esta transformación se lleva a cabo mediante una ruta metabólica en la cual los microorganismos se deshacen del ión tóxico. Se han clonado y secuenciado los genes plasmídicos que confieren la resistencia a este metal en *Pseudomonas* y *Shigella Sp*. Se ha observado que los sistemas bacterianos emplean un mismo mecanismo de resistencia el cual consiste en la reducción enzimática del Hg²⁺ a Hg⁰ mediante una enzima llamada reductasa mercúrica, la cual es codificada por el gen *merA*. Todos los sistemas de resistencia también codifican proteínas que se encargan de transportar específicamente al Hg hacia el citoplasma de la célula bacteriana donde se encuentran las enzimas reductasas (Silver, 1992).

Los determinantes *mer* inician con un gen regulatorio, *mer R* que es transcrito a partir de la cadena opuesta con respecto a los demás genes *mer*. La proteína MerR se une como un homodímero al sitio adyacente operador/promotor del operón *mer* (Summers, 1992), funcionando tanto como un represor (en ausencia de Hg) como en forma de inductor (en presencia de Hg). En los determinantes *mer*, la región operador/promotor es seguida por los genes implicados en el transporte de Hg al interior de las células. En el caso del transposón Tn501 y del plásmido pDU1358, los genes son *merT* y *merP*,

II. ANTECEDENTES

quienes codifican para una proteína de la membrana interna y una proteína periplásmica que une mercurio, respectivamente. También se encuentra el gen *merA* el cual codifica la síntesis de la enzima reductasa mercúrica, una enzima homodimérica que contiene FAD y que es dependiente de NADPH. El funcionamiento del sistema se basa en que un par de cisteínas de la proteína periplásmica MerP unen al ión mercurio (Hg^{2+}) del exterior y lo transfieren a otro par de cisteínas de la proteína membranal MerT; ésta lo pasa a las cisteínas de la reductasa que, a su vez, lo transfieren finalmente al sitio activo de la enzima. En este modelo, el Hg^{2+} intracelular nunca se encuentra libre, sino que es transferido de un par de cisteínas a otro, protegiéndose así el ambiente citoplásmico de la toxicidad del ión. La figura 18 muestra el mecanismo de resistencia bacteriana a mercurio. El esquema muestra una célula bacteriana que posee los productos de los genes *mer*, los cuales contienen grupos sulfhidrilo que captan al ión metálico. La proteína MerP del espacio periplásmico transporta inicialmente al ión mercúrico al citoplasma, donde MerT lo une y lo lleva a la reductasa MerA que, finalmente, lo convierte en mercurio metálico (Hg^0), forma volátil e inerte (Tomado de Moreno, 1999).

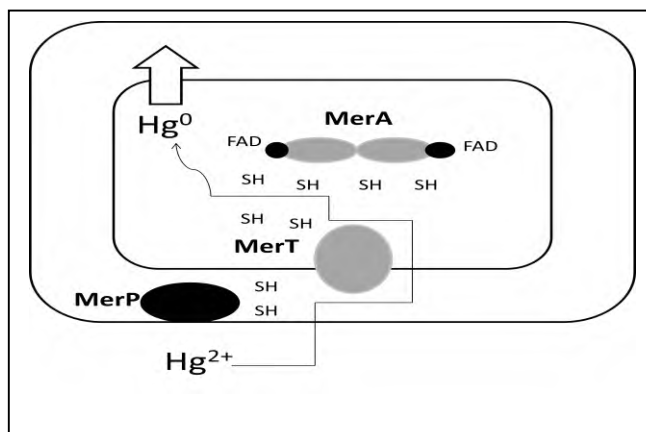


Figura 18. Mecanismo de resistencia bacteriana a mercurio (Tomado de Moreno,

II. ANTECEDENTES

f) Reducción de cromo hexavalente

El amplio uso industrial de los derivados del cromo, ha ocasionado que estos compuestos sean considerados como serios contaminantes ambientales. En la naturaleza el cromo se encuentra principalmente en dos estados de oxidación: la forma trivalente Cr (III) que es relativamente inocua, y la forma hexavalente Cr (VI), considerada una especie tóxica. El Cr (III) a nivel extracelular es relativamente inocuo debido a su insolubilidad. En contraste, en el interior de la célula el Cr (III) es altamente tóxico debido a su capacidad para unirse al ADN y a las proteínas. El Cr (VI) usualmente se encuentra como ión cromato (CrO_4^{2-}) o ión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Cualquiera de las dos formas atraviesa fácilmente las membranas plasmáticas al ser capturados erróneamente por el sistema de transporte de sulfato. En el ambiente, el Cr (VI) puede ser reducido a Cr (III), ya sea de manera abiótica o mediante enzimas llamadas cromato reductasas (figura 19). Varias cromato reductasas han sido identificadas en bacterias. En diversas especies bacterianas se ha demostrado que el cromo (VI) en forma de cromato entra activamente a las células a través del sistema de transporte del sulfato. La analogía química entre el cromato y el sulfato ha sido enfatizada por el hecho de que el cromato es un inhibidor competitivo del transporte del sulfato en todas las especies bacterianas que han sido estudiadas. En contraste, el ión cromo (III) atraviesa las membranas con muy baja eficiencia debido a que forma compuestos insolubles en soluciones acuosas ácidas. La cromato reductasa mejor caracterizada es la enzima ChrR de la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas putida*, que pertenece a la familia de las flavoproteínas reductasas dependientes de NAD(P)H. Esta familia posee 243 proteínas homólogas que unen al cofactor FMN. Los miembros de este grupo están ampliamente distribuidos, sugiriendo un origen evolutivo muy antiguo para estas proteínas.

II. ANTECEDENTES

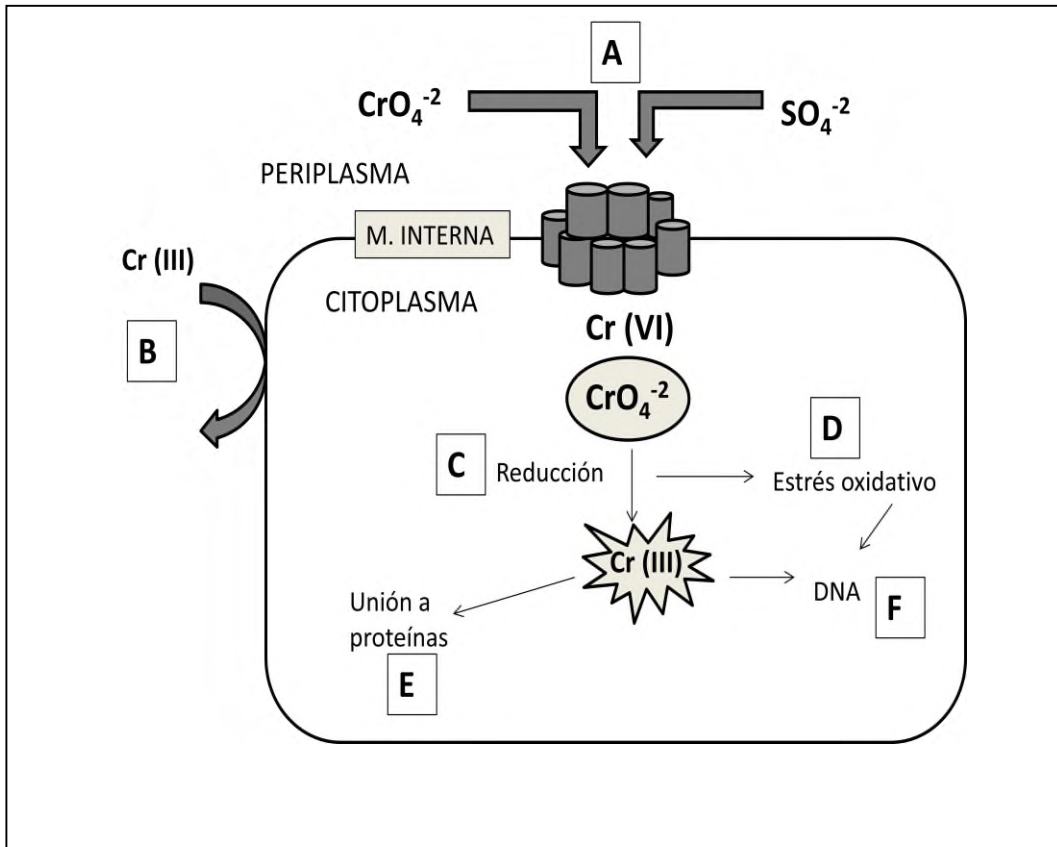


Figura 19. Transporte y toxicidad del Cromo en la célula bacteriana. A) Captación del Cr (VI) [CrO_4^{-2}] a través del sistema de transporte del sulfato (SO_4^{-2}). B) Las membranas biológicas son impermeables al Cr (III), por lo que este resulta inocuo extracelularmente. C) reducción intracelular de Cr (VI) a Cr (III). D) estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la reducción de cromo (VI). E) Daño ocasionado por la interacción del Cr (III) con las proteínas o F) Con el ADN. (Modificado de Ramírez, 2009).

2.4 RESISTENCIA A PLOMO EN BACTERIAS

Este metal es comúnmente más encontrado en la superficie terrestre pero, en relación con las bacterias, ha sido menos estudiado que otros metales. Bajo este esquema se ha reportado que el plomo en grandes cantidades se acumula en la corteza terrestre en forma de sales orgánicas. Estas al encontrarse presentes en los ecosistemas en forma de soluciones salinas son absorbidas por las comunidades microbianas y de esta manera el plomo puede encontrarse en el medio ambiente cambiando las condiciones normales del

II. ANTECEDENTES

ecosistema.

Pseudomonas marginalis presenta un mecanismo extracelular de exclusión el cual se cree puede ser la excreción de un exopolímero. Otros mecanismos de resistencia a plomo envuelven la acumulación celular en gránulos densos en el citoplasma, los que han sido observados en *Bacillus megaterium* (Beveridge, 1989) (esta acumulación intracelular no es comúnmente observada en mecanismos de resistencia a metales). No han sido aislados plásmidos que confieran resistencia al plomo en estas bacterias pero si se ha observado que bajo estrés por el metal, estos microorganismos pueden desarrollar resistencia al utilizar mecanismos directos, mismos que incluyen bombas de eflujo dependientes de ATP y secuestación celular del metal (Roane, 1998).

2.5 IONES METÁLICOS GENERADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN BACTERIAS

La supervivencia de las células depende de su capacidad para detectar alteraciones en el medio y responder a ellas. Los cambios físicos o químicos del medio pueden desencadenar efectos negativos en la célula, y la supervivencia de ésta exige una respuesta rápida a dichos cambios. Estas alteraciones del medio o estrés pueden ser más importantes en microorganismos debido a que el medio externo de estos es altamente variable y las condiciones como temperatura, osmolaridad o nutrientes no son siempre constantes.

El estrés oxidativo se produce por la exposición de un organismo a oxígeno o a otras moléculas altamente oxidantes en ocasiones generadas por el propio metabolismo (Aruoma y Halliwell, 1998). El estrés oxidativo puede ser consecuencia de la propia respiración aeróbica de la célula (Halliwell y Gutte-

II. ANTECEDENTES

-ridge., 1984). El oxígeno es una molécula altamente reactiva que puede ser reducida parcialmente para generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas por tanto son producidas por diversos procesos celulares, algunos de los cuales se mencionan a continuación.

- Procesos metabólicos normales, como la respiración aeróbica o la β -oxidación de los ácidos grasos.
- El sistema inmune, para la destrucción de potenciales competidores.
- Substancias químicas externas.

La toxicidad de las ROS es debida a su capacidad de dañar diferentes componentes celulares. Por ejemplo, las ROS producen roturas de la doble hélice o modificaciones químicas en las bases nitrogenadas del ADN (Storz., 1987). También afectan a lípidos, formando peróxidos lipídicos, y a proteínas, donde las cadenas laterales de los aminoácidos son oxidadas perdiendo la molécula proteica su función (Wolf., 1986).

Las especies reactivas de oxígeno más comunes son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el oxígeno singulete (O^{\cdot}) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). El anión superóxido no es por sí solo un radical muy reactivo, pero da lugar a otras ROS que si son altamente reactivas y tóxicas. Por lo cual es importante que la célula posea mecanismos para eliminarlo. La destrucción del anión superóxido tiene lugar a través de las reacciones mostradas en la figura 20, en las que intervienen las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.

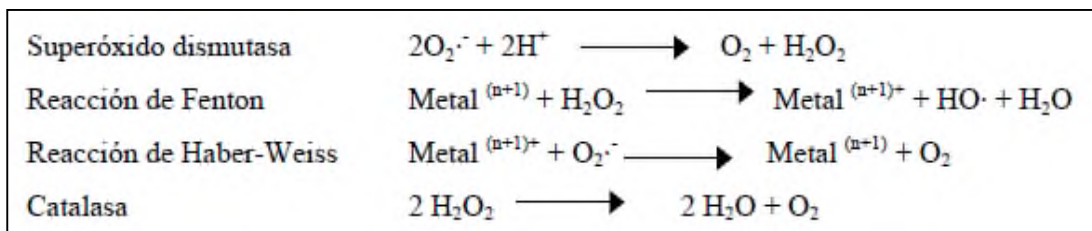


Figura 20. Reacciones mediante las cuales se tiene lugar la destrucción del anión superóxido (Tomado de Rodríguez., 2002).

II. ANTECEDENTES

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) es generado por la destrucción del anión superóxido a través de la superóxido dismutasa y por medio de la reacción de algunas oxidasas. La enzima catalasa destruye H_2O_2 para generar agua. El peróxido de hidrogeno no es un radical libre porque no posee ningún electrón desapareado, pero puede atravesar fácilmente la membrana y dar lugar al radical hidroxilo (HO^\cdot) por los siguientes mecanismos:

- Por descomposición espontánea de H_2O_2 a HO^\cdot .
- Por la reacción de Fenton, en la cual, gracias a la presencia de un metal, se genera HO^\cdot a partir de H_2O_2 . Algunos de los metales que pueden participar en esta reacción son hierro o cobre, entre otros.
- Por la reacción de Haber-Weiss, que tiene lugar entre las formas oxidadas de Fe^{3+} o Cu^{2+} y el anión superóxido, generando la forma reducida de los metales; estos, vía Fenton, generan el radical HO^\cdot .

La generación de especies reactivas de oxígeno (conocidas como ROS), en algunos casos, es catalizada por iones metálicos, especialmente el cobre y el hierro entre otros. Estos metales constituyen nutrientes esenciales y juegan papeles importantes en diferentes procesos biológicos, entre ellos ser cofactores de enzimas o actuar como donadores o aceptores de electrones, según su estado iónico, en gran variedad de reacciones bioquímicas.

Sin embargo, una acumulación excesiva de los metales puede tener efectos tóxicos, ya que generan ROS por las reacciones antes descritas. Esto significa que la célula ha de desarrollar mecanismos que acumulen niveles suficientes de estos metales para permitir las reacciones bioquímicas normales, pero sin que esta acumulación favorezca la producción de ROS (Dix., 1994).

2.5.1 DEFENSA CONTRA ESTRÉS OXIDATIVO EN *Escherichia coli*.

Para protegerse contra el daño causado por estrés oxidativo las células poseen enzimas antioxidantes, así como moléculas antioxidantes de bajo peso molecular y actividades reparadoras del daño.

II. ANTECEDENTES

Algunas de estas actividades se expresan a bajos niveles durante el crecimiento normal de la célula, mientras que otras se expresan única o preferentemente en respuesta a estrés oxidativo. Las bacterias y las algas constituyen dos ejemplos de microorganismos en los que se realizó la primera caracterización en detalle de muchos de estos mecanismos de detoxificación de metales pesados.

Se ha reportado que en *E. coli* algunas de las actividades de defensa inducibles por $O_2^{\cdot-}$ están reguladas por los factores de transcripción SoxRS, por ejemplo la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*sodA*), la endonucleasa IV reparadora de ADN (*nfo*), la fumarasa C (*fumC*) y la aconitasa (*acnA*) (Hidalgo y Demple, 1996). La activación de SoxRS también lleva a un aumento de los niveles de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*), que incrementa el poder reductor de la célula. Paralelamente, SoxRS aumenta los niveles del represor Fur (*fur*), lo cual disminuye la entrada de hierro y así reduce la formación de HO^{\cdot} (Carmel-Harel, 2000). SoxRS también confiere resistencia a diferentes drogas y otras especies reactivas de nitrógeno (Nakajima, 1995).

SoxR es una proteína de 17 kDa que se expresa constitutivamente, mientras que SoxS tiene 13 kDa y sus niveles son regulados por SoxR. El control del regulón soxRS tiene lugar en dos pasos (Nunoshiba, 1992). Bajo condiciones de estrés oxidativo la proteína SoxR es convertida a la forma activa, activando a su vez la transcripción de *soxS*. El consiguiente aumento en los niveles de SoxS lleva a la expresión de genes implicados en actividades antioxidantes. SoxR es un homodímero con dos centros hierro-azufre $[2Fe-2S]^+$ o $[2Fe-2S]^{2+}$ y este parece ser el mecanismo de activación de SoxR (Gaudu, 1997). La naturaleza del oxidante que reacciona con el centro $[2Fe-2S]$ en SoxR no está clara. $O_2^{\cdot-}$ podría ser un candidato, pero la generación de $O_2^{\cdot-}$ va acompañada del consumo de moléculas reductoras celulares, de modo que podría ocurrir que la actividad de SoxR estuviera regulada por alteraciones en los niveles de NADPH, la flavodoxina reducida o la ferredoxina reducida (Liochev, 1994).

II. ANTECEDENTES

SoxR es rápidamente reducido cuando el estrés oxidativo desaparece, pero el mecanismo de la reducción se desconoce. La actividad SoxR también parece ser modulada por el ensamblaje de los centros [2Fe-S]. La exposición aeróbica a monotioles como el glutatión conlleva la destrucción del centro [2Fe-2S] de SoxR *in vitro*. Por el contrario, la presencia de ditioles como ditiotreitól o el enzima ditiólico tioredoxina promueve el ensamblaje del centro a la apoproteína SoxR (Ding y Demple., 1998). La tabla 4 muestra la actividad antioxidante en *Escherichia coli*.

No todas las actividades enzimáticas implicadas en la respuesta a superóxido están reguladas por SoxRS. Así, la superóxido dismutasa citosólica producto de *sodB* y la superóxido dismutasa periplasmática dependiente de Cu-Zn (*sodC*) protegen contra estrés oxidativo causado por O_2^- y no están reguladas por SoxRS (Fridovich, 1995).

Las bacterias no producen todo el tiempo todas las proteínas que son capaces de elaborar, en lugar de esto, ellas se adaptan a su medio ambiente y sintetizan solo aquellos productos genéticos esenciales para sobrevivir en diversas circunstancias. Por lo cual normalmente llevan a cabo un control de la expresión genética regulando los niveles de la transcripción. En ellas, los genes con función relacionada se encuentran generalmente adyacentes uno al otro y están regulados en forma coordinada, (cuando uno se expresa se expresan todos).

La regulación coordinada de los genes agrupados se consigue mediante la producción de un mRNA policistrónico (un mRNA largo conteniendo la información de muchos genes). La expresión de los genes estructurales no solamente se ve influenciada por la presencia o ausencia del inductor, también está controlada por un gen regulador específico. El gen regulador puede estar cerca o lejos de los genes que están siendo regulados.

II. ANTECEDENTES

El gen regulador codifica para una proteína específica, un producto denominado represor por tanto, las bacterias son capaces de "sentir" su medio ambiente y expresar el juego de genes necesario y más apropiado para el medio ambiente en particular regulando la transcripción de ciertos genes (Murray, P., 2002).

Tabla 4. Genes, enzimas, antioxidantes y reguladores en *Escherichia coli* (Tomado de Fridovich, 1995).

Gen	Actividad	Regulador
sodA	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso	SoxRS
nfo	Endonucleasa IV	SoxRS
fun C	Fumarasa C	SoxRS
anca	Aconitasa	SoxRS
zwf	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	SoxRS
fur	Represor Fur de entrada de Fe	SoxRS/OxyR
sodB	Superóxido dismutasa citosólica	
sodC	Superóxido dismutasa periplasmática	
katG	Catalasa (hidroperoxidasa I)	OxyR
grxA	Glutaredoxina 1	OxyR
grxB	Glutaredoxina 2	
grxC	Glutaredoxina 3	
trxA	Tioredoxina 1	
trxC	Tioredoxina 2	
trxB	Tioredoxina reductasa	OxyR
gorA	Glutation reductasa	OxyR
gshA	γ - Glutamyl-cisteina sintasa	
gshB	Glutation sintasa	
ahpC	Alquil hidroperóxido reductasa	OxyR
ahpF	Alquil hidroperóxido reductasa	OxyR
tpx	Tioredoxina peroxidasa	
bcp	Tioredoxina peroxidasa	
xthA	Endonucleasa III	
katE	Hidroperoxidasa II	

II. ANTECEDENTES

2.5.2 DEFENSA CONTRA PERÓXIDO DE HIDROGENO EN *E. COLI*.

El tratamiento de *E. coli* con H₂O₂ provoca la síntesis de unas 30 proteínas e induce la actividad del factor de transcripción OxyR. Este actúa sobre el promotor de al menos nueve genes, cuyos productos son necesarios para la protección contra el estrés oxidativo (Storz, 1990). Algunos de estos genes son los que codifican para la hidroperoxidasa o catalasa (*KatG*), la glutaredoxina I (*grxA*), la glutatión reductasa (*gorA*) y el represor Fur (*fur*) (tabla 4). La actividad OxyR también confiere resistencia a HOCl, solventes orgánicos y otras especies reactivas de nitrógeno (Dukan y Touati, 1996).

Otras enzimas que protegen contra H₂O₂ pero que no son inducidas por OxyR son las endonucleasas III reparadora de ADN (*xthA*), la ADN polimerasa I (*polA*) y la hidroperoxidasa II (*katE*).

OxyR es un activador transcripcional tetramérico que existe en dos formas, reducida y oxidada. Solo la forma oxidada activa la transcripción. Cuando OxyR está en su forma reducida los residuos C199 y C208 se encuentran en la forma libre tiólica; cuando OxyR se halla oxidada las dos cisteínas forman un enlace disulfuro (Zheng., 1998). Una mutación en cualquiera de las dos cisteínas impide que el factor transcripcional responda a H₂O₂. Así la oxidación directa de OxyR por H₂O₂ y la consecuente formación del puente disulfuro es el mecanismo por el cual *E. coli* induce la expresión de actividades antioxidantes en respuesta a dicho agente.

2.6 LA IMPORTANCIA DE LA GST EN LAS BACTERIAS

La familia de enzimas Glutatión S-transferasa (GST) son parte de la fase II de detoxificación de compuestos tóxicos hidrofóbicos por catálisis de la conjugación de glutatión (GSH) a el centro hidrofílico de las sustancias tóxicas. Estas proteínas son enzimas conocidas por su capacidad de catalizar la conjugación de GSH con una gran cantidad de sustancias electrofílicas provenientes o no de la fase I del metabolismo de los xenobióticos en

II. ANTECEDENTES

mamíferos. Muchos miembros de la familia GST son selectivamente inducidas por estrés biótico o abiótico. Estas enzimas juegan un importante papel en la regulación de la homeostasis en reacciones óxido-reducción en metabolismos endógenos.

Las GST constituyen una familia con gran cantidad de proteínas y es por eso que han sido subdivididas en un gran número de especies asociadas con diferentes funciones y propiedades enzimáticas. Las GST fueron divididas en al menos cuatro grandes familias de proteínas llamadas GST citosólicas, GST mitocondriales, GST microsomales y proteínas bacterianas resistentes a fosfomicina. Las GST que están agrupadas en diferentes clases, usualmente cuentan con diferencias generales de los perfiles del sustrato, mientras que los miembros de la misma clase tienen pocas diferencias en el reconocimiento del sustrato.

Todas las GST citosólicas tienen el mismo plegado proteico, mismo que comprende los dos dominios. El dominio N-terminal adopta la topología α/β y provee la unión del sitio GSH (sitio G). El dominio C-terminal es toda una estructura α -helicoidal y provee los elementos estructurales para el reconocimiento de una amplia gama de cosustratos hidrofóbicos (sitio-H). El sitio H se encuentra adyacente al sitio G y define la especificidad del sustrato de la enzima.

Como en los organismos eucariontes, las bacterias son caracterizadas por múltiples genes GST de extensas divergencias secuenciales y funciones biológicas desconocidas. En las bacterias han sido identificadas cuatro clases diferentes de GST: beta, chi, theta y zeta. La mayoría de las GST bacterianas identificadas hasta la fecha pertenecen a la clase beta específicamente y las estructuras cristalinas de varios representantes de esta clase han sido determinadas y caracterizadas como GST *Proteus mirabilis* (PmGST) y GST *Ochrobactrum anthropi* (OaGST) (Skopelitou, 2012).

II. ANTECEDENTES

Han sido descritas GST en una variedad de bacterias incluyendo especies como *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Burkholderia* y *Rhodococcus*. Además de las funciones de conjugación de GSH en la resistencia a antibióticos, estas enzimas son capaces de unirlos. La determinación de la estructura tridimensional de la enzima caracterizada para *P. mirabilis* reveló una mezcla disulfuro entre un residuo de cisteína conservada y el grupo tiol del GSH, similar a la observada la clase omega de mamíferos. Diversos análisis de secuencias sugieren que un número de GST bacterianas que contienen cisteína formen una nueva clase de GST: la clase beta. La comparación de las estructuras de *P. mirabilis* con las de la clase teta de las plantas y la clase delta de los insectos reveló importantes diferencias en la interface dimérica: las de la clase beta cierran el paquete de enzimas y están dominadas por las interacciones polares en la estructura bacteriana, mientras que las clases delta y teta tienen que abrir en forma de V y la interface está dominada por interacciones hidrofóbicas. Los sitios directos a la mutagénesis han demostrado que ningún residuo de cisteína, tirosina o serina son esenciales catalíticamente al extremo N-terminal, pero la histidina 106 y lisina 107 en el extremo C-terminal pueden contribuir a la interacción con GSH. Puede haber más de una clase de GST en bacterias, ya que la mutagénesis dirigida al sitio y alineamientos de secuencias sugieren que la GST de *Ochrobacterium anthropi* contiene restos de serina conservadas en el sitio activo al igual que las clases teta y zeta.

