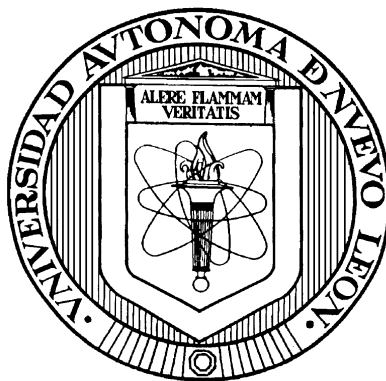


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS DE BIOMINERALIZACIÓN MICROBIANA
EN EL NORESTE DE MÉXICO: BACTERIAS PRODUCTORAS DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO**

Por:

JULIO SILVA MENDOZA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación
en Microbiología Aplicada**

Mayo, 2014

**IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS DE BIOMINERALIZACIÓN MICROBIANA
EN EL NORESTE DE MÉXICO: BACTERIAS PRODUCTORAS DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO**

Aprobación de la Tesis:

Dr. Alberto Gómez Treviño

Dra. Raquel Mendoza Reséndez

Dr. María Elena Cantú Cárdenas

Dr. Ulrico López Chuken

Dra. María Elena Rodríguez Cantú

RESUMEN

Julio Silva Mendoza

Fecha de graduación: Mayo, 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS DE BIOMINERALIZACIÓN MICROBIANA EN EL NORESTE DE MÉXICO: BACTERIAS PRODUCTORAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO

Número de páginas: 89

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias
Con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Existen diversos materiales como las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro las cuales se emplean en la elaboración de ferrofluidos, en el área de la nanobiomedicina, en el área de biorremediación, en la industria electrónica para la elaboración de bocinas y cintas magnéticas, entre otras. Las nanopartículas se obtienen por varios métodos convencionales, solo que todos ellos tienen en común los siguientes inconvenientes: altos costos, gasto de energía y elevados volúmenes de reactivos. Una alternativa verde para su obtención es por medio de microorganismos capaces de biomineralizar, los cuáles pueden ejercer un control muy eficiente sobre el tamaño y la morfología de la nanopartícula, lo que las hace aptas para su empleo en la nanotecnología. Este trabajo consistió en la búsqueda de microorganismos con capacidad de biomineralizar, donde se encontraron microorganismos que producen nanopartículas de hematites y acaganeíta.

Firma del asesor: _____

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Gómez Treviño, gracias por la asesoría, revisión y apoyo brindado durante este proyecto de investigación.

A los doctores Raquel Mendoza y Carlos Luna, gracias por sus enseñanzas, y apoyarme en el área de magnetismo y microscopía electrónica y por las facilidades que me dieron para trabajar en el CIQA.

A mi comité tutorial: los doctores Ulrico López, María Elena Rodríguez y María Elena Cantú, gracias por la revisión y corrección de esta tesis.

A la Dra. María Elena Cantú, coordinadora del posgrado: gracias por todo el apoyo que me brindo en este tiempo, por sus consejos y enseñanzas.

A mis profesores de la maestría: gracias por el conocimiento que me transmitieron en todo este tiempo, todo lo que les aprendí me sirvió para el desarrollo de esta tesis, y también para mi trabajo de diario en el laboratorio.

A mis compañer@s y amig@s que hice en el laboratorio: José Luis, Margarita, Citlali, Pamela y Jesy y l@s niñ@s del servicio, gracias a tod@s por ayudarme y apoyarme, tanto con el trabajo de laboratorio, como en mis situaciones personales, les agradezco haber estado conmigo todo este tiempo.

A mis compadres, Ángel y Uriel: gracias por haber estado conmigo todo este tiempo, por tantas cosas que tuvimos que pasar para por fin volvernos todos unos MC.

A mis mejores amigas Diana y Selene, gracias por estar ahí para mí siempre, gracias a ustedes no termine volviéndome (más) loco.

A mi familia: gracias por apoyarme siempre que lo necesito

DEDICATORIA

A mi padre, Julio Silva López

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1.- INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Propiedades Magnéticas a Tamaño Nanométrico.	2
1.2 Propiedades Eléctricas a Tamaño Nanométrico.	6
1.3 Nanopartículas Magnéticas de Óxidos de Hierro.	8
1.4 Aplicaciones de las Nanopartículas Magnéticas de Óxidos de Hierro.	10
1.4.1 Aplicaciones de las Nanopartículas de Magnetita.	10
1.4.2 Aplicaciones de las Nanopartículas de Maghemita.	11
1.4.3 Aplicaciones de las Nanopartículas de Hematites.	12
1.5 Obtención de Nanopartículas Magnéticas de Óxidos de Hierro.	13
1.5.1 Métodos Convencionales.	13
1.5.2 Métodos Microbiológicos.	14
1.5.2.1 Mineralización Inducida Biológicamente.	15
1.5.2.2 Mineralización Controlada Biológicamente.	17
1.6 Bacterias Magnetotácticas.	18
1.7 Producción de Magnetosomas y Biomineralización.	22
1.8 Caracterización de las BMT y de las Partículas Magnéticas.	23
1.9 Técnicas de Identificación y Aislamiento.	26
1.10 Medios de Cultivo y Condiciones de Crecimiento.	27
1.11 Antecedentes.	28
1.12 Justificación.	29
1.13 Hipótesis.	30
1.14 Objetivos.	30
1.14.1 Objetivos Generales.	30
1.14.2 Objetivos Específicos.	31
2.- MATERIALES Y MÉTODOS.	32

Capítulo	Página
2.1 Muestras y Materiales.	32
2.2 Equipos.	32
2.3 Metodología.	33
2.3.1 Obtención de las Muestras.	33
2.3.2 Identificación.	34
2.3.2.1 Identificación por PCR.	34
2.3.3 Aislamiento.	37
2.3.4 Mantenimiento de los Microorganismos.	37
2.3.5 Condiciones de Cultivo.	39
2.3.6 Caracterización de los Microorganismos.	40
2.3.7 Caracterización de las Nanopartículas.	40
2.3.7.1 Microscopía Electrónica.	40
2.3.7.2 Difracción de Rayos X.	41
3.0 RESULTADOS.	43
3.1 Identificación por PCR.	43
3.1.1 Extracción de DNA Genómico.	43
3.1.2 Estandarización de la PCR.	44
3.1.3 Muestras Positivas a la PCR Realizadas a los Microorganismos de las Muestras.	44
3.2 Tinción Gram de las Muestras Positivas a la PCR.	45
3.3 Identificación por Gota Pendiente.	46
3.4 Identificación y Caracterización por Microscopía Electrónica	47
3.4.1 Difracción de Electrones.	49
3.5 Secuenciación de Producto de PCR.	51
3.6 Caracterización de los Medios de cultivo.	54
3.7 Caracterización de las Condiciones de Cultivo.	56
3.7.1 Condición de Cultivo 2.	56
3.7.2 Condición de Cultivo 3.	60
4.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	62
4.1 Bacterias Magnetotáticas.	62
4.2 Nanopartículas de Óxidos de Hierro.	64
4.3 Condiciones de Cultivo.	67

