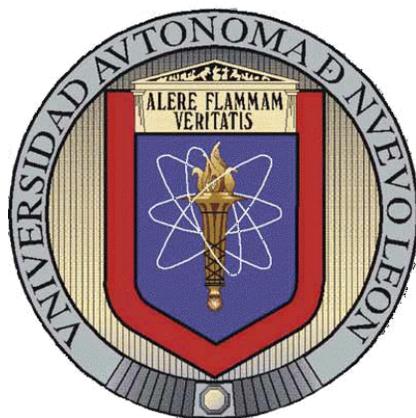


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
BACTERIAS SINTETIZADORAS DE PARTICULAS MAGNETICAS

POR

KAROOL ANGELINA MANILLA DIAZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con
orientación en Microbiología Industrial

JUNIO 2011

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS
SINTETIZADORAS DE PARTICULAS MAGNETICAS**

Aprobación de tesis:

**Dra. Martha Alicia Suárez Herrera
Directora de Tesis**

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Revisor de la Tesis**

**Dr. Alberto Gómez Treviño
Revisor de la Tesis**

**Dra. María Teresa Garza González
Sub-directora de Estudios de Posgrado**

RESUMEN

Karool Angelina Manilla Díaz

Fecha de Graduación: Junio 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Titulo de Estudio: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS SINTETIZADORAS DE PARTICULAS MAGNETICAS

Número de páginas: 80

Candidata para el grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Microbiología Industrial

Área de Estudio: Microbiología Industrial

La biomineralización es el proceso por el cual los organismos, tanto procariotas como eucariotas, producen minerales. Los microorganismos son el segundo grupo en importancia con respecto a la formación de minerales, y pueden producir una gran variedad de minerales diferentes según dos procesos de biomineralización: mineralización controlada biológicamente y mineralización inducida biológicamente. A partir de las muestras de agua y sedimentos de las pozas del área del Valle de Cuatro Ciénegas Coahuila se aislaron microorganismos con propiedades magnéticas; se buscaron las condiciones para su supervivencia utilizando técnicas de enriquecimiento. Se lograron obtener cultivos puros de espirilos y bacilos Gram negativos que mostraron propiedades magnéticas. Mediante el estudio de microscopía electrónica de transmisión se pudo confirmar la presencia de partículas de tamaño nanométrico en los cultivos puros de bacterias aisladas y mediante la técnica de difracción de electrones se demostró que las partículas presentes tienen características cristalinas. El análisis químico EDS demostró que las partículas magnéticas de los bacilos están constituidas por sodio, potasio, fósforo, cloro, calcio y hierro.

FIRMA DEL ASESOR: _____

DEDICATORIAS

A Dios

Por permitirme lograr una etapa más en mi vida, gracias por todo lo brindado y por siempre estar conmigo.

A mis padres

Por ser mis pilares, los amo gracias por el apoyo incondicional, papi ya sabes te quiero mucho gracias por todo tu esfuerzo eres el mejor, mami te adoro gracias por el apoyo que siempre me brindas te quiero.

A mis hermanas

Por su amor, motivación y por estar siempre presentes las quiero.

A mi esposo

Por el amor y apoyo brindado gracias por impulsarme siempre T.A

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Suárez Herrera por la asesoría, revisión y apoyo brindado en este proyecto.

A mi comité tutorial Dra. María Elena Cantú, Dra. Elizabeth Alemán, Dr. Alberto Gómez gracias por la revisión y corrección de esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología, Magda, Chema, Allan, Alex, Carlos, Rosy, Julián, Natalie, Pedro, por los ánimos recibidos y por la compañía de todo este tiempo.

A la Dra. Mónica Sánchez por el apoyo con el material del laboratorio muchas gracias.

A la Dra. Raquel Mendoza y Dr. Carlos Luna por el apoyo brindado en el área de microscopía electrónica, gracias por permitirme realizar pruebas en CIQA y CIIDIT muchas gracias.

A los proyectos ciencia básica 84478 y 83468 de CONACYT

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1. INTRODUCCION		1
1.1	Ecología Microbiana	1
1.2	Ecosistema acuático del Valle de Cuatro Ciénegas	7
	1.2.1 Características de Cuatro Ciénegas	8
1.3	Generalidades de la biomineralización	11
1.4	Tipos de Biominerales	13
1.5	Procesos de biomineralización	14
	1.5.1 Biomineralización inducida biológicamente	15
	1.5.2 Biomineralización controlada biológicamente	17
1.6	Microscopía Electrónica	18
	1.6.1 Tipos de rejillas	27
2. ANTECEDENTES		28
2.1	Bacterias presentes en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila	28
2.2	Microorganismos y Biomineralización	29
2.3	Bacterias magnetotácticas y sus partículas magnéticas	31
2.4	Magnetita en depósitos naturales	34

2.5	Magnetita abiótica	36
2.6	Magnetita biótica	37
2.6.1	Magnetita controlada biológicamente	37
2.6.2	Magnetita inducida biológicamente	39
2.7	Justificación	46
3.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL PROYECTO	47
3.1	Hipótesis	47
3.2	Objetivos específicos	47
4.	MATERIALES Y METODOS	48
4.1	Área de estudio	48
4.2	Recolección de las muestras	48
4.3	Caracterización fisicoquímica de las muestras	49
4.4	Enriquecimiento de cultivo microbiano	49
4.5	Inducción de campo magnético a los microorganismos	51
4.6	Concentración y recolección de microorganismos con propiedades magnéticas	51
4.7	Medio de aislamiento	52

4.8	Obtención de cultivos puros de bacterias con propiedades magnéticas	53
4.9	Deposición de cultivos aislados para microscopía electrónica	54
4.10	Análisis mediante microscopía electrónica	55
4.11	Disposición de residuos.	56
5.	RESULTADOS	57
5.1	Caracterización fisicoquímica de las muestras	57
5.2	Enriquecimiento de cultivo microbiano	57
5.3	Inducción del campo magnético	58
5.4	Concentración y recolección de microorganismos con propiedades magnéticas	59
5.5	Aislamiento y obtención de cultivos puros	60
5.6	Microscopía electrónica de Transmisión	61
6.	DISCUSION DE RESULTADOS	66
7.	CONCLUSIONES	69
	REFERENCIAS	71
	ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Ubicación de Cuatro Ciénegas, Coahuila	7
2. Esquema de un Microscopio Electrónico de Transmisión	24
3. Tipos de rejillas para uso en MET	27
4. Imagen por MET de <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	33
5. Imagen observada mediante MET del género <i>Geobacter</i> , donde se observan los cristales extracelulares de magnetita	45
6. Enriquecimiento en medio líquido de las muestras	50
7. Observación mediante microscopía óptica de las muestras enriquecidas	50
8. Aislamiento en medio de cultivo líquido y sólido	53
9. Rejillas de cobre formvar	54
10. Microscopio Electrónico de Transmisión	55
11. Inducción de campo magnético	58
12. Observación de los microorganismos mediante microscopía óptica	59
13. Concentración de las muestras mediante imanes de neodimio	59
14. Aislamiento en medio sólido	60
15. Observación microscópica de bacilos y espirilos Gram (-)	61
16. Bacilo observado mediante MET	62
17. Espirilo observado mediante MET	62
18. Difracción de electrones de partículas extracelulares del bacilo	63
19. Difracción de electrones del espirilo	64
20. Espectro EDS de las partículas extracelulares del bacilo	65

LISTA DE TABLAS

Página

1. Minerales de origen biogénico producidos por diferentes bacterias	12
2. Microorganismos productores de magnetita intracelular	38
3. Microorganismos productores de magnetita extracelular	42

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

pH	Potencial de hidrógeno
km	Kilómetros
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
m	Metros
INE	Instituto Nacional de Ecología
Kv	Kilovoltios
SAED	Selected area electron diffraction (Difracción de electrones de área selecta)
EDS	Energy Dispersive X-ray (Energía de dispersión de rayos X)
mm	Milímetros
µm	Micras
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
MET	Microscopía electrónica de Transmisión
mg	Miligramo
N	Normalidad
l	Litro
g	Gramos
h	Horas
Eh	Potencial redox
ha	Hectáreas
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
pCO ₂	Presión parcial de dióxido de carbono
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
G	Intensidad del campo magnético
et al	et alii ('y otros')

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Ecología Microbiana

Todos los seres vivos interactúan de forma variable con los diversos componentes del ambiente, responden ante ellos, y a su vez influyen de modo diverso sobre el medio. En muchas de estas interacciones se presentan cambios en la morfología y en el contenido químico de los organismos; se producen diversos compuestos químicos por los organismos y su liberación al ambiente afecta sobre el crecimiento, la salud, la conducta y la biología poblacional de plantas, animales y microorganismos, de modo distinto al relacionado con la nutrición, este hecho determina la existencia de interacciones bióticas particulares, y las relaciones químicas entre los organismos.

Para los protistas son particularmente significativas las condiciones químicas del medio y las interacciones químico-biológicas. El agua es el medio a través del cual estos pequeños seres reciben la acción de otros factores y de muy diversos compuestos químicos como los producidos por otros microorganismos, por plantas y animales, o bien sustancias químicas presentes. (Anaya Lang, 2003).

Los microorganismos muestran frecuentemente, más y mejores adaptaciones a los ambientes acuáticos y no tienen la capacidad de vivir fuera de ellos, a menos que estén protegidos de alguna forma especial o que hayan adoptado formas quísticas o latentes. Existen en todas las regiones del planeta, en los sedimentos marinos, en la atmósfera, en las profundidades del océano o la superficie terrestre así como en la superficie de las rocas, en lugares agrestes y poco propicios para la vida (Alexander, 1971; Atlas y Bartha, 1987).

Cada especie crece, se reproduce y sobrevive dentro de un rango definido de condiciones externas que representan sus límites de tolerancia, entre los que se encuentran factores abióticos y bióticos. Los factores más importantes para el desarrollo de los microorganismos son el hábitat, sustrato, pH, temperatura, humedad o agua disponible, presión, potencial de oxidación-reducción (E_h), toxinas e interacciones bióticas.

Las especies microbianas tienen una amplitud ecológica acorde con el ambiente donde residen y límites de tolerancia a diversos factores que en conjunto determinan el nicho ecológico que ocupan en el ecosistema.

Los límites de tolerancia pueden ser distintos para los individuos de una sola especie, esto probablemente está determinado por la variabilidad fenotípica, que tienen gran importancia en la selección natural. (Alexander, 1971; Klug y Reddy, 1984; Atlas y Bartha, 1987).

El sustrato es importante para determinar el tipo de microorganismos que se encuentran presentes en un hábitat. Los sustratos utilizados por los microorganismos en la naturaleza pueden ser toda clase de materiales y compuestos orgánicos producidos por seres vivos, sustancias inorgánicas y compuestos sintéticos. Del sustrato, dependen otros factores fundamentales como los nutrimentos y el pH, por esta razón, para muchos microorganismos constituye la fuente de energía o de minerales y dependiendo de su naturaleza química se encontrarán en él diversidad de microorganismos.

El pH es el resultante y la expresión de fenómenos diversos, este depende entre otras cosas de la temperatura y la presión, pero también de otros factores como el equilibrio de carbonatos y calcio, que afectan paralelamente a los organismos. (Anaya Lang, 2003).

El pH es importante en términos de interacciones partícula-sustrato, ya que la carga de una molécula cambia si hay una variación del pH, y si esto sucede, la molécula se comporta de manera totalmente distinta.

El pH y el potencial de oxido-reducción son importantes para la nutrición de los microorganismos. El pH regula el grado de retención de numerosos nutrientes solubles sobre superficies coloidales, mientras que el potencial de oxido-reducción determina la disponibilidad de diversos nutrimentos.

La temperatura influye sobre la cantidad de gas disuelto en el agua y sobre el grado de crecimiento, reproducción y desplazamiento de los organismos en el agua.

Los microorganismos muestran un amplio rango de tolerancia a la temperatura desde temperaturas menores a 0°C hasta más de 80°C. En relación con este factor, se ha observado que una población puede alterar los límites de tolerancia a la temperatura de una segunda población.

El agua es importante en la ecología microbiana, ya que la composición de la solución acuosa que rodea una célula determina la difusión de iones a través de la membrana, fenómeno del que depende la nutrición de los organismos; esta difusión se ve influida por el pH, la fuerza iónica del medio y la presión osmótica. (Alexander, 1971; Anaya Lang, 2003).

La actividad e influencia fisicoquímica del medio, se concentra en la interfase de la célula y el medio.

La composición iónica influye en las interacciones célula - célula o célula y el medio. Un cambio pequeño en la composición iónica, da como resultado, grandes cambios en las respuestas biológicas. (Klug, Reddy, 1984; Atlas y Bartha, 1987).

Los microorganismos tienen una alta tolerancia a la presión osmótica, algunos son capaces de sobrevivir en soluciones muy concentradas, esta cualidad se presenta más en las bacterias.

El potencial de óxido-reducción es otro factor determinante del crecimiento y del metabolismo del cultivo. El potencial óxido-reducción del medio de cultivo nos indica su capacidad para aceptar o donar electrones, esto es, sus características oxidantes o reductoras. Uno de los factores que intervienen en el potencial óxido-reducción, aunque no el único, es la concentración de oxígeno [O₂].

La composición de la microflora y la microfauna de un ecosistema está regulada por las interacciones de los microorganismos de una comunidad entre sí y de los mismos con el medio no biótico del cual surge un equilibrio dinámico. (Dajoz Roger, 2002).

Las secuencias de las bacterias no cultivables han demostrado que el número de especies procariontes podría exceder al de todas las otras formas de vida en el planeta, lo cual acentúa el hecho de que los microorganismos son claves en la mayoría de los ciclos biogeoquímicos y en la cadena alimenticia y son responsables de la regulación de la temperatura del planeta. (Curtis *et al.* 2002).

Los elementos considerados como más importantes para la vida son seis: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo.

Los tres primeros se encuentran en los seres vivos formando materiales ricos en energía, el nitrógeno y el azufre son constituyentes fundamentales de las proteínas y el fósforo es necesario para la transferencia de energía dentro de la célula.