Muy poco se sabe acerca del sitio-H de las enzimas bacterianas. Por ejemplo, se demostró que una única variación amino-ácido aumenta la actividad enzimática hacia varios sustratos. Esto sugiere que las variaciones individuales amino-ácidos en GST bacterianas pueden ser explotadas para generar enzimas con mayor afinidad a sustratos seleccionados para ser utilizados con fines de biorremediación (Sheeman, D., 2001).

II. ANTECEDENTES

Se ha encontrado relación entre los fenómenos de estrés oxidativo y la actividad Glutación S-Transferasa como respuesta a la intoxicación por plomo y de acuerdo a esto en el presente trabajo de investigación se exploran ambos aspectos en las diferentes cepas bacterianas aisladas de efluentes contaminados.

III. JUSTIFICACION

Una de las líneas de investigación que se llevan a cabo en la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec se relaciona con el Proyecto General “Fenómeno de la intoxicación con plomo y las proteínas de cuerpos de inclusión (PCI)”, mismo que involucra un gran número de estudios cuya finalidad es la de demostrar dos hipótesis. La primera se relaciona con la posibilidad de que las PCI (Apéndice II) constituyan una posible respuesta al estrés generado por la exposición a metales pesados como el plomo y la segunda investigar si las mismas podrían utilizarse, en un futuro, como bioindicadores de daño renal por exposición a metales pesados (Figura 22).

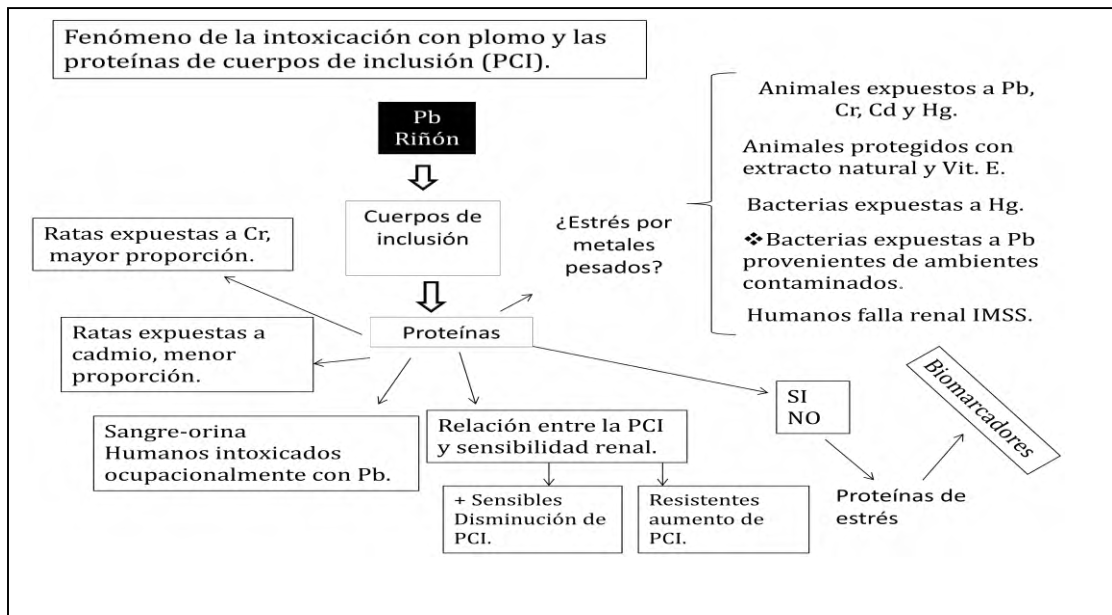


Figura 22. Proyecto general “Fenómeno de la intoxicación con plomo y proteínas de cuerpos de inclusión”.

Para explorar cada una de las dos posibilidades se han llevado a cabo varios protocolos de experimentación en roedores, microorganismos y humanos, mismos que se muestran en la figura 14.

El presente trabajo de tesis incide dentro de la propuesta de las PCI como posibles proteínas de estrés que en células procariotas podrían participar en el fenómeno de resistencia a plomo en bacterias.

III. JUSTIFICACION

Se sabe que los agentes contaminantes desencadenan eventos metabólicos de respuesta en los organismos. Estos dependen de factores relacionados con el sistema vivo y con las propiedades fisicoquímicas de los agentes tóxicos. Bajo este contexto, se sabe que el plomo es un metal que no es biodegradable por los organismos vivos y por ello el estudio de posibles mecanismos de tolerancia resultan importantes e interesantes desde el punto de vista evolutivo, bioquímico y biotecnológico.

IV. HIPOTESIS

Las bacterias aisladas de efluentes contaminados pueden desarrollar mecanismos de resistencia contra diversos agentes tóxicos, como los metales pesados, por lo cual la exposición a plomo podría resultar menos dañina para estos microorganismos.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto ocasionado por la exposición a plomo en cepas bacterianas aisladas de ambientes contaminados.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.- Aislar y purificar las cepas bacterianas presentes en diferentes efluentes de agua del río Papaloapan el cual atraviesa la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.

2.- Crecer las bacterias aisladas en medios de cultivo preparados con diferentes concentraciones de plomo.

3.- Seleccionar cepas bacterianas resistentes al plomo.

4.- Estudiar el efecto del plomo en las cepas seleccionadas por medio de estudios microbiológicos y bioquímicos como crecimiento, morfología celular y colonial, actividad de la enzima Glutación S-transferasa (GST), generación de especies reactivas de oxígeno y electroforesis.

5.- Establecer una posible relación entre la exposición a plomo, la actividad de GST y el estrés oxidativo en bacterias aisladas de efluentes contaminados y no contaminados con metales pesados.

6.- Establecer una posible relación entre la exposición a plomo, el estrés oxidativo y las proteínas de los cuerpos de inclusión en bacterias aisladas de efluentes contaminados y no contaminados con metales pesados.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS.

6.1.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

La recolección de las muestras de agua se llevó a cabo utilizando material estéril (frascos con tapa) tomando las muestras en la parte media y en los laterales del afluyente, colocando los recipientes hasta que el volumen fuera el marcado por el frasco. Las muestras se taparon y se colocaron en refrigeración hasta su posterior uso. Tres zonas fueron seleccionadas, de acuerdo a las necesidades de este proyecto: a) zonas industriales de la ciudad de Tuxtepec (Papelera, Ingenio azucarero y Cervecera), b) un arroyo contaminado cercano al seguro social y c) arroyos de comunidades rurales (Plan de Águila, Naranjal y Orquídeas) cercanos a Tuxtepec Oaxaca.

Tabla 5. Lugares donde se llevará a cabo la recolección de muestras de

Muestra	Lugar de recolección	Ubicación
a)	Papaloapan 1	Zona centro medio, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Papaloapan 2	Zona Centro Norte, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Papaloapan 3	Zona Centro Sur, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Playa de mono 1	Localidad Playa de Mono Norte, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Playa de mono 2	Localidad Playa de Mono Sur, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Sumatra 1	Colonia San Rafael Norte, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Sumatra 2	Colonia San Rafael Sur, Tuxtepec, Oaxaca.
b)	Papaloapan 1	Zona seguro social, Tuxtepec, Oaxaca.
b)	Arroyo Moctezuma (AN)	Zona seguro social, Tuxtepec, Oaxaca.
b)	Arroyo Moctezuma (Eco)	Zona Seguro Social, Tuxtepec, Oaxaca.
c)	Plan de águila 1	Comunidad Plan de Águila Norte, Chiltepec, Oaxaca.
c)	Plan de águila 2	Comunidad Plan de Águila Sur, Chiltepec, Oaxaca.
c)	Orquídeas	Comunidad San Isidro Naranjal Norte, Chiltepec, Oaxaca.
c)	Naranjal	Comunidad San Isidro Naranjal Sur, Chiltepec, Oaxaca.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las muestras se recolectaron por duplicado dos veces al año (meses de marzo y agosto) y se clasificaron de acuerdo a la zona y a la región donde fueron tomadas como se indican en la tabla 5.

6.1.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS.

Esto se realizó con la ayuda del Dr. Francisco Avelar, Investigador de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las muestras de agua se trataron con ácido nítrico 1N, para preservarse antes de su procesamiento en un espectrofotómetro de absorción atómica con lámpara de plomo.

6.2 CULTIVO DE MICROORGANISMOS.

Alícuotas de diferentes muestras se sembraron en los medios agar para métodos estándar (ACS) y agar nutritivo (AN) hasta lograr la obtención de colonias puras mediante técnicas microbiológicas como diluciones y resiembras en medios líquidos y sólidos. La figura 23 muestra la técnica de sembrado por estría, misma que se utilizó a lo largo de esta parte experimental.

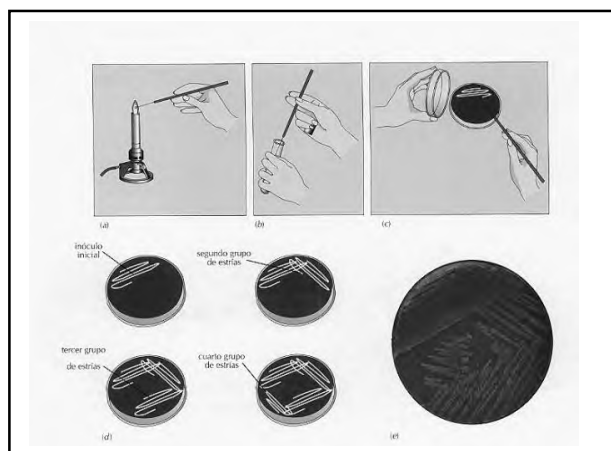


Figura 23. Sembrado de colonias bacterianas en placa (Método de siembra. www.blogspot.mx, 2012).

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La selección de colonias resistentes a plomo se llevó a cabo en placas que contenían agar nutritivo más concentraciones crecientes de plomo (0.32 mM, 0.629 mM ,1.95 mM, 5.66 mM y 6.59 mM). Posterior a la exposición se realizaron análisis macro y microscópicos, seleccionando 4 colonias completamente puras que resultaron tolerantes al metal. Dentro de las características macroscópicas se analizaron la forma, color, tamaño y brillo de las colonias. Para la determinación microscópica se utilizó la tinción de Gram (la cual se describe en el apéndice III) aplicada a los frotis bacterianos (ver figura 24). Se analizó la morfología microscópica (cocos, bacilos y espirilos) y la tinción de Gram.

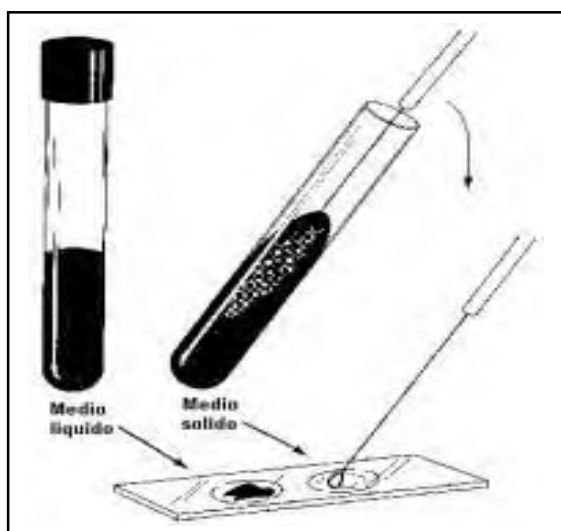


Figura 24. Extendido de frotis bacteriano (Velarde Hernandez. www.blogspot.com, 2012).

6.3 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE COLONIAS BACTERIANAS SENSIBLES Y RESISTENTES A PLOMO MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Esta parte se llevó a cabo bajo la colaboración de la Q.B.P. Miriam Juárez Juárez Jefe del Departamento de Control sanitario de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (UPIBI-

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

IPN). La identificación del género de las bacterias de interés se llevó a cabo realizando pruebas bioquímicas, las que se explican a continuación.

6.3.1. CALDO ROJO DE FENOL CON SACAROSA.

La capacidad de las bacterias de fermentar carbohidratos es utilizada como un criterio para su identificación. El medio provee los requerimientos nutricionales para el crecimiento de los microorganismos y contiene Rojo de Fenol como indicador de pH. Es utilizado para la diferenciación de cultivos puros en base a su capacidad para fermentar la sacarosa.

6.3.2. AGAR DE HIERRO TRIPLE AZUCAR (TSI).

Es un medio diferencial en tubos que sirven para un doble fin: 1) determinación de la fermentación de los hidratos de carbono, y 2) determinación de la producción de ácido sulfhídrico. Un organismo puede utilizar diversos sustratos incorporados en el medio; los diferentes sustratos metabolizados son utilizados para la diferenciación entre varios grupos, géneros o especies, sobre todo en Enterobacteriaceae (Mac Faddin, 1980).

6.3.3. VOGUES-PROSKAUER (VP).

Determina la capacidad de algunos organismos de producir un compuesto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la glucosa. La prueba se utiliza para diferenciar *Escherichia coli* de los grupos de *Klebsiella* y *Enterobacter*. La molécula de acetoína se forma por la descaboxilación de dos moléculas de ácido pirúvico.

La glucosa es metabolizada hasta ácido pirúvico, por la vía de la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoína es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias. La reacción de Voges-Proskauer para la acetoína se usa sobre todo para separar a la *Escherichia coli* de los grupos *Klebsiella-Enterobacter*, aun cuando otros miembros de las Enterobacterias son capaces de producir una reacción de VP positiva (Smith; *et al*, 1968).

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.3.4. ROJO DE METILO (RM).

Se basa en el empleo del indicador del pH rojo de metilo para determinar la concentración de iones hidrógeno (pH) presentes cuando un organismo fermenta la glucosa (Wilson., Miles., 1964). La concentración de hidrogeniones depende de la relación gaseosa entre CO₂ y H₂, que a su vez representa un índice de los diferentes ciclos del metabolismo de la glucosa que muestran diversos organismos. Las diferentes formas de fermentación se deben a variaciones en las enzimas vinculadas con el metabolismo del ácido pirúvico que se encuentra en el organismo (Doelle, 1969). Esta prueba sirve para comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos ácidos terminales de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema.

6.3.5. CITRATO DE SIMMONS (CS).

Determina si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento. El microorganismo utiliza las sales de amonio como única fuente de nitrógeno, las cuales son degradadas hasta amoníaco.

Algunas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico empleando el citrato como única fuente de carbono. Normalmente, el metabolismo del citrato comprende la condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido a través del ciclo del ácido tricarboxílico o el ciclo de fermentación del citrato. En las bacterias, el desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A. Esta enzima se denomina citritasa (citrato oxalacetato-liasa) o citrato desmolasa. La enzima requiere un catión bivalente para su actividad, que es suministrado por el magnesio o el manganeso (Sokatch, 1969).

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.3.6. MALONATO.

Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono con la resultante alcalinidad.

El malonato es un inhibidor enzimático. Quastel y Wooldridge fueron los primeros en demostrar la capacidad del ácido malónico (malonato) de interferir en la oxidación del ácido succínico en ácido fumárico, inhibiendo la acción catalítica de la enzima succinato-deshidrogenasa. El ácido malónico inactiva la enzima por un proceso denominado inhibición competitiva. La enzima succinato-dehidrogenasa transfiere el hidrógeno a un compuesto aceptor adecuado en la conversión del ácido succínico en ácido fumárico. Sin embargo, esta reacción puede ser inhibida por un compuesto orgánico que estructuralmente es similar al sustrato normal, el ácido succínico. El ácido malónico es estructuralmente análogo al ácido succínico y compite por su lugar en la enzima (Pelczar., Reid, 1965).

6.3.7. DESAMINACIÓN DE LISINA (LIA).

Este ensayo determina la capacidad de las bacterias para desaminar o descarboxilar a la lisina. Las pruebas de las descarboxilasas se emplean fundamentalmente para determinar grupos bacterianos entre las *Enterobacteriaceae*. Ayuda a la diferenciación entre los géneros: *Edwardssiella* (+), *Salmonella* (por lo general +), y *Arizona* (+) del *Citrobacter* (-). También se logra observar diferenciación de las especies: *Enterobacter aerogenes* (+) *Enterobacter hafniae* (+) del *Enterobacter cloacae* (-) y *Enterobacter agglomerans* (-) (Mac Faddin, 1980).

6.3.8. MOVILIDAD, INDOL, ORNITINA (MIO).

Por su composición, es posible detectar 3 reacciones en un mismo tubo: movilidad, presencia de ornitina descarboxilasa e indol.

Método de siembra por picadura. La movilidad se demuestra por un enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

de inoculación. La ornitina es el sustrato para la detección de la enzima ornitina descarboxilasa, el púrpura de bromocresol es el indicador de pH. El indol se produce a partir del triptófano por los microorganismos que contienen la enzima triptofanasa.

6.3.9. MOVILIDAD, INDOL, SULFUROS (SIM).

Se utiliza para determinar tres factores: producción de sulfuro de hidrógeno, detección de indol y movilidad. Determina si la bacteria a través de la acción de diversas triptofanasas puede degradar el triptófano a indol. Evalúa si hay producción de H₂S a partir de aminoácidos azufrados. Indica si la bacteria es móvil.

6.3.10. PRUEBA DE LA CATALASA.

Determina la presencia de la enzima catalasa, que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos.

La enzima catalasa se encuentra en bacterias que contienen citocromos; la excepción principal es el *Streptococcus*. Por lo general, los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. La mayoría de las bacterias anaerobias (por ejemplo, especies de *Clostridium*) poseen la enzima peroxidasa en lugar de la catalasa. Tanto las catalasas como las peroxidasas entran en la clasificación enzimática general de "hidroperoxidasas". La catalasa es una hemoproteína; el grupo prostético está formado por cuatro átomos de hierro trivalente (Fe³⁺-férrico) moléculas que retienen su estado oxidado durante la actividad enzimática (Cantarow., Schepartz, 1962).

6.3.11. PRUEBA DE LA OXIDASA.

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que cataliza la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular. Se produce agua o peróxido de hidrógeno según la

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

especie bacteriana. El oxígeno es el aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones.

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El oxígeno es el aceptor de hidrogeno final, produciendo a partir del hidrogeno, según la especie bacteriana y su sistema enzimático (Frobisher., 1957).

6.3.12. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN.

Determina la capacidad de un microorganismo para secretar la enzima amilasa para la degradación de almidón en moléculas más pequeñas.

6.3.13. LICUEFACCIÓN DE LA GELATINA.

Determina la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que a su vez son detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina.

Se incorpora gelatina a diversos medios para determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico que, a su vez son detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina presente. Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas primero debe ser catabolizada en componentes más pequeños. Las enzimas exocelulares de tipo proteolítico, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas, y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana (Mac Faddin., 1980).

6.3.14. MEDIO DE CULTIVO CON 7% de NaCl.

Cada microorganismo tiene requerimientos de actividad de agua que permiten su proliferación. Algunas bacterias, hongos y las levaduras son capaces de crecer mejor en medios con una actividad de agua baja.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La variación en la concentración del soluto no solo altera la disponibilidad de agua, sino también la presión osmótica, que es la concentración

6.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

El crecimiento de la población microbiana se siguió midiendo los cambios en el número de células. Esto se realizó colocando tubos de caldo nutritivo más el sembrado inicial de bacterias en la incubadora a 37°C procediendo a la toma de alícuotas en tiempos determinados después del sembrado (tiempo cero) de las bacterias en caldo nutritivo, esto pudo medirse directamente al microscopio mediante muestras líquidas en la cámara de conteo Petroff-Hausser.

6.5 ENSAYOS CON PLOMO.

Se evaluó el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de plomo (0.32, 0.629, 1.95, 5.66, 6.59 mM) sobre el crecimiento de las bacterias en medio líquido, al igual se mantuvieron las cepas sin exposición a Pb. Las pruebas se realizaron por triplicado. El crecimiento se evaluó midiendo la concentración de proteínas totales mediante la técnica de Lowry la que constituye un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se le agregó un reactivo capaz de formar un complejo colorido con las proteínas, siendo la intensidad del color directamente proporcional a la concentración de las mismas, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas:

- 1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2) La reducción, en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, se da por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, donde el cobre actúa como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin- Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

6.5.1 CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.

Esta se llevó a cabo en placas con agar nutritivo y en tubos (transparentes) con caldo nutritivo, en los cuales se adicionaron las concentraciones crecientes de plomo antes mencionadas, esta determinación se realizó con la finalidad de observar cual es la concentración máxima tolerada durante el crecimiento bacteriano, ya que esta ayudará a confirmar la resistencia de las cepas a las diferentes concentraciones de plomo y además permitirá establecer las concentraciones toleradas en estudios posteriores.

6.5.2 SELECCIÓN DE COLONIAS SENSIBLES Y TOLERANTES A PLOMO.

Se realizó la selección de las colonias bacterianas de acuerdo al crecimiento mostrado en la prueba de concentración mínima inhibitoria. Las colonias que presentaron crecimiento se aislaron y sembraron en caldo nutritivo para procurar su preservación. A las muestras anteriores se les realizó la técnica de Lowry para la cuantificación de proteínas totales.

6.6 EXAMEN MICROSCÓPICO.

Este se realizó después de la exposición a plomo en las colonias seleccionadas mediante un frotis y la Tinción de Gram para observar las

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

características morfológicas (ver figura 4) en un microscopio óptico marca Olympus (modelo: CX41RF/SP-320), a un aumento de 100X.

6.7 ENSAYOS BIOQUÍMICOS.

6.7.1. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST).

Las muestras de bacterias tomadas a diferentes tiempos se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado fue disuelto en un amortiguador de fosfatos 20 mM, EGTA 0.1 mM y KCl 5mM a pH 7.4. Se midió la concentración de proteínas totales por el método de Lowry. La proteína se ajustó a 1 mg/ml y se realizó el ensayo en un medio que contendría fosfato de potasio 0.1 M pH 6.5, al cual se le agregó glutatión reducido 1mM, el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno 1mM y la enzima (suspensión bacteriana). Se midió el incremento de absorbancia a 350 nm cada 20 segundos por un tiempo total de tres a cinco minutos en un espectrofotómetro ultravioleta/visible (Habig y Jakoby, 1981).

6.7.2. MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).

Este método se utilizó para determinar el grado de lipoperoxidación de células bacterianas por medio de la producción de TBARS. Este se basa en la reacción de dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) con una de MDA, produciendo dos moléculas de agua y un complejo colorido, el cual se midió espectrofotométricamente a 535 nm.

Se suspendieron 200µl de la muestra lavada y centrifugada en 800µl de PBS (8.1 g de NaCl, 2.302 g de NaHPO₄ y 0.194 g de NaH₂PO₄ aforar en 1 litro de agua a pH 7.4), 25µl de butirilhidroxitolueno (BHT) Y 350µl de ácido tricloroacético (TCA) al 30%. La mezcla se colocó en hielo 2.5 horas, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. A 100µl del sobrenadante se le agregó

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

EDTA 0.1 M más 250µl de TBA al 1%, se colocó a ebullición durante 15 min, se procedió a leer en un espectrofotómetro ultravioleta-visible de doble haz, marca Perkin Elmer (modelo Lambda 25L600-00BB) (Navarro, 1999).

6.7.3. ELECTROFORESIS.

La palabra electroforesis, proviene de los prefijos griegos *electro* que significa electrón y *phoresis* traslación. La electroforesis se utiliza para lograr la separación de moléculas al paso de una corriente eléctrica continua y para lograr la migración y separación de moléculas, al aplicar un campo eléctrico. La separación se basa en la diferencia de peso en la molécula. De manera que la migración neta es directamente proporcional al peso de las proteínas constituyentes de la molécula.

Se prepararon geles en condición desnaturalizante al 12% (ver preparación en la tabla 6) y se usaron marcadores de peso molecular preteñidos (marca BenchMark™ Prestained). Las muestras se ajustaron de 1 a 5 mg/ml, para colocarlas en los pozos. Se corrió de 60 a 100 Volts, por un periodo de 1 a 2 horas o hasta que el frente salió. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para posteriormente desteñirse con solución para desteñir (bajo metanol y alto metanol) hasta hacer visibles las bandas proteicas y proceder a hacer su análisis.

Tabla 6. Preparación de los geles para electroforesis.

Solución	Gel separador		Gel condensador	
	1 Gel	2 Geles	1 Gel	2 Geles
H ₂ O	2.025	4.05	1.425	2.85
Sep B/ D cond	1.875 (sol B)	3.75 (sol B)	0.625 (sol D)	1.25 (sol D)
A	3.0	6.0	0.250	0.5
C	0.075	0.15	0.00625	0.0125
Persulfato	0.54375	1.09	0.175	0.35
Temed	0.00375	0.0075	0.0025	0.005

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Solución A: Acrilamida 30%; Bis-acrilamida 0.8%.

Solución B: Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (100ml: 18.2 g Tris-HCl).

Solución C: SDS 10%

Solución D: Tris-HCl 0.5M pH 6.8 (100 ml: 6.1 g Tris-HCl)

Persulfato de amonio al 1%. Preparar al momento y usar la cantidad.

Temed: directo del frasco.

Solución fijadora: Metanol 40%-ácido acético 10%.

Solución para desteñir: Bajo metanol (metanol 30%) más Acético 7.5%.

Alto metanol: (metanol al 50%) más Acético 7.5%.

Tinción: Coomassie R-250 0.2%/MeOH 50%

Amortiguador de corrida: 14.4 g de glicina, 3.0 g de Tris-HCl, 10.0 ml de solución C en 100 ml de agua.

Amortiguador de la muestra: 5.0 ml de glicerol, 2.5 ml de solución D, 1.0 ml de solución C, 100 μ l de β -mercaptoetanol, 0.1 mg de azul de bromofenol en 100 ml de agua.

VII. RESULTADOS

7.1 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS Y ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LAS MUESTRAS

Se aislaron un total de 13 colonias bacterianas de las cuales nueve (clasificadas entre las muestras tipo a y b) se tomaron de zonas industriales en donde muy posiblemente existe presencia de metales pesados contaminando los efluentes.