Capítulo	Página
5.0 CONCLUSIONES.	70
BIBLIOGRAFÍA.	72

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Propiedades magnéticas y físicas de los óxidos de hierro.	9
2. Algunos minerales de hierro inducidos biológicamente.	17
3. Nomenclatura de las muestras recolectadas.	34
4. Primers diseñados	35
5. PCR por 100 μ L de reacción para el kit Promega.	36
6. PCR por 100 μ L de reacción para el kit GenScript.	36
7. Gradiente de temperatura con los diferentes primers.	37
8. Condiciones de PCR.	37
9. Medio de cultivo empleado.	38
10. Solución de quinato férrico.	38
11. Solución de minerales.	38
12. Escalamiento de las condiciones de cultivos dos y tres.	41
13. Comparación de las distancias interplanares de la hematites, con las distancias interplanares de la muestra.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Representación de la relación superficie-volumen.	2
2.	Comportamientos más comunes en los materiales.	3
3.	Pared de Bloch.	5
4.	Relación entre los dominios y el tamaño de partícula.	5
5.	Representación de la estructura de bandas para un material conductor, semiconductor y aislante.	7
6.	Cristales de hematites extracelulares producidos por <i>Desulfovibrio magneticus</i> cepa RS-1.	15
7.	Micrografía de una bacteria magnetotáctica.	19
8.	Modelo esquemático de la magnetoaerotaxis.	20
9.	Diferentes tipos de magnetosomas encontrados en BMT.	22
10.	Organización molecular de los genes de la MAI en diferentes bacterias.	23
11.	Purificación magnética de BMT mediante la técnica “ <i>Capillary Racetrack</i> ”.	27
12.	Diagrama de metodología.	33
13.	Dilución y siembra en placa.	40
14.	Gel de agarosa al 1.0% del DNA total extraído de las muestras.	43
15.	Gel de agarosa al 2% del gradiente de PCR realizado a las muestras A y B.	44
16.	Gel de agarosa al 2% de PCR de muestras positivas.	45
17.	Tinciones Gram de las muestras positivas a PCR.	46
18.	Secuencia fotográfica de un video de gota pendiente durante la aplicación de un campo magnético externo.	47
19.	Micrografías de muestras analizadas por TEM mostrando diferentes formas bacterianas.	48
20.	Difracción de electrones de la muestra de Poza Azul.	49
21.	Difracción de electrones de la muestra de Poza Azul.	50
22.	Micrografía de las nanopartículas.	51
23.	Comparación de secuencias.	53
24.	Micrografías.	54

Figura	Página
25. Análisis EDS del medio de cultivo de la condición de cultivo 3. . .	55
26. Difractograma de los blancos de las condiciones de cultivo 1 (izquierda) y 3 (derecha) contrastados con hematites, acaganeíta y lepidocrocita.	56
27. Difractograma de la condición de cultivo 2 contrastada con hematites, acaganeíta y lepidocrocita.	57
28. Condición de cultivo 2.	58
29. Difracciones de electrones en zonas específicas.	58
30. Micrografía de la condición de cultivo 2.	59
31. Difractograma de la condición de cultivo 3 contrastado con hematites, acaganeíta y lepidocrocita.	60
32. Condición de cultivo 3.	61
33. Comparación de hematites producidas por microorganismos. . .	66

NOMENCLATURA

° C	Grados Celsius
Å	Armstrong
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
µL	Microlitros
Abs	Absorbancia
BCM	Mineralización Controlada Biológicamente
BIM	Mineralización Inducida Biológicamente
BMT	Bacterias magnetotácticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDS	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
E _g	Energía de banda prohibida
<i>et al</i>	y otros
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
G	Gramos
K	Kelvin (temperatura)
L	Litros
M	Metros
MAI	Isla génica de los magnetosomas
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NCBI	Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pte.	Poniente
RNA	Ácido ribonucleico
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
ZTOA	Zona de transición óxica-anóxica

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología está teniendo un impacto importante en la sociedad. En la actualidad se utiliza en una diversidad de sectores como el de la información y comunicaciones, medicina, en el desarrollo de fármacos, en el sector agrario y de la alimentación, también se emplea en cosméticos, protectores solares, en el sector textil, así como en el sector automotriz, entre otros (Erro, 2011).

La nanotecnología se define como el control y entendimiento de la materia a escalas comprendidas entre 1 y 100 nanómetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). A dicha escala los materiales experimentan fenómenos que propician cambios en sus propiedades físicas, químicas, magnéticas, eléctricas y ópticas, lo que permite dar nuevas aplicaciones a los materiales convencionales. Los cambios en las propiedades magnéticas son de principal importancia en este trabajo de investigación.

Mientras más pequeña sea una partícula de cualquier material, mayor es su superficie en relación con su volumen. Y con frecuencia, su reactividad se ve aumentada, ya que el número de átomos en contacto con la superficie es mucho mayor (Erro, 2011). En la figura 1 se puede apreciar mejor esta relación.

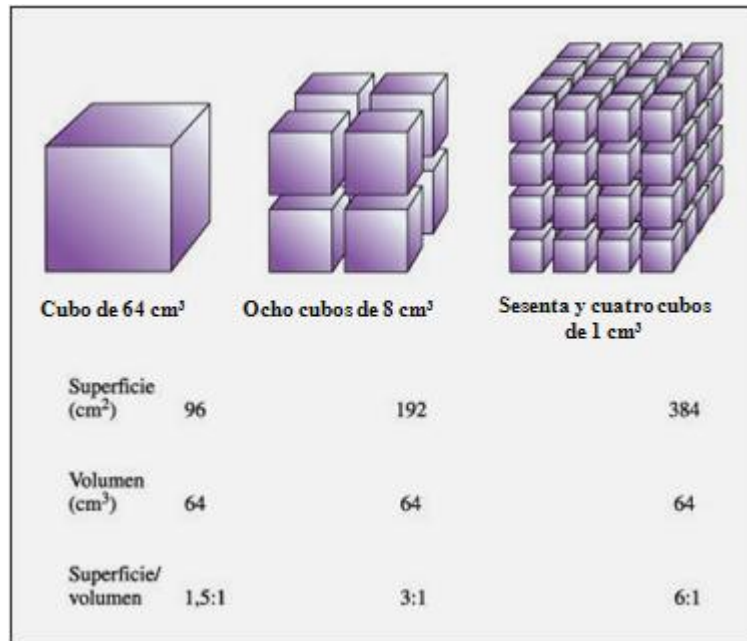


Figura 1.- Representación de la relación superficie-volumen (modificada de Erro, 2011).

1.1 Propiedades Magnéticas a Tamaño Nanométrico

Cuando los materiales se encuentran en bulto (a escalas convencionales), pueden presentar diferentes tipos de magnetismo, los más comunes son paramagnetismo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo y antiferromagnetismo (figura 2).