Estos elementos también los podemos encontrar formando parte del aire, del agua y de los seres vivos, desde el punto de vista biogeoquímico.

Los elementos que se encuentran en los ciclos vitales son arrastrados y captados por animales, plantas, y microorganismos, los cuales los utilizan para cubrir sus necesidades orgánicas.

El equilibrio natural entre las poblaciones depende rigurosamente de la duración de la permanencia y de la concentración óptima de estos elementos en los ecosistemas introducidos por la vía de los ciclos biogeoquímicos. (Seoáñez Calvo, 2000).

1.2 Ecosistema acuático del Valle de Cuatrociénegas, Coahuila.

El ecosistema acuático de Cuatrociénegas, presenta un conjunto de condiciones particulares que lo hacen ser, además de área de interés natural, un espacio idóneo para la investigación ecológica.

Cuatrociénegas se encuentra orientado hacia el este de la región conocida como altiplano septentrional o Desierto Chihuahuense, en la parte central del estado de Coahuila, a 80 km al oeste de la ciudad de Monclova; está localizado entre los macizos montañosos más grandes de México, al este de la Sierra Madre Oriental y al oeste de la Sierra Madre Occidental.



Figura 1. Ubicación de Cuatro Ciénegas, Coahuila

1.2.1 Características de Cuatrociénegas

Una de las características más interesantes de la zona es que el agua presenta contenidos muy bajos en fósforo, lo cual, sumado a la pobreza de nutrientes, genera condiciones de vida extremas; estas condiciones impiden el desarrollo de algas en los manantiales, por lo que es posible que la base de la pirámide alimenticia esté formada por bacterias.

El valle de Cuatro Ciénegas, se decretó como área natural protegida en la categoría de Área de Protección de Flora y Fauna, es considerado el humedal más importante dentro del Desierto Chihuahuense y es uno de los humedales más importantes en México. En este valle subsisten una gran cantidad de especies endémicas.

El Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatro Ciénegas tiene una superficie de cerca de 85 000 ha, y se localiza entre las coordenadas 26° 45' 00" y 27° 00' 00" de latitud Norte; 101° 48' 49" y 102° 17' 53" de longitud Oeste.

Con poca precipitación anual, la gran cantidad de agua subterránea es la causa de la existencia de manantiales en el valle de Cuatro Ciénegas, que a su vez forman arroyos permanentes y áreas inundadas donde se concentra el agua de los manantiales.

Los manantiales se llaman localmente pozas; las áreas inundadas se conocen como lagunas o lagos, algunas de las cuales son lagunas de desecación. Algunos de los manantiales son termales (30-35°C) y su temperatura disminuye corriente abajo, lo cual puede deberse a un enfriamiento del agua a lo largo del curso o bien a que existen diferentes fuentes de abastecimiento de agua.

Las aguas en general son duras, ya que contienen gran cantidad de sales de calcio y magnesio, sulfatos, carbonatos y cloruros.

La dureza de las aguas se incrementa a partir de los manantiales hasta los ríos y las lagunas de desecación donde la salinidad es de nivel de saturación.

Casi todos estos ambientes acuáticos tienen agua con pocos nutrientes y con altas concentraciones de minerales provenientes de las rocas cársticas que existen en la zona, sobre todo iones sulfato y calcio resultado de la evaporación y precipitación de carbonato de calcio y sulfato de calcio (yeso); en menor proporción se han encontrado iones de sodio, magnesio y cloro (Winsborough 1990).

En muchas de las pozas y ríos, tanto de agua salada como de agua dulce, hay estromatolitos (depósitos de carbonatos construidos por comunidades de bacterias) que son poco comunes en el mundo (Winsborough and Seeler 1984, Winsborough 1990).

Los numerosos cuerpos de agua que brotan de manantiales tienen diámetros que van desde menos de un metro hasta más de cien; las profundidades de los mismos van desde 50 cm hasta 18 m; algunas de las pozas están comunicadas entre sí por un complicado sistema de drenaje.

La mayor parte de los manantiales se ubican en las faldas de la Sierra de San Marcos y Pinos, formando alrededor de 200 pozas dentro del Valle de Cuatro Ciénegas.

Como resultado de la exportación del agua fuera del valle y su uso dentro del mismo, se provocaron serios desequilibrios, como son la interconexión artificial de los manantiales, la disminución de las áreas inundadas y cambios en los niveles de agua en muchas de las pozas (INE 2000).(Espinoza Asuar, 2005).

1.3 Generalidades de la biomineralización.

La biomineralización es el proceso mediante el cual los organismos vivos precipitan minerales bajo un estricto control biológico, mediante una extracción selectiva y absorción de iones de un ambiente local, para formar cristales que se incorporan a estructuras funcionales.

Estos procesos dan lugar a materiales de formas y microestructuras con alto grado de organización como las conchas de moluscos, cáscaras de huevos, dientes, huesos, otolitos, cocolitos, cálculos biliares o renales (en situaciones patológicas), etc. (Lowenstam *et al.*, 1989).

Si bien la mayoría de los organismos no forma depósitos minerales, se ha encontrado que algunas proteínas, polímeros u otra clase de compuestos orgánicos podrían ser responsables del proceso de nucleación y crecimiento de cristales. (Mann S, 2001).

La biomineralización ocurre en microorganismos, animales y plantas. Los animales son el grupo capaz de formar un mayor número de biominerales diferentes, seguidos por las bacterias, las plantas vasculares y finalmente los hongos y protozoarios (Simkiss., Wilburg, 1989). En la tabla 1 se muestran algunos minerales en cuya formación se encuentran implicadas bacterias.

Tabla 1. Minerales de origen biogénico producidos por bacterias.

Mineral	Bacteria	Referencia
Calcita	Bacteria marina <i>Azobacter vinelandii</i> <i>Azobacter chroococcum</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Synechococcus sp.</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Morita,1980 Rivadeneira <i>et al.</i> , 1985 Ferrer <i>et al.</i> , 1988 Thompson y Ferris, 1990 Chafetz <i>et al.</i> , 1992 Kropp <i>et al.</i> , 1997 Tourney ,2009
Aragonita	Bacteria marina Bacteria marina Bacteria marina Bacteria marina Bacterias sulfato reductoras	Greenfeld,1963 McCallum, 1970 Krumbein,1974 Buczynski,1991 Wacey <i>et al.</i> , 2007
Dolomita	<i>Pseudomona putida</i> Cepas del genero <i>Desulfovibrio</i> <i>Virgibacillus marismortui</i> y <i>Halomonas meridiana</i>	Rivadeneira <i>et al.</i> , 1986 Vasconcelos <i>et al.</i> , 1995 Sánchez – Román <i>et al.</i> , 2009
Estroncionita	<i>Bacillus sp.</i> <i>Synechococcus sp.</i>	Ramos-Cormenzana, 1975 Schultze-Lam y Beveridge 1994
Estruvita	<i>Myxococcus xanthus</i> <i>Myxococcus coralloides</i> <i>Myxococcus xanthus</i>	Ben omar <i>et al.</i> ,1994 González Muñoz <i>et al.</i> ,1993 González Muñoz <i>et al.</i> ,1996
Siderita	Biofilm bacteriano	Brown <i>et al.</i> , 1994
Apatita e hidroxiapatita	<i>Escherichia coli</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Serratia sp.</i>	Ennever <i>et al.</i> , 1974 Hirscheler <i>et al.</i> , 1990 Medina Ledo <i>et al.</i> , 2008
Bobierrita	<i>Acinetobacter sp.</i>	Rivadeneira <i>et al.</i> , 1987
Fosfato cálcico	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hutchison,1961
Vaterita	<i>Myxococcus xanthus</i>	Rodríguez-Navarro <i>et al.</i> , 2007
Barita	<i>Myxococcus xanthus</i>	González Muñoz <i>et al.</i> ,2003
Magnetita	<i>Shewanella oneidensis</i>	Lovley <i>et al.</i> , 1989 Pérez-González <i>et al.</i> , 2010

Los minerales producidos suelen tener una función muy específica. La más importante es la formación de esqueletos/exoesqueletos, siendo esta función muy evidente en organismos eucariotas unicelulares y en muchos *phyla* de invertebrados. (Mann, 2001).

Los minerales más abundantes en los esqueletos son los carbonatos de calcio, el fosfato de calcio y la sílice. Otras funciones de los biominerales son: 1) la de actuar como almacén de iones que se pueden utilizar posteriormente en momentos de gran demanda fisiológica; 2) formación de dientes, espículas, dispositivos para detectar la gravedad (otolitos, estatolitos), dispositivos de flotación y 3) la de respuesta a taxias (formación de magnetita y greigita por bacterias magnetotácticas que hace que presenten aeromagnetotaxia). (Lowenstam., Weiner, 1989; Frankel *et al.*, 2007)

1.4 Tipos de Biominerales

Los biominerales están constituidos por una fase inorgánica que puede ser de carbonato y oxalato de calcio, sulfato de sílice y óxido de hierro (Mann *et al.*, 1990), y una fase orgánica que puede estar compuesta por proteínas (fosfoproteínas, glicoproteínas), polisacáridos, lípidos y con frecuencia una mezcla de ellos. En cuanto a la estructura se sabe que alrededor de un 80% de los biominerales son cristalinos y un 20% son amorfos.

La mayor parte de los biominerales cuentan con el calcio y el hierro como cationes mayoritarios. De los 20 a 25 elementos esenciales para la vida de los organismos vivos, el carbono, hidrógeno, oxígeno, magnesio, calcio, silicio, fósforo, azufre, manganeso y el hierro, son los constituyentes más comunes de los aproximadamente 60 minerales biológicos diferentes que se conocen. Más de la mitad de los elementos esenciales para la vida se encuentran incorporados en depósitos biominerales. (Mann, 2001).

1.5 Procesos de Biomineralización

A pesar de lo que se conoce acerca de estructuras biominerales y de cómo varían de un organismo a otro, se sabe relativamente poco sobre los mecanismos e interacciones moleculares que gobiernan la producción controlada de estos biominerales tan complejos y de cómo los organismos biológicos controlan exhaustivamente la composición mineralógica del material y seleccionan una u otra estructura polimórfica de un compuesto.

Los procesos de formación de minerales en ambientes biológicos o de biomineralización están regulados por los mismos factores fisicoquímicos (sobresaturación, temperatura, pH, aditivos, etc.) que rigen los procesos de precipitación inorgánica, sin embargo, los seres vivos son capaces de

regular estos procesos así como los factores fisicoquímicos que los controlan mediante mecanismos químicos, genéticos y celulares.

Así, dependiendo de la capacidad de regulación que los organismos ejercen sobre estos procesos se distinguen los siguientes tipos de biomineralización: biomineralización inducida biológicamente (Lowenstam., 1981) y biomineralización controlada biológicamente (Bazylinski., *et al.*, 2003).

1.5.1 Biomineralización inducida biológicamente

La formación de biominerales ocurre como consecuencia de cambios en la sobresaturación del sistema ocasionados por la captación o la excrección de diferentes metabolitos (mecanismo activo) y debido al aporte de núcleos de cristalización tales como superficies celulares, pared celular, membranas orgánicas, restos celulares y de lisis, que favorecen la precipitación (mecanismo pasivo).

La mayoría de los exopolímeros y de las superficies celulares están cargados negativamente, lo que provoca la unión de cationes por interacciones electrostáticas inespecíficas. Esta unión, además de incrementar localmente la sobresaturación del sistema, también ayuda a estabilizar las superficies de las partículas minerales que se están formando. (Lowenstam, 1981).

Gracias a la presencia de estos mecanismos pasivos, la tasa de mineralización puede incrementarse en varios órdenes de magnitud respecto a una situación en la que no estuvieran presentes estas superficies (Beveridge, 1989; Konhauser, 1998; Bazylinski *et al.*, 2007).

Los minerales formados por mineralización inducida, se depositan en el exterior del organismo que los induce. Por tanto, la mineralización ocurre en un ambiente abierto y no en un espacio intracelular delimitado para este propósito y no existe una maquinaria celular o macromolecular especializada con un papel específico en el proceso de biomineralización.

Un mismo organismo en distintas condiciones puede dar lugar a distintos minerales (Lowenstam., Weiner, 1989). Los minerales formados suelen tener un tamaño y morfología indistinguible en comparación con los formados en procesos puramente inorgánicos en condiciones fisicoquímicas similares (Jiménez - López *et al.*, 2010).

Los procesos de mineralización inducida biológicamente están ampliamente extendidos entre los diversos *phyla* del dominio Bacteria, siendo también muy amplio el número de biominerales producidos mediante este proceso en todo tipo de ambientes: óxicos, anóxicos e interfase óxico- anóxica.

Los biominerales mas comunes son los óxidos (fundamentalmente magnetita, goethita, hematita, ferrihidrita y óxidos de manganeso), carbonatos, fosfatos, sulfatos y sulfuros (Konhauser, 2007).

Es especialmente interesante la formación de dolomita y vaterita por microorganismos (Wright., Wacey, 2005., Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007) y el conocimiento sobre la formación de ambos minerales de que aportan estos procesos de biomineralización.

1.5.2 Biomineralización controlada biológicamente.

En la mineralización controlada biológicamente los minerales normalmente se forman sobre (o dentro) de matrices o vesículas orgánicas dentro de la célula. El organismo ejerce un grado de control significativo sobre el proceso de nucleación y crecimiento del mineral y, por lo tanto, sobre la composición, tamaño, aspecto y localización intracelular de las partículas (Bazylinski., *et al.*, 2003).

El mineral que se forma se aísla primero del ambiente exterior por una barrera a través de la cual los iones no pueden difundir libremente (Simkiss, Wilburg 1989). Las bicapas lipídicas, tanto en las membranas celulares como en vesículas localizadas dentro o fuera de las células, son las más utilizadas para delimitar estos espacios.

Otros materiales utilizados para este propósito son las macromoléculas insolubles como proteínas y/o polisacáridos que forman láminas impermeables.

En los microorganismos, el ejemplo mejor caracterizado de este tipo de mineralización es la formación de magnetosomas por bacterias magnetotácticas, que son un grupo de microorganismos que fabrican minerales magnéticos, concretamente magnetita o greigita, que le permite responder al campo magnético terrestre para situarse, dentro de la columna de agua, en el nivel de concentración de oxígeno más adecuada para su crecimiento. (Frankel., *et al*, 1979, 2007).