Tabla 7. Muestras, lugar de recolección y ubicación. Los números 1, 2 y 3 significan la región del efluente donde fueron tomadas, 1 tomadas en la orilla izquierda del río, 2 tomadas de la zona centro del río y 3 tomadas en la orilla derecha del río Papaloapan de san juan bautista,

Muestra	Lugar de recolección	Ubicación
a)	Papaloapan 1	Zona centro medio, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Papaloapan 2	Zona Centro Norte, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Papaloapan 3	Zona Centro Sur, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Playa de mono 1	Localidad Playa de Mono Norte, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Playa de mono 2	Localidad Playa de Mono Sur, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Sumatra 1	Colonia San Rafael Norte, Tuxtepec, Oaxaca.
a)	Sumatra 2	Colonia San Rafael Sur, Tuxtepec, Oaxaca.
b)	Arroyo Moctezuma (AN)	Zona seguro social, Tuxtepec, Oaxaca.
b)	Arroyo Moctezuma (Eco)	Zona Seguro Social, Tuxtepec, Oaxaca.
c)	Plan de águila 1	Comunidad Plan de Águila Norte, Chiltepec, Oaxaca.
c)	Plan de águila 2	Comunidad Plan de Águila Sur, Chiltepec, Oaxaca.
c)	Orquídeas	Comunidad San Isidro Naranjal Norte, Chiltepec, Oaxaca.
c)	Naranjal	Comunidad San Isidro Naranjal Sur, Chiltepec, Oaxaca.

VII. RESULTADOS

Las cuatro restantes (clasificadas como c) se tomaron de zonas alejadas del centro de la ciudad de Tuxtepec, donde se piensa que aún no se presenta contaminación del agua. La tabla 7 muestra el tipo de muestra así como el lugar de su recolección y la ubicación del mismo.

De las 13 muestras analizadas por técnicas de tinción y microscopia se identificaron tres colonias Gram (-) dos de las cuales fueron bacilos y una cocos. Las colonias restantes resultaron ser Gram (+); de ellas, cuatro colonias fueron cocos y nueve se identificaron como bacilos. Todas las colonias mostraron características estructurales diferentes ya que se encontraron duplas, tétradas, aglomerados así como diferentes tamaños celulares. La tabla 8 resume los resultados del análisis microscópico de las 13 muestras.

Tabla 8. Análisis microscópico y colonial de las muestras de agua de afluentes del río Papaloapan y lugares cercanos a la zona.

MUESTRAS	ANÁLISIS MICROSCÓPICO		
	Tinción de Gram	Forma	Características de la colonia
a) Papaloapan 1	(-)	Bacilos	En duplas y aisladas, colonia pura.
a) Papaloapan 2	(-)	Cocos Bacilos	En duplas y cadenas, colonia pura.
a) Papaloapan 3	(+)	Cocos Bacilos	Duplas, tétradas y aglomeradas
a) Playa de mono 1	(+)	Cocos Bacilos	Tétradas y aglomeradas.
a) Playa de mono 2	(+)	Cocos Bacilos	En cadenas
a) Sumatra 1	(+)	Bacilos	Aisladas, colonia pura.
a) Sumatra 2	(-)	Bacilos Cocos	Aisladas, colonia contaminada.
b) Arroyo Moctezuma (AN)	(+)	Cocos	Aisladas, colonia pura.
b) Arroyo Moctezuma (Eco)	(+)	Cocos	Aisladas, colonia pura.
c) Plan de águila 1	(+)	Bacilos	Duplas y cadena.
c) Plan de águila 2	(+)	Bacilos	Aglomeradas
C) Orquídeas	(+)	Bacilos	Aislados, colonia pura.
c) Naranjal	(+)	Bacilos	Diferentes tamaños

VII. RESULTADOS

7.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA PARA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS.

Los datos de la tabla 9 señalan las concentraciones de metales pesados determinados en las muestras de agua tomadas de diferentes ambientes. Se observó que en tres muestras no se logró detectar la presencia de metales pesados [Playa de mono (1y 2), Plan de Águila 2 y Orquídeas] lo cual indica probablemente que estas aguas se encuentran presuntamente sin la presencia de estos metales.

Se demostró la presencia de cromo en las muestras de agua Papaloapan 1 y Papaloapan 3 con una concentración de 2.1 a 2.3 ppm. Sumatra y Naranjal en un intervalo de trazas hasta 1.2 ppm.

Tabla 9. Determinación de metales pesados de las muestras de agua procedentes de diferentes zonas del Distrito Tuxtepec, Oaxaca. ND significa no determinado

Muestras		Determinación de metales en las muestras de agua (ppm)
a)	Papaloapan 1	Plomo: 1.2 Cromo: 2.3
a)	Papaloapan 2	Cadmio: 0.75
a)	Papaloapan 3	Plomo: 1.2 Cromo: 2.1
a)	Playa de mono 1	-----
a)	Playa de mono 2	-----
a)	Sumatra 1	Mercurio: 0.00072
a)	Sumatra 2	Plomo: trazas Cadmio: trazas
b)	Arroyo Moctezuma (AN)	ND
b)	Arroyo Moctezuma (Eco)	ND
c)	Plan de águila 1	Plomo: Trazas Cadmio: trazas
c)	Plan de águila 2	-----
c)	Orquídeas	-----
c)	Naranjal	Plomo: 0.85

VII. RESULTADOS

Uno de los elementos que se ha reportado como más dañino para los seres vivos es el mercurio (Chávez, 1988; Santos, 1997; Goering, 2000) Este elemento fue determinado en aguas del río Sumatra alcanzando una concentración de 0.00072 ppm. En el caso del cadmio, este metal se determinó en las muestras Papaloapan 2, Sumatra 2 y Plan de águila en un intervalo de trazas hasta 0.75 ppm. El plomo se encontró en las zonas Papaloapan 1, Papaloapan 3, Sumatra 2, Plan de Águila 1 y Naranjal.

Los resultados anteriores demuestran que en zonas cercanas a industrias se encontraron los cuatro metales pesados a diferentes concentraciones, lo cual quiere decir que esta agua se encuentran contaminadas por metales pesados provenientes, muy probablemente, de las industrias que se encuentran cercanas a las mismas (industria cervecera e industria papelera). En la zona del arroyo Moctezuma, el cual se clasifica como un arroyo de aguas negras, no se determinó la presencia de metales pesados, sin embargo se podría suponer su existencia debido a que este río atraviesa lugares industriales, la zona del hospital y zonas urbanas. Finalmente en la zona clasificada como no contaminada se determinó la presencia de plomo y cadmio procedentes, probablemente, de las actividades humanas llevadas a cabo dentro de los ríos que pasan por la comunidades.

7.3 SELECCIÓN DE COLONIAS QUE CRECIERON EN MEDIOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO.

Para iniciar la selección de las colonias, las 13 iniciales fueron sometidas a crecimiento en medios de cultivo sólido en presencia de 1.95 mM de plomo, siendo esta concentración tomada como criterio de selección (ya que esta concentración del metal es soluble en el medio de cultivo). La tabla 10 indica que solo cuatro colonias crecieron a esta concentración de plomo. Todas las colonias presentaron forma de bacilo, tres Gram (+) y una Gram (-).

VII. RESULTADOS

Estas cuatro colonias microbianas seleccionadas se clasificaron como cepas bacterianas resistentes a plomo y se eligieron 3 debido a que AN y Eco presentaron las mismas características y fueron aisladas del mismo efluente, en contraste *Bacillus pumillus* (Playa de mono) fue aislado de un ambiente completamente diferente. Lo anterior ayudó a la selección de cepas para poder así, en los resultados presentados más adelante, hacer una comparación entre las cepas.

Tabla 10. Selección de colonias tolerantes a plomo en placa de acuerdo a sus características.

Muestras	Forma	Gram	Color de colonia	Tamaño de la colonia	[Pb]
a) Papaloapan 1	Bacilo	(-)	Beige (opaca)	2mm	1.95 mM
a) Playa de mono	Bacilo	(+)	Beige (opaca)	1mm	1.95 mM
b) Arroyo Moctezuma (AN)	Bacilo	(+)	Beige (opaca)	2mm	1.95 mM
b) Arroyo Moctezuma (Eco)	Bacilo	(+)	Beige (opaca)	2mm	1.95 mM

7.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICO-MICROBIOLÓGICA DE COLONIAS BACTERIANAS RESISTENTES A PLOMO.

La caracterización se realizó a las colonias bacterianas que presentaron crecimiento en presencia de plomo. En la tabla 11 se puede observar que la colonia denominada Papaloapan 1 (zona centro medio, Tuxtepec, agua contaminada con Pb y Cr) presentó resultados diferentes en comparación con las colonias Arroyo Moctezuma (AN) (Zona cercana al seguro social, metales pesados no determinados), Playa de mono (Localidad de playa de mono norte, sin detección de metales pesados) y Arroyo Moctezuma (Eco) (Zona cercana al seguro social, metales pesados no determinados). Estos resultados permitieron diferenciar la existencia de dos especies diferentes.

VII. RESULTADOS

Arroyo Moctezuma (AN y Eco) y Playa de mono presentan los mismos resultados en las pruebas realizadas por lo cual se cree que podría tratarse de la misma especie. Físicamente la diferencia que se puede observar es que las cepas mencionadas fueron aisladas a partir de diferentes afluentes de agua o que posiblemente se trate de una bacteria de origen común quizá de origen humano, ya que en el seguro social se han detectado bacterias provenientes de desechos de muestras de pacientes.













Tabla 11. Resultados pruebas bioquímicas.

Colonias	Papaloapan 1	Arroyo Moctezuma (AN)	Playa de mono	Arroyo Moctezuma (Eco)
Gram	(-)	(+)	(+)	(+)
Agar de hierro triple azúcar (TSI)	(+)	A/A	A/A	A/A
Movilidad, Indo, Sulfuros (SIM)	Inmóvil	Móvil	Móvil	Móvil
Movilidad Indol, Ornitina (MIO)	Inmóvil	Móvil	Móvil	Móvil
Desanimación de la lisina (LIA)	(+)	(+)	(+)	(+)
Caldo rojo fenol más sacarosa (CRFL)	(-)	(+)/sg	(+)/sg	(+)/sg
Rojo de metilo (RM)	(-)	(+)	(+)	(+)
Descarboxilación de la ornitina	(+)	(-)	(-)	(-)
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)
Citrato-Simmons (C-S)	(+)	(-)	(-)	(-)
Almidón	(-)	(-)	(-)	(-)
Caldo maltosa	(+)	(+)	(+)	(+)
Oxidasa	(-)	(-)	(-)	(-)
Licuefacción de la gelatina	(-)	(-)	(-)	(-)
Medio de cultivo más 7.1 de NaCl	(+)	(+)	(+)	(+)










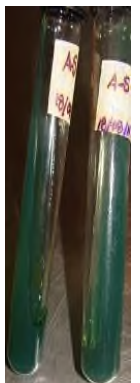






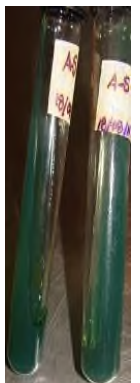






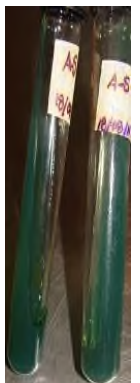




VII. RESULTADOS

La tabla 12 muestra las imágenes de los resultados obtenidos durante la realización de las pruebas bioquímicas.

Tabla 12. Imágenes de las pruebas bioquímicas.

COLONIAS	TSI	SIM	MIO	LIA	CRFL	RM
Papaloapan 1						
Arroyo Moctezuma (An) Playa de mono Arroyo Moctezuma (Eco)						

VII. RESULTADOS

COLONIAS	ORNITINA	CATALASA	C-S	ALMIDÓN	MALTOSA	GELATINA	NaCl 7%
Papaloapan 1							
Arroyo Moctezuma (An)							
Playa de mono							
Arroyo Moctezuma (Eco)							

TSI= Agar de hierro triple azúcar

SIM = Movilidad, Indol, Sulfuros

MIO = Movilidad, Indol, Ornitina

LIA = Desaminación de la lisina

CRLF = Caldo rojo fenol más sacarosa

RM = Rojo de metilo

C-S = Citrato-Simmons

VII. RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la realización de las pruebas bioquímicas y utilizando el manual Bergey's se logró determinar el género y la especie de las bacterias estudiadas. Los resultados se presentan en la tabla 13. En ella se puede ver la existencia de bacilos con Gram tanto positivos como negativos, los cuales pertenecen a las familias Enterobacteriaceae y Bacillaceae. De los bacilos pertenecientes a la familia Bacillaceae se presentan tres colonias bacterianas con las mismas características morfológicas y bioquímicas. Analizando los datos anteriores se decidió trabajar con las cepas que presentaron mayor crecimiento a las 24 horas de sembrado en placas de agar nutritivo más plomo (pruebas presentadas más adelante), mismas que fueron Playa de mono y Arroyo Moctezuma (Eco). No se descarta que las bacterias sean las mismas, lo que se puede pensar es que tienen diferente susceptibilidad al plomo y esto puede deberse a que se aislaron de diferentes ambientes.

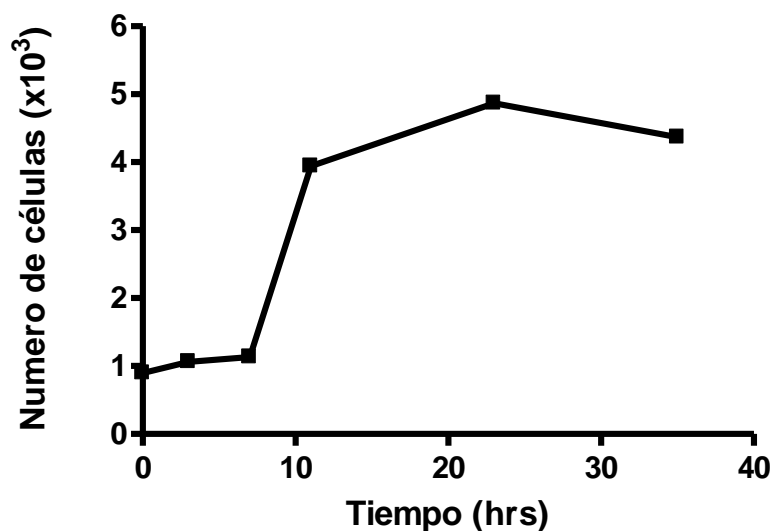
Tabla 13. Determinación bacteriana a partir de resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas.

	Colonia			
	Papaloapan 1	Playa de mono	Arroyo Moctezuma (AN)	Arroyo Moctezuma (Eco)
Gram	(-)	(+)	(+)	(+)
Forma	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Familia	Enterobacteriaceae	Bacillaceae	Bacillaceae	Bacillaceae
Género	Hafnia	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Especie	alvei	pumillus	Pumillas	pumillus

VII. RESULTADOS

7.5 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

En la gráfica 1 se observa que la colonia bacteriana identificada como *Hafnia alvei* (aislada de la zona centro medio, Tuxtepec, Oaxaca) presentó, después del sembrado inicial, un estado de latencia de aproximadamente 8 horas con una población inicial promedio de 1000 células, alcanzando su fase exponencial a las 23 horas con un número máximo de aproximadamente 4.4×10^3 células. Posteriormente la densidad celular comenzó a decrecer (fase de muerte).

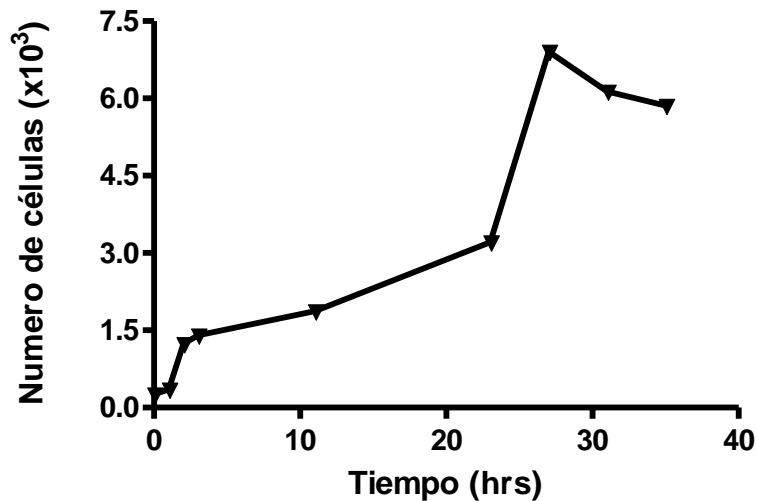


Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Hafnia alvei* (Gráfica representativa de 2 repeticiones).

En la gráfica 2 se observa que *Bacillus pumillus* (Playa de mono) presentó un estado de latencia de 3 horas después de su sembrado inicial (con una población promedio de 0.26×10^3 células) y alcanzó su fase exponencial a las 23 horas con un número aproximado de 3.2×10^3 células, posteriormente comenzó la fase de muerte debido a que se observa un decaimiento en el número de células.

VII. RESULTADOS

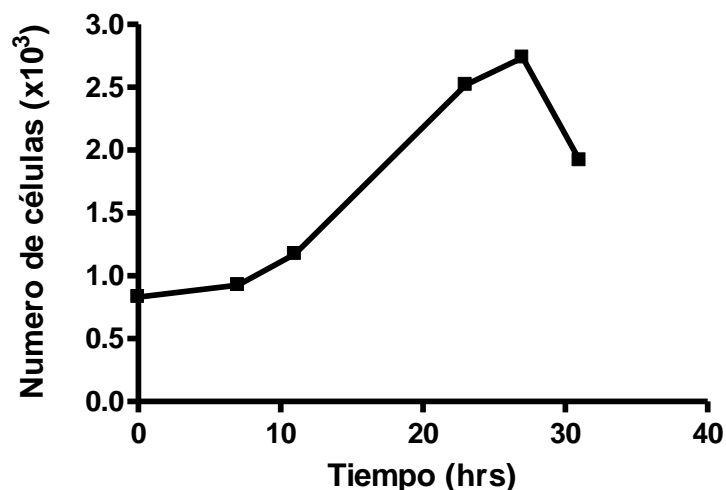
La cepa presenta una cinética diferente a la primera bacteria.



Gráfica 2. Cinética de crecimiento de *Bacillus pumillus* (Playa de mono) (Gráfica representativa de 2 repeticiones).

En la gráfica 3 se observa que la colonia bacteriana *Bacillus pumillus* (Eco, aislada de una zona cercana al Seguro Social) presentó un estado de latencia de 8 horas después de su sembrado inicial (con una población promedio de 0.9×10^3 células) y alcanzó su fase exponencial a las 23 horas con un número aproximado de 2.7×10^3 células, posteriormente comenzó la fase de muerte observándose un decaimiento en el número de células.

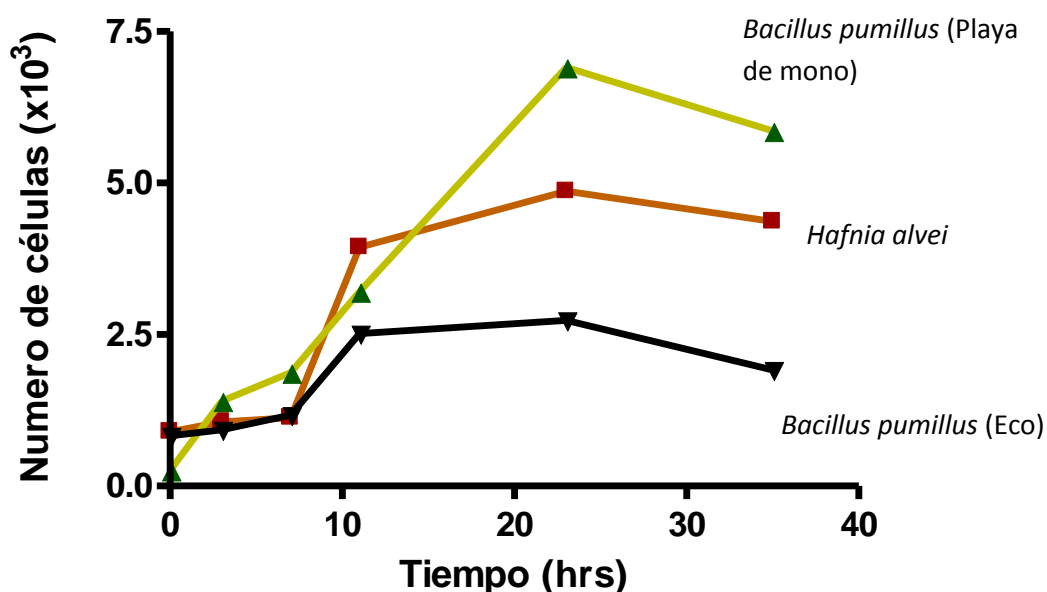
VII. RESULTADOS



Gráfica 3. Cinética de crecimiento de *Bacillus pumillus* (Eco) (Gráfica representativa de 2 repeticiones).

La grafica 4 muestra que las 3 cepas poseen un periodo de latencia parecido y aproximado de 10 horas a partir del cual comienza el crecimiento celular. La comparación de las cinéticas de crecimiento de las tres cepas puede observarse en la gráfica 4. En ella se puede observar que *Hafnia alvei* y *Bacillus pumillus* (aislado del arroyo contaminado y denominado como Eco) presentan un comportamiento parecido pero la densidad celular es diferente ya que *Hafnia alvei* muestra fases log, estacionaria y de muerte. *Bacillus pumillus* (aislado de playa de mono) muestra un comportamiento diferente a de las otras 2 cepas mostrando una fase log muy larga, escasa fase estacionaria y muerte celular. El número de células alcanzado por esta cepa es mayor en relación con las otras 2.

VII. RESULTADOS



Gráfica 4. Comparación de la cinética de crecimiento de las colonias (*Hafnia alvei* en color naranja, *Bacillus pumillus* en color verde y *Bacillus pumillus* (Eco) en color negro (Gráfica representativa de 2 repeticiones).

7.6 CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO

Para realizar este estudio se utilizaron las 3 cepas seleccionadas como resistentes y se expusieron a concentraciones crecientes del metal. En la sección 7.3 se observó que las colonias crecieron a una concentración de 1.95 mM de Pb. A partir de este dato se establecieron 2 concentraciones por debajo y 2 concentraciones por arriba mismas que se eligieron por ser concentraciones solubles y no precipitar en el medio de cultivo.

a) Medio de cultivo líquido

En la tabla 14 se reporta el crecimiento máximo de las bacterias a diferentes concentraciones de plomo en tubos con caldo nutritivo, donde el crecimiento celular se determinó mediante la turbidez. A las 24 horas se observó que en

VII. RESULTADOS

comparación con los tubos en el tiempo inicial, los tres primeros tubos comienzan a ponerse turbios por lo cual se confirmó el crecimiento bacteriano, a las 48 horas se observó turbidez hasta la cuarta concentración. 5.66 mM fue la máxima concentración a la cual se observaron cambios en la turbidez de los tubos correspondientes a las 2 cepas de *Bacillus* (ver tabla 14). Posiblemente en el tubo con la última concentración no se logró distinguir el crecimiento debido a que en esta concentración el color del medio se aprecia ligeramente opaco, lo cual pudo afectar las observaciones realizadas.





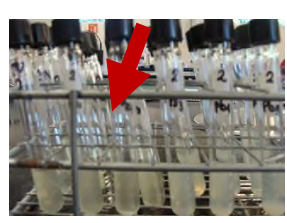
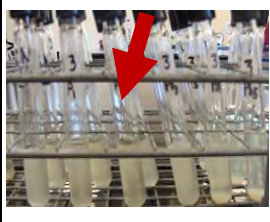



En el caso de *Hafnia alvei*, el crecimiento se logró hasta la concentración de 6.59 mM a partir de las 48 horas, lo cual puede indicar que esta bacteria pudo utilizar algún mecanismo de defensa mismo que le ayudó a resistir esta concentración del elemento tóxico. La tabla 15 muestra las imágenes del crecimiento de las 3 diferentes bacterias en concentraciones crecientes de plomo.

Tabla 14. Concentración máxima de Pb a la cual crecieron las diferentes cepas

Pb (mM)	Colonia			Tiempo (Horas)
	<i>Hafnia alvei</i> (Papaloapan 1)	<i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono)	<i>Bacillus Pumillus</i> (Arroyo Moctezuma (Eco))	
0.32	+	+	+	24
0.629	+	+	+	24
1.95	+	+	+	24
5.66	+	+	+	48
6.59	+	X	X	

VII. RESULTADOS

Tabla 15. Crecimiento de las bacterias en caldo nutritivo más concentraciones crecientes de plomo.

	<i>Hafnia alvei</i> (Papaloapan 1)	<i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono)	<i>Bacillus pumillus</i> (Arroyo M.(Eco))
Inicial			
24			
48			

← Indica donde es visible el crecimiento de las bacterias.

b) Medio de cultivo solido

Se realizó el crecimiento de bacterias a concentraciones crecientes de plomo en placa con agar nutritivo; en la tabla 17 se puede observar que a las 24 horas *Hafnia alvei* y el *Bacillus pumillus* (Eco) presentaron crecimiento hasta la concentración 1.95 mM, mientras que el *Bacillus pumillus* (playa de mono) creció hasta la concentración de 5.66 mM. A las 48 horas las colonias *Hafnia alvei* y *Bacillus pumillus* (Eco) siguieron creciendo lo cual se manifestó como el aumento del tamaño de la colonia. En estas dos bacterias se inhibió el crecimiento cuando fueron expuestas a 5.66 y 6.59 mM del tóxico. *Bacillus pumillus* (Playa de mono) siguió creciendo hasta las 48 horas, inhibiéndose su crecimiento a la concentración de 6.59 mM.

VII. RESULTADOS

La tabla 16 muestra el crecimiento de las tres bacterias a diferentes concentraciones de plomo durante 48 horas de exposición.

De los resultados observados en placa de agar podemos constatar que uno de los efectos de la exposición a plomo podría ser el retraso del crecimiento celular. Los datos observados en las concentraciones más altas del metal (5.66 y 6.58 mM) podría deberse a que el tóxico no se distribuyó uniformemente en la placa.

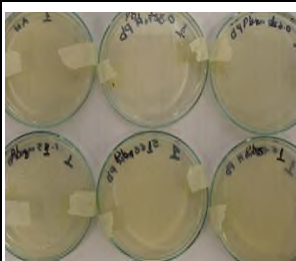
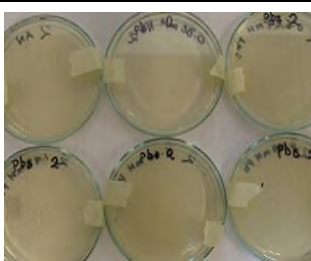
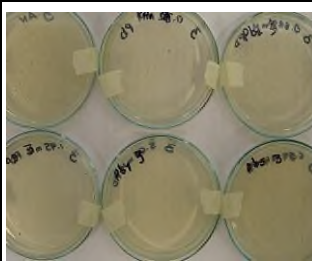

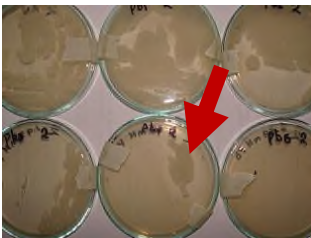


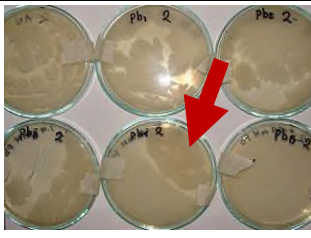
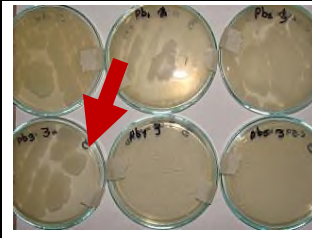
Tabla 16. Crecimiento bacteriano en placas con agar nutritivo más concentraciones crecientes de Pb (n=3).