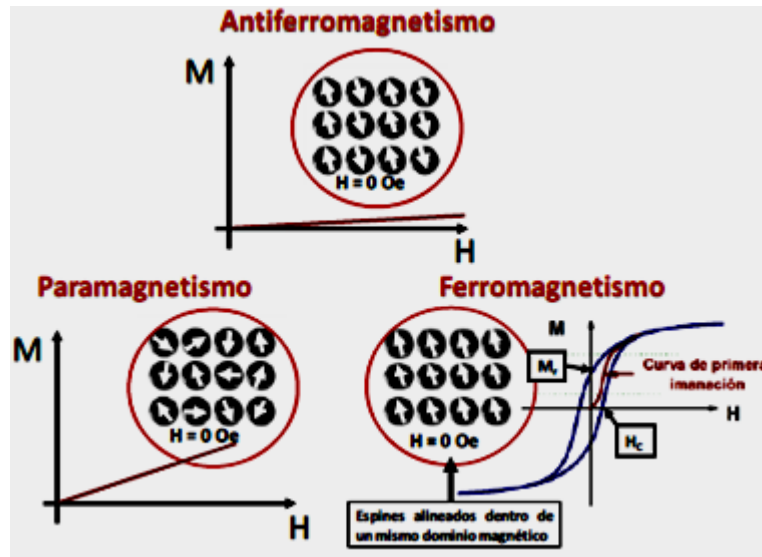


Figura 2.- Comportamientos más comunes en los materiales (modificada de Luna, 2012).

Paramagnetismo: se presenta en materiales constituidos por átomos (o iones) magnéticos con interacciones nulas o despreciables; los momentos atómicos se orientan de forma arbitraria y al azar en ausencia de un campo magnético. A cierta temperatura, la orientación de los momentos magnéticos varía debido a la agitación térmica, por lo que la magnetización en ausencia de un campo es nula. Al aplicar un campo magnético, los momentos atómicos tenderán a alinearse con el campo aplicado (Luna, 2012). Este tipo de magnetismo se presenta en materiales como el aluminio, magnesio, titanio y wolframio.

Ferromagnetismo: ocurre un ordenamiento de los momentos magnéticos de los átomos (o iones) magnéticos al aplicarles un campo magnético. El ordenamiento es paralelo a la dirección del campo magnético aplicado (Teja y

Koh, 2009). Este comportamiento se observa en los imanes y en el hierro, cobalto y níquel, entre otros.

Ferrimagnetismo: ocurre en materiales donde dos o más tipos de átomos (o iones), con diferentes momentos magnéticos y diferente fuerza, se ordenan en dos redes antiparalelas, resultando en un magnetismo más débil (Luna, 2012). Las ferritas, como la magnetita y la maghemita presentan esta propiedad.

Antiferromagnetismo: ocurre en materiales donde dos o más tipos de átomos (o iones), con diferentes momentos magnéticos y misma fuerza, se ordenan en dos redes antiparalelas, resultando en una magnetización neta nula. La hematites (a -13° C) y la acaganeíta son antiferromagnéticas.

Los momentos atómicos de un material macroscópico se encuentran organizados en regiones conocidas como dominios magnéticos, esto porque la existencia de un solo dominio sería energéticamente desfavorable, dada la elevada energía magnetostática. Por otra parte, entre dos dominios magnéticos contiguos hay una zona que los separa conocida como pared de dominio o de Bloch (figura 3), la cual tiene un tamaño de decenas-centenas de nanómetros (Luna, 2012).

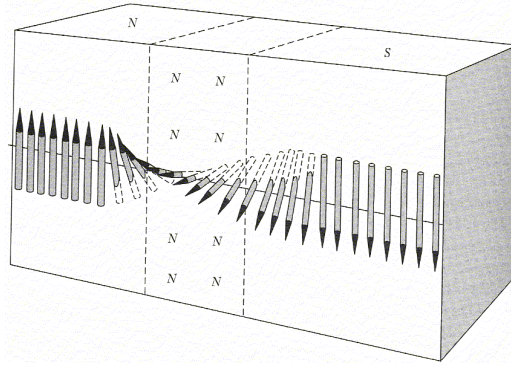


Figura 3. Pared de Bloch (tomada de Hook y Hall, 1995).

Los materiales de baja dimensionalidad (nanométricos) presentan comportamientos magnéticos que pueden distar considerablemente de aquellos observados en los materiales macroscópicos (Luna, 2012).

Cuando el material tiene dimensiones menores a las dimensiones de la pared de Bloch, todos los momentos magnéticos del material se encuentran en un único dominio, a esto se le conoce como partículas monodominio, las cuales tienen un tamaño entre 30-120 nm dependiendo del material. Esto se representa en la figura 4:

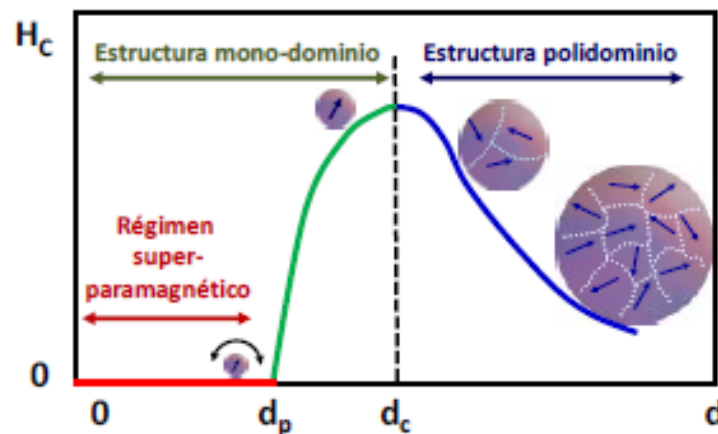


Figura 4.- Relación entre los dominios y el tamaño de partícula (tomada de Luna, 2012).

Si se reduce aún más el tamaño del material, la energía térmica se vuelve mayor a la energía del material, lo que lleva a una magnetización espontánea y al azar (similar a lo que ocurre en el paramagnetismo), a éste fenómeno se le conoce como superparamagnetismo.

La disposición ordenada de los momentos magnéticos disminuye con el aumento de la temperatura debido a las fluctuaciones térmicas de los momentos individuales. La temperatura de Neel, es la temperatura crítica por encima de la cual desaparece el efecto antiferromagnético en los materiales, pasando éstos a comportarse como materiales paramagnéticos. La temperatura de Curie, es la temperatura crítica por encima de la cual desaparece el efecto ferromagnético o ferrimagnético de un material, comportándose como un material paramagnético (Teja y Koh, 2009).

1.2 Propiedades Eléctricas a Tamaño Nanométrico

Los materiales se pueden clasificar en tres grupos básicos de acuerdo a su conductividad eléctrica: conductores, aislantes y semiconductores. La diferencia entre estos materiales se encuentra en la brecha energética existente entre sus bandas de valencia y de conducción (figura 5).

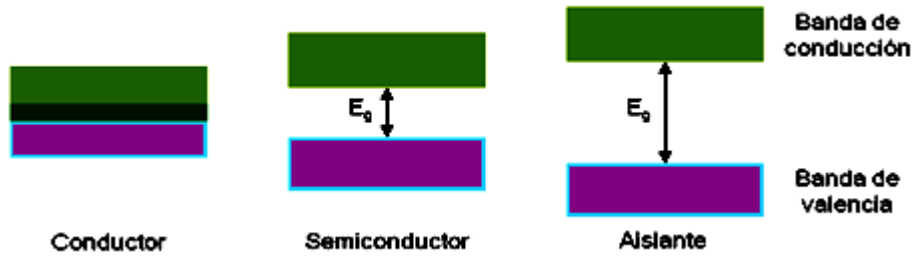


Figura 5. Representación de la estructura de bandas para un material conductor, semiconductor y aislante (tomada de Vázquez, 2011).