1.6 Microscopía Electrónica

Se ha identificado una gran cantidad de tipos de minerales con ayuda de los microscopios electrónicos, ya que los minerales a analizar en general son de tamaño nanométrico. Los microscopios electrónicos son muy útiles debido a que nos permiten ver objetos mucho más pequeños y texturas más finas que los microscopios ópticos debido a que tienen mayor poder de resolución. El poder de resolución es una característica numérica o parámetro de un sistema óptico (de luz o de electrones) que definen su capacidad de dar imágenes de detalles muy pequeños del objeto.

La microscopía electrónica de transmisión da imágenes por medio de electrones que atraviesan la muestra como lo hace la luz en el microscopio óptico.

Existen varios tipos de microscopía electrónica dentro de los cuales se encuentran la microscopía electrónica de transmisión, y la microscopía electrónica de barrido.

El microscopio electrónico de transmisión (MET) es un instrumento que utiliza un haz de electrones acelerados para irradiar una muestra delgada por una de sus caras, dándonos una imagen formada por los electrones que emergen por la cara contraria.

Las principales partes que constituyen el microscopio electrónico de transmisión son: a) la óptica electrónica, generalmente llamada “columna” por ser habitualmente cilíndrica y vertical; b) el sistema de vacío que mantiene una presión muy baja en el interior de la columna; c) sistemas de enfriamiento; d) corrientes de alimentación y sus controles y e) dispositivos de registro de imágenes.

La columna está formada de arriba a abajo por el dispositivo productor de electrones o cañón electrónico, que tiene la función equivalente al iluminador de los microscopios de luz, seguido por una o más lentes condensadoras (generalmente dos) que concentran el haz electrónico sobre el objeto de estudio. (Yacamán., *et al*, 1995).

Debajo de estas lentes se encuentra la cámara del objetivo provista de esclusas que permiten introducir y retirar los especímenes sin alterar el vacío de la columna. Dentro de esta cámara se encuentra una platina a la que queda unido el objetivo, la cual puede ser movida mecánicamente por el operador, permitiéndole observar diversas zonas de un espécimen plano hasta de dos milímetros de diámetro.

Por debajo de esta cámara se encuentran otras lentes electromagnéticas, que permiten la observación del objeto. La primera es el objetivo, la lente más perfeccionada, tanto por la precisión y acabado de sus piezas, como por la estabilización de la corriente de alimentación, pues como en el microscopio óptico, es la que da la primera imagen de la preparación.

La segunda lente de observación es la lente intermediaria o primera proyectora, que agranda un trozo de la imagen del objeto creada por el objetivo. La tercera etapa de aumento la realiza la lente proyectora, la que tomando una parte de la segunda imagen la proyecta aumentada sobre la pantalla fluorescente, en la que la imagen electrónica final se hace visible al ojo humano.

El MET se asemeja al microscopio óptico de campo claro en su concepción, y sus principales diferencias derivan del uso de una radiación diferente a la luz, el haz electrónico, que obliga al empleo de lentes electromagnéticas para formar la imagen.

El cañón electrónico está compuesto por un cátodo -- electrodo negativo-- formado por un filamento de tungsteno en forma de V , un cilindro hueco -- cilindro de control o cilindro de Wehnelt -- y un ánodo - electrodo positivo -- a potencial cero. Las lentes electromagnéticas se emplean tanto en el sistema de iluminación como en el de observación de los microscopios electrónicos actuales. El vacío de la columna de óptica electrónica y de los dispositivos fotográficos es producido en dos etapas, por dos tipos de bombas. El vacío inicial o prevacío es generado por bombas mecánicas rotatorias, que realizan la evacuación del aire desde la presión ambiente hasta 10^{-1} milibarios. Esta primera etapa permite a las bombas de alto vacío comenzar su función. El vacío de un MET se debe rehacer cada vez que se apaga el aparato, para lo que cuenta con compuertas de vacío que se abren y cierran comunicando o aislando diferentes partes del microscopio.

Estas compuertas permiten meter y sacar muestras, y cambiar el material sin alterar el alto vacío de la columna. Otra parte importante del MET es el sistema de enfriamiento, es importante señalar que las bombas difusoras, así como muchas de las lentes electrónicas, necesitan un dispositivo de refrigeración para disipar el calor. Este dispositivo esta constituido por agua que circula en serpentines metálicos en relación con el embobinado de cables de las lentes electrónicas y por fuera de la pared cilíndrica del cuerpo de la bomba difusora.

Las principales necesidades de alimentación del MET son las del cañón generador del haz de electrones acelerados y las de las lentes.

El cañón requiere el voltaje negativo de aceleración y la corriente de calefacción del filamento. El primero es una corriente de muy baja intensidad y de voltaje muy alto y cuidadosamente regulado; los voltajes de aceleración son comúnmente entre 40 y 125 mil voltios y las intensidades corresponden a la cantidad de electrones del haz por unidad de tiempo.

El voltaje de aceleración debe ser muy estable, pues la longitud de onda del haz de electrones depende de su velocidad.

El usuario puede controlar tres parámetros del cañón: 1) el voltaje de aceleración, con opciones repartidas generalmente cada 20Kv (40, 60, 80,100, 120 Kv); 2) la intensidad del haz, y 3) la corriente de calefacción del filamento.

- 1) La capacidad de variar el voltaje de aceleración permite al usuario adaptar la penetración de los electrones del haz en el material biológico, a la vez que cambia la longitud de onda del mismo. A voltajes elevados las longitudes de onda son mas cortas, lo que mejora la resolución. Por otra parte la cantidad de interacciones de los electrones del haz con la muestra es menor, por lo que disminuye el contraste.

- 2) La intensidad debe mantenerse al mínimo compatible con una imagen suficientemente brillante para ser observada con facilidad. Cuanto menor sea la intensidad del haz, menor será el daño causado a la preparación biológica durante su observación.
- 3) La calefacción del filamento debe ser la mínima saturante. La saturación es un fenómeno que se produce cuando la cantidad de electrones emitidos por el filamento, por efecto termoiónico, iguala la cantidad de electrones que forman parte del haz.

La visualización y registro de la imagen puede realizarse por medios electrónicos, como una cámara de televisión situada en la columna de óptica electrónica cerca de la pantalla donde se ve la imagen final. Esta cámara está provista de un sistema óptico enfocado sobre una pequeña pantalla que transduce la imagen electrónica en imagen luminosa. (Yacamán., *et al*, 1995). (Vázquez Nin., *et. al* 2000).

La microscopía electrónica de transmisión se divide en dos tipos, el contraste de difracción y contraste de fase.

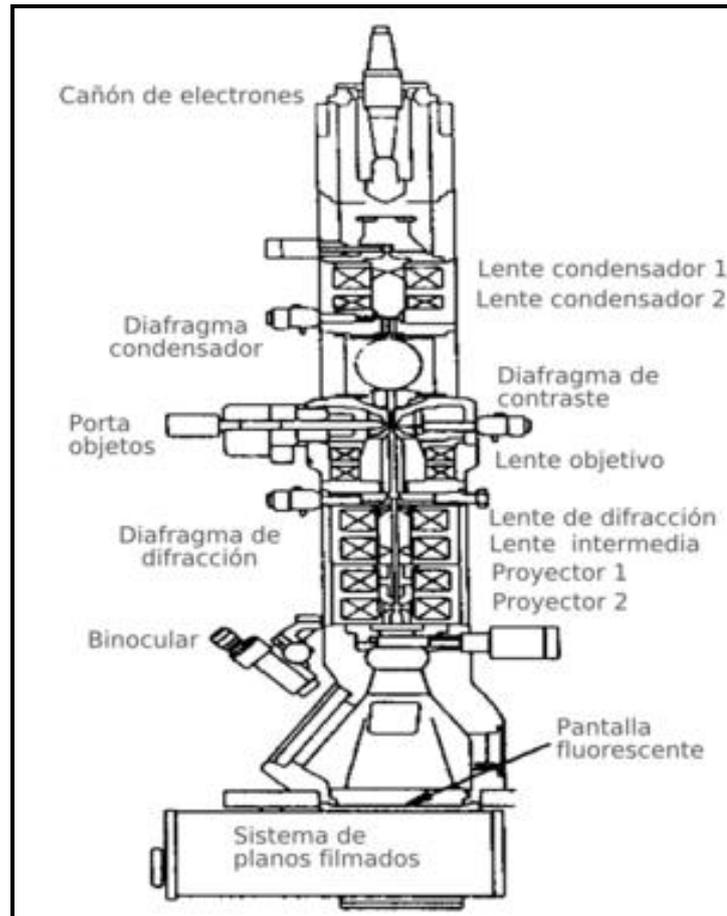


Figura 2. Esquema de un Microscopio Electrónico de Transmisión

Por contraste de difracción es posible obtener imágenes denominadas de campo brillante y campo oscuro. En el campo brillante el haz transmitido, que no ha sufrido dispersión, contribuye a la formación de la imagen. Para el caso del campo oscuro solo algunos electrones dispersados se incluyen en la imagen.

Al hacer coincidir el plano focal de la lente objetivo sobre la pantalla se obtiene un diagrama de difracción.

Para obtener diagramas de difracción de zonas locales de la muestra, se utiliza una apertura en el microscopio, la cual contiene únicamente la zona de la que se obtendrá el diagrama. Estos diagramas se denominan diagramas de difracción de área seleccionada.

La difracción de electrones (SAED) es hasta la fecha una de las técnicas más poderosas para el estudio de la estructura cristalina en la materia condensada. A través de la difracción de electrones es posible determinar diferentes estructuras cristalográficas, estudiar defectos o bien diferenciar dos o más materiales que conforman una matriz.

Dentro de la dispersión de energía de rayos X (EDS), la energía dispersiva de rayos X se utiliza para identificar los elementos químicos en los materiales. Los rayos X detectados provienen de los saltos electrónicos en los diferentes niveles de energía de cada elemento. Los espectros obtenidos son singulares para cada elemento.

Los microscopios electrónicos, como el microscopio electrónico de barrido y microscopio electrónico de transmisión son equipos usados para análisis de materiales a una escala más pequeña que la posible por microscopios ópticos. Los microscopios electrónicos usan las interacciones que los electrones hacen con la muestra, para producir imágenes y patrones de difracción que se utilizan para analizar el material a una escala atómica.

Una de las limitaciones del MET es la preparación de muestras. Las muestras de MET tienen que ser transparentes a los electrones para transmitir suficientes electrones y poder formarse una imagen de fácil interpretación.

En MET, el haz de electrones pasa por la muestra y produce una imagen de la muestra a través del haz transmitido. El equipo recoge los rayos-X característicos de la muestra para permitir hacer un análisis de la composición química de la muestra.

En microscopía electrónica se trabaja siempre en el vacío. Esto se debe a que como se opera con electrones que viajan con una trayectoria desde la fuente hasta su destino es imprescindible que esta trayectoria no sea desviada por la presencia de átomos o moléculas que no sean las de la muestra a analizar. Por eso la columna debe estar lo más libre posible de moléculas de gas, esto se consigue con potentes bombas de vacío.

Las presiones a las que se trabaja oscilan entre los 10^{-7} y 10^{-10} bares, es decir que, se reduce la presión por debajo de una millonésima parte de la presión atmosférica.

La interacción de los electrones incidentes con la muestra produce una serie de radiaciones secundarias: electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones transmitidos, radiación X, electrones Auger, catodoluminiscencia y energía absorbida (por la muestra). La utilización de una u otra nos permite obtener distintas informaciones sobre la muestra. (Vázquez Nin., et. al 2000).

1.6.1 Tipos de rejillas

El portamuestra, para el MET, es una pequeña rejilla muy delgada de cobre en forma de disco. Las rejillas se construyen de diferentes materiales, las más comunes son de cobre, níquel o carbón, el diámetro estándar de todas es de 3 mm. Se suelen guardar o transportar en placas o cajas especiales (porta rejillas). Las rejillas deben manipularse con mucho cuidado antes, durante y después que se ha colocado la muestra.

Deben protegerse durante su manipulación de daños tales como dobleces o pliegues. Cualquier daño puede afectar la calidad de las mismas y la imagen que se logre ya que las muestras serán tan planas como lo sean las rejillas a las que están unidos.

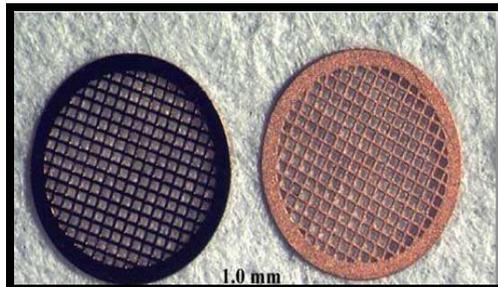


Figura 3. Tipos de rejillas para uso en MET

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Bacterias presentes en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

En Cuatro Ciénegas, Coahuila, se encuentra una amplia diversidad de organismos de los dominios Bacteria y Archaea. Algunas de las bacterias que se han encontrado son similares a microorganismos cosmopolitas que están en ambientes salinos del mundo, como *Bacillus*, capaces de formar esporas y transportarse con el polvo. Recientemente investigadores del CINVESTAV unidad Irapuato, secuenciaron el material genético de un bacilo encontrado en este hábitat y lo denominaron *Bacillus coahuilensis*, dicha secuenciación demostró que este microorganismo es de origen marino. Además se han detectado numerosos géneros de Bacteria y Archaea que también se consideran fundamentalmente marinos.

Como ejemplo de estos microorganismos está el género *Rheinheimera*, que es una bacteria marina de los mares del norte de Europa, bacterias similares a simbiontes de moluscos marinos del género *Teredinibactertunerae*, así como otras cercanas a *Rhodobacter* marinas que forman parte del picoplancton.