Pb (mM)	Colonia			Tiempo (Horas)
	<i>Hafnia alvei</i> (Papaloapan 1)	<i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono)	<i>Bacillus Pumillus</i> (Arroyo Moctezuma (Eco))	
0.32	+	+	+	24
0.629	+	+	+	24
1.95	+	+	+	24
5.66	x	+	X	48
6.59	x	x	X	

(+) Indica crecimiento bacteriano y (x) que las bacterias no crecen.

VII. RESULTADOS

Tabla 17. Crecimiento macroscópico de las diferentes cepas bacterianas en placas con agar nutritivo más concentraciones crecientes de plomo.

Tiempo (horas)	<i>Hafnia</i>	<i>Bacillus</i> (Playa de mono)	<i>Bacillus</i> (Eco)
Inicial			
24			
48			

← Indica el crecimiento de las bacterias

7.6.1 Análisis microscópicos de las colonias resistentes a plomo.

Hasta este punto, se observó que las cepas *Hafnia alvei* y *Bacillus pumillus* pueden crecer en presencia de diferentes concentraciones de plomo. Para analizar un posible efecto del metal en la morfología colonial y estructural de las bacterias expuestas al metal se realizó el análisis microscópico de la tinción de Gram y la morfología de las colonias que mostraron crecimiento en tubos y cajas con medio nutritivo más concentraciones crecientes de Pb. Se observó que *Hafnia alvei* y *Bacillus pumillus* (Eco) no presentan cambios en la tinción

VII. RESULTADOS

de Gram ni tampoco en sus características morfológicas, sin embargo *Bacillus pumillus* (Playa de mono) no presentó cambios en la tinción de Gram pero si presentó cambio en su tamaño celular, mismo que se observó cómo se indica en la figura 25B y que se manifestó al exponer a las células a una concentración alta del tóxico. De la misma manera presentó una variación colonial no observada en las cepas restantes. La tabla 18 muestra las características morfológicas y microscópicas de las colonias que presentaron resistencia al plomo constatando que las bacterias conservan su estructura celular y composición de pared, por lo cual sus características de tinción no se ven alteradas, aunque si su tamaño en cada caso al exponerse a concentraciones altas de metal. La figura 25 muestra las características coloniales y resalta el cambio de coloración de la colonia perteneciente a *Bacillus pumillus* (Playa de mono) cuando fue expuesta a una concentración alta de Plomo.

Tabla 18. Características de las colonias seleccionadas como resistentes a diferentes concentraciones de plomo (Pb).

Colonia	[Pb]	Morfología	Tinción de Gram	Características
Papaloapan 1 (Hafnia)	1.95mM	Bacilo	Gram (-)	En duplas y aglomerados.
<i>Bacillus pumillus</i> (Arroyo Moctezuma (Eco))	1.95mM	Bacilo	Gram (+)	Aglomerados
<i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono)	5.66mM	Bacilo	Gram (+)	Aglomerados, cambio de tamaño, alargadas e hinchadas.

Las bacterias de la especie *Bacillus pumillus* (Playa de mono) al ser expuestas a diferentes concentraciones de plomo, y en dos medios de cultivo diferentes mostraron cambios coloniales macroscópicos en la coloración ya que el color crema normal cambió a color café intenso, tal como se observa en la figura 25.

VII. RESULTADOS

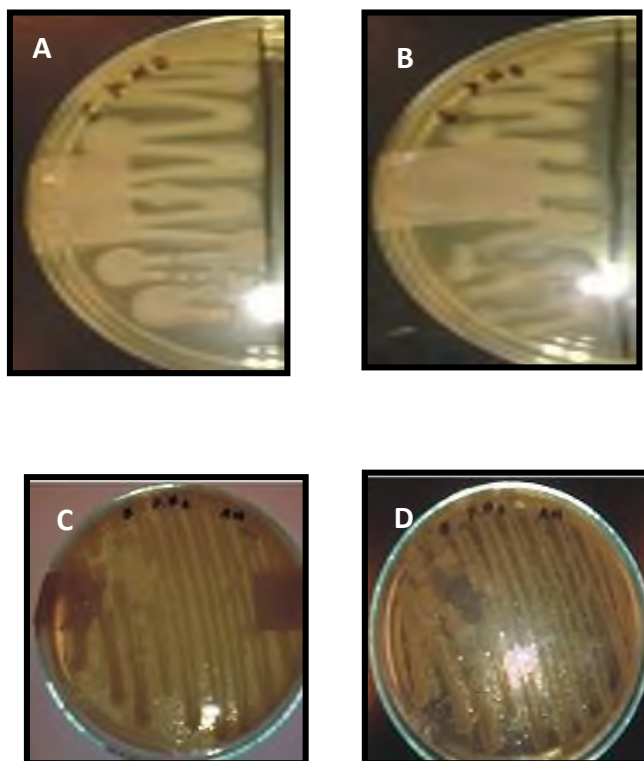


Figura 25. Crecimiento de *Bacillus pumilus* en diferentes medios con diferentes concentraciones de plomo: **A)** *Bacillus pumilus* (Playa de mono) crecido en medio agar cuenta estándar en presencia de 0.32 mM de plomo. **B)** *Bacillus pumilus* (Playa de mono) crecido en agar cuenta estándar en presencia de 0.629 mM de plomo. **C)** *Bacillus pumilus* (Playa de mono) crecido en agar nutritivo en presencia de 0.32 Mm de plomo. **D)** *Bacillus pumilus* (Playa de mono) crecido en agar nutritivo en presencia de 0.629 mM de plomo.

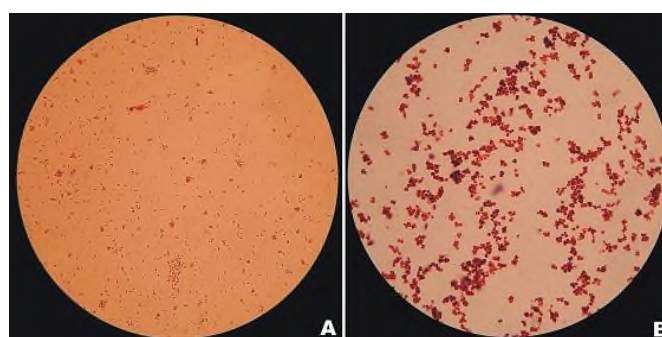


Figura 26. Análisis microscópico de los frotis bacterianos de *Bacillus pumilus* A) Bacterias sin exposición a plomo, observadas a 100X B) Bacterias expuestas a 5.66 mM de plomo observadas a 100X.

VII. RESULTADOS

Bajo estas condiciones las bacterias del género *Bacillus pumillus* provenientes de un ambiente sin contaminación presentaron cambios en su tamaño, ya que las células se observaban más grandes o posiblemente hinchadas, debido posiblemente a un fenómeno osmótico ocasionado por la exposición a plomo (Fotografía B, figura 26) al compararlas con las mismas bacterias sin exposición a plomo (Fotografía A, figura 26).

7.7 ENSAYOS BIOQUÍMICOS

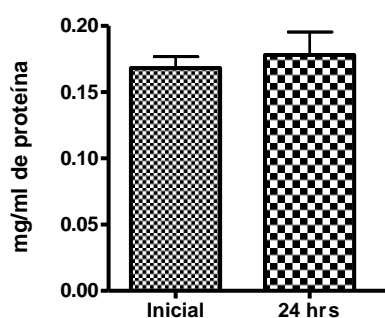
7.7.1 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A PLOMO EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Con la finalidad de conocer el efecto del plomo en las proteínas totales que conforman a las bacterias en estudio se realizó la medición de estas para las cepas *Hafnia alvei* aislada del río Papaloapan, *Bacillus pumillus* obtenido de Playa de mono y *Bacillus pumillus* recolectado del Arroyo Moctezuma (denominado Eco), en ausencia y presencia de concentraciones variables de plomo y a dos tiempos diferentes (correspondientes a diversos estadios de la curva de crecimiento de cada una).

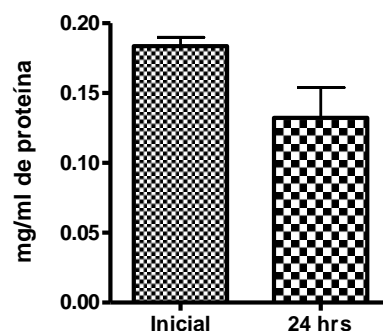
a) *Hafnia alvei* aislada del río Papaloapan

En la gráfica 5 se observa que en función del tiempo en las bacterias no expuestas a plomo la concentración de proteínas totales tiende a aumentar en función del tiempo. En la gráfica 6 se observa que la concentración de proteínas totales en bacterias expuestas a 0.32mM de Pb a las 24 horas disminuyó 18.37%. Se debe recordar que esta especie crece en ambientes en donde hay presencia de plomo y cromo.

VII. RESULTADOS

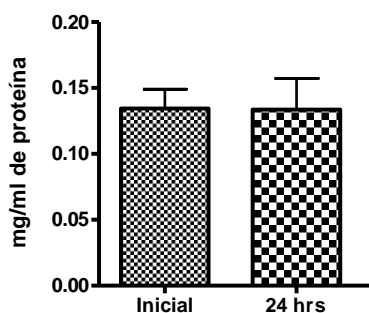


Gráfica 5. Concentración de proteínas totales en *Hafnia alvei* (Papaloapan 1) sin exposición a Pb (n=3) en función del tiempo.

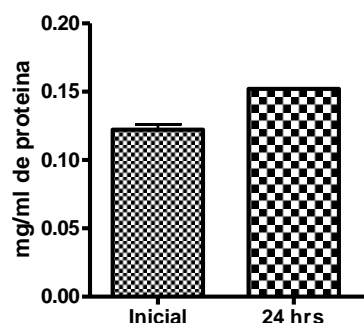


Gráfica 6. Concentración de proteínas totales en *Hafnia alvei* expuesta a 0.32 mM de Pb (n=3) en función del tiempo.

En la gráfica 7 se presenta el contenido de proteínas en bacterias expuestas a plomo a una concentración de 0.629mM y se observa que la concentración de proteínas a las 24 horas después de la exposición al metal no aumentó. Cuando las bacterias expuestas a 1.95 mM de plomo incrementa 5.16% la concentración de proteínas a las 24 horas a partir del sembrado inicial (Gráfica 8). Esto podría indicar que a las 2 concentraciones anteriores el plomo no tiene un efecto significativo inhibitorio en estas bacterias.



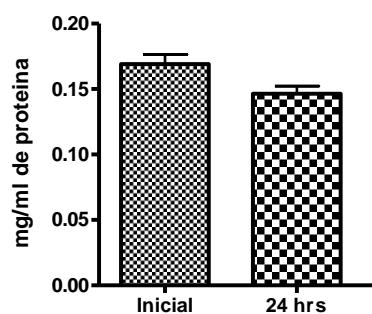
Gráfica 7. Concentración de proteínas totales en *Hafnia alvei* expuesta a 0.629 mM de plomo en función del tiempo.



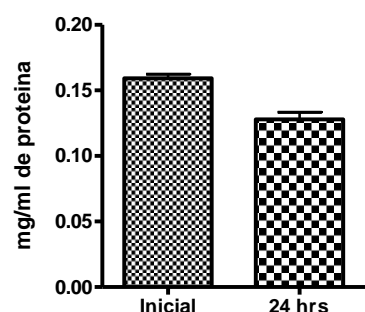
Gráfica 8. Concentración de Proteínas totales en *Hafnia alvei* expuesta a 1.95 mM de plomo en función del tiempo.

VII. RESULTADOS

Cuando *Hafnia alvei* es expuesta a 5.66 y 6.59 mM de Pb se puede observar que a las 24 horas el contenido de proteínas disminuye 16.67%, en comparación con la concentración de proteínas en el tiempo inicial en ambos casos. Lo anterior se puede observar en la graficas 9 y 10. Este comportamiento denota que estas bacterias muestran resistencia a las 3 primeras concentraciones de plomo y que a partir de 5.66 mM de Pb el efecto comienza a ser inhibitorio.



Gráfica 9. Concentración de proteínas totales en *Hafnia alvei* expuesta a 5.66 mM de Pb en función del tiempo (n=3).



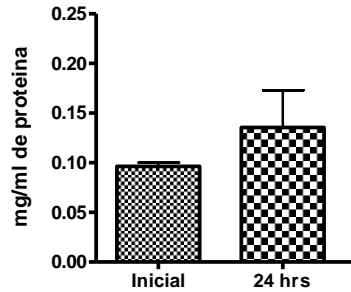
Gráfica 10. Concentración de proteínas totales en *Hafnia alvei* expuesta a 6.59 mM de Pb en función del tiempo (n=3).

b) *Bacillus pumillus* aislado de la zona Playa de mono.

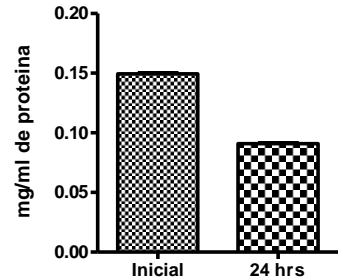
Esta bacteria se aisló de un ambiente acuático libre de metales pesados. Durante la exposición de *Bacillus pumillus* (Playa de mono) a diferentes concentraciones de Pb se pudo observar que estas presentaron un comportamiento diferente al de *Hafnia alvei*. La gráfica 11 muestra la concentración de proteínas totales en función del tiempo (horas) de *Bacillus pumillus* sin exponer a plomo, en ella se observa que a las 24 horas la concentración de proteínas totales aumenta 37.5% reflejando el crecimiento normal de las bacterias de esta especie. Al exponer a *Bacillus pumillus* a 0.32 mM de plomo, se observó una disminución promedio de 30% en la concentración de proteínas totales a las 24 horas en comparación con la

VII. RESULTADOS

concentración inicial. La gráfica 12 muestra la concentración de proteínas totales en *Bacillus pumillus* expuesta a 0.32 mM de plomo.

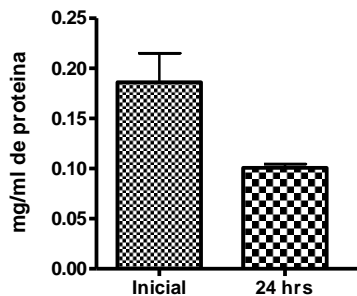


Gráfica 11. Concentración de proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Playa de mono) sin exposición a Pb en función del tiempo (n=3).

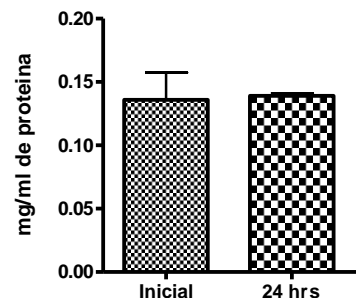


Gráfica 12. Concentración de proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Playa de mono) expuesto a 0.32 mM de Pb en función del tiempo (promedio de 2 mediciones).

Cuando *Bacillus pumillus* creció en presencia de 0.629 mM de plomo se observó una disminución de la concentración de 47.36% de proteínas totales al transcurrir el tiempo tal como se observa en la gráfica 13; mientras que cuando la concentración del metal fue de 1.95 mM el contenido de proteínas totales no se vio afectado. Lo anterior se representa en la gráfica 14.



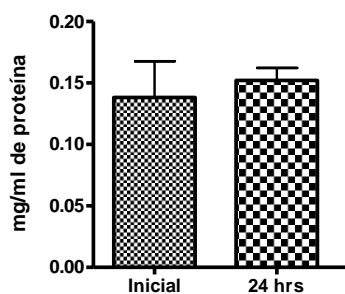
Gráfica 13. Proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Playa de mono) expuesto a 0.629 mM de Pb en función del tiempo (n=3).



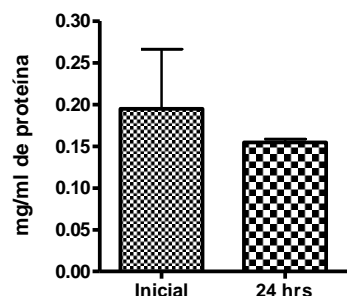
Gráfica 14. Proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Playa de mono) expuesto a 1.95 mM de Pb en función del tiempo (n=3).

VII. RESULTADOS

Al igual que en el caso anterior cuando *Bacillus pumillus* se expuso a 5.66 mM de plomo se observó que la concentración de proteínas totales no disminuyó. La gráfica 15 muestra este comportamiento, mismo que se presenta en la gráfica anterior. Hasta este momento no se tiene una idea del porqué de estos resultados, ya que ningún autor lo ha publicado previamente, sin embargo se puede afirmar que probablemente *Bacillus pumillus* este resistiendo hasta las 24 horas las concentraciones de 1.95 y 5.66 mM de Pb cuando es sembrado en medio líquido. De manera sorprendente la gráfica 16 muestra el efecto que la exposición a 6.59 mM de metal tiene en esta bacteria ya que presentó una disminución de 36.37% de la concentración de proteínas totales en comparación con la concentración inicial. Este efecto es similar al observado en la gráfica 11.



Grafica 15. Concentración de proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Playa de mono) expuesto a 5.66 mM de Pb en función del tiempo (n=3).



Grafica 16. Concentración de Proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Playa de mono) expuesto a 6.59 mM de Pb en función del tiempo (n=3).

c) *Bacillus pumillus* aislado del Arroyo Moctezuma (Eco)

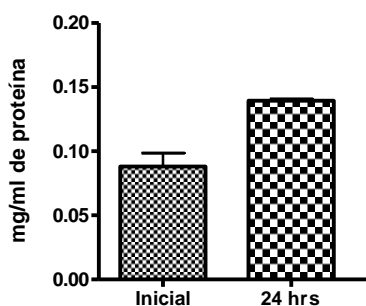
Esta bacteria se aisló de un ambiente acuático contaminado. Se analizó el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de plomo en la concentración de proteínas totales en esta bacteria. Durante la medición de la concentración de proteínas totales del *Bacillus* sin exposición a plomo se observó que la concentración de las mismas aumentó conforme transcurrió el

VII. RESULTADOS

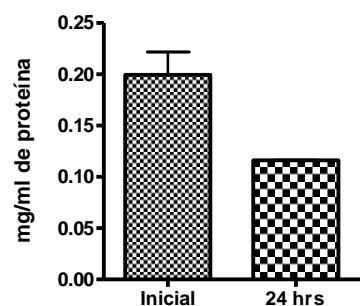
tiempo observándose a las 24 horas un incremento de 35.72%. La gráfica 17 muestra los resultados.

Al exponer a las bacterias a las diferentes concentraciones de plomo se pudo constatar un comportamiento muy similar entre estas bacterias y las aisladas de Playa de mono. Esto se detalla a continuación.

En bacterias expuestas a 0.32 mM de plomo se observó lo contrario de la gráfica anterior debido a que conforme paso el tiempo la concentración inicial de proteínas disminuyó un 40% aproximadamente a las 24 horas. Este comportamiento se puede ver en la gráfica 18.



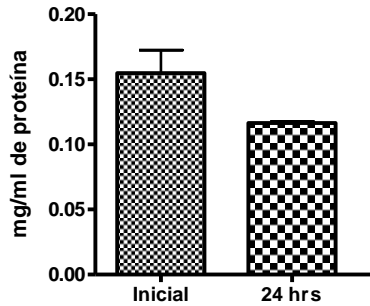
Gráfica 17. Proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Eco) sin exposición a Pb en función del tiempo (n=3).



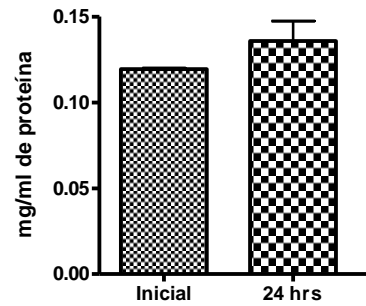
Gráfica 18. Proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Eco) expuestas a 0.32 mM de Pb en función del tiempo (n=3).

Al aumentar la concentración a 0.629 mM no se observó la disminución de la concentración de proteínas (Gráfica 19). De forma contraria cuando las bacterias se expusieron a 1.95 mM de plomo la concentración de proteínas aumentó del tiempo inicial a las 24 horas denotando el nulo efecto de esta concentración de metal. La grafica 20 muestra los resultados obtenidos.

VII. RESULTADOS

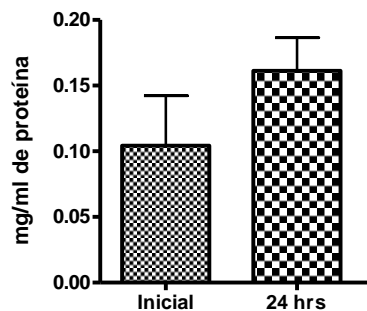


Gráfica 19. Concentración de proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Eco) expuestas a 0.629 mM de Pb en función del tiempo (n=3).

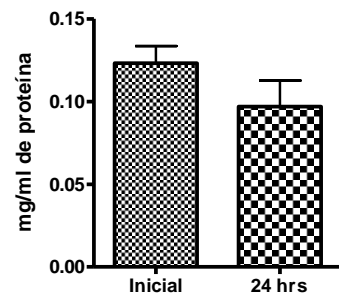


Gráfica 20. Concentraciones de proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Eco) expuestas a 1.95 mM de Pb en función del tiempo (n=3).

Cuando las bacterias se sometieron a 5.66 mM del tóxico se observó un comportamiento similar al presentado en la gráfica anterior, ya que la concentración de proteínas aumentó a las 24 horas (Gráfica 21). En comparación a lo anterior cuando se expusieron a 6.59 mM de plomo la concentración de proteínas disminuyó 15.39% a las 24 horas (Gráfica 22).



Gráfica 21. Proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Eco) expuestas a 5.66 mM de Pb en función del tiempo (n=3).



Gráfica 22. Proteínas totales en *Bacillus pumillus* (Eco) expuestas a 6.59 mM de Pb en función del tiempo (n=3).

VII. RESULTADOS

Estos resultados muestran que aunque las 2 cepas de *Bacillus pumillus* tienen diferente cinética de crecimiento, el efecto de las diferentes concentraciones de plomo es el mismo en ambas. *Hafnia alvei* presenta un comportamiento diferente al de los *Bacillus* esto se puede apreciar en la tabla 19.

Tabla 19. Efecto de la exposición a plomo en las cepas estudiadas.

Concentración	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Bacillus pumillus</i> (Playa de mono)	<i>Bacillus pumillus</i> (Moctezuma, Eco)
Sin Plomo	Aumento	Aumento	Aumento
0.32 mM de Pb	Disminuye	Disminuye	Disminuye
0.629 mM de Pb	No afectó	Disminuye	Disminuye
1.95 mM de Pb	No afectó	No afectó	No afectó
5.66 mM de Pb	Disminuye	No afectó	No afectó
6.59 mM de Pb	Disminuye	Disminuye	Disminuye

Aunque los resultados se muestran hasta las 24 horas, para todas se realizó la medición hasta las 48 horas, mostrando una tendencia mayoritaria a disminuir la concentración de proteínas totales.

7.7.2 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATION S-TRANSFERASA (GST)

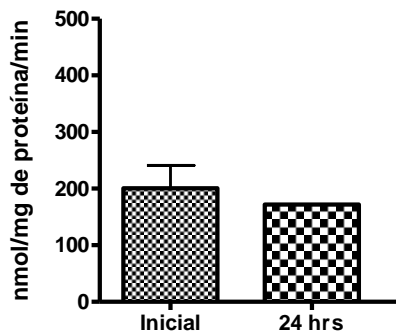
Como se ha mencionado en la parte teórica de esta Tesis la actividad de la enzima Glutación S-Transferasa se considera como un indicador de toxicidad. En esta sección se presentan los resultados obtenidos al medir la actividad de la enzima en bacterias expuestas a diferentes concentraciones de plomo y diferentes tiempos.

a) *Hafnia alvei*

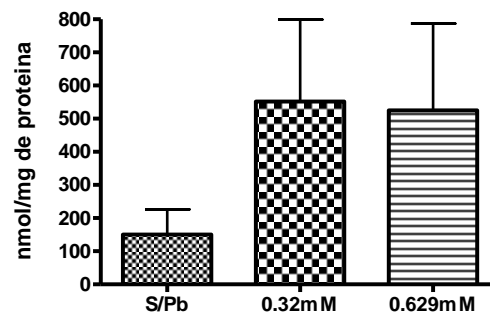
La actividad de GST en las bacterias sin exponer a plomo permanece constante ya sea al inicio o a las 24 horas de crecimiento. Este resultado se

VII. RESULTADOS

muestra en la gráfica 23 y representa el comportamiento normal de enzima. La actividad de la enzima fue estudiada en presencia de dos concentraciones bajas de plomo. Cuando *Hafnia alvei* es expuesta a las concentraciones de plomo 0.32 y 0.629 mM la actividad GST se ve incrementada aproximadamente tres veces pasando de una actividad de 160 a 520 nmol/mg/min. La gráfica 24 muestra estos resultados.



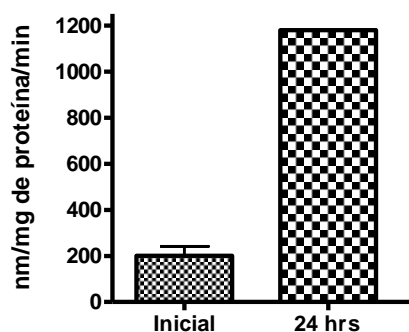
Gráfica 23. Actividad GST en la cepa *Hafnia alvei* sin exposición a Pb (n=3 y n=2 respectivamente).