En un material conductor las bandas de valencia y conducción se encuentran traslapadas lo que permite una transferencia de electrones de una banda a otra. En un material aislante la diferencia energética entre ambas bandas es muy grande lo que impide que los electrones puedan pasar de un nivel energético a otro. Por otro lado, en un material semiconductor la diferencia energética es lo suficientemente grande para que el proceso no se realice de manera espontánea, pero puede ocurrir bajo la acción de un estímulo energético. A esta brecha energética entre una banda y otra se le llama energía de banda prohibida (E_g) y depende de la naturaleza del material (Callister, 2007).

En el caso de los semiconductores, aunque los valores de E_g de cada semiconductor son dependientes de la naturaleza del material, también dependen del tamaño de partícula del material. A tamaños nanométricos se presentan fenómenos de confinamiento cuántico, es decir, los electrones se encuentran confinados en un espacio muy reducido, lo que aumenta sus interacciones. Por lo tanto, la energía necesaria para llevar a un electrón de la

banda de valencia a la banda de conducción se incrementa conforme se disminuye el tamaño de partícula (Wang, 2008).

El confinamiento cuántico resulta en un incremento de la E_g al disminuir el tamaño de la partícula. En base a esto se han desarrollado mejores semiconductores ampliando el intervalo energético para su activación. Además del aumento de la E_g , un tamaño de partícula nanométrico incrementa la eficiencia de los procesos de conducción y, en el caso de los catalizadores, se incrementa el área superficial hasta valores de cientos de metros cuadrados por gramo (Afanasiev, 2008).

1.3 Nanopartículas Magnéticas de Óxidos de Hierro

Las nanopartículas magnéticas son de gran interés en la biotecnología para la obtención de fluidos magnéticos, en la biomedicina, imágenes de resonancia magnética, almacenamiento de datos y remediación ambiental (Strobel y Pratsinis, 2008). Dentro de los múltiples materiales con propiedades magnéticas se encuentran los óxidos de hierro, los cuales presentan diferentes tipos de magnetismo dependiendo de su fórmula química, su estado de oxidación y cristalización, su tamaño y su morfología. En la naturaleza se encuentran diversos óxidos de hierro, siendo probablemente los más comunes la magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) y la hematites ($\alpha-Fe_2O_3$) (Teja y Koh, 2009). En la tabla 1 se muestran algunas de las propiedades de éstos óxidos de hierro.

Tabla 1.- Propiedades magnéticas y físicas de los óxidos de hierro (modificada de Teja y Koh, 2009).

Propiedad	Hematites	Magnetita	Maghemita
Fórmula molecular	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Fe_3O_4	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Densidad (g/cm³)	5.26	5.18	4.87
Dureza	6.5	5.5	4.87
Temperatura de Curie (K)	956	850	820-986
Sistema cristalográfico	Hexagonal, rombohédrica	Cúbica	Cúbica o tetrahédrica
Tipo de magnetismo	Ferromagnético débil o antiferromagnético	Ferrimagnético	Ferrimagnético
Magnetismo a tamaño nanométrico	Superparamagnético	Superparamagnético	Superparamagnético

Maghemita: es ferrimagnética a temperatura ambiente, inestable a altas temperaturas y pierde su susceptibilidad magnética con el tiempo (Dronskowski, 2001). Sin embargo, ésta puede ser estabilizada por dopaje con otros iones metálicos (Helgason *et al.*, 2003). Las partículas de maghemita menores a 10 nm son superparamagnéticas a temperatura ambiente.

Hematites: es paramagnética a temperaturas por encima de su temperatura de Curie de 956 K (Cornell, 2003). A temperatura ambiente es débilmente ferromagnética y se somete a una fase de transición a 260 K a un estado antiferromagnético. El comportamiento magnético de la hematites depende de su cristalinidad, tamaño de partícula y de sustituciones catiónicas. A tamaños menores de 10 nm presenta superparamagnetismo.

Magnetita: es ferrimagnética a temperatura ambiente y tiene una temperatura de Curie de 850 K (Cornell, 2003). Partículas menores a 6 nm se consideran superparamagnéticas a temperatura ambiente, aunque sus propiedades dependen fuertemente del método de síntesis empleado. Margulies *et al.*, (1996) reportaron que las propiedades magnéticas de las nanopartículas de magnetita parecen depender fuertemente de cambios en la morfología del cristal (Teja y Koh, 2009).

1.4 Aplicaciones de las Nanopartículas Magnéticas de Óxidos de Hierro

1.4.1 Aplicaciones de las Nanopartículas de Magnetita

Elaboración de ferrofluidos; los cuáles consisten en partículas magnéticas dispersas en un fluido (agua o aceite) además de un agente surfactante que recubre las partículas y evita su agregación y consecuente sedimentación. Los ferrofluidos se emplean en ejes de rotación de discos duros, en sistemas de sonido como bocinas, componentes de amortiguamiento en motores; en el campo de la seguridad bancaria se emplean para elaborar tintas magnéticas, lectores y medios de grabación magnética; y por el lado ecológico se pueden utilizar en procesos de reciclaje para separar metales de desperdicio (Mazo-Zuluaga, 2011).

En el área de biomedicina, las nanopartículas de magnetita se emplean como agente de contraste en imágenes de resonancia magnética, como agente de transporte y dosificación de medicamentos; donde los medicamentos son anclados a la superficie de la nanopartícula y su transporte en el organismo es controlado externamente por medio de campos magnéticos seguido de la liberación del medicamento por un cambio de temperatura aplicando un campo magnético externo en la zona afectada (Mazo-Zuluaga, 2011).

En el tratamiento para el cáncer: se recubren las partículas magnéticas con azúcares, posteriormente se conducen a la zona cancerosa y mediante la aplicación de campos magnéticos alternos se induce la hipertermia en la región afectada, aumentando la temperatura por unos minutos a 45°C, eliminándose así el tejido afectado (Mazo-Zuluaga, 2011).

1.4.2 Aplicaciones de las Nanopartículas de Maghemita

La maghemita es útil en la grabación y el almacenamiento de datos debido a su estabilidad física y química. A menudo se dopa o recubre con 1-5% de cobalto con el fin de mejorar la coercitividad y la capacidad de almacenaje. Las nanopartículas de maghemita embebidas en una matriz no magnética presentan magnetorresistencia gigante, que es una disminución en la resistencia debido a un campo magnético y es útil en cabezas de grabación magnética y elementos de detección en magnetómetros.

También se utilizan en el transporte y dosificación de medicamentos, en la elaboración de biosensores, agentes de contraste en la resonancia magnética, y como catalizador en reacciones industriales (Teja y Koh, 2009).