En las cuevas de Cuatro Ciénegas se encontraron bacterias oxidantes del azufre, muy similares a algunas descritas como endosimbiontes de gusanos exclusivos de las ventilas hidrotermales del Atlántico, bacterias típicas de glaciales y arqueas sólo reportadas en sedimentos marinos. También se han encontrado representantes de los géneros *Magnetospirillum* y *Aquaspirillum*, que son típicamente marinos. (Souza Saldivar, 2004).

2.2 Microorganismos y Biomineralización

En la naturaleza los seres vivos se encuentran por todas partes y es prácticamente imposible encontrar un lugar en la tierra, por inhóspito que este sea, que no esté colonizado por bacterias. La actividad de los seres vivos, en particular la de los microorganismos tiene la capacidad de modificar, asistir o inhibir los fenómenos puramente inorgánicos de disolución, cristalización y adsorción, que tienen lugar sobre superficies de los minerales. La capacidad de los microorganismos de formar polisacáridos extracelulares en los que se depositan compuestos es conocida desde hace mucho tiempo.

Los microorganismos son el segundo grupo en importancia con respecto a la formación de minerales, y pueden producir una gran variedad de minerales por los procesos de mineralización controlada biológicamente y mineralización inducida biológicamente. (Simkiss., *et al*, 1989).

Los microorganismos, en particular las bacterias, habitan en todos los ambientes posibles de la biosfera y desempeñan un papel importante en procesos geológicos tales como la precipitación y disolución mineral, e influyen notablemente sobre los ciclos biogeoquímicos de diferentes elementos. La confirmación de que la precipitación de calcita o carbonatogénesis por influencia bacteriana, es un fenómeno habitual en ambientes marinos y suelos, dio un gran auge a la geomicrobiología.

La geomicrobiología es la ciencia que estudia el papel desempeñado por los microorganismos en los procesos geológicos, tanto los que han ocurrido en el pasado como los que están sucediendo en el presente. Ejemplo de estos procesos son el efecto de los microorganismos sobre los ciclos de muchos elementos y la precipitación de compuestos minerales. (Baskar., *et al*, 2009)

La formación de carbonatos es un proceso muy común entre las bacterias, existiendo numerosos ejemplos de bacterias carbonatogénicas en los distintos phyla. Como las bacterias de los géneros: *Pseudomonas* (Baskar *et al.*, 2006), *Bacillus* (Castainer *et al.*, 2000), *Vibrio* (Rivadeneira *et al.*, 1993) y *Streotomyces* (Canaveras *et al.*, 1999), bacterias sulfatoreductoras y

cianobacteras (Wright 1999), *Myxobacteria* (González-Muñoz *et al.*, 1996) y *Halobacillus* (Rivadeneira *et al.*, 2004).

Con relación a la formación de fosfatos, también hay una gran cantidad de microorganismos capaces de inducir la formación de apatita como son *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* y *Bacterionema matruchotti* (Rizzo *et al.*, 1962) y estruvita como *Staphylococcus aureus* (Beavon, Heatley, 1962), *Bacillus pumilus* (Nelson *et al.*, 1991), *Pseudomonas calciprecipitans* (Shinano, Sakai, 1975) y *Myxococcus xanthus* (González-Muñoz *et al.*, 1996).

2.3 Bacterias magnetotácticas y sus partículas magnéticas

Los cristales magnéticos sintetizados por las bacterias magnetotácticas presentan propiedades muy particulares y deseadas en los campos científico e industrial, tales como tamaño nanométrico, estructura cristalina organizada y pureza.

Las aplicaciones de minerales con magnetismo, brindan un aporte significativo a la ciencia y la tecnología como medio ideal de almacenamiento de datos en cintas, discos y burbujas magnéticas; las partículas magnéticas han incursionado en áreas muy diversas desde la medicina para la inmovilización de sustancias bioactivas, elaboración de biosensores, transportadores de fármacos antitumorales, y como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear. (Matsunaga, 1991).

Se ha reportado la biomineralización de materiales ferromagnéticos, principalmente magnetita, en una gama extremadamente diversa de organismos, como algas (Torres de Araujo *et al.*, 1986), insectos (Maher 1998), moluscos (Lowenstam 1981), peces (Mann *et al.*, 1988), aves (Perry *et al.*, 1985) y en humanos (Kirschvink *et al.*, 1992).

La magnetita bacteriana tiene múltiples aplicaciones biotecnológicas, en campos tan diversos como nuevos materiales para ingeniería, biomedicina y fabricación de microchips moleculares (Mann *et al.*, 1990, Matsunaga, 1991, Schwartz y Blakemore, 1985).

En todas las bacterias magnetotáticas productoras de magnetita que se han estudiado a la fecha, la fase mineral del magnetosoma aparece envuelto por una membrana. En cepas de *Magnetospirillum* se encontró que esta membrana está formada por una bicapa de fosfolípidos y proteínas (Gorby *et al.*, 1988, Matsunaga, 1991, Schüller *et al.*, 1997).

Las partículas magnéticas que se fabrican sintéticamente no son uniformes y por lo general no son completamente cristalinas, su composición es heterogénea y forman aglomerados, lo cual conlleva a problemas en el procesamiento; contrario a la síntesis realizada mediante procesos biológicos, en la que se puede controlar el crecimiento y las propiedades morfológicas.

Además, la biomineralización lleva a la producción de cristales de magnetita altamente uniformes sin los drásticos regimenes de temperatura, pH y presión que por lo general se utilizan para su producción industrial (Sarikaya, 1994., Mann *et al.*, 1990).

Las partículas de magnetosomas aisladas de tamaño pequeño confieren una relación superficie-volumen grande, lo cual las convierte en útiles acarreadores para la inmovilización de cantidades relativamente grandes de sustancias bioactivas, las cuales pueden separarse por campos magnéticos (Matsunaga *et al.*, 1987). En la Figura 4 se observa la cadena de magnetosomas alineados dentro de la bacteria, lo que le confiere capacidad de migración.



(Matsunaga, et al., 1991)

Figura 4. Imagen por MET de *Magnetospirillum magnetotacticum* donde se aprecia dentro la cadena lineal de magnetosomas.

2.4 Magnetita en depósitos naturales

La magnetita (Fe_3O_4) es un óxido ferroso, diferente del resto de los óxidos de hierro porque contiene hierro di y trivalente. Es un mineral común en las rocas terrestres que puede tener origen biótico (bien por una mineralización inducida o controlada biológicamente) o inorgánico.

La magnetita está presente en la tierra en rocas ígneas, metamórficas y sedimentarias. Se han encontrado cristales nanométricos de magnetita con variedad de formas, distribución de tamaño y composición química en numerosos ambientes antiguos y modernos (Thomas-Keprta *et al.*, 2000).

El origen de muchas de las magnetitas terrestres es desconocido y actualmente existe una gran controversia sobre como distinguir las magnetitas de origen biogénico de las producidas de forma inorgánica cuando aparecen en sedimentos. Mientras que las magnetitas formadas a altas temperaturas tienen claramente un origen inorgánico, las formadas en ambientes a bajas temperaturas como los estromatolitos precámbricos y formaciones de hierro pueden tener un origen inorgánico o biogénico.

La magnetita también se ha encontrado en partículas de meteoritos, en este contexto hay un notable interés centrado en un subconjunto de magnetitas con propiedades químicas y físicas inusuales que están íntimamente asociadas con los discos de carbonatos del meteorito ALH84001. (McKay *et al.*, 1996).

Se ha producido un gran debate sobre el origen de estas magnetitas desde que McKay y colaboradores en 1996 las propusieran como prueba de la existencia de vida primigenia en Marte, por su semejanza con las magnetitas producidas en la tierra por las bacterias magnetotácticas.

La magnetita es ferri magnética a temperatura ambiente, es decir, el alineamiento de los espines electrónicos es anti paralelo, lo que hace que el momento magnético de los espines sea diferente y cree un momento magnético neto, por lo que se ve fuertemente atraída por los campos magnéticos.

Cualquier sustitución catiónica, además del tamaño de partícula, hace variar la coercitividad, es decir, la fuerza magnética de la magnetita. Mientras que las partículas entre 35 – 120 nm son de dominio único magnético (es decir cada partícula se comporta como imán), las partículas inferiores a 35 nm son superparamagnéticas a temperatura ambiente (no tienen un magnetismo permanente a temperatura ambiente).

Las partículas que superan los 120 nm presentan un magnetismo más débil ya que al presentarse varios dominios magnéticos en una misma partícula se anulan unos a otros. (Mann, 2001).

2.5. Magnetita abiótica

La magnetita abiótica puede precipitarse como fase primaria o como fase secundaria. Como fase primaria, la magnetita se puede formar por precipitación homogénea o heterogénea a partir de una solución. Como fase secundaria, la magnetita se forma gracias a la descomposición térmica de carbonatos que contienen hierro y por la transformación de ferrihidrita o de una fase mineral conocida como “green rust” (herrumbre verde).

Los métodos más desarrollados para la síntesis de magnetita abiótica son aquellos en los que se precipita este mineral como fase primaria a partir de una solución, ya que se pueden obtener grandes cantidades del mineral.

En general, la síntesis inorgánica de magnetita requiere condiciones reductoras, valores altos de pH y baja presión parcial de CO₂ en el sistema. Como fase secundaria, la magnetita puede obtenerse mediante la transformación de fases minerales tanto a altas temperaturas como a bajas temperaturas. (Garrels, 1990).

2.6 Magnetita biótica

La magnetita puede ser formada por microorganismos, bien a través de una mineralización inducida biológicamente o de una mineralización controlada biológicamente.

2.6.1. Magnetita controlada biológicamente

La magnetita intracelular es producida por las bacterias magnetotácticas en un proceso de mineralización controlado biológicamente. Estas bacterias forman un grupo heterogéneo de procariontas, que presentan la peculiaridad de alinearse en forma pasiva y desplazarse activamente a lo largo de las líneas del campo magnético terrestre (Blakemore, 1985). Es un grupo morfológica, metabólica y filogenéticamente diverso.

Las bacterias magnetotácticas se encuentran comúnmente en columnas de agua o sedimentos con estratificación química vertical. En los sistemas de agua dulce, donde la concentración de sulfato es muy baja o cero, la interfase óxica-anóxica esta generalmente ubicada en la región agua-sedimento o varios milímetros por debajo de ella; la situación en muchos lugares de aguas profundas es similar. En la tabla 2 se muestran algunos microorganismos productores de magnetita intracelular así como sus tipos de magnetosomas formados.

Tabla 2. Microorganismos productores de magnetita intracelular

Cepa	Hábitat	Morfología	Forma de magnetosoma	Autor
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	Agua dulce	Espirilo	Cristales cubo-octahédricos de magnetita	Blakemore <i>et al.</i> , 1979 Scheleifer <i>et al.</i> , 1991
<i>Magnetotactic Marine Vibrio</i> MV-1	Agua Salada	Vibrio	Cristales hexahédricos de magnetita	Bazylinski, 1990
<i>Magnetospirillum</i> sp. AMB-1	Agua dulce	Espirilo	Cristales cubo-octahédricos de magnetita	Matsunaga <i>et al.</i> , 1991
<i>M. gryphyswaldense</i> MSR-1	Agua dulce	Espirilo	Cristales cubo-octahédricos de magnetita	Schüler <i>et al.</i> , 1992 Scheleifer <i>et al.</i> , 1991
<i>Desulfovibrio magneticus</i> RS-1	Agua dulce	Vibrio	Partículas de magnetita en forma de punta	Sakaguchi <i>et al.</i> , 2002
<i>Magnetospirillum</i> sp. WM-1	Agua dulce	Helicoidal	Cristales cuboidales	Wenbing <i>et al.</i> , 2007

Las bacterias magnetotácticas como se menciona anteriormente tienen una amplia perspectiva en aplicaciones biotecnológicas, aunque en la actualidad no se han explotado a escala comercial, principalmente debido a problemas relacionados con el cultivo masivo de estas bacterias. (Bazylinsky, 1995; Stolz, 1993).

El aislamiento y cultivo axénico de las bacterias magnetotácticas ha demostrado ser muy difícil. El desarrollo de estrategias generales de aislamiento es aún más difícil por el hecho de que la fisiología y las necesidades nutricionales son diferentes y en muchos casos aun son desconocidas. Al parecer, la fisiología de las especies que se han descrito esta determinada por su ecología local. Se conoce que las cepas productoras de Fe_3O_4 son microaerofílicas y que fijan nitrógeno atmosférico, mediante una enzima nitrogenasa sensible al oxígeno. (Bazylinsky, 2006).

2.6.2. Magnetita inducida biológicamente

En la última década se ha producido un creciente interés tanto en la transformación como en la precipitación de minerales de hierro. Esto es debido a que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y también se piensa que el Fe^{3+} fue el primer aceptor de electrones externo relevante en la respiración microbiana (de Duve, 1995).

Además *Nealson y Myers* en 1990, sugirieron que la reducción bacteriana de hierro pudo haber jugado un papel importante en la génesis de las formaciones bandeadas de hierro del precámbrico. La reducción bacteriana del Fe^{3+} la llevan a acabo principalmente (aunque no de manera exclusiva) las bacterias reductoras desasimiladoras del hierro.

La reducción desasimiladora del hierro es el proceso por el cual el microorganismo reduce Fe^{3+} con un propósito diferente a la asimilación de este catión, se obtenga o no energía a partir de este proceso.

Las bacteria reductoras del hierro están muy extendidas en el dominio *Bacteria* y se han encontrado en diferentes ambientes, como hábitats acuáticos marinos y de agua dulce (Lovley *et al.*, 1990) incluyendo lagos básicos (Zavarzina *et al.*, 2006), manantiales termales, sedimentos de lagos con residuos de minería y aguas residuales (Ye *et al.*, 2004).

Las bacterias reductoras de hierro intervienen en los ciclos geoquímicos globales de elementos como el carbono, el oxígeno, el azufre y el hierro. Muchos de estos microorganismos reducen Fe^{3+} como efecto secundario de su metabolismo, pero no obtienen energía para su crecimiento a partir de esta transferencia de electrones (Lovley, 1991).