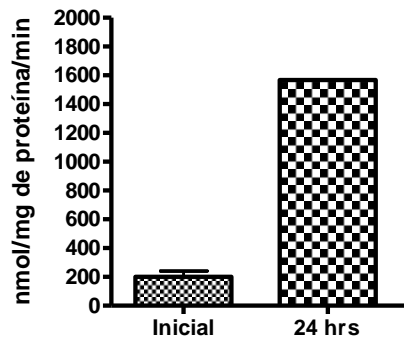
Gráfica 24. Actividad GST en la cepa *Hafnia alvei* más concentraciones crecientes de plomo (n=3).

Posteriormente se ensayó la actividad de la enzima expuesta a ambas concentraciones al inicio y a las 24 horas. En la gráfica 25 se observa la actividad de *Hafnia alvei* expuesta a 0.32 mM de plomo en función del tiempo. Se observó que la actividad de GST aumentó aproximadamente 5 veces a las 24 horas. La actividad de la enzima GST expuesta a 0.629 mM aumentó cerca de 7 veces a las 24 horas (Gráfica 26). Lo anterior representa el efecto que la exposición al metal tiene en la actividad de esta enzima, y se puede afirmar que al aumentar la concentración de plomo aumenta la actividad de la enzima GST de la bacteria *Hafnia alvei* aislada de un ambiente contaminado con plomo y cromo.

VII. RESULTADOS



Gráfica 25. Actividad GST en la cepa *Hafnia alvei* más 0.32 mM de Pb (n=3 y n=2 respectivamente).

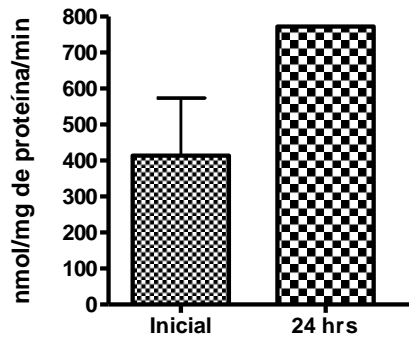


Gráfica 26. Actividad GST en la cepa *Hafnia alvei* más 0.629 mM de Pb (n=3 y n=2 respectivamente).

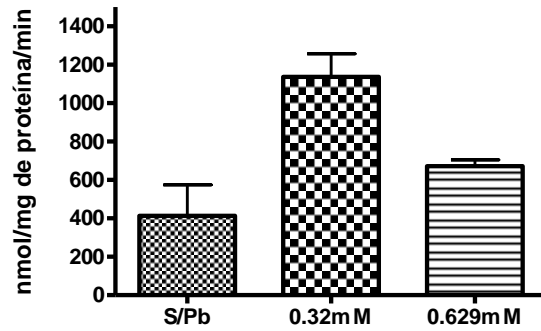
b) *Bacillus pumillus* aislada de Playa de mono

El comportamiento de la actividad enzimática en una bacteria aislada de un medio libre de metales pesados se detalla a continuación. La gráfica 27 da cuenta de la actividad de *Bacillus pumillus* en condiciones normales (sin exposición a plomo) en función del tiempo. A las 24 horas la actividad GST aumenta aproximadamente el doble. El efecto de diferentes concentraciones de plomo sobre la actividad de la enzima se muestra en la gráfica 28 en donde se observa que la actividad de la GST aumenta casi tres veces cuando se expone la bacteria a 0.32 mM de plomo, pero cuando se expone a 0.629 mM la actividad disminuye en comparación con la actividad anterior pero sigue elevada al compararla con la actividad de la bacteria sin exposición a plomo. El efecto observado en este caso podría ser de tipo activación e inhibición respectivamente.

VII. RESULTADOS

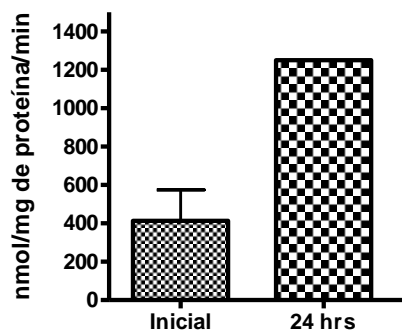


Gráfica 27. Actividad GST en la cepa *Bacillus pumillus* (Playa de mono) sin exposición a Pb (n=3 y n=2 respectivamente).

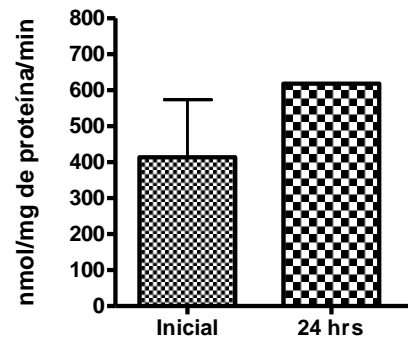


Gráfica 28. Actividad GST en la cepa *Bacillus pumillus* (Playa de mono) más concentraciones crecientes de plomo (n=3).

En relación con el tiempo de crecimiento, cuando *Bacillus pumillus* (Playa de mono) se expuso a 0.32 mM se observó que la actividad GST aumentó 3 veces a las 24 horas mientras que cuando la concentración del metal fue de 0.629 mM se observó que la actividad de la enzima aumento en menor grado que en el caso de la concentración anterior. Las gráficas 29 y 30 muestran estos resultados.



Gráfica 29. Actividad GST en la cepa *Bacillus pumillus* (Playa de mono) más 0.32 mM de Pb (n=3 y n=2 respectivamente).

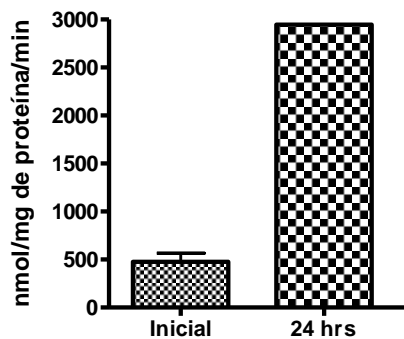


Gráfica 30. Actividad GST en la cepa *Bacillus pumillus* (Playa de mono) más 0.629 mM de Pb (n=3 y n=2 respectivamente).

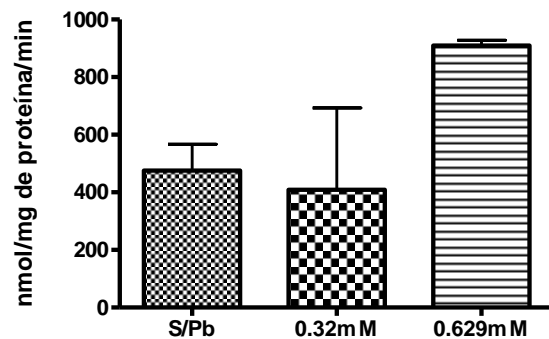
VII. RESULTADOS

c) *Bacillus pumillus* aislado del arroyo Moctezuma (Eco)

En este caso se trata de bacterias aisladas de un medio contaminado. La gráfica 31 muestra que la actividad GST de la bacteria *Bacillus pumillus* (Eco) aumenta 7 veces a las 24 horas cuando las células no están expuestas a plomo. La gráfica 32 nos muestra que al exponer a 0.32 mM no hay un efecto en la actividad de la enzima GST sin embargo al exponer a 0.629 mM la actividad aumenta 3 veces en comparación con la actividad en el tiempo inicial.

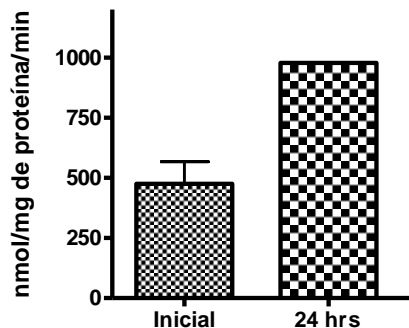


Gráfica 31. Actividad GST en la cepa *Bacillus pumillus* (Eco) sin exposición a Pb (n=3 y n=2 respectivamente).

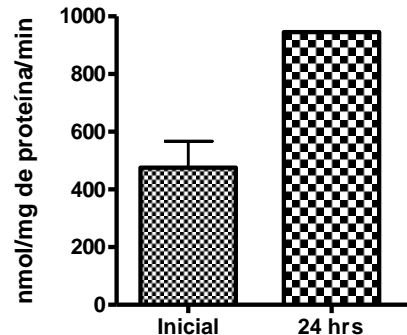


Gráfica 32. Actividad GST en la cepa *Bacillus pumillus* (Eco) expuesta a concentraciones crecientes de plomo.

En función del tiempo, al medir la actividad GST en presencia tanto de 0.32 y 0.629 mM, esta aumenta 1 y 3 veces respectivamente a las 24 horas (Gráfica 33 y 34).



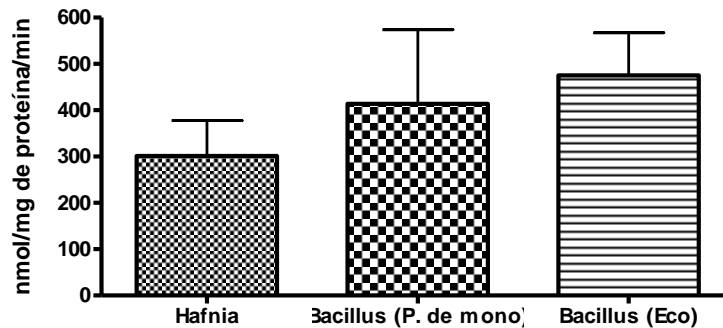
Gráfica 33. Actividad GST en la cepa *Bacillus pumillus* (Eco) más 0.32 mM de Pb en función del tiempo (n=3 y n=2 respectivamente).



Gráfica 34. Actividad GST en la cepa *Bacillus pumillus* (Eco) más 0.629 mM de Pb en función del tiempo (n=3 y n=2 respectivamente).

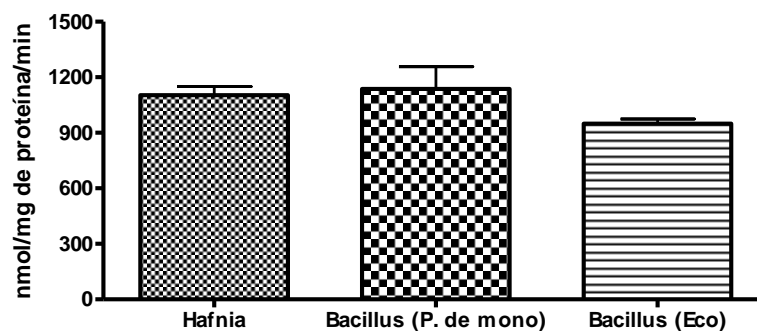
VII. RESULTADOS

Al realizarse la comparación entre las cepas se observó que las bacterias sin exposición a plomo se comportan de diferente manera debido a que *Hafnia alvei* presenta menor actividad de la enzima GST y las cepas de *Bacillus pumillus* presentaron mayor actividad, ver gráfica 35.



Gráfica 35. Comparación de las 3 cepas sin exposición a plomo (n=3)

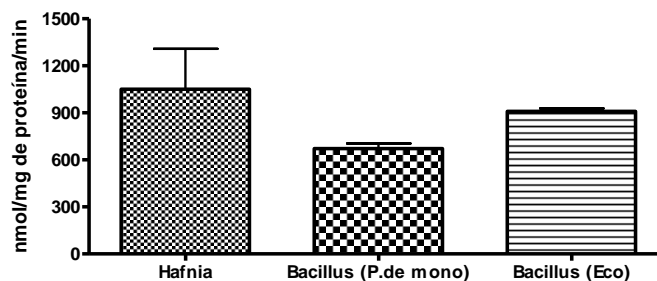
Se expusieron las bacterias a 0.32 mM de plomo y se observó que la bacteria *Bacillus pumillus* (Playa de mono) muestra una mayor actividad de la enzima GST en comparación con las bacterias *Hafnia alvei* y *Bacillus pumillus* (Eco) como se presenta en la gráfica 36.



Gráfica 36. Comparación de las 3 cepas expuestas a 0.32 mM de plomo (n=3).

VII. RESULTADOS

En la gráfica 37 se muestra la comparación entre las tres cepas cuando estas fueron expuestas a 0.629 mM de plomo observándose una mayor actividad de la enzima GST en la bacteria *Hafnia alvei* en comparación con *Bacillus pumillus* (Eco) quien presenta menor actividad, seguida por la bacteria *Bacillus pumillus* (Playa de mono).



Gráfica 37. Comparación de las 3 cepas expuestas a 0.629 mM de plomo (n=3).

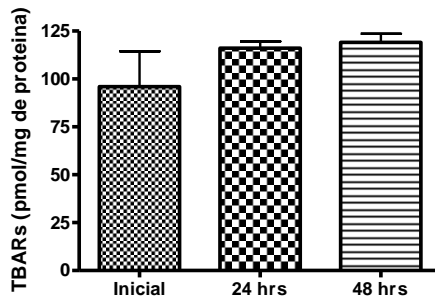
7.7.3 MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).

Uno de los efectos tóxicos de la exposición a plomo es la generación de estrés oxidativo por aumento de las especies reactivas de oxígeno. En este ensayo se determinó la producción de estas especies como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

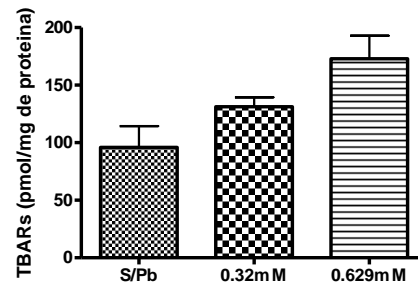
a) *Hafnia alvei*

En la gráfica 38 se puede observar la concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en función del tiempo sin exposición a plomo. En condiciones normales la concentración de TBARS tiende a aumentar conforme aumenta el tiempo, tomando como tiempo inicial el tiempo cero es decir cuando las bacterias hacen contacto con el medio. Cuando la bacteria se expone a 0.32 y 0.629 mM del metal se observa un incremento en la concentración de TBARS proporcional a la concentración de plomo utilizada. Lo anterior se puede ver en la gráfica 39.

VII. RESULTADOS

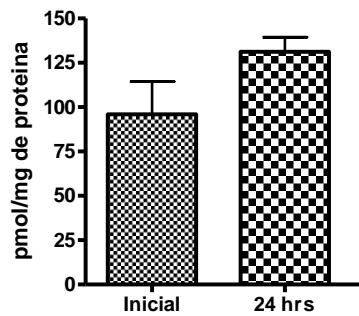


Gráfica 38. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en *Hafnia alvei* sin exponer a plomo.

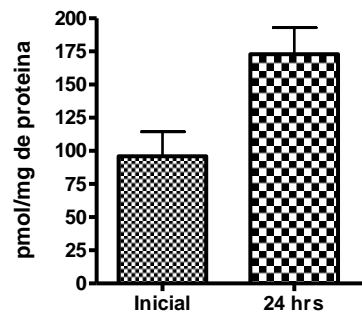


Gráfica 39. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Hafnia alvei* en presencia de concentraciones crecientes de plomo (n=3).

En función del tiempo, las gráficas 40 y 41 muestran la concentración de TBARs en la bacteria *Hafnia alvei* expuesta tanto a 0.32 mM como a 0.629 mM de plomo. A las 24 horas un incremento aproximadamente de una vez de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico respectivamente en comparación con el tiempo inicial.



Gráfica 40. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en *Hafnia alvei* en presencia de 0.32 mM de plomo (n=3).



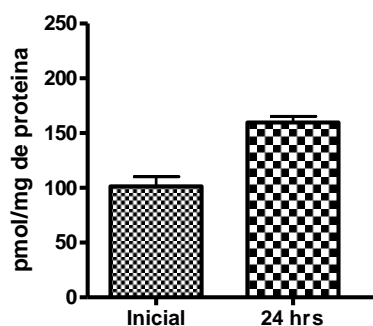
Gráfica 41. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en *Hafnia alvei* crecidas en medio más 0.629 mM de plomo (n=3).

VII. RESULTADOS

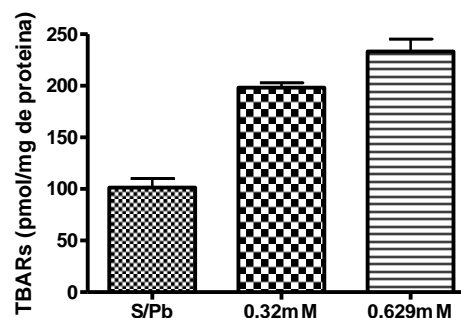
b) *Bacillus pumillus*

La gráfica 43 muestra el efecto dosis-respuesta de la exposición a 0.32 y 0.629 mM de Pb. Los incrementos encontrados fueron aproximadamente del doble de TBARs respectivamente en comparación con la bacteria sin exponer.

Al determinar la concentración de TBARs en la bacteria sin exponer a Pb se observa un incremento de estos compuestos en función del tiempo. La gráfica 42 presenta los resultados en función del tiempo en donde se observa que a las 24 horas hay un aumento de la mitad de especies reactivas en comparación a la concentración al tiempo inicial.



Gráfica 42. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Bacillus Pumillus* (Playa de mono) sin exposición a plomo.

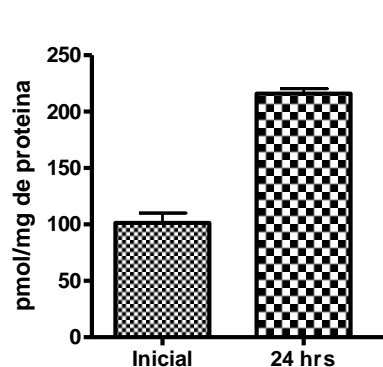


Gráfica 43. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Bacillus pumillus* (Playa de mono) más concentraciones crecientes de plomo.

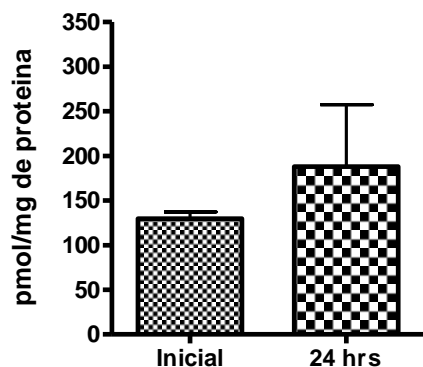
El efecto de la exposición a plomo en esta bacteria, en función de la concentración y el tiempo, fue similar al encontrado en *Hafnia alvei*, aun cuando se aislaron de ambientes acuáticos diferentes. En la gráfica 44 se presenta el efecto de la exposición a plomo en *Bacillus pumillus* (Playa de mono) expuesta a 0.32mM de plomo en función del tiempo. A las 24 horas se observó un incremento del doble en comparación con la concentración inicial. De la misma manera, en la gráfica 45 se puede observar el aumento de nueva cuenta de las especies reactivas de oxígeno cuando la bacteria creció en presencia de 0.629 mM observándose un incremento mayor en comparación

VII. RESULTADOS

con la concentración anterior.



Gráfica 44. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Bacillus Pumillus* (Playa de mono) expuesta a 0.32 mM.

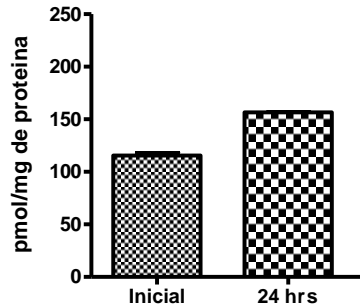


Gráfica 45. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Bacillus Pumillus* (Playa de mono) expuesta a 0.629 mM.

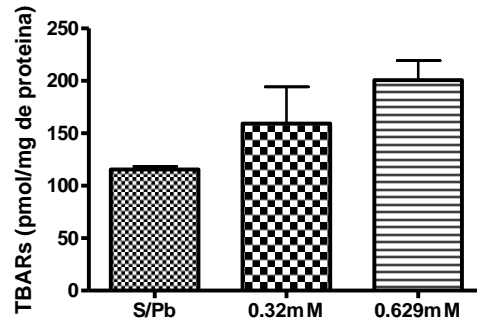
c) *Bacillus pumillus* (ECO)

Bacillus pumillus fue aislada de un medio altamente contaminado. Al medir la concentración de TBARs en condiciones normales, se puede detectar un aumento en las mismas en función del tiempo. La gráfica 46 presenta estos resultados. En la gráfica 47 se puede apreciar el efecto del plomo en la generación de TBARs en la bacteria *Bacillus pumillus* (Eco) expuesta a dos concentraciones de plomo. En un medio con 0.32 mM del metal, se pudo determinar un incremento de uno de tres veces con respecto a las bacterias sin exponer a plomo y al someterlas a 0.629 mM se observó un aumento de una vez de las especies reactivas de oxígeno.

VII. RESULTADOS

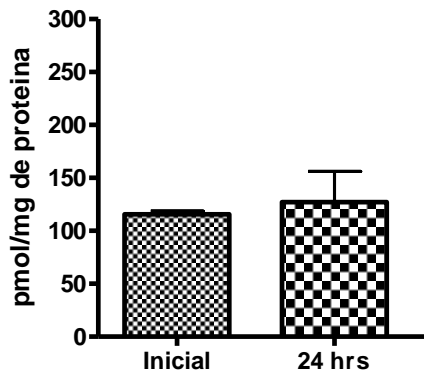


Gráfica 46. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Bacillus pumillus* (Eco) sin exposición a plomo (n=3).

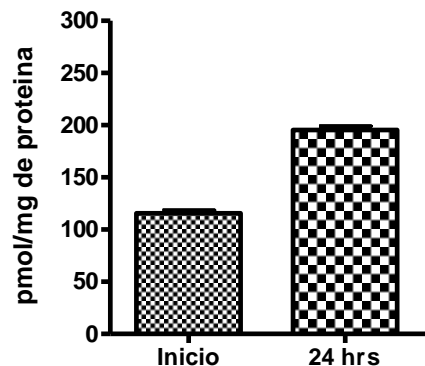


Gráfica 47. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Bacillus pumillus* (Eco) en presencia de concentraciones crecientes de plomo (n=3).

Al estudiar el efecto del tóxico en dos tiempos de crecimiento celular diferentes se observó que cuando la bacteria se expuso a 0.32mM de plomo, las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico no presentaron una alteración significativa. La gráfica 48 muestra estos resultados. Cuando la bacteria se enfrenta a 0.629 mM de metal, las TBARs incrementan tres veces a las 24 horas en comparación con la concentración del tiempo inicial. Lo anterior se presenta en la gráfica 49.



Gráfica 48. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Bacillus pumillus* (Eco) expuestas a 0.32 mM de plomo en función del tiempo (n=3).

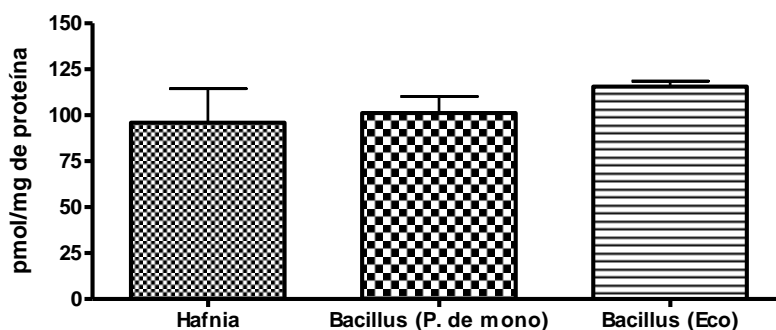


Gráfica 49. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la bacteria *Bacillus pumillus* (Eco) expuestas a 0.629 mM de plomo (n=3).

Con la finalidad de estudiar de manera comparativa el efecto de la exposición a plomo en las tres cepas de bacterias, se realizó una comparación entre las mismas; observándose que las bacterias sin exposición a plomo presentaron

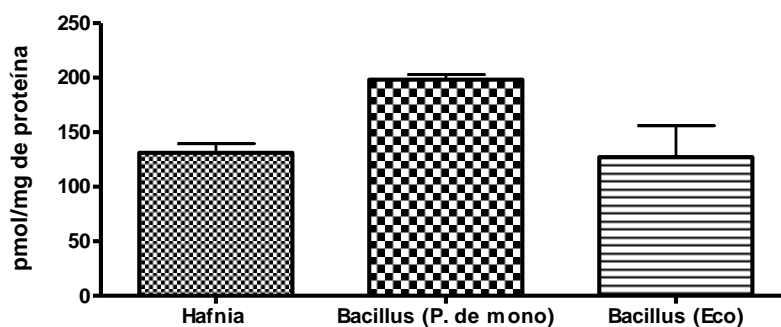
VII. RESULTADOS

niveles basales de TBARs similares. *Hafnia alvei* tiende a ser la cepa con menor concentración de especies reactivas de oxígeno mientras que la cepa de *Bacillus pumillus* (Eco) tiene una tendencia a presentar mayor concentración de estas especies. La gráfica 50 ilustra lo anterior.



Gráfica 50. Comparación de especies reactivas ácido tiobarbitúrico en las tres cepas, sin exposición a plomo.

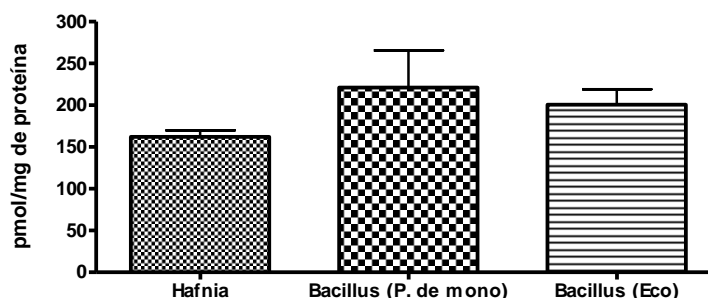
Cuando las bacterias se expusieron a 0.32 mM de plomo se pudo apreciar que la bacteria *Bacillus pumillus* (Playa de mono) mostró un mayor aumento en la concentración de especies de oxígeno en comparación con las bacterias *Hafnia alvei* y *Bacillus pumillus* (Eco) como se presenta en la gráfica 51.



Gráfica 51. Comparación de especies reactivas de oxígeno en las tres colonias bacterianas expuestas a 0.32 mM de plomo.

VII. RESULTADOS

En la gráfica 52 se presenta la comparación entre las tres cepas cuando éstas fueron expuestas a 0.629 mM de metal. Se observó que la que presentó mayor concentración de especies reactivas de oxígeno fue de nueva cuenta *Bacillus pumillus* (Playa de mono), seguida por la bacteria *Bacillus pumillus* (Eco) siendo *Hafnia alvei* la que presenta menor concentración es esta comparación.



Gráfica 52. Comparación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en las tres colonias bacterianas expuestas a 0.629 mM.