1.4.3 Aplicaciones de las Nanopartículas de Hematites

Se emplean para catalizar un gran número de reacciones industriales, incluyendo la síntesis de NH_3 , y la desulfuración de gas natural. Se utilizan en la síntesis de Fisher Tropsch en la obtención de hidrocarburos, en la oxidación de alcoholes. Se utilizan como semiconductoras y catalizadoras en reacciones de óxido/reducción. También han sido usadas como fotocatalizadoras en la degradación de clorofenol y colorantes azo, además de emplearse en la elaboración de pinturas y barnices, entre otras (Teja y Koh, 2009).

Como se observa, los óxidos de hierro son de gran importancia tecnológica. Éstos pueden ser obtenidos por diversas formas, tanto por métodos convencionales, que son los que se emplean con regularidad, como por métodos microbiológicos por medio de síntesis verde.

1.5 Obtención de Nanopartículas Magnéticas de Óxidos de Hierro

1.5.1 Métodos Convencionales

Las nanopartículas se han obtenido por varios métodos: uno es el llamado “*top-down*” (proceso de reducción de tamaño) con el que se logran obtener nanoestructuras cuyo tamaño está en el límite superior de la escala nanométrica (Mazo-Zuluaga, 2011). Entre sus técnicas están: síntesis mecánica, evaporación térmica, deposición química en fase vapor, clusters gaseosos, molienda, entre otras (Zanella, 2012).

También se encuentra el método “*botton-up*” donde se manipulan átomos individuales para generar arreglos o conglomerados de ellos lográndose así dimensiones más pequeñas que por el método “*top-down*” (Mazo-Zuluaga, 2011). Entre sus técnicas se encuentran: síntesis química, métodos coloidales, reducción fotoquímica y radioquímica, microondas, dendrímeros, el método sol-gel, entre otros (Zanella, 2012).

El autoensamble y autorganización de las nanopartículas se da de manera espontánea, por lo que no existe un control sobre la formación de los cristales; obteniéndose estructuras amorfas con baja cristalinidad y tamaños no uniformes, perdiendo algunas características deseables. Los principales

inconvenientes de estas técnicas son el costo, el gasto de energía y de reactivos (Mazo-Zuluaga, 2011).

Es por esto que se ha optado por buscar otros métodos que permitan mejores resultados y reduzcan los enormes costos, a la par de la búsqueda del perfeccionamiento de estas técnicas.

1.5.2 Métodos Microbiológicos

Existe otra manera de obtener nanopartículas de óxidos de hierro y es mediante el uso de microorganismos que son capaces de producir nanopartículas por un proceso conocido como biomineralización (proceso por el cual los seres vivos producen minerales). Esta biomineralización ocurre como resultado de la actividad celular donde por cambios fisicoquímicos se produce la nucleación y posteriormente el crecimiento del núcleo formado sobre una superficie (pared celular, membranas) que actúa como núcleo de cristalización (Pérez-González *et al.*, 2004).

Los microorganismos pueden producir nanopartículas de dos formas diferentes: por mineralización inducida biológicamente y/o por mineralización controlada biológicamente (Lowenstam, 1998; Bazylinski, 1999).

1.5.2.1 Mineralización Inducida Biológicamente

En la BIM, la biomineralización ocurre extracelularmente como resultado de los procesos metabólicos del organismo y reacciones químicas subsecuentes. En muchos casos, los organismos secretan uno o más productos metabólicos que reaccionan con iones o compuestos específicos en el medioambiente externo, resultando en la producción de partículas minerales extracelulares (Frankel y Bazylinski, 2003). En la figura 6 se observan cristales de hematites extracelulares producidos por *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1.

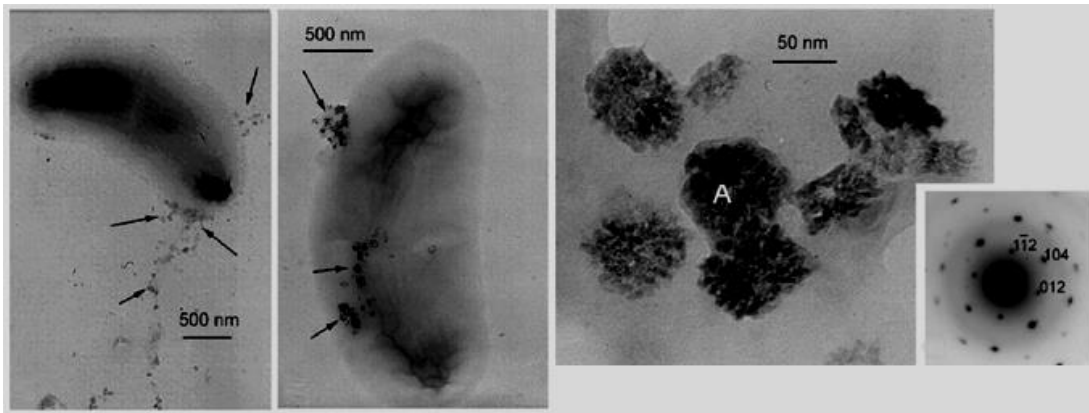


Figura 6. Cristales de hematites extracelulares producidos por *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 (tomada de Pósfai, 2006).

La mineralización es una consecuencia no deseada e incontrolada de las actividades metabólicas. Los minerales formados se caracterizan por su pobre cristalinidad, poseen una amplia distribución de tamaño de partícula y carente de morfologías cristalinas específicas. La falta de control sobre la mineralización a menudo resulta en una especificidad mineral disminuida y/o la inclusión de impurezas en las partículas. Las mismas partículas pueden ser producidas

químicamente con las mismas características cristalológicas (Frankel y Bazylinski, 2003).

En algunos casos, los productos metabólicos difunden y los minerales se forman a partir de la solución. Sin embargo, las superficies bacterianas tales como las paredes celulares o materiales poliméricos (exopolímeros) exudados por bacterias, incluyendo lodos, envolturas, o biopelículas, e incluso esporas inactivas, pueden actuar como sitios importantes para la adsorción de los iones y minerales de nucleación y el crecimiento de los cristales (Beveridge, 1989; Konhauser, 1998; Banfield y Zhang, 2001; Bäuerlein, 2003). En ocasiones para formar los minerales se necesita de la participación de más de una bacteria, ya sea de la misma especie o de especies diferentes (consorcio microbiano), las cuáles son capaces de liberar al medio diferentes tipos de iones o compuestos que interactúen entre sí y formen el mineral.

BIM es especialmente significativa para las bacterias en los hábitats anaerobios, incluidos los lugares profundos del subsuelo, o en las interfaces óxica-anóxicas. Esto es debido a que bajo condiciones anaeróbicas, muchas bacterias respiran con sulfato y/o varios metales como el hierro que actúan como aceptores finales de electrones en la cadena de transporte de electrones. Los productos metabólicos de estas reducciones, por ejemplo, los iones de

metales reducidos y sulfuro, son reactivos y participan en la formación posterior de los minerales (Frankel y Bazylinski, 2003).

A la fecha, se han obtenido varios minerales de hierro por este medio, se muestran algunos ejemplos en la tabla 2.

Tabla 2.- Algunos minerales de hierro inducidos biológicamente (modificada de Frankel y Bazylinski, 2003).