Entre estos microorganismos se han estudiado *Bacillus polymyxa*, *Clostridium butyricum* y *Cl. pasteurianum* (Ottow & Glathe, 1971). Una vez que se descubrió que los microorganismos que utilizan el Fe^{3+} como aceptor final de electrones de la respiración (por lo tanto obteniendo energía en este proceso) son los principales responsables en la mayoría de la reducción de Fe^{3+} en suelos y sedimentos, se profundizó en el estudio de estos microorganismos, presentes en los dominios *Bacteria* y *Archaea*.

Dentro del dominio Bacteria se encuentran microorganismos desasimiladores reductores de hierro en los diferentes *phyla* de Proteobacteria, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Thermodesulfobacteriales*, *Thermotogales* y *Deinococcus-Thermus*. En el dominio Archaea aparecen tanto en *Euryarchaeota*, *Thermococcales* y *Methanopyrales*, como en *Crenoarcheota*, *Desulfurococcales*, *Methanococcales* y *Thermoproteales*. Los géneros más estudiados son *Shewanella*, *Geobacter* y *Geothrix*.

Las bacterias reductoras desasimiladoras del hierro utilizan en su mayoría oxohidróxidos de Fe^{3+} amorfos como aceptores de electrones, siendo los más usados por las células goethita, hematita, ferrihidrita y nanogoethita. Algunas de estas bacterias también son capaces de utilizar y reducir el Fe^{3+} presente en filosilicatos por ejemplo montmorillonita e illita. En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de las bacterias productoras de magnetita extracelular.

Tabla 3. Microorganismos productores de magnetita extracelular.

Bacteria	Mineral	Referencia
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Capacidad de formación de agregados finos de magnetita formados como subproducto.	Lovley et al.1987
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Producción de magnetita extracelular	Lovley et al. 1989
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Producción de magnetita extracelular	Caccavo Jr et al.1992
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	Producción de magnetita extracelular junto con siderita	Nealson., Safarini 1994
<i>Geothrix fermentans</i>	Producción de magnetita extracelular	Coates et al.1999

En condiciones anóxicas estas bacterias usan el Fe^{3+} (previa disolución del mineral que contiene Fe^{3+}) como aceptor de electrones en el proceso de respiración, transformándolo en Fe^{2+} , que se excreta al medio de cultivo, ya que la bacteria no lo usa en los procesos de biosíntesis.

Tanto el Fe^{2+} como el Fe^{3+} se concentran en las zonas cargadas negativamente de la pared celular bacteriana, haciendo que el sistema se sobresature localmente con respecto a la magnetita lo que provoca la precipitación de esta fase mineral.

Para que se produzca la formación de magnetita hace falta la conjunción de los mecanismos activos y pasivos de precipitación, es decir, células metabólicamente activas que aporten superficies (paredes celulares, membranas, y/o productos de lisis). Además de valores altos de pH y una concentración elevada de Fe^{2+} y Fe^{3+} en las superficies aportadas por las bacterias.

Aunque el mecanismo de precipitación no se conoce en su totalidad, sí se sabe que la mineralogía, morfología, composición y tamaño de las magnetitas inducidas por bacterias depende en gran medida de varios factores como las condiciones ambientales en las que ocurre la precipitación (pH, pCO_2 , pO_2 , Eh y temperatura), la composición del medio de cultivo, la concentración y las formas químicas de los aceptores y donadores de electrones y los iones absorbidos.

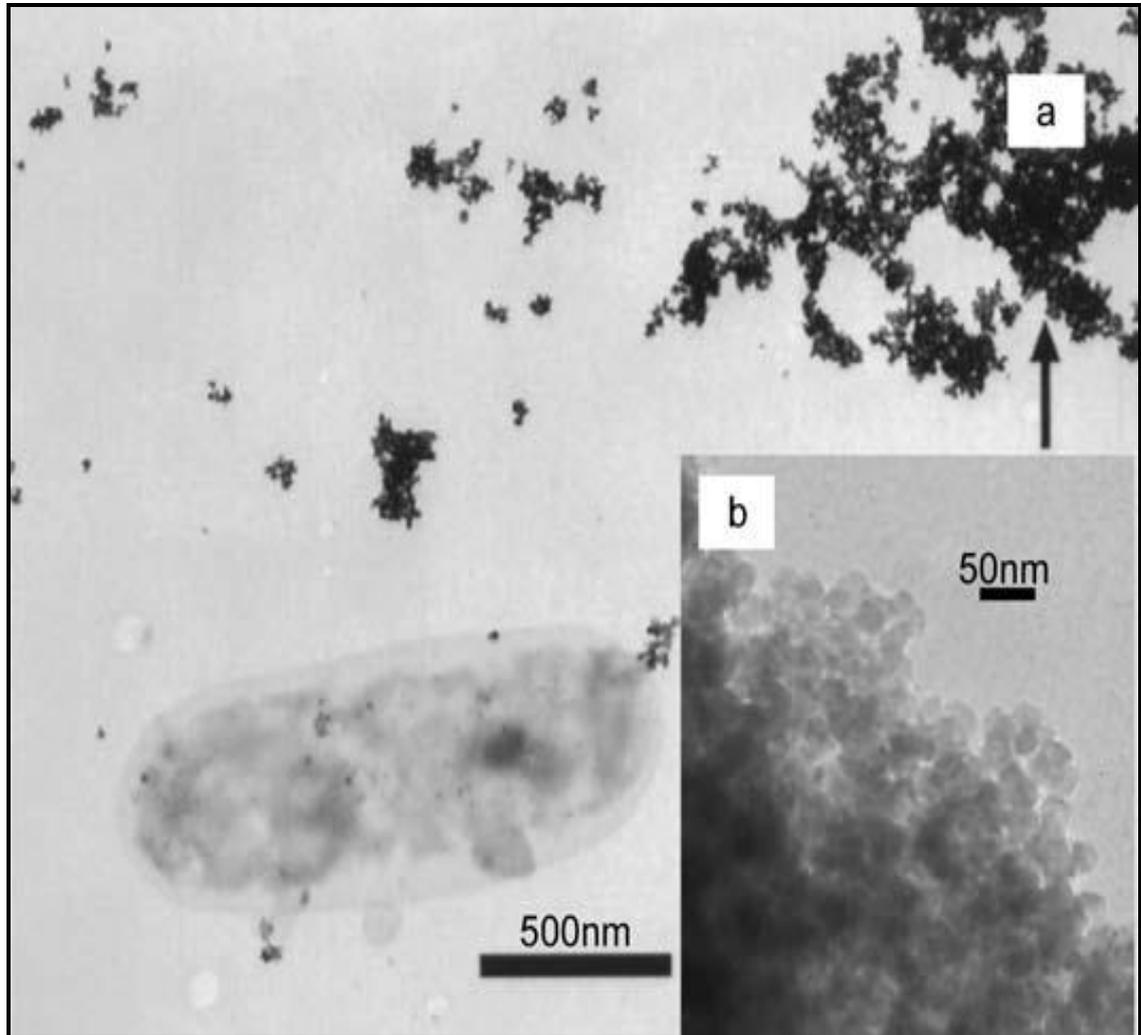
La morfología y el tamaño de los cristales de magnetita producidos por bacterias reductoras desasimiladoras del hierro han sido caracterizados hasta cierto punto y se han descrito cristales globulares, euhédricos o irregulares. (Zachara *et al.*, 2002).

El tamaño de las magnetitas en estos estudios puede variar desde menos de 35 nm en el rango de partículas superparamagnéticas, hasta tamaños entre 35-120 nm, en el que cada cristal individual tiene un momento de dipolo magnético permanente a temperatura ambiente.

Estos biominerales están caracterizados, en general, por una baja cristalinidad, amplias distribuciones de tamaño de partícula, ausencias de morfologías cristalinas específicas, poca especificidad mineral (minerales mezclados) y/o la presencia de impurezas en la red mineral (Frankel *et al.*, 2007).

Todo lo mencionado anteriormente explica por que la magnetita inducida biológicamente no se utiliza como biomarcador en la actualidad. Sin embargo existen algunas excepciones, por ejemplo *Geobacter metalliredunces* que son capaces de inducir la formación de una forma única de magnetita tubular, con un aspecto cristalino y propiedades magnéticas bien definidas.

En la figura 5 se pueden observar los cristales nanométricos de magnetita producida extracelularmente por bacterias del género *Geobacter*.



(Lloyd et al.2000)

Figura 5. a) Imagen observada mediante MET del género *Geobacter* donde se observan las nanopartículas extracelulares de magnetita escala 500 nm., b) nanopartículas de magnetita escala 50 nm.

2.7 Justificación

El desarrollo de nuevos materiales y su aplicación a tecnologías modernas es un dinamismo que mueve a la sociedad industrial; sin embargo, para los países en vías de desarrollo, el desafío consiste en utilizar de forma óptima los recursos con los que cuentan, para no quedarse a la zaga de los avances científicos y tecnológicos.

Debido a que en la naturaleza están presentes gran cantidad de microorganismos aún no identificados, de los cuales las bacterias con características magnéticas son un grupo importante, en este trabajo de investigación se evaluará una serie de factores fisicoquímicos y condiciones de cultivo que permitan el aislamiento y caracterización de bacterias con propiedades magnéticas.

CAPITULO 3

HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL PROYECTO

3.1 HIPOTESIS

Sobre la base de los elementos expuestos anteriormente se estableció la siguiente hipótesis:

- Es posible el aislamiento y caracterización de bacterias sintetizadoras de partículas magnéticas presentes en cuerpos de agua y sedimentos.

3.2 OBJETIVOS

Para el desarrollo de este trabajo se definieron los siguientes objetivos específicos.

- Aislamiento de microorganismos sintetizadores de partículas magnéticas a partir de muestras de agua y sedimento mediante técnicas de enriquecimiento.
- Obtención de cultivos puros.
- Caracterización bioquímica de los cultivos puros.
- Caracterización de partículas magnéticas mediante microscopía electrónica.

CAPITULO 4

MATERIALES Y METODOS

4.1 Área de estudio

Para el aislamiento de bacterias con propiedades magnéticas se seleccionaron muestras de agua y sedimento de un estero del estado de Veracruz así como dos muestras de agua y sedimento de la zona de Cuatrociénegas, Coahuila; la primera muestra se tomó en la zona de la Poza Azul localizada a 8 Km de Cuatrociénegas, Coahuila y la segunda muestra se tomó en la zona de Las Playitas localizada a 15 Km de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

4.2 Recolección de las muestras.

La recolección de muestras se realizó de la interfase agua - sedimento de cada sitio de muestreo, a profundidades de entre 30 a 45 cm, y las muestras se colocaron en frascos de vidrio con tapón de rosca estériles de 600 ml.

4.3 Caracterización fisicoquímica de las muestras.

Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio, donde se incubaron por 4 semanas a temperatura ambiente con la tapa del recipiente entre abierta y luz tenue, para suprimir organismos fotótrofos y permitir aireación y formación de una zona óxico anóxica. Se les determinaron los parámetros fisicoquímicos de temperatura y pH, empleando un potenciómetro marca Thermo Scientific. Las muestras se sometieron a análisis por espectroscopía de absorción atómica para la determinación cualitativa de los elementos presentes.

4.4 Enriquecimiento del cultivo microbiano.

Las muestras se enriquecieron en frascos de vidrio con medio líquido de enriquecimiento el cual contenía 1.0 g de ácido succínico, 0.1 g de NaNO_3 , 0.2 g de acetato de sodio, 0.05 g de tioglicolato de sodio, 2.0 ml de solución (0.01 M) de quinato férrico y 5 ml de solución de minerales (ver anexo), a cada muestra (100 ml) se le adicionaron 100 ml de solución de enriquecimiento (1:1). Se mantuvieron en incubación a 30 °C durante 28 días. En la figura 6 se observa el enriquecimiento realizado a las muestras así como la aplicación del campo magnético en un extremo del frasco. Se tomaron muestras de cultivo cada 7 días para observación directa mediante microscopía óptica.



Figura 6. Enriquecimiento en medio líquido de las muestras, obsérvese que en el extremo de los frascos de vidrio se colocó un imán común.

Como se muestra en la Figura 7 la muestra se colocó entre un portaobjetos y cubre objetos y se aplicó un campo magnético, para observar la presencia y/o ausencia de microorganismos y la migración de éstos hacia el campo magnético.

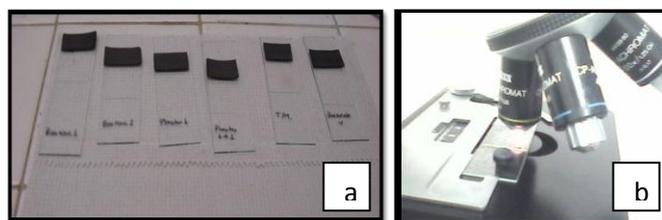


Figura 7. Observación mediante microscopía óptica de las muestras enriquecidas con aplicación de campo magnético a) imán común, b) imán de neodimio.

4.5 Inducción de campo magnético a los microorganismos

Posterior al enriquecimiento los microorganismos presentes en la muestra enriquecida se sometieron a una inducción de campo magnético, se tomaron alícuotas de 5 ml de las muestras dentro de una pipeta pasteur y se realizó la aplicación de campos magnéticos en diferentes ensayos: a) primero se utilizaron imanes comunes por 30 minutos, b) se diseñó una bobina magnética, dentro de la cual se colocó la muestra y se aplicó campo magnético por 30 minutos, c) se utilizaron imanes de neodimio de 1 x 0.5 cm y 2 x 0.5 cm de diámetro ambos con capacidad de 38000 gauss de potencia por 30 minutos.

4.6 Concentración y recolección de microorganismos con propiedades magnéticas

La concentración y recolección de microorganismos se llevó a cabo mediante la aplicación de campos magnéticos utilizando imanes de neodimio de 2 x 0.5 cm de diámetro; la muestra (5 ml) se colocó en condiciones de asepsia en un frasco de vidrio de aproximadamente 50 ml y el campo magnético se mantuvo en un extremo de frasco por 30 minutos, una vez transcurrido este tiempo se recolectaron con una pipeta pasteur de 1 a 4 gotas de muestra y se colocaron en un tubo eppendorf, en un extremo del tubo se colocó un pequeño imán de neodimio.