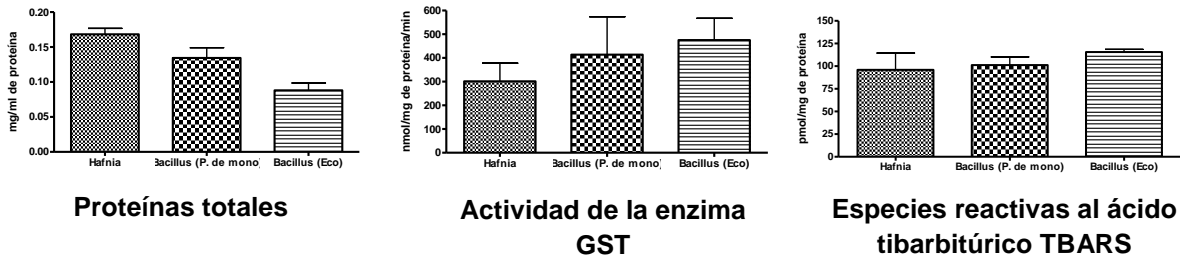
El aumento de especies reactivas de oxígeno (EROS) fue mayor en la cepa aislada de un ambiente libre de metales pesados, representando siempre un mayor nivel de TBARS a nivel basal, expuesto a plomo y en función del tiempo.

VII. RESULTADOS

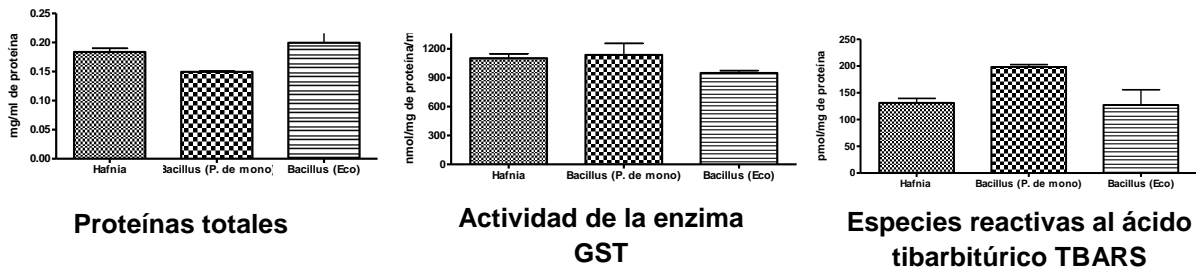
ENSAYOS BIOQUÍMICOS.

La siguiente composición de gráficas muestra los resultados bioquímicos encontrados en cada cepa estudiada a las diferentes concentraciones de plomo.

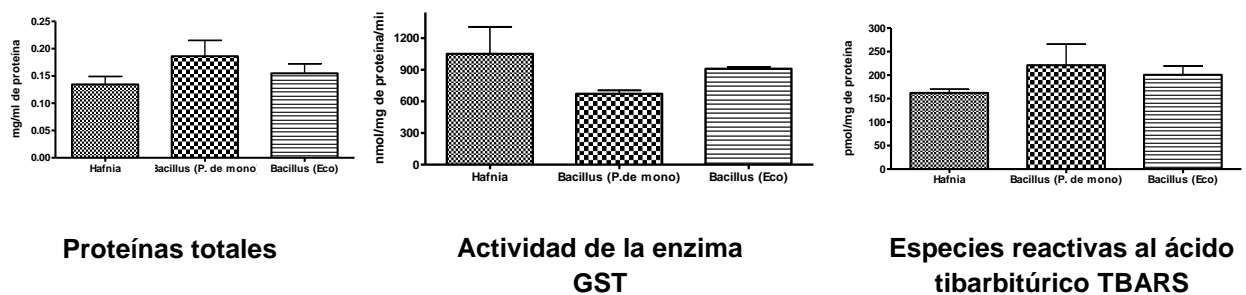
Bacterias sin exposición a plomo



Bacterias expuestas a 0.32 mM de plomo



Bacterias expuestas a 0.629 mM de plomo



VII. RESULTADOS

7.7.4 ELECTROFORESIS

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, esta investigación forma parte de un proyecto general en el que se ha planteado a las proteínas de los cuerpos de inclusión como una posible respuesta al estrés por exposición a metales pesados. Estas proteínas se localizan en la zona cercana a los 30 kDa y poseen un punto isoeléctrico ácido. Como estudio inicial se realizaron algunos barridos electroforéticos de las cepas estudiadas bajo los diferentes esquemas de intoxicación. La figura 27 muestra las bandas proteicas que presenta la bacteria *Hafnia alvei* (aislada del arroyo Moctezuma) y se hace una proyección de la región aproximada de 30 kDa, la cual resulta la región de interés. Se muestra también las proteínas de cuerpos de inclusión detectadas en homogeneizado de riñones de roedores expuestos a plomo, y la región donde originalmente se han detectado estas proteínas. Se pudo observar que en comparación con el estándar y la muestra de homogeneizado de riñón de roedores, las muestras obtenidas de las cepas bacterianas presentan las bandas en la misma región, presentándose algunas más intensas que otras.

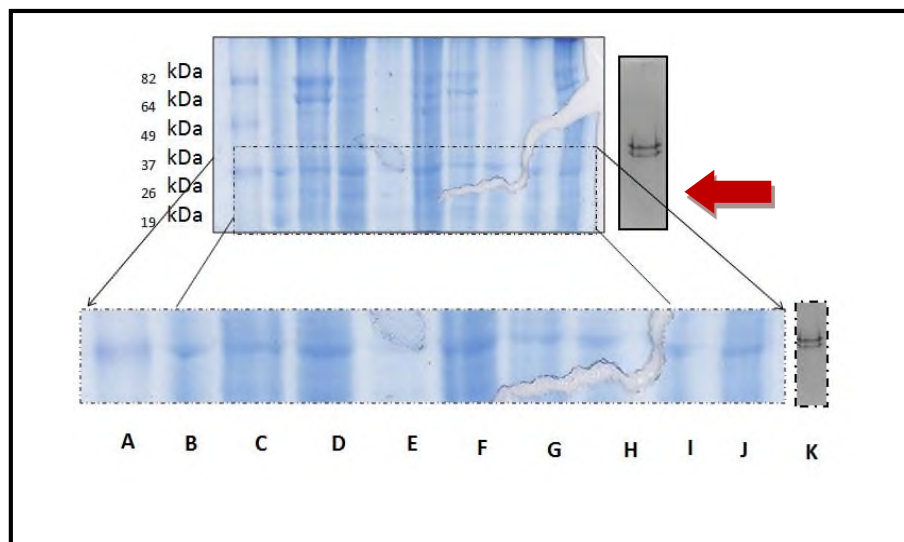


Figura 27. Corrimiento electroforético de *Hafnia alvei* crecida en concentraciones crecientes de plomo en función del tiempo, la flecha indica la región de interés.

VII. RESULTADOS

En el gel se pueden distinguir las siguientes muestras.

- A)** Estándar comercial de pesos moleculares de 10 a 82 kDa.
- B)** *Hafnia* sin exposición a plomo en el tiempo inicial.
- C)** *Hafnia* sin exposición a plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- D)** *Hafnia* más 0.32 mM de plomo en el tiempo inicial.
- E)** *Hafnia* más 0.32 mM de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- F)** *Hafnia* más 0.629 mM de plomo en el tiempo inicial.
- G)** *Hafnia* más 0.629 mM de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- H)** *Hafnia* más 1.95 mM de plomo en el tiempo inicial.
- I)** *Hafnia* más 1.95 Mm de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- J)** Estándar comercial.
- K)** Proteínas aisladas de cuerpos de inclusión (PCI) de homogenizado de riñón de rata expuesta a plomo de manera crónica (7 meses).

La figura 28 muestra el corrimiento electroforético de la bacteria *Bacillus pumillus* (aislada del afluyente conocido como Playa de mono), a partir de estas se realizó una proyección de la región del gel que mostró la presencia de las bandas proteicas obtenidas en las muestras de dicha bacteria en presencia de diferentes concentraciones de plomo a dos tiempos. Se logró observar la presencia de las bandas de interés con baja intensidad, en especial la correspondiente a *Bacillus* expuesta a 0.32 mM a las 24 horas.

VII. RESULTADOS

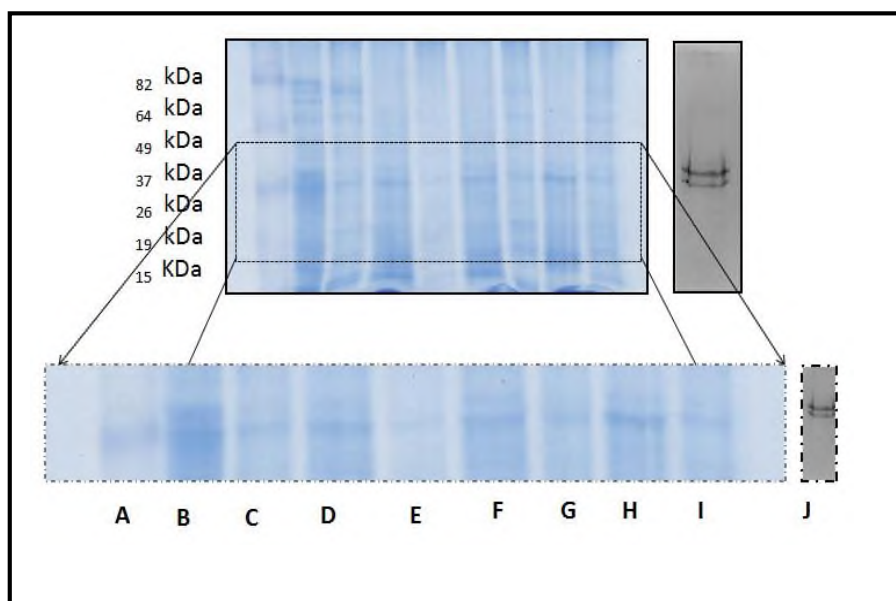


Figura 28. Corrimiento electroforético de *Bacillus pumillus* (Playa de mono) crecido en ausencia y presencia de plomo a diferentes tiempos en función del tiempo.

En el gel se pueden distinguir las siguientes muestras.

- A)** Estándar comercial de pesos moleculares de 10 a 82kDa.
- B)** *Bacillus* (Playa de mono) sin exposición a plomo en el tiempo inicial.
- C)** *Bacillus* (Playa de mono) sin exposición a plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- D)** *Bacillus* (Playa de mono) más 0.32 mM de plomo en el tiempo inicial.
- E)** *Bacillus* (Playa de mono) más 0.32 mM de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- F)** *Bacillus* (Playa de mono) más 0.629 mM de plomo en el tiempo inicial.
- G)** *Bacillus* (Playa de mono) más 0.629 mM de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- H)** *Bacillus* (Playa de mono) más 1.95 mM de plomo en el tiempo inicial.
- I)** *Bacillus* (Playa de mono) más 1.95 Mm de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- J)** Proteínas aisladas de cuerpos de inclusión (PCI) de homogenizados de riñón de ratas expuestas a plomo de manera crónica (7 meses).

VII. RESULTADOS

En la figura 29 se observa el corrimiento electroforético de la bacteria *Bacillus pumillus* (aislado del río Papaloapan (Eco)) más concentraciones crecientes de plomo. En las muestras C, E y G la intensidad de la banda baja a las 24 horas (como se muestra en la figura con las flechas). Estos resultados son diferentes a los observados en *Hafnia* y *Bacillus* aislado playa de mono.

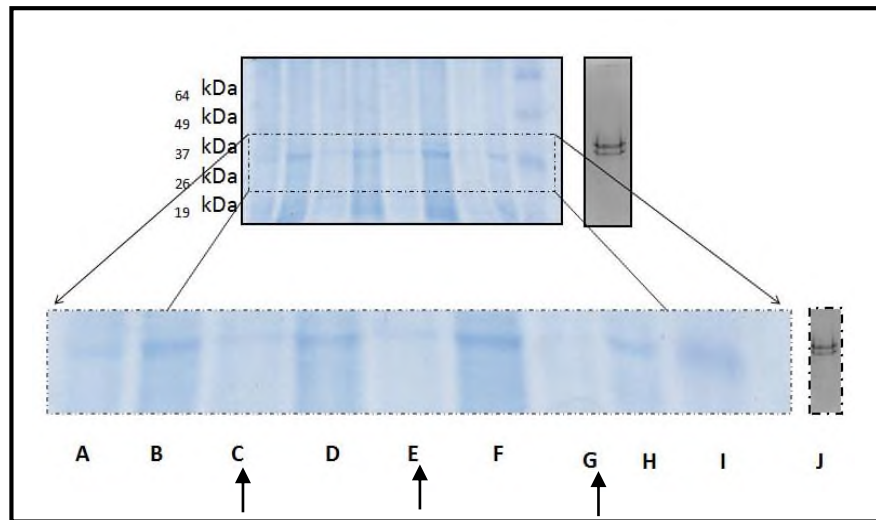


Figura 29. Corrimiento electroforético *Bacillus pumillus* (Eco) más concentraciones de plomo en función del tiempo.

En el gel se pueden distinguir las siguientes muestras.

- A)** Estándar comercial de pesos moleculares de 10 a 82 kDa.
- B)** *Bacillus* (Eco) sin exposición a plomo en el tiempo inicial.
- C)** *Bacillus* sin exposición a plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- D)** *Bacillus* (Eco) más 0.32 mM de plomo en el tiempo inicial.
- E)** *Bacillus* (Eco) más 0.32 mM de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- F)** *Bacillus* (Eco) más 0.629 mM de plomo en el tiempo inicial.
- G)** *Bacillus* (Eco) más 0.629 mM de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- H)** *Bacillus* (Eco) más 1.95 mM de plomo en el tiempo inicial.
- I)** *Bacillus* (Eco) más 1.95 Mm de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- J)** Proteínas aisladas de cuerpos de inclusión (PCI) de homogenizado de riñón de rata expuesta a plomo de manera crónica (7meses)

VII. RESULTADOS

Al realizar la comparación de la zona de interés en las 3 cepas se pudieron observar las zonas en donde se tienen los diferentes comportamientos presentados por las tres bacterias. Al examinar la figura, se pueden detectar las diferencias marcadas en la intensidad de las bandas, mismas que se señalan mediante las flechas y que corresponden a las bacterias sin exposición a plomo C), expuestas a 0.32 mM de plomo E) y expuesta a 0.629 mM G) todas a las 24 horas.

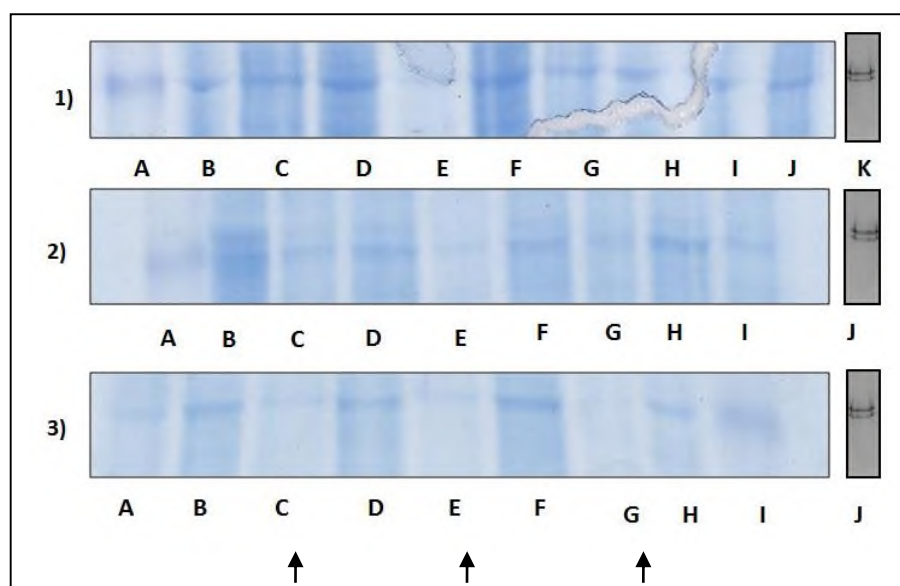


Figura 30. Comparación de geles de las bacterias 1) *Hafnia alvei*, 2) *Bacillus pumillus* (playa de mono) y 3) *Bacillus pumillus* (Eco).

Finalmente la figura 31 muestra el corrimiento proteico de las tres colonias bacterianas expuestas a la concentración 5.66 mM de plomo. De manera sorprendente solo en el caso de *Hafnia alvei* se logran distinguir las bandas de interés a los 2 tiempos siendo el tiempo inicial cuando la banda es más clara. En los dos *Bacillus* no se detectaron bandas.

VII. RESULTADOS

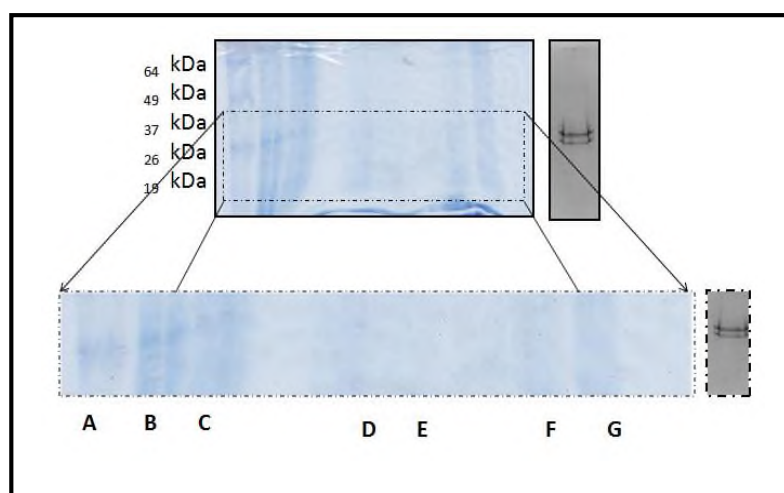


Figura 31. Corrimiento electroforético en *Hafnia alvei*, *Bacillus pumillus* (Playa de mono) y *Bacillus pumillus* (Eco) expuestas a 5.66mM de plomo en función del tiempo.

En el gel se pueden distinguir las siguientes muestras.

- A)** Estándar comercial de pesos moleculares de 10 a 82 kDa.
- B)** *Hafnia* expuesta a 5.66 mM de plomo en el tiempo inicial.
- C)** *Hafnia* expuesta a 5.66 mM de plomo 24 horas después del sembrado inicial.
- D)** *Bacillus* (Playa de mono) más 5.66 mM de plomo en el tiempo inicial.
- E)** *Bacillus* (Playa de mono) más 5.66 mM de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.
- F)** *Bacillus* (Eco) más 5.66 mM de plomo en el tiempo inicial.
- G)** *Bacillus* (Eco) más 5.66 mM de plomo después de las 24 horas de su sembrado inicial.

Proteínas aisladas de cuerpos de inclusión (PCI) de homogenizado de riñón de rata expuesta a plomo de manera crónica (7 meses).

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

En el río Papaloapan, el cual cruza la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec Oaxaca, se ha determinado la presencia de metales pesados como plomo, mercurio, cadmio y cromo a niveles que pueden considerarse alarmantes, mismos que fueron determinados como parte inicial de este trabajo. De la misma manera se ha observado que las aguas residuales provenientes de desechos industriales, familiares y hospitalarios llegan a contaminar al río Papaloapan (Ríos de México, 2000., Gómez-Anguiano, 2007), quién constituye la fuente de vida de la localidad de San Juan Bautista Tuxtepec. Resulta importante indicar lo anterior debido que se ha reportado, por varios autores, que diversas formas de vida microscópica, entre ellas la bacteriana, poseen la capacidad de desarrollar ciertos mecanismos de defensa mismos que podrán conferir tolerancia a diversos agentes tóxicos, entre ellos los metales pesados al activarse algunos de los procesos que determinan este fenómeno. Roane ha expresado la existencia de algunos mecanismos de defensa de algunas bacterias contra la intoxicación con plomo, entre ellos la existencia de mecanismos de salida basados en exopolímeros, acumulación celular en gránulos densos en el citoplasma, sin embargo no han sido aislados plásmidos que confieran resistencia al plomo en bacterias pero si se ha observado que bajo estrés por el metal, estos microorganismos pueden desarrollar resistencia al utilizar mecanismos directos, mismos que incluyen bombas de eflujo dependientes de ATP y secuestro celular del metal (Roane, 1998). Se sabe que estos mecanismos a veces son inducidos por el ambiente en el cual se desarrollen las bacterias, por lo cual éste resulta ser un factor esencial para el desarrollo de la defensa y la tolerancia hacia especies como los metales pesados.

Este trabajo de Tesis tuvo como parte inicial el aislamiento de diversas cepas bacterianas provenientes de tres zonas. La primera zona estuvo caracterizada por la presencia de metales pesados, la segunda por aguas residuales contaminadas y la tercera en una zona libre de contaminantes.

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

De las trece colonias aisladas, de los diferentes puntos de muestreo, tres fueron seleccionadas por su resistencia a la misma concentración de plomo en el medio de cultivo y se caracterizaron bioquímica y microbiológicamente. Estas bacterias correspondieron a los géneros *Hafnia* y *Bacillus*. De ésta última, aun cuando se determinó que las dos colonias pertenecían a la misma especie, el comportamiento de cada una de ellas en todos los parámetros determinados fue diferente, lo cual indica que se trata de dos colonias con diferente susceptibilidad al plomo. Lo anterior podría deberse a que dentro de una misma especie podrían existir miembros que expresen más una u otra característica, la cual podría conferirles propiedades diferentes y con ello representar la gran variabilidad genética que las bacterias pueden expresar.

Se ha reportado que *Hafnia alvei* se encuentra distribuída ampliamente en la naturaleza ya que se trata de una bacteria entérica que se aloja en el intestino de algunos mamíferos, entre ellos los humanos. Al encontrarse en el medio ambiente (agua y tierra) es capaz de infectar vertebrados, aves y diferentes alimentos. En los animales puede ocasionar septicemia, necrosis hepática, neumonía y hemorragias. En los humanos la bacteria genera procesos de septicemia, daño respiratorio y gastroenteritis (Janda, 2006). El género *Bacillus* se encuentra preferentemente en el suelo y posee la capacidad de formar esporas por lo cual se puede adaptar fácilmente a una gran variedad de condiciones ambientales. Junto con *B. cereus* y *B. subtilis*, *B. pumilus* es considerado como el mayor componente de las comunidades bacterianas marinas. Se ha reportado que *Bacillus pumilus* es altamente resistente a condiciones medioambientales extremas como baja disponibilidad de nutrientes, desecación, irradiación, presencia de peróxido de hidrógeno y otros desinfectantes químicos. Además de lo anterior, esta bacteria puede producir compuestos antagonistas contra hongos y bacterias patógenas (Parvathi, 2009).

El crecimiento bacteriano denota las características de desarrollo de las bacterias y muestra los tiempos a los cuales las mismas van cursando por las

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

diferentes etapas de crecimiento. Existen factores externos que pueden afectar las curvas de crecimiento como la temperatura, el pH, las condiciones de salinidad, etc (Prescott, 2002). En este trabajo se observó que el crecimiento de las tres cepas se comportó de dos formas diferentes. *Bacillus pumilus* (Playa de mono) presentó una fase log de más de 10 horas junto con un mayor crecimiento celular, seguida inmediatamente de una fase de muerte, con disminución en el número de células. *Hafnia alvei* y *Bacillus pumilus* (Eco) presentaron una cinética de crecimiento parecida, en donde la cepa aislada del medio contaminado con metales pesados presentó mayor número de células que la cepa aislada del medio contaminado por aguas negras. Lo anterior podría estar reflejando que las cepas provenientes de los medios contaminados aun cuando crecen menos conservan su capacidad de reproducción celular a una tasa de crecimiento menor a comparación con la cepa proveniente de un medio no contaminado. Resulta interesante observar que, aun cuando se ha expresado anteriormente, las dos cepas de *Bacillus pumilus* presentan diferencias marcadas en relación a su curva de crecimiento, quizá debido a que aun cuando naturalmente son resistentes a varias condiciones de estrés, entre ellas existen también diferencias en relación a su crecimiento en diferentes medios acuosos.

El estudio reportado por Roane en 1998 indica que las bacterias aisladas del suelo y expuestas a plomo retrasan su crecimiento hasta 10 semanas, lo que podría indicar que este fue el tiempo en el cual las bacterias lograron tolerar la presencia del plomo y comenzar a reproducirse al sintetizar exopolímeros. Posteriormente Bar en 2007 reportó que la exposición a 0.2 mM de plomo en *Klebsiella pneumoniae* no afecta el crecimiento de la bacteria en comparación con las bacterias no expuestas al metal (Bar, 2007). En el caso de las bacterias aisladas en este trabajo, el tiempo que tardaron las bacterias en comenzar a crecer en los medios de cultivo más concentraciones crecientes de plomo fue de 24 y 48 horas en función de la concentración del metal. En el medio líquido se observó, de manera interesante, que *Hafnia alvei* creció en el medio líquido

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

se observó, de manera interesante, que *Hafnia alvei* creció en presencia de 0.32, 0.629 y 1.95 mM de plomo a las 24 horas y en 5,66 y 6,59 mM a las 48 horas. Sin embargo las cepas de *Bacillus pumillus* crecieron solo en presencia de las cuatro concentraciones iniciales. Ello podría indicar que *Hafnia alvei*, podría ya estar adaptada o capacitada para soportar el plomo por provenir de un medio contaminado con el elemento. Sin embargo, cuando se llevó a cabo el mismo experimento en condiciones sólidas, se observó que la cepa de *Bacillus pumillus* proveniente de un ambiente sin contaminar logra crecer hasta la concentración de 5.66 mM de plomo, reflejando posiblemente un efecto de captación intracelular de metal. Lo anterior podría explicar el hecho de que en esta cepa se observó, mediante el análisis microscópico y colonial, un cambio en el tamaño de las células y la formación de colonias con un tono café, lo cual se relaciona con la exposición al metal. Se ha reportado que cuando las células de algunos mamíferos son intoxicadas con metales como el plomo, las células cursan por un proceso de hinchamiento, el cual refleja la posible entrada de agua a las células como un mecanismo de defensa contra el metal, de la misma manera se han observado mitocondrias “hinchadas” por exposición a plomo (Goyer, 1968; Goyer, 1969, Mahaffey, 1977). Debido a que las bacterias presentan sistemas de entrada y salida de iones, podría ser que el plomo entre a las mismas y genere un fenómeno osmótico que ocasione la entrada de agua y ello se refleje como el cambio de tamaño observado y la tonalidad adquirida por las colonias al ser sembradas en el medio sólido. En relación a lo anterior, se ha reportado que *Bacillus subtilis* puede formar complejos de peptidoglicano con los cuales logra unir iones metálicos de sodio, manganeso, níquel y calcio (Matthews, 1979).