Fórmula química	Nombre del mineral
Fe(OH)_3	Hidróxido férrico
$2\text{Fe(OH)}_3 \cdot \text{Fe(OH)}_2$	Óxido verde
$\alpha\text{-FeO(OH)}$	Goetita
$\gamma\text{-FeO(OH)}$	Lepidocrocita
$5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Ferrihidrita
Fe_3O_4	Magnetita
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maghemita
FeCO_3	Siderita
$\text{FePO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Fosfato férrico hidratado
FeS	Mackinawita
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Melanterita
Fe_3S_4	Greigita
FeS_2	Pirita
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Hematites

1.5.2.2 Mineralización Controlada Biológicamente

En la BCM el organismo tiene un control significativo en el proceso de nucleación y crecimiento de los cristales, por lo que las nanopartículas (minerales) formadas suelen tener tamaños iguales y morfologías regulares cristalinas adecuadas para su empleo en la nanotecnología (Bazylinski, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la magnetita es un óxido de hierro de gran importancia. Existe un grupo de microorganismos capaces de producir magnetita intracelularmente y han sido de gran relevancia, ya que los cristales de magnetita que producen, además de ser nanopartículas monodominio (debido a su tamaño de 20-120 nm); se encuentran recubiertos por una membrana lipoproteica que les da características únicas comparadas con los obtenidos por otros métodos.

Entre estas características está su gran relación superficie-volumen (Schüler y Heyen, 2003) su fácil dispersión en soluciones acuosas (Matsunaga *et al.*, 2005), y su compatibilidad biológica, por lo que mejoran las utilidades de la magnetita obtenida por otros métodos reduciendo así los costos. Ejemplos de estos son la inmovilización de compuestos bioactivos para tratamiento de enfermedades (Schüler y Heyen, 2003), y la inmovilización de anticuerpos, enzimas o moléculas de DNA sobre su propia para poder utilizarse en análisis cuantitativo (Ortega, 2006). Su utilización también ha sido adaptada, en el diseño de biosensores para el análisis electroquímico de DNA, además de las mismas aplicaciones de la magnetita sintética (Ortega, 2006)

1.6 Bacterias Magnetotácticas

Las bacterias magnetotácticas son organismos capaces de desplazarse siguiendo las líneas del campo geomagnético de la Tierra. Esta capacidad de

orientación está dada por los magnetosomas; que constan de una membrana lipoproteica la cual recubre cristales de magnetita (Fe_3O_4) y/o greigita (Fe_3S_4) de tamaño nanométrico (20-120 nm) (Blakemore, 1975) (figura 7).

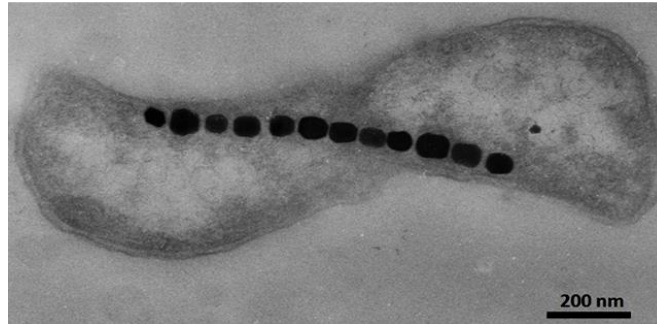


Figura 7. Micografía de una bacteria magnetotáctica

Los magnetosomas poseen un dominio magnético único, y la suma de sus dominios magnéticos convierte a las células en un dipolo permanente sometido a la influencia de cualquier campo magnético (Madigan *et al.*, 1975). Al orientarse con las líneas del campo geomagnético de la Tierra pueden desplazarse hacia arriba/abajo en una columna de agua hasta encontrar las condiciones adecuadas para su crecimiento, a este comportamiento se le conoce como magnetoaerotaxia (Bazylinski, 1999).

Generalmente, las bacterias productoras de magnetita se ubican en la zona de transición óxica-anóxica (ZTOA) de los cuerpos de agua donde las concentraciones de oxígeno son bajas, mientras que las productoras de greigita se encuentran por debajo de ésta, en la zona anaerobia de una columna de

agua. La ZTOA se encuentra en la interfase agua/sedimento o cerca de ésta (Simmons *et al.*, 2004; Shüler y Bazylinski, 2009).

La magnetoaerotaxia les da una ventaja de ubicación con respecto a las demás bacterias, ya que al ser influenciadas por los campos magnéticos, sólo se desplazan bidimensionalmente (arriba o abajo), mientras que las demás bacterias tienen que desplazarse en todas direcciones para encontrar sus condiciones adecuadas de crecimiento (Bazylinski *et al.*, 2006). En la figura 8 se muestra donde se ubica la ZTOA y cómo se orientan y migran las BMT.

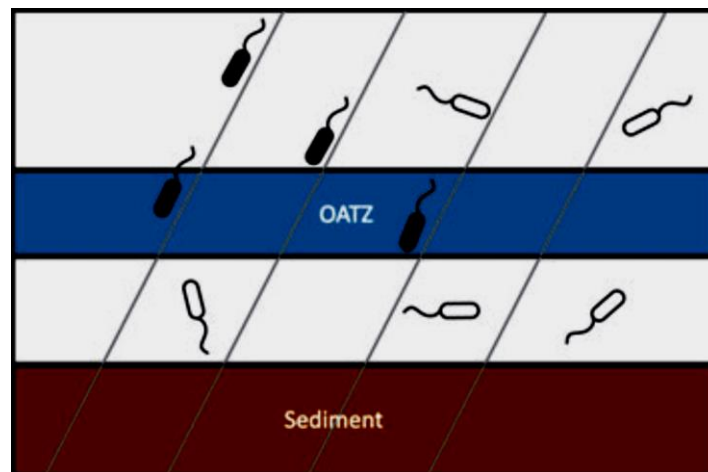


Figura 8.- Modelo esquemático de la magnetoaerotaxis.

Se sabe que estas bacterias son microaerofílicas y/o anaerobias utilizando al O_2 y al nitrato como aceptores de electrones; presentan un metabolismo respiratorio; sólo bajo estas condiciones son capaces de producir los magnetosomas (Simmons *et al.*, 2004); a altas concentraciones de O_2 pierden esta capacidad (Jian-Bo *et al.*, 2008).

Estos microorganismos son muy variados tanto filogenética, morfológica como metabólicamente. Pero todas las identificadas y caracterizadas hasta ahora tienen ciertas características en común: son procariotas Gram (-), mediante estudios del RNA 16S, se ha identificado que están asociadas con varios subgrupos del Phyla *Proteobacteria* (α y γ) y el grupo *Nitrospira* (Spring *et al.*, 1993). Se desplazan por un único flagelo en cada polo de la bacteria, son microaerófilas, anaerobias, o ambas, se encuentran ampliamente distribuidas en hábitats de agua dulce y ambientes marinos, excepto en hábitats que son altamente aireados y aquellos con valores de pH <5.5 o >8.5 , poseen magnetosomas, entre otras características (Christen *et al.*, 2004; Bazylinski *et al.*, 2006).