4.7 Medio de aislamiento.

Para el aislamiento de los microorganismos recolectados que presentaban propiedades magnéticas (4.6) se realizaron ensayos en medio de cultivo líquido al cual se le adicionó solución de vitaminas de uso farmacéutico 10 ml, solución de minerales 5.0 ml, solución de quinato férrico (0.01M) 2.0 ml, resazurina 0.1% 0.45 ml, KH_2PO_4 0.68 g, NaNO_3 0.12 g, ácido ascórbico 0.035 g, ácido tartárico 0.37 g, ácido succínico 0.37 g, acetato de sodio 0.05 g, agua destilada 1lt., se ajustó el pH a 6.75 con NaOH.

El medio de cultivo se colocó en tubos de ensayo y se realizaron dos series de ensayos, en la primer serie a los tubos de ensayo conteniendo 12 ml de medio de cultivo se les burbujeó con argón para proporcionar condiciones bajas de oxígeno al medio y a la segunda serie de tubos con 12 ml de medio de cultivo no se aplicó argón, posteriormente el medio se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión, 121°C durante 15 minutos. (Fig. 8). Para medio de cultivo sólido se utilizaron los mismos componentes y se añadió agar bacteriológico al 1.5 %.

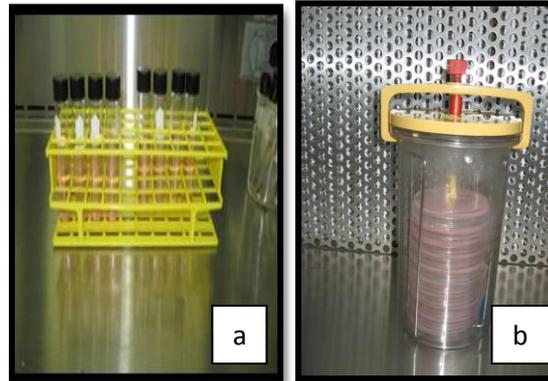


Figura 8. Aislamiento del microorganismo a) en medio de cultivo líquido b) en medio de cultivo sólido.

4.8 Obtención de cultivos puros de bacterias con propiedades magnéticas.

Los medios de cultivo líquidos preparados y esterilizados se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se inocularon con 500 μl de una suspensión de bacterias obtenidas en la sección (4.6), posterior a la inoculación los tubos de ensayo se incubaron a 28°C por 10 a 14 días., una vez desarrolladas bacterias en este medio líquido, se hizo una transferencia por estría con un asa bacteriológica al medio de cultivo sólido que contiene los mismos componentes. Sembradas las placas se colocaron en el interior de una jarra de anaerobiosis junto con una vela encendida se cerró herméticamente la jarra para proporcionar condiciones microaerófilas, se incubaron a 28°C por 10 a 14 días. (Fig. 8). Finalmente de las colonias aisladas en medio sólido se realizaron tinciones Gram para observación morfológica y las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa.

4.9 Deposición de cultivos aislados para microscopía electrónica

Por lo general las preparaciones de material biológico para la observación por microscopía electrónica deben someterse a un tratamiento específico de acuerdo al material que se desee observar, esto para evitar su descomposición. En este proyecto se modificó el modo de preparación de muestra y se procedió de la siguiente manera: de las colonias aisladas en medio sólido se tomó una pequeña porción y se resuspendió en agua estéril dentro de un tubo eppendorf posteriormente de esta suspensión se tomó una gota con una pipeta pasteur y se depositó directamente en rejillas de cobre formvar, las cuales se dejaron secar dentro de cajas petri a temperatura ambiente por 24 hrs para su posterior observación en el microscopio electrónico de transmisión. En la figura 8 se muestra este tipo de rejillas y la forma de transporte de las mismas.

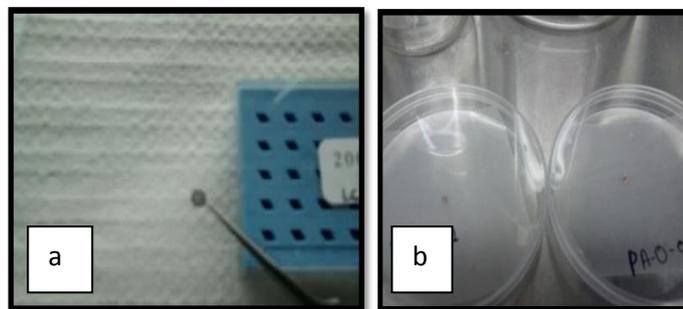


Figura 9. a) Rejilla de cobre formvar b) transporte de la rejilla en cajas petri.

4.10 Análisis mediante microscopía electrónica

Las determinaciones de microscopía electrónica se realizaron en el Centro de Investigación de Química Aplicada de la Ciudad de Saltillo, Coahuila, empleando un microscopio de transmisión el cual se muestra en la figura 10.

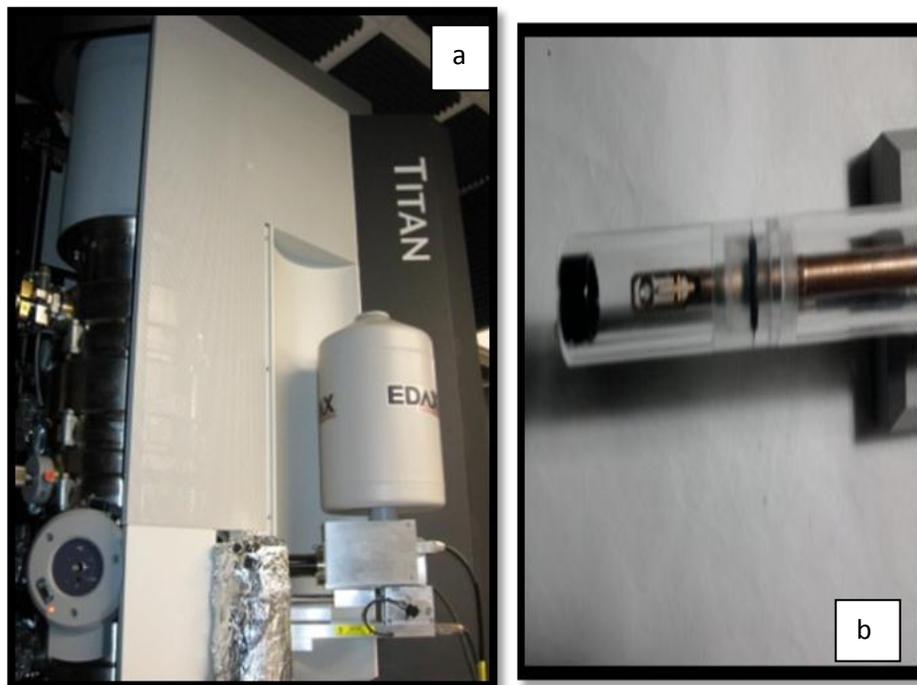


Figura 10. a) Microscopio electrónico de transmisión marca FEI modelo TITAN, b) portamuestras del MET utilizado en estas determinaciones.

El voltaje aplicado para la observación de la muestra fue de 300 Kv, además se realizaron a la muestra patrones de difracción así como un análisis químico EDS para conocer la composición química de la misma. El análisis químico de la muestra se hizo mediante un detector EDAX.

Las imágenes obtenidas en MET se registraron mediante el uso de una cámara digital acoplada al microscopio (CCD) Gatan de 1024 x 1024 píxeles.

4.11 Disposición de Residuos

Los residuos generados durante el desarrollo experimental de este proyecto fueron dispuestos en contenedores específicos de acuerdo a lo establecido por el Departamento de Residuos Peligrosos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Aquellos residuos que estuvieron en contacto con células microbianas se esterilizaron antes de su disposición.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Caracterización fisicoquímica de las muestras.

EL pH de las muestras de la zona de Cuatro Ciénegas fue de 7.8 para la muestra recolectada en la zona de Las Playitas y de 7.1 para la muestra de la zona de la Poza Azul, la temperatura ambiente en la zona de recolección fue de 18° C para ambas zonas. Mediante análisis cualitativo de espectroscopía de absorción atómica se detectó la presencia de calcio, magnesio, potasio y sodio en las muestras de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

5.2 Enriquecimiento de cultivo microbiano.

La observación directa del cultivo cada 7 días durante 4 semanas por microscopía óptica dio como resultado que no existía presencia ni migración de microorganismos de las muestras de agua procedentes del estero del estado de Veracruz por lo cual dichas muestras se descartaron y se procedió a continuar la investigación con las muestras procedentes de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

5.3 Inducción del campo magnético

En los ensayos realizados para determinar la presencia y migración de los microorganismos con características magnéticas mediante el uso de la barra magnética (Fig. 11a) y la bobina magnética (Fig. 11b) no se logró observar la migración de microorganismos. Al utilizar los imanes de neodimio con capacidad de 38000 gauss (Fig. 11c) se obtuvieron mejores resultados ya que por este método se confirmó la migración de microorganismos mediante observación en fresco por microscopía óptica. (Fig. 12).

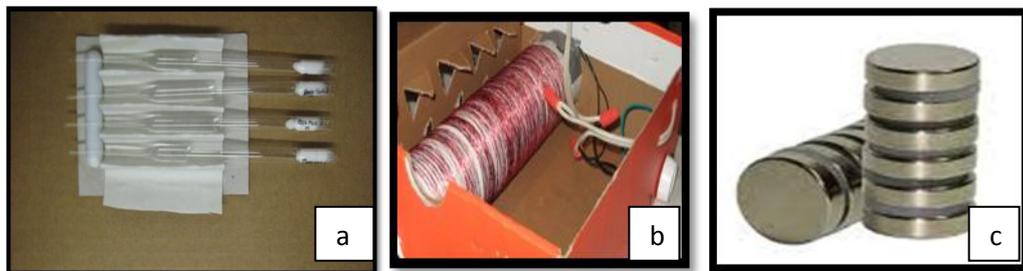


Figura 11. Inducción de campo magnético mediante: a) barra magnética b) bobina magnética c) imanes de neodimio

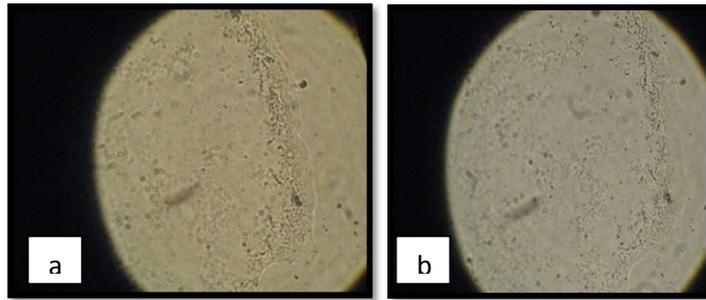


Figura 12. a) Inicio de la migración de los microorganismos presentes b) observación de la migración transcurridos 30 minutos. (40x)

5.4 Concentración y recolección de microorganismos con propiedades magnéticas

Al aplicar el campo magnético al frasco del cultivo se observó la migración de microorganismos hacia el extremo donde se colocó del imán por un aumento en la turbidez del medio, como se puede observar en la figura 13 esta turbidez facilitó la recolección de los microorganismos de interés.



Figura 13. Concentración de la muestras mediante imanes de neodimio.

5.5. Aislamiento y obtención de cultivos puros

Después de la incubación a 28°C durante 10 días se observó que solamente los medios de cultivo líquido a los cuales se les realizó el burbujeo con argón presentaron crecimiento. En la parte superior del tubo de ensayo se observó una tenue capa color gris opaco, lo cual indica la presencia de microorganismos. El medio al que no se le burbujeo argón no mostró ningún cambio.

En el medio de cultivo sólido que se inoculó con el cultivo aislado en medio líquido con argón se observaron colonias planas cremosas color beige de forma irregular como se observa en la figura 14. Las características morfológicas que se determinaron en el Gram fueron bacilos cortos, gruesos, Gram negativo y espirilos Gram negativos como se muestra en la figura 15. Ambos microorganismos aislados no producen catalasa ni oxidasa.



Figura. 14. Aislamiento en medio de cultivo sólido

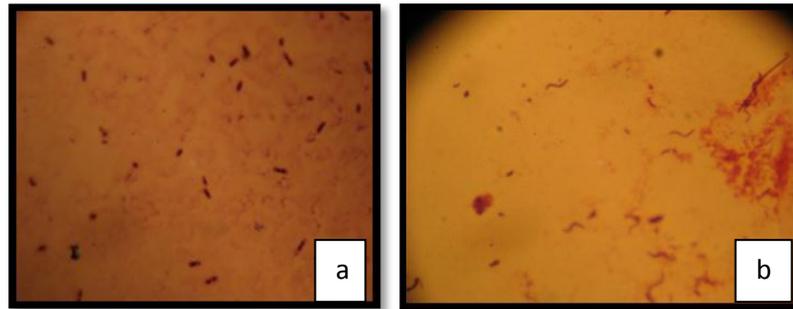


Figura 15. Observación microscópica (100x) de los microorganismos aislados y teñidos mediante Gram. a) bacilos Gram (-) b) Espirilos Gram (-).

5.6 Microscopía electrónica de Transmisión.

Las muestras preparadas de acuerdo a la sección (4.9) que se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión no mostraron descomposición del material biológico presente, estos microorganismos aislados pudieron resistir el vacío y la intensidad de voltaje con la que se trabajó.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión revelaron la presencia de bacilos (Fig. 16) y espirilos (Fig.17) en los cuales se confirmó la presencia de partículas extracelulares de tamaño nanométrico.