El efecto de la exposición de plomo sobre el crecimiento de las células se determinó en función de la concentración total de proteínas a un tiempo fijo para todas las cepas. Este procedimiento se pudo utilizar como un criterio de crecimiento celular (Prescott, 2002).

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

En general en las tres cepas se observó un aumento en el contenido total de proteínas en función del tiempo. Cuando las bacterias se expusieron a concentraciones crecientes de plomo el crecimiento disminuyó pero no se inhibió aún en la cepa de *Hafnia alvei* crecida a la concentración más alta de plomo reflejando, de nuevo, que posiblemente el hecho de crecer en un ambiente contaminado le proporcionó alguna ventaja sobre las demás cepas.

La presencia de agentes tóxicos en bacterias genera procesos de adaptación algunos de los cuales se encuentran bien determinados. Algunos ejemplos son los mecanismos reportados para cobre, arsénico, cadmio, cobalto, mercurio, níquel y plata en cepas de bacterias como *Pseudomonas*, *E. coli*, *Cyanobacterias*, *Syneccoccus*, entre otras (Silver, 1993; Cervantes, 1994; Silver, 1996^a, 1996^b; Nies, 1992, Trevors, 1986, Nies, 1995, 1999, 2003; Cervantes, 2001, Losi, 1994), muchos de ellos codificados por plásmidos (Silver, 1998). Entre estos mecanismos se encuentran desde los procesos de transformación de metales hasta la participación de bombas de tipo ATPasas (Summers, 1978, Robinson, 1984, Moreno-Sánchez, 1999).

Muchos de estos procesos son generados debido a que uno de los mecanismos de toxicidad de los metales es la generación de estrés oxidativo. Existen múltiples reportes que señalan que el plomo puede generar estrés oxidativo en una gran variedad de células de diferentes organismos. Ejemplos de lo anterior lo constituyen estudios en animales de laboratorio, en donde se encontró que la exposición al metal se relacionó con la presencia del metal en función del tiempo (Whittaker, 2011). En especies diferentes de musgo se observó que la exposición a plomo generó estrés oxidativo (Sun, 2011). Bokara reportó en 2008 el incremento de las enzimas antioxidantes como efecto de la exposición a plomo en cerebro de ratas expuestas. En el mismo año Benedet describió el posible papel de algunos metales en la generación de la lipoperoxidación en hígado (Benedet, 2008). También se ha investigado la generación de estrés por plomo en órganos como hígado y cerebro (Luján, 2007).

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

La generación de estrés oxidativo en diferentes células puede condicionarlas a padecer algunas patologías como es el cáncer (Sun, 1990). En microorganismos se ha observado que la exposición a metales podría generar fenómenos de estrés. Uno de los resultados de este trabajo se relaciona con lo anterior, ya que se observó que el plomo aumenta la generación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico cuando las células son expuestas a éste. En condiciones normales las tres cepas presentaron niveles semejantes de especies reactivas. Cuando *Hafnia alvei* fue expuesta a las concentraciones de 0.32 y 0.629 mM de plomo en el medio de cultivo, las especies reactivas aumentaron 20 y 50 unidades respectivamente, en *Bacillus pumilus* (Playa de mono) las especies reactivas aumentaron 100 y 120 veces y en *Bacillus pumilus* (Eco) el aumento fue de 50 a 100 veces respectivamente. Posiblemente *Hafnia alvei* presentó niveles bajos de especies reactivas de oxígeno debido a que al estar en contacto con el metal de manera natural, el efecto del mismo no resultó tan grande como en las cepa de *Bacillus pumilus* aislada de un ambiente sin contaminación. Los valores encontrados en la cepa de *Bacillus pumilus* proveniente de aguas residuales mostró niveles intermedios de especies reactivas de oxígeno debido, probablemente a que en estas aguas se encuentren metales o compuestos tóxicos generadores de estrés oxidativo. En bacterias como *E.coli* se han reportado genes que codifican para enzimas antioxidantes, mismas que se inducen por agentes tóxicos. Entre estas enzimas se pueden mencionar las relacionadas con el metabolismo del glutatión, la Superóxido dismutasa dependiente de manganeso, la citosólica y la periplásmica, tioredoxinas, hidroperoxidasas y deshidrogenasas. Lo anterior podría indicar que en bacterias si se podrían generar fenómenos de estrés oxidativo por metales. Aunado a lo anterior, se ha reportado que el plomo puede generar por sí mismo las especies reactivas de oxígeno al catalizar la reacción de Fenton.

Dentro de este trabajo y en base a los resultados obtenidos se ha podido establecer una relación entre el efecto de la exposición a plomo en bacterias

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

y sus efectos en el crecimiento celular, la morfología colonial y microscópica y la generación de estrés oxidativo. Al proseguir con los estudios bioquímicos se encontró una relación entre la exposición a plomo, el estrés oxidativo y la actividad de la enzima Glutación S-transferasa.

Al igual que algunas otras proteínas la enzima Glutación S-transferasa es una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en muchos seres vivos, incluyendo mamíferos, plantas y microorganismos. El papel principal de la enzima es el de participar, en las células hepáticas de los organismos superiores, dentro de la fase II del metabolismo de los xenobióticos. En esta etapa, la enzima une compuestos hidrofílicos (provenientes de las reacciones catalizadas por el citocromo P450 de la fase I) a glutación con lo cual resultan fácilmente eliminados a nivel renal por orina. Sin embargo en bacterias su función es desconocida aunque se ha propuesto que podrían tener la función de unión de ciertos antibióticos o estar implicadas en procesos de bioremediación (Sheeman, 2011). Lo que sí se sabe es que de la familia GST, en bacterias predomina la clase β , misma que se encuentra en varias especies microbianas. En este estudio, se analizó la actividad de la enzima en las tres cepas bacterianas a concentraciones crecientes de plomo y se encontró que las cepas en ausencia de plomo existen actividades de la enzima diferentes. En *Hafnia alvei* la actividad de GST es menor en comparación con las cepas de *Bacillus pumillus*. De estas la cepa aislada de las aguas residuales presenta una actividad mayor. Una de las funciones que se le han atribuido a esta enzima es que podría utilizarse como un indicador de toxicidad. Este hecho nos podría ayudar a entender que, como se ha demostrado anteriormente, el plomo origina menos especies reactivas de oxígeno en *Hafnia alvei*, lo cual estaría indicando un menor daño oxidativo en estas bacterias mismo que estaría reflejándose en una actividad baja de la enzima. Cuando las cepas son expuestas a plomo se observa que la actividad de la enzima en las cepas aisladas de ambientes contaminados aumenta al aumentar la concentración de plomo y en la cepa proveniente del ambiente libre de contaminantes existe

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

un doble efecto del plomo sobre la actividad enzimática, ya que con la primera concentración presenta un aumento de actividad y en presencia de una concentración más elevada presenta una disminución de la misma posiblemente por algún efecto directo del metal sobre la estructura proteica. Se ha reportado que el plomo al generar especies reactivas de oxígeno podría activar ciertos factores de transcripción, mismos que reflejan su actividad al inducir la síntesis de algunas proteínas. Esta hipótesis podría estudiarse empleando como modelo alguna de las cepas aisladas en este trabajo, ya que se ha encontrado una posible relación entre la intoxicación con plomo, la generación de especies reactivas de oxígeno y la actividad de la enzima GST.

Dentro de los mecanismos que ayudan a los organismos a protegerse contra la gran variedad de agentes tóxicos que se encuentran en el medio ambiente se encuentran las proteínas. A lo largo de este trabajo se han mencionado proteínas que tienen una actividad antioxidante o que forman sistemas compuestos por bombas de eflujo o transportadores de iones, los que se han ido adaptando a lo largo del tiempo y que han adoptado la función de detoxificación cuando las células se enfrentan a condiciones extremas o que generan cualquier tipo de estrés. El grupo de investigación conformado por la Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno y sus colaboradores han demostrado la existencia de proteínas de bajo peso molecular (aisladas de núcleos de células de túbulo proximal de ratas expuestas de manera crónica a plomo por vía oral, a las que se les ha dado el nombre de PCI) compuestas por aminoácidos ácidos, con punto isoeléctrico cercano a 6, con capacidad de asociarse y disociarse en presencia de agentes quelantes y plomo respectivamente, con diferente comportamiento en función del órgano estudiado y que pueden ser inmuno detectadas en animales intoxicados con cromo y en muestras de suero y orina de humanos expuestos ocupacionalmente al metal (Navarro, 2004, 2009). Como se ha mencionado a lo largo de este escrito, una de las ideas del estudio de estas proteínas se relaciona con el fenómeno del estrés ocasionado por exposición a metales.

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Bar en 2007 reportó la existencia de bandas proteicas en dos cepas microbianas aisladas de tierras contaminadas y expuestas a plomo (Bar, 2007). Los resultados obtenidos al llevar a cabo los ensayos de electroforesis en las tres cepas demuestran que la banda correspondiente a las proteínas de los cuerpos de inclusión aisladas a partir de los animales intoxicados se pudo detectar en las cepas en función del ambiente del cual fueron aisladas y la concentración de plomo utilizada. Solo a concentraciones bajas y en las cepas sin exponer a plomo se observaron las bandas correspondientes al peso molecular de las PCI. Estas bandas fueron detectadas a tiempos iniciales de intoxicación, sin embargo a las 24 horas la intensidad de las bandas disminuyó en las cepas de *Bacillus pumillus*, no así en la de *Hafnia alvei*. A concentraciones altas de plomo solo las bandas detectadas en *Hafnia* permanecen. Podría ser que las proteínas de los cuerpos de inclusión estuvieran involucradas dentro del fenómeno de intoxicación de las cepas aisladas en este trabajo. Sin embargo para poder asegurar lo anterior se requiere iniciar estudios inmunológicos y proteómicos mismos que ayudarán a afirmar o a refutar esta idea.

IX. CONCLUSIONES

El medio ambiente en el cual se desarrollen las bacterias determinará, generalmente, su sensibilidad a la exposición a plomo en un medio de cultivo. Esto se puede deber a que si en el afluente del cual fueron aisladas las bacterias contenía metales pesados, éstas al estar en contacto con los mismos poseían muy probablemente mecanismos previos de tolerancia a plomo.

Hafnia alvei y *Bacillus pumilus* presentan diferente sensibilidad a la exposición a plomo. Las dos especies de *Bacillus pumilus* aisladas expresaron distinta tolerancia al metal debido a que pertenecen a diferentes subespecies o a que se aislaron de diferentes ambientes.

Los estudios microbiológicos y bioquímicos indicaron que las tres cepas bacterianas, en ausencia y en presencia de plomo, presentaron diferente comportamiento en relación con la curva de crecimiento, la concentración total de proteínas, la generación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), la actividad de la enzima Glutathion S-transferasa (GST) y la presencia de bandas en la región de las proteínas de los cuerpos de inclusión.

Se puede establecer una relación entre las cepas bacterianas aisladas, el estrés oxidativo generado por la exposición a plomo y la actividad de la enzima Glutathion S-Transferasa.

La cepa de *Bacillus pumilus* aislada de aguas no contaminadas expresó algún mecanismo de defensa mismo que le ayudó a tolerar la exposición a plomo. Este mecanismo pudo ser introducir agua dentro de la célula para disminuir la concentración de plomo, reflejándose como hinchamiento de las células y cambio de coloración de las colonias en medio sólido.

Las bandas proteicas encontradas en las cepas presentaron una región que correspondió a la banda de proteínas de inclusión. La presencia de estas bandas dependió de la cepa, la concentración de metal y el tiempo de exposición. *Hafnia alvei* mostró mayor intensidad de las bandas y logró conservarlas a concentraciones elevadas de plomo.

IX. CONCLUSIONES

En base a estas observaciones se podría establecer una posible relación entre la exposición al metal y la presencia de bandas de proteína correspondientes a las proteínas de los cuerpos de inclusión.

X. PERSPECTIVAS

- 1.- Realizar el estudio de especie de las bacterias correspondientes al mismo género que presentan diferente sensibilidad hacia la exposición a plomo.
- 2.- Corroborar la especie de las cepas encontradas mediante análisis de ADN o RNA.
- 2.- Llevar a cabo el análisis del efecto de la exposición a plomo en cepas comerciales correspondientes a las aisladas dentro de este trabajo, con la finalidad de comparar los efectos del tóxico en especies naturales y especies que nunca han estado en contacto con el metal.
- 3.- Llevar a cabo estudios de medición de actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo (Glutatión peroxidasa, Catalasa, Glutatión oxidasa) y contenido de glutatión para poder correlacionar el daño ocasionado por plomo con dicho fenómeno.
- 4.- Profundizar el estudio sobre los procesos que confieren tolerancia a plomo en las bacterias.
- 5.- Establecer estudios de tolerancia cruzada para determinar si la resistencia a plomo conferida a las bacterias les permite tolerar la exposición a otros metales pesados.
- 6.- Llevar a cabo los estudios inmunológicos para determinar la presencia de proteínas de cuerpos de inclusión en bacterias resistentes y sensibles a plomo.
- 7.- Comparar los resultados obtenidos con los datos que se tienen dentro del proyecto general de estudio de las proteínas de los cuerpos de inclusión para iniciar las correlaciones necesarias y establecer si estas proteínas se pueden clasificar dentro de las proteínas de estrés.

XI. PARTICIPACION EN CONGRESOS Y ESTANCIAS

3° Congreso de Estudiantes, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias, 19 al 23 de abril del 2010.

I Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química, Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Básicas e Ingeniería y el Área Química, 27 al 29 de octubre del 2010.

III Simposium de Química Universidad del Papaloapan, 10 y 11 de marzo de 2011.

II Simposium Nacional de Detección de Microorganismos, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 7 de abril del 2011.

II Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química, Universidad Autónoma Metropolitana, 3 al 7 de octubre del 2011.

3ra. Reunión Regional y 1er. Congreso Latinoamericano de Ciencias Microbiológicas: Resistencia Antimicrobiana. Tecnológico de Monterrey Campus Puebla y la Asociación Poblana de Ciencias Microbiológicas A.C., 11 Y 12 de noviembre del 2011.

Seminario Estudiantil UNPA, Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, 11 de abril del 2012.

Estancias Profesionales realizadas en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, donde se llevaron a cabo las técnicas necesarias para el aislamiento e identificación de bacterias a partir de pruebas bioquímicas, del 01 de agosto al 15 de septiembre del 2011.

XVIII Reunión de la rama de Bioenergética y Biomembranas de la Sociedad mexicana de Bioquímica. Del 20 al 25 de Octubre de 2013 en Jurica, Querétaro.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Ainbinder, E., Bergelson, S., Pinkus, R., Daniel, V., 1997. Regulatory mechanisms involved in activator-protein-1 (AP-1) - mediated activation of glutathione S-transferase gene expression by chemical agents. *FEBS* 243, 49-57.

Bar, Ch., Patil, R., Doshi, J., Kulkarni, M. J., Gade, W. N. (2007). Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance. A proteomic approach. *J. Biotech.* 128, 444-451.

Bear, S. J., R. Hashim, J. Membrillo- Hernandez, M. N. Hughes and R. K. Poole. 1997. Zinc (II) Tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the ZntA gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Molecular Microbiology* 25:883-891.

Benedet, J. A., Shibamoto, T. (2008). Role of transition metals, Fe (II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in lipid peroxidation. *Food Chem.* 107, 165-168.

Beveridge, T. J., Doyle, R. J. (1989) *Metal Ions and Bacteria*, John Wiley and sons. Inc, New York.

Brocklehurst et al; (1999). ZntR is a Zn(II)-Responsive MerR-like transcriptional regulator of ZntA in *Escherichia coli*.

Calderón S. V., Maldonado V. M., (2008) *Capítulo 2: Contaminación e intoxicación por plomo*, 11-17.

Cantarow, A. and Schepartz, B., *Biochemistry*, 3rd ed., Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1962, pp. 134 and 388-389.

Carabias, J. Instituto Nacional de Ecología. (1999) SEMARNAP. *Promoción de la prevención de riesgos químicos ambientales*, México, D. F., pp. 149-158.

Cervantes, C. (2001). Campos-García J, Devars, S., Gutiérrez-Corona, F, Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C., Moreno-Sánchez, R. Instituto de

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Investigaciones Químico- Biológico, Universidad Michoacana, Edificio B-3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacana, México.

Cervantes, C., Chávez. J., Vaca, S. (1991). Mecanismo de resistencia bacteriana a metales pesados.

Cervantes, C., Gutierrez.Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiol. Rev. 14(2), 121-137.

Cervantes, C., Ji G, Ramirez, J. L., Silver, S. (1994) Resistance to arsenic Compounds in microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 56, 173-176.

Cervantes. C., Campos-García. J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman. J. C., Moreno-Sánchez. R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev. 25 (3), 335-347.

Choie D.D. and Richter G.W., 1972. Lead poisoning: rapid formation of intranuclear inclusions. Science, 177, 1194.

Devars, S., Hernandez S., Moreno-Sanchez, R. (1997). Enhanced Heavy Metal Tolerance in Two Strains of Photosynthetic *Euglena gracilis* by Preexposure to Mercury or Cadmium. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México, D.F. 14080.

Diamond L. G., K. Zalups K. Rudolfs., (1988). Understanding Renal Toxicity of Heavy Metals. Toxicol Pathol/26:92.

Doelle,H. W., Bacterial Metabolism, New York: Academic Press, 1969, pp.284-286 and 291.

Donaldson, W. E., Knowles, S.O., 1993. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? Comp. Biochem. Physiol. 104C, 377-379.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Frobisher, L. F., Fundamentals of Microbiology, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1957, p.181.

Goyer, R. A., Krall, A., Kimball, J, P. (1968). The Renal Tubule in Lead Poisoning- Lab. Invest. 19 (1), 28-33.

Goyer, R. A., Krall, R, (1969). Ultrastructural transformation in mitochondria isolated from kidneys of normal and lead intoxicated rats. J. Cell. Biol. 41, 393-400.

Goyer, R.A., 1993. In: Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, C.D. (Eds.) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, New York, pp. 623-680.

Habig, W. H. and Jakoby, W. B. (1981). Assays for differentiation of Glutathione S-transferases. Methods Enzymol. 77:398-405.

Habig, W. H. and Jakoby, W. B. (1981). Glutathione S-transferases (Rat and Human). Methods Enzymol. 77:218-237.

Hermes-Lima, M., Pereira, B., Bechara, E.J.H., 1991. Are free radicals involved in lead poisoning? Xenobiotica 21, 1085-1090.

Herranz A. A., (2010). Nuevas estrategias electroanalíticas aplicadas a sistemas de difícil resolución de complejacion de fitoquelatinas con plomo. Universitat de Barcelona, Departamento de Química Analítica.

Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annual review of cell biology 8: 67-113.

Hus, P., Liu, M., Hus, C., Chen, L., Guo, Y., (1997). Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment of rat sperm. Toxicology 122, 133-143.

Igarashi Y, Aoki K., Mamitsuk H., Kuma K., Kanehisa M. The evolutionary repertoires of the Eukaryotic type ABC transporters in terms of the phylogen

XII. BIBLIOGRAFÍAS

of ATP binding domains in eukaryotes and prokaryotes. *Mol Biol Evol* 2004; 21, 2149-60.

Introducción a la química ambiental, Manaham S. E., Reverte ediciones, S. A. de C.V., 2007.

Horitsu, H., K. Yamamoto, S. Wachi, K and A. Fukuchi. (1998). Plasmid-determined cadmium resistance in *Pseudomonas putida* GAM.1 isolated from soil. *J. Bacteriol.* 165: 334-335.

Higman, D. P., Sadler, P. J., and Scawen, M. D. (1984). Cadmium resistant *Pseudomonas putida* Synthesizes novel cadmium Proteins. *Science* 225, 1043-1046.

J. Simeray, A. Delcourt, et J.C. Mestre, (1977). Influence de trios derives mercuriels sur la croissance d' *Euglena gracilis* Z., Laboratoire de botanique et de cryptogamie, Séance du 21 mai.

Jean F. Mac Faddin., *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica.*, 1980, Editorial médica panamericana S.A.

Jeong E. Park, Kho E. Young, Hans G. Schlegel, Ho G. Rhie., Ho S. Lee. (2003). Conjugative plasmid mediated inducible nickel resistance in *Hafnia alvei* 5-5. *Rev. Lat.-amer. Microbiol.* 33, 61-70.

J. Simeray, A. Delcourt, et J.C. Mestre, (1977). Influence de trios derives mercuriels sur la croissance d' *Euglena gracilis* Z., Laboratoire de botanique et de cryptogamie, Séance du 21 mai.

Jean F. Mac Faddin., *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica.*, 1980, Editorial médica panamericana S.A.

Jeong E. Park, Kho E. Young, Hans G. Schlegel, Ho G. Rhie., Ho S. Lee. (2003). Conjugative plasmid mediated inducible nickel resistance in *Hafnia alvei* 5-5. *Rev. Lat.-amer. Microbiol.* 33, 61-70.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Kägi, J.H.R.; Kojima, Y. (Ed) (1987) "Chemistry and Biochemistry of metallothionein. Metallothionein II." Birkhäuser Verlag, Basel.

Kho E. Young, Hans G. Schlegel, Ho G. Rhie, Ho S. Lee; Rev. Lat.-amer. Microbiol. 33, 61-70.

Kumar, B. K., Brown, E., McCormic, R., Rao, Y. P., Rajanna, S., Bettaia, R. (2008). Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. Biometals. 21, 9-16.

Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. Biol. Trace Element Res. 28, 83-97.

Loeza Lara Pedro D., Valdez Alarcón Juan J., Aguirre Baizabal Victor M. y López Meza Joel E. (2004). Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. Centro multidisciplinario de estudios en Biotecnología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Nicolás de Hidalgo.

Long, G.J., Rosen, J.F., Schanne, F.A.X., 1994. Lead activation of protein kinase C from rat brain. Determination of free calcium, lead, and zinc by ¹⁹F NMR. J. Biol. Chem. 269, 834-837.

López-Burrillo, S., Tan, D.X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Manchester, L. C., Reiter, R. J., 2003. Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG Vitamin C and alpha-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions actions. J. Pineal Res. 34, 269-277.

Losi, M. E., Amrhein, C., Frankenberger, W. T. (1994). Environmental biochemistry of chromium. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 136, 91-121.

Luigi F de F., Rüdiger H., Hubert Z., (1981). The Effects of sublethal concentrations of Zinc, Cadmium and Mercury on Euglena. Arch Microbiol 128:407-411.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Luján, M. E., Corredor, L., Antonio, M. A. (2007). Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and /or cadmium. *J. Trace Elements Med, Biol.* 21, 210-216.

Mahaffey, K. R; Goyer, A, A, (1977). Effects of Concurrent Administration of Lead, Cadmium, and Arsenic in the rat. *Environ. Health Perspect.* 19, 156-171.

Mahaffey, K.R., (1997). Relation between quantities of lead ingested and health effects of lead in humans. *Pediatrics* 59, 448-456.

Marchetti, M. L., Frrecaide J., Mestorino, N. (2011) Resistencia Bacteriana a los microbios ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en multiresistencia, Catedra de farmacología, Facultad de ciencias veterinarias. Universidad Nacional de la Plata, CC 296, Argentina.

Markovac, J., Goldstein, G.W., 1988. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 334, 71-73.

Marrs K. A., (1996). The functions and regulation of Glutathione-S-transferasas in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158.

Masci, O., Bongarzone, R., 1995. Toxicity of lead. In: Castellino, N., Castellino, P., Sannolo, N. (Eds.), *Inorganic Lead Exposure: Metalolism and Intoxication*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 203-213.

Matthews, T. H., Doyle, R. J., Streips, U. N. (1979). Contribution of Peptidoglycan to the Binding of Metals Ions bu Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Current. Microbiol.* 3, 51-53.

Michael, J. J., Abbotl, S. L. (2008). The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. *Arch. Microbiol, Rews.* 13, 12-25.

Moore J.F. and Goyer R.A., 1974. Lead-induced inclusion-bodies: composition and probable role in lead metabolism. *Environ. Health Perspect.*, 7,121.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Moreno-Sánchez R. y Devars Silvia. (1999) Capitulo 1: Abundancia de metales pesados en la biosfera. En: Contaminación ambiental por metales pesados. AGT Editor, S. A. México.

Moreno-Sánchez R., Diaz-Barriga Fernando y Devars Silvia. (1999) Capitulo 2: Mecanismos de toxicidad y de tolerancia a los metales pesados. En: Contaminación ambiental por metales pesados. AGT Editor, S. A. México.

Moreno-Sánchez R., Cervantes C., (1999). Contaminación ambiental por metales pesados. Departamento de bioquímica, Instituto Nacional de cardiología México, D.F. AGT Editor, S. A.

Murray, P., Medical Microbiology, 3ra. Ed., Capitulo 5, 2002.

Nakagawa, K.E., Oberley, T.D., Sempf, J.M., Oberley, L.W., 1994 Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney. Histochem. J. 26, 734-753.

Navarro M.L.G., (2004). Proteínas de los cuerpos de inclusión y la susceptibilidad renal hacia la intoxicación con plomo. Centro de investigación y de estudios avanzados del IPN.

Navarro Moreno Leticia G. (1999). Efecto del plomo sobre algunos aspectos fisiológicos de túbulos proximales de riñón de rata. Centro de investigación y de estudios avanzados del IPN.

Ndgzangou, S. O., M Richer-Lafleche., D. Houle. Sources and evolution of anthropogenic lead in dated sediments from lake clair, Quebec, Canada, Journal Environmental Quality, 11;34 (3):1016-25,2005.

Nieboer E. and Fletcher Glenn E., (1996). Chapter 7: Determinants of reactivity in metal Toxicology. In Toxicology of Metals. Edited by Louis W. Chang. Lewis Publishers. USA.

XII. BIBLIOGRAFIAS

Nies, D. H. (1992). Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid*. 27 (1), 17-28.

Nies, D. H. (1998). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(6), 730-750.

Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27(2-3), 313-339.

Nies, D. H., Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* 14(2), 186-199.

Oberley, T., Friedman, A.L., Moser, R., Siegel, F., (1995). Effect of lead administration on developing rat kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131, 94-107.

Othman, A. I., El-Missiry, M.A., (1998). Role of selenium against lead induced toxicity in male rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12, 345-390.

Páez-Espino D., Tamames J., De Lorenzo V. y Canovas D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* 22: 117-130.