La forma y el tamaño de los cristales de Fe_3O_4 y Fe_3S_4 en las especies de BMT parecen estar bajo control genético. La forma de los cristales de los magnetosomas incluye la forma en equilibrio de Fe_3O_4 y Fe_3S_4 , la cubo-octahédrica, y cristales elongados anisotrópicos que parecen una proyección rectangular con forma de diente o bala (figura 9). El rango de tamaño de los cristales maduros está entre 35-120 nm (Bazylinski *et al.*, 2006).

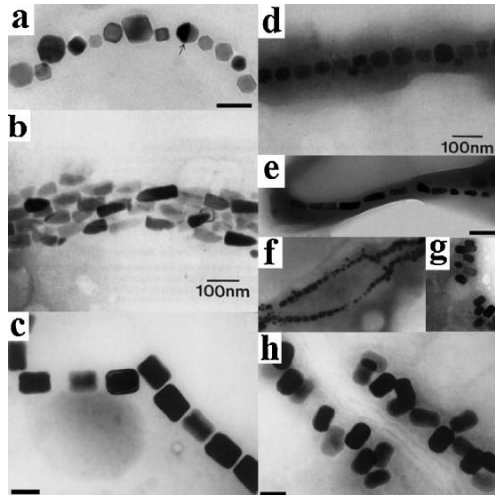


Figura 9. Diferentes tipos de magnetosomas encontrados en BMT

1.7 Producción de Magnetosomas y Biomineralización

La producción de los magnetosomas bacterianos parece ser un proceso complejo que envuelve varios pasos, los cuales incluyen la formación de la vesícula de los magnetosomas, captación de hierro por la célula, transporte de hierro hacia las vesículas de los magnetosomas y la biomineralización controlada de Fe_3O_4 y/o Fe_3S_4 dentro de las vesículas de los magnetosomas (Schüler, 1999).

El segmento genómico que contiene los genes que codifican para la mayoría de las proteínas de los magnetosomas se le denomina isla génica de los magnetosomas (MAI) (Schübbe *et al.*, 2006). Se muestra la MAI para varias especies de BMT en la figura 10.

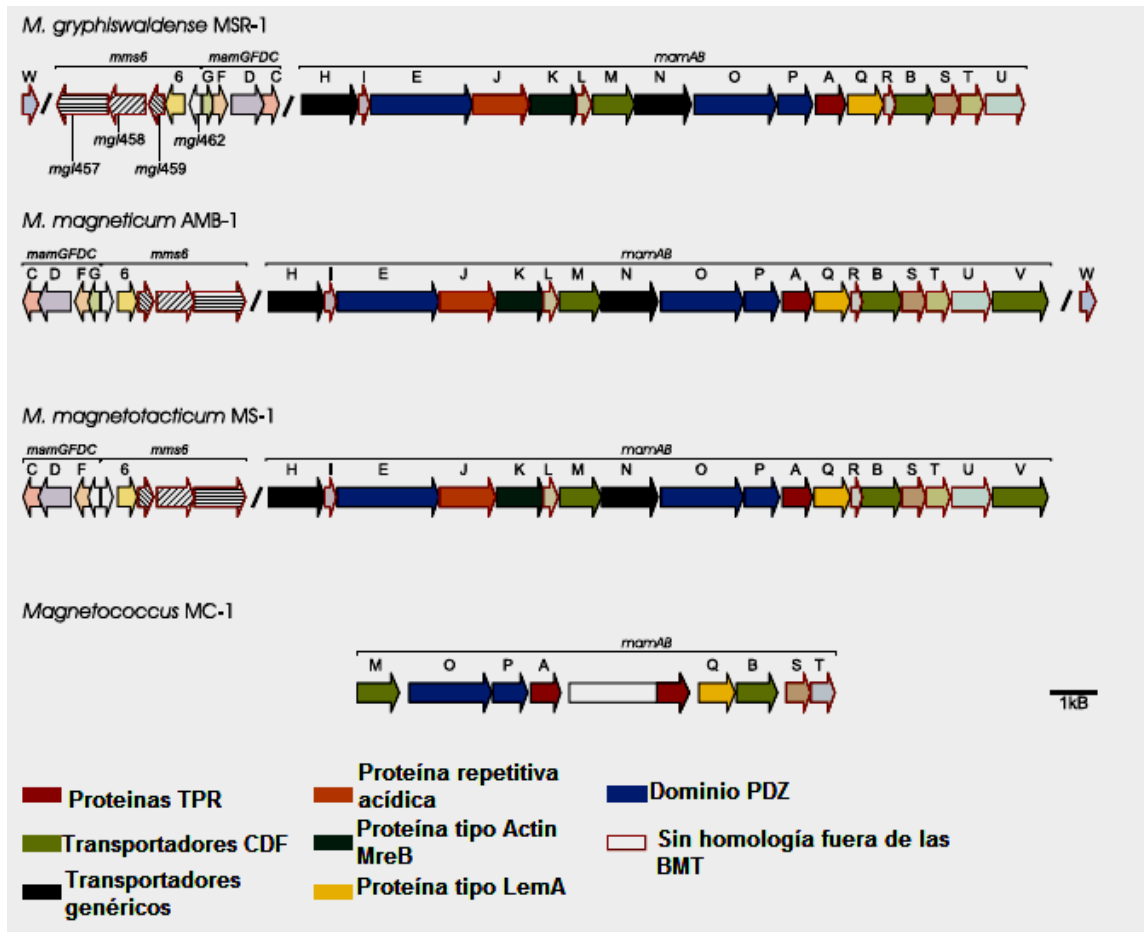


Figura 10.- Organización molecular de los genes de la MAI en diferentes bacterias (tomada de Schübbe *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que proteínas de la MAI como las Mms participan en el proceso de formación del cristal. La proteína mas estudiada es la Mms6 ya que está relacionada con la perfecta morfología del cristal (Tanaka *et al.*, 2010).

1.8 Caracterización de las BMT y de las Partículas Magnéticas

Debido a la amplia diversidad filogenética de estas bacterias, no existe un set de *primers* o sondas de hibridación específicas disponibles para estas bacterias. Se han utilizado *primers* universales para la amplificación de genes

que codifican para el RNAr 16S por PCR y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) para detectar las BMT, raras veces se han usado sondas marcadas o la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) para su detección. Sin embargo, tanto la DGGE y PCR con *primers* genéricos son ineficientes para cubrir totalmente todas las poblaciones de BMT presentes en poblaciones microbianas complejas (Shüler y Bazylinski, 2009).

Se han diseñado *primers* grupo específicos para *Magnetospirillum* pero con el crecimiento de información de las secuencias disponibles en bases de datos, se han vuelto ineficientes. La técnica FISH se ha empleado para detectar varias BMT, entre ellas a *Magnetobacterium bavaricum* (Spring *et al.*, 1993).

Utilizar *primer* o sondas específicas nos daría una gran ventaja selectiva comparada con los genéricos, ya que facilitaría su detección en poblaciones microbianas complejas sin necesidad de aislamientos tediosos.