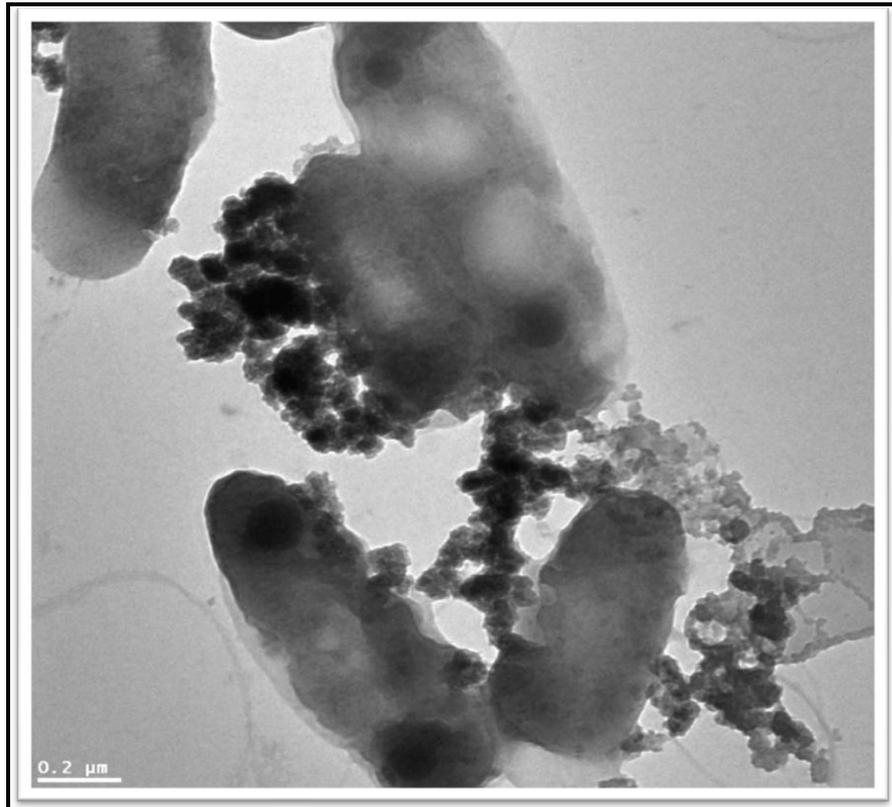


Figura 16. Bacilo observado mediante MET 300 Kv, donde se pueden observar nanopartículas extracelulares (Escala 0.2 μm)

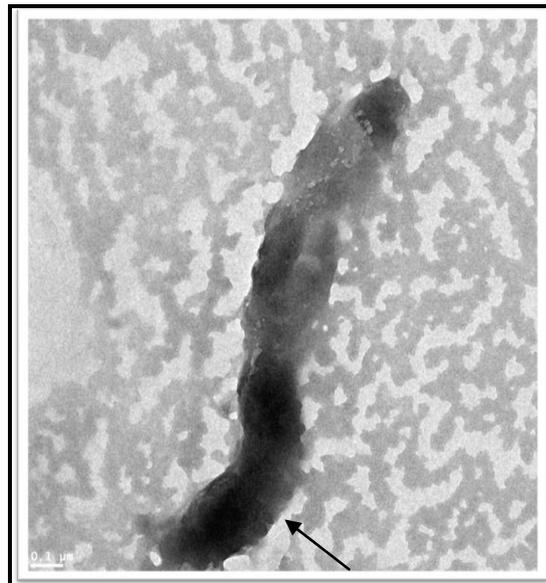


Figura 17. Imagen de espirilo observado mediante MET 300 Kv, donde se pueden observar nanopartículas en el borde inferior derecho. (Escala 0.1 μm)

La difracción de electrones realizada a la muestra del bacilo permitió demostrar que las partículas presentes tienen características cristalinas, como puede observarse en la (Fig.18a).

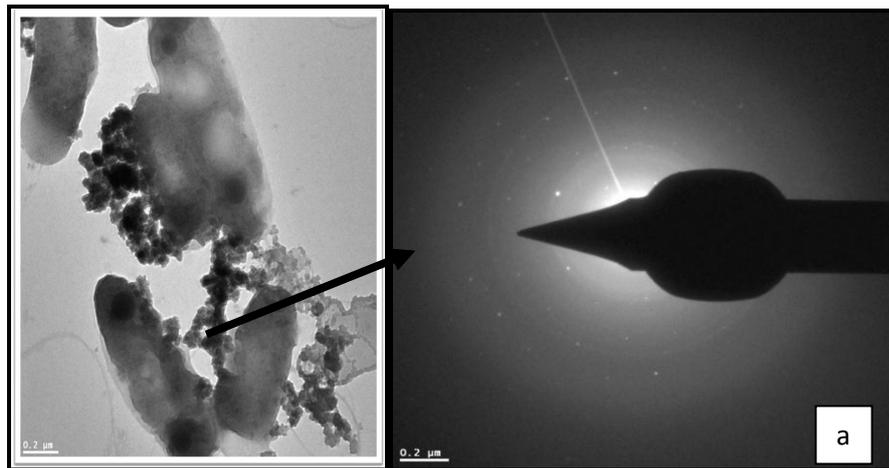


Figura 18. a) Difracción de electrones de las partículas extracelulares del bacilo, donde se aprecian los puntos y anillos definidos característicos de materiales cristalinos.

Al espirilo observado mediante microscopía electrónica de transmisión, se le realizó la técnica de difracción de electrones donde se aprecian los puntos y anillos definidos característicos de materiales cristalinos. (Fig. 19).

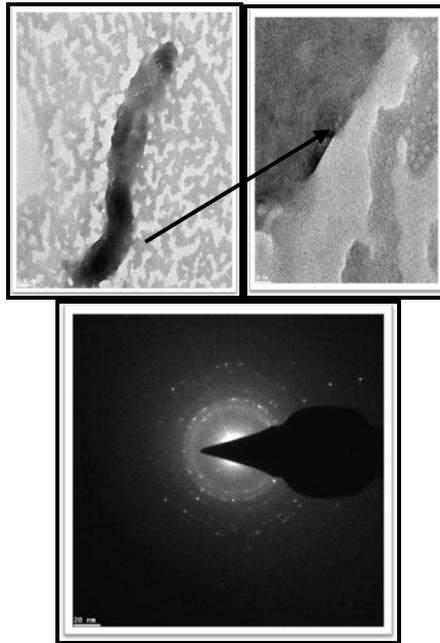


Figura 19. Difracción de electrones del espirilo denotando la presencia de material cristalino.

El análisis EDS no se pudo realizar a la muestra de espirilos debido a que al realizar esta determinación en la muestra se presentaron vibraciones las cuales impidieron realizar esta determinación.

El análisis químico EDS se realizó únicamente a la muestra del bacilo mostró la composición de las partículas nanométricas las cuales están constituidas por sodio, potasio, fósforo, cloro, calcio destacando la presencia del hierro. (Fig. 20)

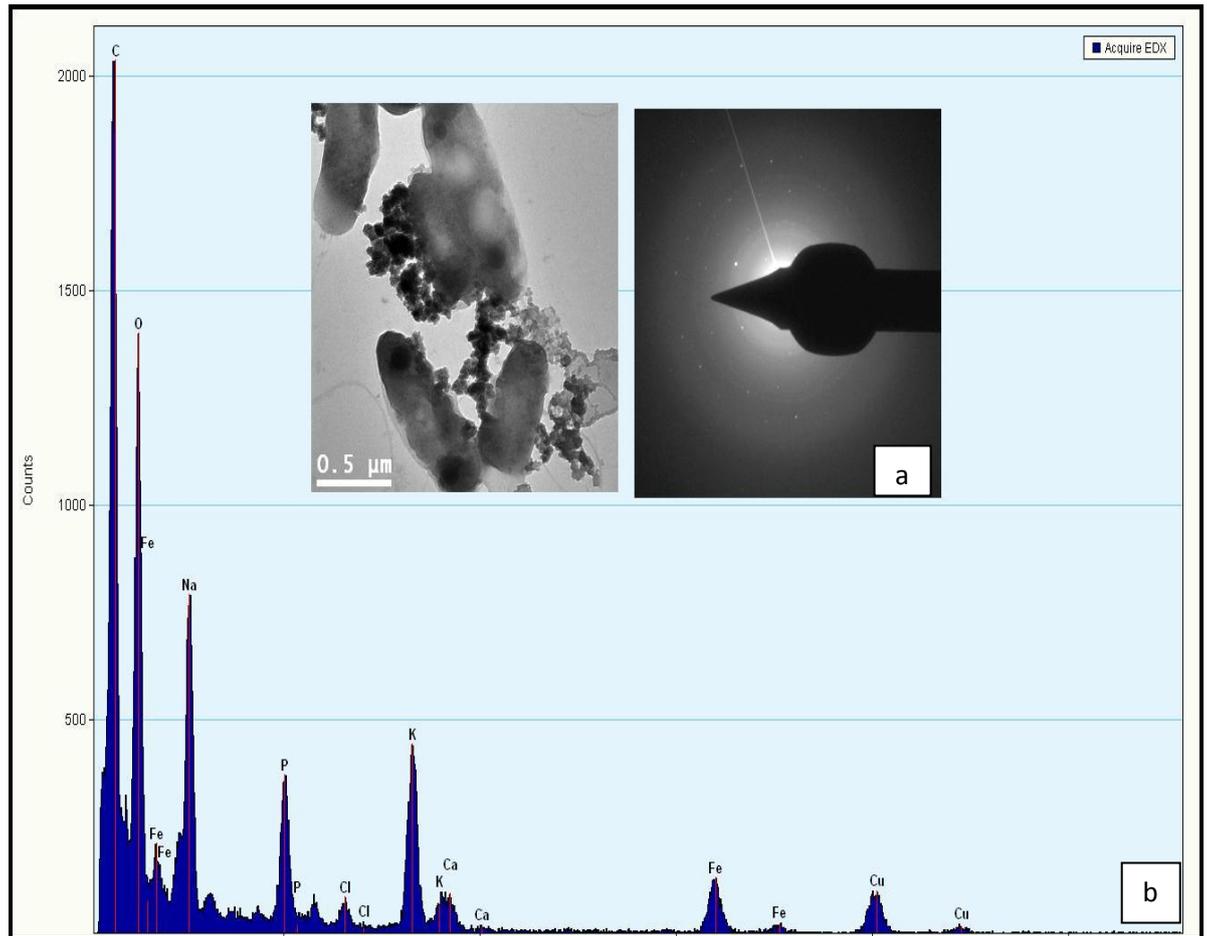


Figura 20 Bacilo visto a 300 Kv a) se muestra la presencia de material cristalino mediante la difracción de electrones b) análisis químico EDS de las partículas, destacando la presencia de hierro.

En la figura 20b (EDS) puede apreciarse también la presencia de carbono, oxígeno y cobre no obstante es necesario aclarar que esto puede deberse a que las rejillas de formvar están fabricadas de cobre y por eso su presencia en este análisis a si como el carbono y oxígeno aparecen debido a que son parte de la composición biológica del microorganismo.

CAPITULO 6

DISCUSION DE RESULTADOS

Transcurridas las 4 semanas de enriquecimiento se observó la presencia de microorganismos con propiedades magnéticas de las muestras procedentes de Cuatro Ciénegas Coahuila, se plantea que para el crecimiento de estas bacterias las condiciones que se generan en el medio de enriquecimiento durante su incubación son esenciales para que las bacterias controlen el proceso biogénico de la formación del mineral.

Cuatro Ciénegas es un hábitat único en el mundo con una gran diversidad de flora y fauna endémica que presenta una amplia diversidad de microorganismos. Las bacterias encontradas y examinadas son apenas una pista del origen de la vida y de la diversidad biológica de la tierra, los microorganismos que se han estudiado tienen características moleculares con las especies marinas, que posiblemente sean descendientes de los antiguos mares someros de la zona. Se sugieren que este ecosistema sirvió como refugio para la flora acuática y terrestre durante las glaciaciones, brindando las condiciones adecuadas para que se mantuviera una inmensa diversidad de microorganismos y microambientes.

Souza y colaboradores (2004) sugieren que la fauna acuática experimentó una radiación adaptativa producto de altas tasas de especiación, lo que generó un elevado número de endemismos.

Considerado como un laboratorio natural, Cuatro Ciénegas sigue siendo estudiado ya que en su ecosistema, se han encontrado los mismos tipos de microorganismos que habitaban la tierra hace miles de millones de años.

Los resultados del aislamiento de este proyecto permiten continuar con investigaciones de microorganismos que existen en esta zona ya que al momento no existen reportes de aislamiento de este tipo de microorganismos con propiedades magnéticas.

Las muestras biológicas observadas por MET son un punto importante de este proyecto ya que no se requirió preparación del material a observar, al momento no existen reportes de bacterias que soporten la observación en MET sin preparación, de lo que da pie a seguir indagando al respecto. Lo propuesto por Souza y colaboradores sobre que las especies de la zona han recibido radiaciones durante millones de Años y les han permitido adaptarse a este ambiente; sugiere que estos microorganismos aislados pudieron soportar la interacción de los electrones recibidos en la muestra al ser observados por este tipo de microscopía.

Las formas y estructuras de los minerales magnéticos reportados en este proyecto pudieron verse influidos por las condiciones del medio de cultivo así como por la presencia y control del oxígeno que se les proporcionó a los microorganismos para su crecimiento ya que estudios han demostrado que el tamaño y la forma de magnetita extracelular dependen de las condiciones de cultivo y del tipo de bacteria, así como en gran medida de la regulación de diversos factores como lo son los ambientales (pH, pO₂, pCO₂), la temperatura y tiempo de incubación.

La difracción de electrones reportada en este proyecto corresponde a cristales de óxidos de hierro con una estructura tipo espinela (magnetita o maghemita), no se puede proponer con exactitud un solo tipo de cristal ya que la similitud de la magnetita y maghemita es muy grande, solo se podría conocer la exactitud del tipo de mineral por medio de espectroscopia Raman, la limitante es que la cantidad de nanopartículas a analizar debe ser amplio y estar separadas completamente del microorganismo.

Pérez-González *et al.* (2010), demostró que los cristales de magnetita inducida por *Shewanella oneidensis* incorporaba cantidades considerables de materia orgánica en la estructura cristalina del mineral, alterando dicha estructura con respecto a las de las magnetitas inorgánicas y además que tal alteración se podía medir mediante espectroscopia Raman. Esta incorporación de materia orgánica fue propuesta como huella de actividad bacteriana para reconocer el origen biogénico de magnetitas naturales.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

- Fue posible aislar bacterias con características magnéticas a partir de las muestras procedentes de Cuatro Ciénegas, Coahuila.
- La morfología presente en los cultivos aislados es de espirilos y bacilos Gram Negativos.
- La presencia de argón permitió crear las condiciones adecuadas para el aislamiento de bacterias con propiedades magnetotácticas.
- Los imanes de neodimio fueron los que dieron mejores resultados al realizar la concentración de las muestras.
- Se confirmó la presencia de partículas de hierro de tamaño nanométrico mediante el estudio de microscopía electrónica de transmisión.
- La técnica de difracción de electrones permitió demostrar que las partículas presentes tienen características cristalinas.