Parvathi, A., Krishna, K., José, H., Joseph, N., Nair, S. (2009)- Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coast environment in Cochin, India. *Braz. J. Microbiol.* 40. 269-275.

Pelczar, M. J., Reid. R. D., *Microbiology*, 2nd. Ed., New York: McGraw-Hill Book Company, 1965, pp.120-121.

Peter L. Goering and Bruce A. Fowler, (1984). Regulation of Lead Inhibition of δ -Aminolevulinic Acid. Dehydratase by a Low Molecular Weight, High Affinity Renal Lead- Binding Protein. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1984, Vol. 231, No.1, 66-71.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Reed, R. H., Gadd, G. M. (1989) Metal Tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. Heavy metal tolerance in plants, Evolutionary Aspects, A. J. Shaw, Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. Capítulo 8, pp. 105-118.

Ribarov, S.R., Benov, L.C., Benchev, I.C., 1981. The effect of lead on hemoglobin-catalyzed lipid oxidation. Biochem. Biophys. Acta 664, 453-459.

Richter G.W., Kress Y. and Cornwall C.C., 1968. Another look at lead inclusion-bodies. Am. J. Pathol., 53, 189.

Robert A. Goyer, M.D., And Marion H. Wilson, B.A., Laboratory (1975). Lead-Induced Inclusion Bodies. Results of Ethylenediaminetetraacetic Acid Treatment. Vol.32, No.2, 149-156.

Robert A. Goyer, M.D., Phillip May, B. SW., Maxine M. Gates, B.S., And Martin R. Krigman, M.D., Laboratory investigation. (1970). Lead and Protein Content of Insolated Intranuclear. Inclusion Bodies from Kidneys of Lead-Poisoned Rats. Vol.22, No.3, 245-251.

Robinson, J. B., Touvinen, O. H. (1984). Mechanisms of Microbial resistance and Detoxification of Mercury and Organomercury Compounds: Physiological. Biochemical and Genetic Analyses. Microbio. Rews. 48(2), 95-124.

Rosenberg H. (1987). Phosphate transport in prokaryotes. P.205-248. En: B. P. Rosen y S. Silver (Eds.), Ion Transport in prokaryotes. Academic Press, San Diego.

Sair M, Paulsen I, Sliwinski M, Pao S, Skuffay R, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drugs specific efflux pumps in bacteria. FACEB J 1998;12:256-74.

Sanders OI, Rensing C, M Kuroda, Mitra B, B P. Rosen Antimonite se acumula por el glicerol facilitador GlpF en *Escherichia coli* . J Bacteriol. de 1997; 179 . :3365-3367 [[PMC libres artículo](#)] [[PubMed](#)]

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Sandhir, R., Julka, D., Gill, K.D., 1994. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes, *Pharmacol. Toxicol.* 74, 66-71.

Scatamburlo M. M, Chartone S. E, Alencar M. C. (2004) Multidrug efflux systems in Gram negative bacteria.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V., Dowd C., Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily., *Department of Biochemistry, University College Cork.*, (2001) 360, 1-16.

Sheffield, S. R., Sawicka-Kapusta, K., Cohen, J. B., Rattner, B. A., (2001). Rodentia and Lagomorpha. In: Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Ecotoxicology of wild Mammals*. Wiley, Chichester. New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, pp. 215-314.

Shelton K. R. and Egle P. M. (1982). The Proteins of Lead-Induced Intranuclear Inclusion Bodies. *J. Biol. Chem.* 257: 11802-11807.

Silbergeld E. K. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo.* (2010), Cap 33 Toxicología.

Silver S., Le T. Phung, (1996). Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Rev. Microbiol.* 1996. 50: 753-789.

Silver, S. (1996). Bacterial resistances to toxic metal ions, a review. *Gene.* 179(1), 9-19-

Silver, S., Ji. G. (1994). Newer Systems for Bacterial Resistances to Toxic Heavy Metals. *Environ. Health Persp.* 102(3), 107-113.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Silver, S., Misra, T, K. (1988). Plasmid-mediated Heavy Metal Resistances. *Ann. Rew. Microbiol.* 42, 717-741.

Silver, S., Phung, L. T. (1996) Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois. College of Medicine, Chicago, Illinois 60612.

Smith, D. T., Conant, N. F. and Willett, H. P. *Zinsser Microbiology*, 14 th ed., New York: Appleton-Century-Crofts, 1968, p.113.

Silver S., Walderhaug M. (1992). Regulation of Chromosomal and plasmid cation and anion transport systems. *Microbiol. Rev.* 56, 1-33.

Sokatch, J. R. *Bacterial Physiology and Metabolism*, New York: Academic Press, 1969, pp. 133-141.

Stanier, R. Y., Doudoroff, M. and Adelberg, E. A. *The microbial World*, 2nd ed., Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, Inc., 1963, pp.271-272.

Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 321-336.

Sugawara, E., Nakamura, K., Miyate, T., Fukumura, A., Seki, Y., 1991. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Br. J. Ind. Med.* 48, 239-242.

Summers, A. O. (1978)- *Microbial Transformations of Metals*. *Ann. Rews. Microbiol.* 636-672.

Sun, S. Q., Wnag, G, X., He, M., Cao, T. (2011). Effects of Pb and Ni stress on oxidative stress parameters in three moss species. *Ecotoxicol. Environ, Safety.* 74, 1630-1635.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Sun, Y. (1990). Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radical Bio. Med.* 8, 583-599.

Trevors J. T., Stratton G. W., Gadd G. M., (1986). Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can J. Microbiol.* 32(6), 447-64.

Tsai, K.J., K. P. Yoon and A. R. Lynn (1992). ATP dependent cadmium transport by the CadA Cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus Subtilis*. *Journal of bacteriology* 174:116-121.

Ureña R. R., (2007). Metalotioneínas en peces y gasterópodos: su aplicación en la evaluación de la contaminación. Departamento de biología funcional y antropología física, Universidad de Valencia.

Vicenzo A., Ester P. and Olimpia C., (1980). Response to heavy metals in organisms- I. Excretion and accumulation of physiological and non-physiological metals in *Euglena Gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 67C.pp. 121 to 127.

Vijayaraghavan, K., Yeoung, Sang Yun. (2008) Bacterial biosorbents and biosorption. Division of Environmental and Chemical Engineering, Research Institute of Industrial Technology; Chunbuk National University, Chonju 561-756.

Vullo L. D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en el beneficio al medio ambiente. *Revista Química Viva.* Vol. 2 número 3.

Walter C. H., Hopkin, S.P., Sibly, R. M., and Peakall, D.B. Chapter 7: Biochemical effects of pollutants. In *Principles of Ecotoxicology.* Second Edition. Ed Taylor and Francis, 2001.

XII. BIBLIOGRAFÍAS

Whittaker, M., Wang. G., Chen, X-G., Lipsty, M., Smith, D., Gwiazda, R., Fouler, B. A. (2011). Exposure to Pb, Cd, and As mixtures potentiates the production of oxidative stress precursors: 30-day, 90-day. And 180-day drinking water studies in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254, 154-166.

Wilson, G. S., and Miles, A. A., Topley and Wilson´s Principles of Bacteriology and Immunity, Vol I, 5th ed., Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1964, pp. 815-816.

Zheng, H., Berman, N.E.J., Klaassen CD. Chemical (1995) Modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain. *Neurochem Int* 1995; 27: 43-58.

CITAS EN INTERNET

www.ptable.com

www.blogspot.mx

XIII. APENDICES

APENDICE I

UNA HISTORIA COMO OTRA CUALQUIERA: EL TETRAETILPLOMO

Texto modificado del original en: <http://es.globedia.com/plomo-gasolina-forma-parte-vidas>

Gasolina: Plomo en nuestras vidas.

Lamentablemente la historia se repite de innumerables formas... corrupción, manipulación de la información, violación de los derechos humanos elementales incluso en países "libres" y se destapa un escándalo para nacer otro en cualquier otro lugar... seguimos sin revelarnos para exigir enérgicamente a los tribunales constitucionales más transparencia y menos influencia política, en la que al final rebuscando, se encuentran grandes corporaciones que mueven a muchas marionetas. Hacia finales de la década de los años cuarenta, un estudiante de la Universidad norteamericana de Chicago llamado Clair Patterson estaba intentando encontrar un método de medición para determinar la edad de la Tierra que en aquella época rompía la cabeza de algunos científicos.

Todas las muestras de rocas de aquellos experimentos, terminaban contaminadas. Casi todas aquellas muestras contenían unas 200 veces más plomo del que debía haber de forma natural. Patterson tardaría muchos años en averiguar que la razón de aquello era causa de un inventor de Ohio conocido por Thomas Midgley, hijo. Este Midgley era ingeniero y se interesó mucho en las aplicaciones industriales de la química. En 1912 trabajaba para el General Motors Research Corporation en Dayton (Ohio) e investigó sobre un compuesto, el tetraetilo de plomo, y descubrió que reducía de forma significativa el fenómeno conocido como trepidación o golpeteo del motor al combustionar.

En aquellos primeros años del siglo XX ya era conocida la peligrosidad del plomo y se podía encontrar este metal pesado en un montón de productos de consumo alimentario. Las latas de conservas se sellaban con plomo y los depósitos de agua se recubrían igualmente. Los de nuestra generación aún

XIII. APENDICES

hemos conocido las casas de nuestros abuelos con tuberías de este metal tóxico. Hasta se rociaba la fruta con arseniato de plomo que era utilizado como pesticida. Estaba presente también en la composición de los tubos de la pasta dentífrica, algo que hacía que se acumulase restos de este metal en la dentadura humana (estudios que a lo largo de los años, han ayudado a esclarecer los efectos tan nocivos del plomo en nuestras vidas).

Pero nada tuvo unos efectos tan nefastos para LA SALUD HUMANA y en la dispersión de este veneno en la atmósfera como en los ecosistemas de la toda la Tierra, como su uso como aditivo en los combustibles.

El plomo es neurotóxico. Si ingieres mucho, puede dañar el cerebro y afectar al sistema nervioso central de una forma irreversible. No hay antídotos ni medicamentos que puedan reducir las dosis almacenadas en el organismo que no existe forma conocida en la actualidad para que puedan ser eliminadas.

Entre los síntomas detectables relacionados con esta exposición excesiva al contaminante, es la ceguera, el insomnio, la insuficiencia renal, la pérdida de audición, el cáncer, la parálisis y las convulsiones. Produce alucinaciones bruscas y aterradoras, que perturban por igual a víctimas manipulantes de este producto como a observadores, que suelen ir seguidas de estado de coma y muerte.

Y no hace falta incorporar demasiado tóxico de este en el organismo para notar sus efectos. Quieren hacernos creer que somos los responsables de esta situación cuando son las administraciones ineficaces, y las leyes que no se aplican, las responsables de los usos inadecuados y suicidas ante las tecnologías nada verificadas de sus productos no controlados éticamente hacia una sociedad que no conoce, que no sabe, que cree a pies juntillas que los gobiernos y sus políticos velan por su salud... por su bienestar. Pues NO... NO es del todo así.

En aquella época el plomo era fácil de extraer y de trabajar, y era vergonzosamente rentable producirlo a escala industrial. Una vez más en la historia social podemos ser testigos de los pocos escrúpulos y de los pocos remordimientos que se tuvo para incorporarlo a los combustibles por el

XIII. APENDICES

pelotazo económico que suponía frente a los carburantes mezclados con alcohol menos rentables comercialmente hablando, y menos impactantes sobre el medio ambiente.

Así que en 1923, tres grandes empresas estadounidenses, General Motors, Du Pont y Standard Oil de Nueva Jersey (hoy EXXON) crearon una empresa conjunta, la Ethyl Gasoline Corporation (más tarde sólo Ethyl Corporation) para fabricar y distribuir el plomo tetraetílico, tanto como el mundo estuviese dispuesto a comprar, y eso ha resultado a lo largo del tiempo, muchísimo más de lo imaginable en aquel momento. Le llamaron "etilo" a aquel componente, porque les pareció un nombre más amistoso y menos tóxico que "plomo" y lo introdujeron para el consumo público el 1 de febrero de 1923.

Los trabajadores de aquellas fábricas casi de inmediato empezaron a acusar sus efectos, a tambalearse y la confusión mental característica del recién envenenado. La empresa de inmediato se sumergió en una política de manipulación de la realidad inflexible y serena, que les resultaría rentable durante decenios. En las primeras semanas los delirios irreversibles se fueron extendiendo y murieron unas 15 personas, y otros tantos enfermaron en muchos casos de gravedad. El número exacto de afectados no se conoció ni se conoce en nuestros días ya que la empresa consiguió silenciar las noticias y a los medios de comunicación a su alcance.

Cuando empezaron a circular los rumores sobre los peligros de este producto, el inventor Thomas Midgley, decidió ofrecer unas demostraciones a los periodistas pero ya estuvo afectado por los efectos nocivos cuando investigaba y no se acercaba al producto o a las instalaciones donde se fabricaba, si podía evitarlo.

También Midgley es el responsable de descubrir y poner en aplicación los gases clorofluorocarbonos, los famosos CFCs. Y raramente se ha aplicado un producto tan rápida y lamentablemente por los efectos que después hemos podido comprobar por su efecto sobre la capa de ozono en la estratosfera.

Estos gases empezaron a fabricarse a principios de los años treinta y se les encontraron miles de aplicaciones, incluyendo su capacidad de destrucción

XIII. APENDICES

tan desmesurada: un solo kilo de CFC puede capturar y aniquilar 70.000 kilos de ozono atmosférico. Estos gases perduran al menos 1 siglo como media, y no cesan de causar deterioro. Actúan por otra parte como grandes esponjas del calor. Una sola molécula de CFC es aproximadamente diez mil veces más eficaz intensificando el efecto invernadero que una molécula de dióxido de carbono. En resumen, estos clorofluorocarbonos podrían convertirse en uno de los peores inventos del siglo XX. Aunque Midgley no llegó a enterarse de todo esto, ya que murió antes de que se descubriera.

Volviendo a los experimentos de Patterson, que intentaba averiguar el hecho de que hubiera tanto plomo en la atmósfera después de 7 años de experimentos, se quedó asombrado al enterarse de lo poco que se sabía sobre los efectos del plomo en los humanos... cosa nada sorprendente si tenemos en cuenta que durante cuarenta años todos los estudios sobre los efectos del plomo los habían costado en exclusiva los fabricantes de aditivos de plomo. En uno de los estudios, un médico que no estaba especializado en patología química, emprendió un programa que pedía a voluntarios que aspirasen o ingiriesen elevadas cantidades de plomo. Luego les examinaban la orina y las heces. No se sabía que el plomo no se excreta como producto de desecho. Se acumula más bien en los huesos y en la sangre eso es lo que lo hace tan peligroso y entonces las autoridades sanitarias no examinaron ni los huesos ni la sangre de los voluntarios.

Y en consecuencia entonces creemos que con la influencia de las grandes corporaciones implicadas se dio el visto bueno sanitario al plomo. Pero Patterson no se dio por vencido y siguió persiguiendo al plomo comprobando que aproximadamente el 90% de este metal pesado presente en el medio provenía de los tubos de escape de los automóviles, pero no podía demostrarlo.

El problema es el de siempre, el que los afectados son los que tienen que demostrar contra aquellos que producen y se enriquecen, comprando las voluntades abogados y gabinetes que inundan de informes amañados todos los despachos a los que tienen acceso, pasando años hasta que se puedan

XIII. APENDICES

obtener pruebas. Y las vidas que se lleva todo ello por delante nunca cuentan... siempre se llega demasiado tarde.

Lo que Patterson descubrió fue que antes de 1923 casi no había plomo en la atmósfera y que los niveles plomo habían ido aumentando constante y peligrosamente desde entonces. A partir de aquel momento fue la obsesión de este hombre que convirtió su vida en la misión de que se retirase el plomo de la gasolina.

Aquello resultaría una campaña infernal contra los intereses de la Ethyl, una empresa poderosa con muchos amigos en puestos elevados (entre sus directivos habían figurado el magistrado del Tribunal Supremo Lewis Powell y Gilbert Grosvenor de la National Geographic Society).

Patterson se encontró con la sorpresa de que retiraron sus fondos para continuar sus investigaciones o que le resultaban difíciles de conseguir. El Instituto Americano del Petróleo canceló su contrato de investigación que tenía con él y lo mismo hizo el servicio de Salud Pública de Estados Unidos, un organismo oficial supuestamente neutral.

Patterson fue convirtiéndose cada vez en un problema para su institución, y los miembros del consejo de administración del Instituto Tecnológico de California fueron objeto de repetidas presiones de directivos de la industria del plomo para que le hiciesen callar o prescindiesen de él.

Según decía en el año 2000 Jamie Linconl Kitman en The Nation, ejecutivos de Ethyl se ofrecieron a financiar una cátedra en el instituto "si se mandaba a Patterson hacer las maletas". Se llegó al absurdo de excluirle de una comisión del Consejo Nacional de Investigación que se creó en 1971 para investigar los peligros del envenenamiento con plomo atmosférico, a pesar de ser por entonces indiscutiblemente el especialista más destacado del país en plomo atmosférico.

Para gran honra suya, Patterson se mantuvo firme a las presiones y amenazas que recibió de forma constante. Finalmente gracias a sus esfuerzos, se aprobó la Ley de Aire Limpio de 1970 y acabaría consiguiendo que se retirase del mercado toda la gasolina plomada en los Estados Unidos en 1986. Casi

XIII. APENDICES

inmediatamente se redujo en un 80% el nivel de plomo en la sangre de los estadounidenses. Pero como el plomo es para siempre, los habitantes actuales del país tienen cada uno de ellos 625 veces más plomo en la sangre del que tenían los que vivieron en el país hace un siglo.

La cantidad de plomo en la atmósfera sigue aumentando también, de una forma completamente legal, en unas cien mil toneladas al año, procedentes sobre todo de la minería, la fundición y las actividades industriales. Estados Unidos prohibió también el plomo en la pintura de las casas para interior "44 años después que la mayoría de los países de Europa", como indica la Macgrayne. Resulta notable que no se prohibiese la soldadura de plomo en los envases de alimentos en el país hasta 1993, pese a su toxicidad alarmante. En cuanto a la Ethyl Corporation, aún es fuerte, a pesar de que la General Motors, la Standard Oil y Dupont no tengan ya acciones de ella (se las vendieron a una empresa llamada Albert Marle Paper en 1962). Según Macgrayne, Ethyl seguía sosteniendo aún en febrero de 2001 "que la investigación no ha conseguido demostrar que la gasolina plomada constituya una amenaza para la salud humana ni para el medio ambiente".

En su portal de la red de Internet, hay una historia de la empresa en la que no se menciona siquiera el plomo (ni tampoco a Thomas Midgley) y sólo se dice del producto original que contenía "cierta combinación de sustancias químicas". Ethyl no fabrica ya gasolina plomada, aunque, de acuerdo con su balance de la empresa del año 2001, todavía hubo unas ventas ese año de plomo tetraetílico (o TEL, como le llaman ellos) por el importe de 25 millones en el 2000 (de un total de ventas de 795 millones de dólares) más que los 24 millones de 1999, pero menos que los 117 millones de 1998. La empresa comunicó en su informe que había decidido "maximizar los ingresos generados por TEL, aunque su utilización siga descendiendo en el mundo". Ethyl comercializa TEL en todo el mundo mediante un acuerdo con Associated Octel LTD, de Inglaterra.

XIII. APENDICES

En cuanto al otro azote que nos legó Thomas Midgley, los CFC se prohibieron en 1974 en EEUU, pero son diablillos tenaces y, los que se soltaron a la atmósfera antes de eso (en desodorantes pulverizadores capilares, por ejemplo), es casi seguro que seguirán rondando por ahí y devorando ozono mucho tiempo aún. Y lo que es peor, seguimos introduciendo cada año enormes cantidades de CFC en la atmósfera. Según Wayne Biddle, aún salen al mercado anualmente 27 kilos de CFC por un valor de 1.500 millones de dólares. ¿Quién lo está haciendo? Nosotros... es decir, muchas grandes empresas siguen produciéndolo en sus fábricas del extranjero. En los países del Tercer Mundo no estará prohibido hasta el año 2010.

Clair Patterson murió en 1995. No ganó el premio Nobel por su trabajo. Los geólogos nunca lo ganan. Ni tampoco se hizo famoso, lo que es más desconcertante. Ni siquiera consiguió que le prestasen demasiada atención pese a medio siglo de trabajos coherentes y cada vez más laboriosos. Sin duda podría afirmarse que fue el geólogo más influyente del siglo XX. Sin embargo, ¿quién ha oído hablar de alguna vez de Clair Patterson? La mayoría de los textos de geología no lo mencionan. Dos libros recientes de divulgación sobre la historia de la datación de la Tierra, se las arreglan incluso para escribir mal su nombre. A principios de 2001, un crítico que hacía una valoración de uno de esos libros en la revista "Nature", cometió el error adicional, bastante asombroso de creer que Patterson era una mujer.

Lo cierto es que, pese a todo, gracias al trabajo de Clair Patterson, en 1953 la Tierra tenía al fin una edad en la que todos podían estar de acuerdo. El único problema era que resultaba ser más vieja que el universo que la contenía. Extraído de... Una breve historia de casi todo.

XIII. APENDICES

APENDICE II

EL PLOMO, CUERPOS Y PROTEÍNAS DE INCLUSIÓN (P.C.I.).

Se presentan cambios ultraestructurales específicos asociados con daño renal ocasionado por intoxicaciones con plomo como son la formación de cuerpos de inclusión citoplásmicos y nucleares. Estos cambios fueron reportados por primera vez por Blackman (Blackman S.S., 1936) en las células epiteliales renales de niños intoxicados con dicho metal. Muchos investigadores han reportado la presencia de cuerpos de inclusión particularmente en animales de laboratorio (Murakami, R., Kawamura, R., Nishii, S. y H. Katsunuma, 1983). Además se encontraron cuerpos de inclusión en biopsias renales de dos trabajadores con exposiciones menores de 1 año al metal pero no en otros con antecedentes de exposiciones más largas (Cramer, K., Goyer RA, Jagenburg, R. y MH Wilson, 1974). Se sabe que los cuerpos de inclusión no están limitados al epitelio tubular proximal, estos se han observado en el peritoneo tras la administración intraperitoneal de plomo a ratas de laboratorio (Wapnir, RA, Moak, S.A., Kifshitz, F. y Teichberg, S., 1979) astrocitos (Goyer, R.A. y Rhyne, B.C., 1973), células de neuroblastoma (Klann, E. y Shelton, KR, 1989) y osteoclastos (Van Mullen, P.J. y Stadhouders A.M., 1974). Los cuerpos de inclusión nucleares inducidos por plomo puede distinguirse de otros por sus características de tinción y su ultraestructura; estos cuerpos son eosinofílicos y son ácido-rápido cuando se tiñen por la técnica de Ziehl-Nielsen. Además, estos cuerpos de inclusión son aproximadamente esféricos y típicamente consisten en un núcleo denso en electrones con una red fibrilar en la periferia (Richter GW, Y. Kress y Cornwall CC, 1968). Estas inclusiones están formadas por 10 o 20 componentes individuales de aproximadamente 25 μm de diámetro cada uno y se disponen como ya se mencionó en un patrón esférico. Estos cuerpos de inclusión nucleares pueden ser aislados de los riñones y desglosados por agentes tales como urea, sulfato de laurilo y EDTA; este último también funciona de forma eficaz en sistemas in vivo (Moore JF y RA Goyer, 1974). Otras investigaciones han revelado que la formación de los

XIII. APENDICES

cuerpos de inclusión nuclear está precedida por la síntesis de cuerpos de inclusión citoplásmicos que tienen una estructura muy similar ya que tienen característica fibrilar y un núcleo denso (Choie D.D. y Richter G. W., 1972). Se ha propuesto que los cuerpos de inclusión juegan un papel protector importante en las células ya que se les ha considerado como los responsables del mantenimiento de concentraciones relativamente bajas de plomo libre tanto en el citoplasma como en el núcleo disminuyendo los efectos tóxicos del plomo libre presente en las células.

Con la idea de los daños ocasionados por la contaminación por plomo tanto en células procariontes, como eucariontes y la presencia de los cuerpos de inclusión en el citoplasma de la misma y tomando en cuenta también a su vez el hecho de que estos cuerpos densos de inclusión no se han reportado en bacterias, el presente trabajo de investigación pretende describir el efecto de la exposición a plomo en bacterias aisladas de efluentes contaminados en la zona del río Papaloapan en la ciudad de Tuxtepec, Oaxaca, con la finalidad de contribuir a estudios posteriores de investigación.

XIII. APENDICES

APÉNDICE III

“TINCIÓN DE GRAM”

Una tinción diferencial requiere más de un tipo de colorante y se utiliza para distinguir entre varios tipos de células bacterianas.

- Cristal violeta o violeta de genciana: colorante básico
- Lugol de Gram: mordiente
- Alcohol- acetona: decolorante
- Fuscina (safranina): colorante de contraste

Esta tinción típicamente consiste de tres pasos principales: primero un colorante primario, el cual se utiliza para teñir a todas las células en la tinción; seguido por la decoloración, la cual remueve el colorante solo de ciertos tipos de células y finalmente un colorante de contraste, el cual tiñe las células recién decoloradas pero no tiene efecto sobre las células que aún retienen el colorante primario. La reacción de la tinción de Gram se basa en la cantidad de peptidoglucano que se encuentra en las paredes celulares de estas bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen muchas capas de peptidoglucano, las cuales a su vez, sostienen moléculas de ácido teicoico. El ácido teicoico reacciona con el cristal violeta y el yodo utilizado en este proceso de tinción. Un complejo de las moléculas cristal violeta-yodo-ácido teicoico es muy difícil de remover. Como la pared celular de las células Gram positivas retiene estos compuestos, es más difícil decolorar una célula Gram positiva que una Gram negativa. Una mezcla de alcohol remueve el cristal violeta de la célula Gram negativa, pero no de la Gram positiva. Esta mezcla de alcohol también disuelve mucho de la capa exterior de lipopolisacáridos de la pared celular de la pared Gram negativa, lo cual acelera la remoción del colorante primario cristal violeta de estas células. Cuando otro colorante, usualmente safranina, se añade, a las células Gram positivas mantienen su color azul-violeta mientras que las Gram negativas absorben el color de la safranina. Al final del procedimiento de tinción, las células Gram positivas serán del color

XIII. APENDICES

del cristal violeta, o colorante primario, y las células Gram negativas serán del color de la safranina que es el colorante en contraste.