- Los patrones de difracción de electrones corresponden a cristales de óxidos de hierro con una estructura tipo espinela (magnetita o maghemita).
- La composición química de las partículas analizadas por la técnica EDS es de: sodio, potasio, fósforo, cloro, calcio y hierro.
- Las muestras biológicas observadas por MET no se vieron afectadas aun cuando éstas no recibieron ninguna preparación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexander, M, (1971). *Microbial Ecology*. New York, John Wiley & Sons.
- Anaya Lang, A L, (2003). *Ecología Química*. Plaza y Valdés, México D.F. 95-109 ISBN 970-722-113-5
- Atlas, R M & Bartha R, (1987). *Microbial Ecology., Fundamentals and Application*, Massachusset ,Addison – Wesley.
- Baskar, S., Mauclaire, L. & McKenzie, J. A. (2006). Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, india. *Curr. Sci. India*, 90,58-64.
- Baskar, S., Baskar, R. (2009). Geobiology and geomicrobiology: importance and need for studies in the Indian context. *Current Science*, 92 (2), 200-201.
- Bazylinski, D. A., Frankel, R B (2003) Biologically controlled mineralization in prokaryotes. *Rev Miner Geochem* 54:217-247.
- Bazylinski D.A., Frankel RB (2004) Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat Rev Microbiology* 2 :217-230
- Bazylinski D.A. (1995) Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* 61:337-343
- Bazylinski DA, Williams T (2006) Ecophysiology of Magnetotactic Bacteria. *Microbiology Monogr* 3 : 38 – 69
- Bazylinski DA,(1990) Anaerobic production of single-domain magnetite by the marine, magnetotactic bacterium, strain MV-1. In:

Frankel RB, Blakemore RP (eds) Iron biominerals. Plenum, New York, pp 69-77

- Bazylinski, D.A., et al (2007). Controlled biomineralization and applications of magnetotactic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2 , 217-230.
- Beavon, J., Heatly, N. G. (1963). The occurrence of struvite (magnesium ammonium phosphate hexahydrate) in microbial cultures. *J. Gen Microbiol.* 31, 167-169.
- Beveridge, T.J. (1989). Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annu. Rev. Microbiology.*, 43, 147-171.
- Blakemore RP, Short KA, Bazylinski DA, Rosenblatt C, Frankel RB (1985) Microaerobic conditions are required for magnetite formation within *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Geomicrobiol J* 4: 53-71.
- Blakemore RP, Maratea D, Wolfe RS (1979) Isolation and pure culture of a freshwater magnetic-spirillum in chemically defined medium. *J Bacteriol* 140: 720-729.
- Blakemore RP (1975) Magnetotactic bacteria. *Science* 190: 377-379.
- de Duve, C. (1995). The beginnings of life on Earth, *Am. Sci.*, 38, 428-437.
- Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G., Perthuisot, J.P. (2000). Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals, *Berling Springer-Verlag*, 32-39.
- Canaveras, J.C., Hoyos, M., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I., Schumann, P. (1999). Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a Karstic Cave. *Geomicrobiol. J.*, 16, 9-25.

- Curtis T.P., W.T. Sloan y J.W. Scannell (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10494–10499.
- Dajoz Roger, (2002). Tratado de Ecología., segunda edición, Mundi – prensa Libros, 363-372.
- Frankel, R.B., Blakemore, R. P., Wolfe, R. S. (1979).Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science*, 203, 1355-1356.
- Frankel, R.B, Williams, T. J., Bazylinski, D. A. (2007).Magneto-aerotaxis in Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria. D Schuler (ed), Vol 3,1-24.Springer, Berlin Heidelberg.
- Garrels, R. M., Christ, C. L. (1990).Solutions, Minerals and Equilibria, 450,Jones and Bartlett, Boston.
- González - Muñoz, M.T., Ben Omar, N., Martínez –Cañamero, M., Rodríguez-Gallego, M., Galindo, A. L., Arias, J.M. (1996). Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*. *J. Cryst. Growth*, 163(4), 434-439.
- Gorby Y.A., Beveridge T.J., Blakemore, R.P. (1988) Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J Bacteriol* 170: 834-841.
- INE, página web: <http://ine.gob.mx>
- Jimenez-Lopez et al. (2010). Magnetite as a prokaryotic biomarker : A review. *J. Geophys.Res.*,1 15, G00G03,doi.
- Kirschvink JL, Kobayashi- Kirschvink A, Woodford BJ (1992) Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7683-7687.
- Klug,M J.& Reddy,CA,(1984). Current Perspectives in Microbial Ecology. Washington,DC ,American Society for Microbiology .

- Konhauser K.O. (2007). Introduction to Geomicrobiology. Blackwell publishing.
- Lins U, Freitas F, Keim CN, Lins de Barros H, Esquivel DMS, Farina M (2003) Simple Homemade apparatus for harvesting uncultured magnetotactic microorganisms, Braz J Microbiology 34:111-116.
- Lovley, D. R., Chapelle, F. H., Phillips, E. J. P. (1990). Fe (III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of the Atlantic Coastal Plain. Geology, 18, 954-957.
- Lovley, D. R. (1991). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. Microbiol. Rev., 55(2), 259-287.
- Lowenstam, H A (1981). Minerals formed by organisms. Science 211: 1126-1131.
- Lowenstam & Weiner, S (1989) On Biomineralization. Oxford Univ. Press, New York.
- Maher BA (1998) Magnetite biomineralization in termites. Proc R Soc Lond Biol 265: 733-737.
- Mann S, Sparks NHC, Borrad RG (1990) Magnetotactic bacteria: microbiology, biomineralization, palaeomagnetism and biotechnology. Adv Microbiol Physiol 31: 125-181.
- Mann S, Sparks NHC, Walker MM, Kirschvink JL (1988) Ultrastructure morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implicatios for magnetoreception. J Exp Biol 140:35-49.
- Mann S, et al. (2001), Biomineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry. Oxford University Press.

- Matsunaga T (1991) Applications of bacterial magnets. Trends Biotechnol 9: 91-95.
- Matsunaga T., Kamiya, S. (1987) Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization. Appl Microbiol Biotechnol 26: 328-332.
- McKay, D. S., Gibson Jr., E. K., Thomas-Keprta, K .L., Vali, H., Romanek, C. S., Clemett, S. j., Chiller ,X. D., Maechling, C.R ., Zare, R. N. (1996) Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. Science,273,924-930.
- Nelson, K.H., Myers, C. R. (1990) Iron deduction by bacteria: a potential role in the genesis of banded iron formations. Am. J. Sci., 290 A, 35-45.
- Nelson, B., Struble, J., McCarthy, G. (1991). In vitro production of struvite by *Bacillus pumilus*. Can. J. Microbiol., 37(12), 978-983.
- Riding,R. (2000) Microbial carbonates:the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms.Sedimentology , 47, 179-214.
- Perry, A., Bauer, G. B. & Dizon, A. E. (1985) Magnetoreception and biomineralization of magnetite in amphibians and reptiles. in: "Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms" J. L. Kirschvink, D. S. Jones and B. J. MacFadden (ed.) Plenum Press, New York. 439-453
- Rivadeneyra, M A., Delgado, R., Del Moral, A., Ferrer, M.R., Ramos-Comenzana, A. (1993). Precipitation of calcium carbonate by *Vibrios p* from an inland saltern. FEMS, Microbiol Ecology., 13(3)197-204.
- Rivadeneyra, M A., Parraga, J., Delgado, R., Ramos-Comenzana, A., Delgado G. (2004). Biomineralization of carbonates by *Halobacillus*

- trueperi in solid and liquid media with different salinities. FEMS, Microbiol Ecology., 48 (1),39-46.
- Rizzo, A. A., Martin, G.R., Scott, D.B., Mergenhagen, S.E. (1962). Mineralization of bacteria. Science,135, 439-441.
 - Rodriguez Navarro, et al., (2007). Complex biomineralized vaterite structures encapsulating bacterial cells. Geochim
 - Sarikaya M (1994) An introduction to biomimetics: a structural viewpoint. Microsc Res Tech 27: 360-375.
 - Sakaguchi T, Arakaki A, Matsunaga T (2002) *Desulfovibrio Magneticus* sp.nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single – domain-sized magnetite particles. Int J Syst Evol Microbiol 52 :215-221
 - Schleifer K-H, Schüler D, Spring S, Weizenegger M, Amann R, Ludwig W, Köhler M (1991) The genus *Magnetospirillum* gen.nov.,description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. Syst Appl Microbiol 14:379-385
 - Schüler D, Baeuerlein E (1997) Iron transport and magnetite crystall formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. J Phys IV 7: 647-650.
 - Seoáñez Calvo ,M (2000)., Tratado de reciclado y recuperación de producción de los residuos, series ingeniería del medio ambiente., Mundi prensa libros.,65-78.
 - Shinano, H., Sakai, M (1975). Effect of magnesium ion concentration on the types of crystals deposited by marine bacteria in sea water.Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish.41, 913.

- Simkiss, K, & Wilburg, K. M. (1989) *Biomineralization. Cell Biology and Mineral Deposition*, 337, Academic Press, Inc., San Diego.
- Souza Saldivar., 2004. Cuatrociénegas un laboratorio natural de astrobiología., *Ciencias* 75., 4-12.
- Stolz JF (1993) Magnetosomes. *J Gen Microbiol* 139: 1663-1670
- Thomas – Keppta, K. L., Bazylinski, D .A., Kirschvink, J. L., Clemett, S. J., McKay, D. S., Wentworth, S. J., Vali, H., Gibson Jr., E. K., Romanek, C. S. (2000). Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian Magnetofossils.. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 4049-4081.
- Torres de Araujo FF, Pires MA, Frankel RB, Picudo CEM (1986) Magnetite and magnetotaxis in algae. *Biophys J* 50: 375-378.
- Vazquez Nin., et al 2000. Introducción a la microscopia electrónica aplicada a las ciencias biológicas., series ciencia y tecnología UNAM.
- Wenbing Li, Longjiang Yu, Pengpeng Zhou, Min Zhu.(2007), Isolation of magnetotactic bacterium WM-1 from freshwater sediment and phylogenetic characterization. *Arch Microbiol* (2007) 188:97-102.
- Winsborough, B.M. y J.S. Seeler 1984. The relationship of diatom epiflora to the growth of limnic stromatolites and microbial mats. *8th Diatom Symposium 1984. Diatom Epiflora, Limnic Stromatolites and Microbial Mats.*: 395–407.
- Winsborough, B.M. 1990. Some ecological aspects of modern fresh water stromatolites in lakes and streams of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico. Doctoral dissertation, University of Texas, Austin

- Wright, D. T.,(1999).The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. *Sediment. Geol.*, 126(1-4), 147-157.
- Wright, D. T., Wacey, D. (2005). Precipitation of dolomite using sulphate – reducing bacteria from the Coorong Region, South Australia. *Sediment. Geol.*, 126*1-4(, 147-157).
- Yacamán, M., Reyes Gasca J. (1995).Microscopía electrónica: una visión del microcosmos. Fondo de cultura económica. México DF.
- Ye, Q., Roh, Y., Carroll, S. L., Blair, B., Zhou, J., Zhang, C. L., Fields, M. W. (2004).Alkaline Anaerobic Respiration: Isolation and Characterization of a novel Alkaliphilic and Metal Reducing Bacterium. *App. Environ. Microbiol.*, 70 (9),5595-5602.
- Zachara, J. M., Kukkadapu, R. K., Fredrickson, J.K., Gorby, Y. A. & Smith, S. C. (2002) Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB).*Geomicrobiol.*, J. 19, 179-207.
- Zavarzina, D. G., Kolganova, T. V., Boulygina, E. S., Kostrikina, N. A., Tourova, T. P., Zavarzin, G. A. (2006) *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp., the First Alkaliphic Representative of the Family Geobacteraceae, Isolated from a Soda Lake. *Microbiology*, 75(6), 673-682.

ANEXO

- **Reactivos y equipos**

Los reactivos utilizados en este estudio: fosfato ácido de potasio (J.T. Baker), nitrato de sodio (Productos Químicos Monterrey S.A.) agar bacteriológico (Bioxon), ácido succínico (Spectrum), ácido ascórbico (Productos Químicos Monterrey S.A.), ácido tartárico (Spectrum), acetato de sodio (Productos Químicos Monterrey S.A.), resazurina (Sigma), ácido quínico (sigma), ácido etilendiaminotetracético (J.T. Baker), sulfato de magnesio (CTR Scientific), sulfato de manganeso (CTR Scientific), cloruro de sodio (Productos Químicos Monterrey), sulfato de hierro (CTR Scientific), cloruro de cobalto (Productos Químicos Monterrey), cloruro de calcio (Baker analyzed), sulfato de zinc (Productos Químicos Monterrey), sulfato de cobre (CTR Scientific), sulfato de potasio y aluminio (Productos Químicos Monterrey), ácido bórico (CTR Scientific), molibdato de sodio (Baker analyzed).

Los equipos utilizados fueron: autoclave (All american), campana de flujo laminar (Novatech), balanza analítica (AND), incubadora (Shel Lab), potenciómetro (Thermo scientific), microscopio óptico (Zeiss), plancha de calentamiento (Thermolyne), congelador (Torrey), y finalmente microscopio electrónico de transmisión marca FEI modelo Titán 80 - 300 Kv

- **Solución mineral**

EDTA 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5g, NaCl 1.0g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, CaCl_2 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, H_3BO_3 0.01g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g se añade agua destilada 1 lt y se ajusta el pH a 6.5 con KOH.

- **Solución de quinato férrico**

FeCl_3 0.27g, Acido quinico 0.19 g se disuelve en agua destilada 100ml y se esteriliza en autoclave 121Cpor 15 minutos.