Debido a la falta de sondas específicas para el RNAr 16S, se ha recurrido al uso de sondas de genes clave que codifican para proteínas específicas envueltas en los pasos de la biomineralización de la magnetita para detectar las BMT. Las sondas deben estar basadas en familias de genes que no estén presentes en bacterias no magnetotácticas, e idealmente que sean comunes en

todas las BMT o grupos particulares de éstas bacterias (Shüler y Bazylinski, 2009).

La morfología celular y patrones flagelares de BMT específicas pueden ser determinados usando preparaciones de tinciones negativas de células y por microscopía electrónica de transmisión. El microscopio electrónico de transmisión alcanza una gran resolución (aproximadamente 0.5 nm) al utilizar haces de electrones de longitud de onda muy corta, en lugar de luz visible (Shüler y Bazylinski, 2009).

Los magnetosomas son estructuras densas de electrones que pueden visualizarse en células sin teñir. Las características mineralógicas y cristalinas relevantes de los cristales de los magnetosomas pueden ser analizados por microscopía electrónica de alta resolución.

La identificación de cristales minerales específicos dentro de morfotipos específicos de BMT es más fácil por el uso de un análisis de difracción electrónica por área seleccionada (SAED) de partículas individuales en el microscopio electrónico de transmisión. Un espectro de rayos X elemental y mapeo celular puede ser usado para distinguir entre los cristales de óxido de

hierro y sulfuro de hierro y para determinar si los magnetosomas contienen impurezas elementales (Shüler y Bazylinski, 2009).

1.9 Técnicas de Identificación y Aislamiento

El desarrollo de estrategias de aislamiento generales es muy limitado por el hecho de que la fisiología y los requerimientos nutricionales de las BMT son muy diversos en muchos casos.

Muchas BMT pueden ser fácilmente detectadas y colectadas mediante el aprovechamiento de su migración activa y dirigida a lo largo de las líneas del campo magnético. Una técnica empleada para detectar la presencia de BMT en las muestras, es mediante la técnica de gota pendiente, de esta forma se podrá observar la movilidad de los microorganismos. Si se aplica un campo magnético externo (con un imán común), los microorganismos que presentan magnetoaerotaxis se orientarán y moverán en el sentido del campo aplicado.

Un método comúnmente usado para obtener células purificadas de BMT es a través de la técnica "*Capillary Racetrack*" desarrollada originalmente por Wolfe *et al* (1987). En la figura 11 se muestra el diagrama de la técnica:

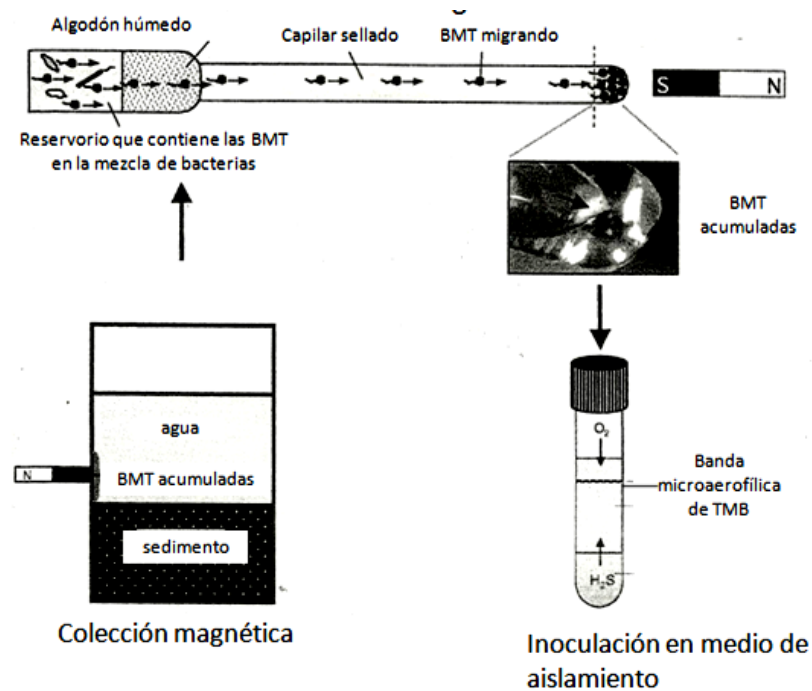


Figura 11.- Purificación magnética de BMT mediante la técnica "Capillary Racetrack".

1.10 Medios de Cultivo y Condiciones de Crecimiento

Un medio con gradiente redox de [O₂] ha sido utilizado exitosamente para el aislamiento y mantenimiento de varias bacterias, ya que permite el establecimiento de gradientes químicos que mimetizan las condiciones en aguas y sedimentos estratificados (Bazylinski *et al.*, 2006; Shüler y Bazylinski, 2009).

Se requiere añadir al medio buffers redox y agentes reductores como son el tioglicolato y el ácido ascórbico para favorecer el crecimiento de estas especies. La inclusión de resazurina, un indicador redox que es incoloro cuando está completamente reducido y color rosa cuando esta oxidada, es muy útil para

identificar la zona de crecimiento (Bazylinski *et al.*, 2006; Shüler y Bazylinski, 2009).

El tipo de fuente de hierro no es crítico, sin embargo se debe mantener soluble a pH neutro, esto se logra con la presencia de agentes quelatantes o agentes reductores en el medio. Como agente quelatante se puede utilizar el ácido quínico en forma de quinato férrico.

1.11 Antecedentes

El *primer* microorganismo magnetotáctico aislado fue *Magnetospirillum magnetotacticum* en Massachusetts en 1975, por Blakemore (Blakemore, 1975), a partir de esa fecha, se empezaron a hacer otros descubrimientos, tanto de BMT, como productoras de otro tipo de nanopartículas. En 1991 se aisló *Magnetospirillum gryphiswaldense*, una BMT, la cual ha sido la más trabajada hasta la fecha (Schleifer *et al.*, 1991). En 1993 se aisló un microorganismo *Magnetospirillum bavaricum*, capaz de producir ~1,000 magnetosomas por célula (Spring *et al.*, 1993). Se han logrado producir 7.9 mg/L (Heyen y Schüler, 2003) hasta 168.3 mg/L (Li *et al.*, 2011) de magnetosomas con la cepa de *Magnetospirillum gryphiswaldense* en diferentes trabajos y diferentes condiciones.

En cuanto a hematites, se encontró que la BMT *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 es capaz de producirlas de forma extracelular (Pósfai *et al.*, 2006). En Canadá se encontró un biofilm capaz de producir hematites y ferrihidrita en condiciones aerobias y siderita en condiciones anaerobias (Brown *et al.*, 1994). En México en el área de Cuatro Ciénegas, Coahuila se logró encontrar microorganismos capaces de mineralizar extracelularmente (Manilla *et al.*, 2011). Estos antecedentes nos sirvieron como base para el planteamiento de este proyecto de investigación.

1.12 Justificación

Como se describió anteriormente, las nanopartículas de óxidos de hierro, presentan diversas aplicaciones nanotecnológicas. También se mencionaron las dificultades que conlleva obtenerlas por métodos convencionales, como problemas con la morfología y tamaño, así como en el gasto energético y utilización de reactivos y generación de residuos tóxicos y/o peligrosos. Es por tanto necesario, buscar nuevos medios de producción de nanopartículas que sean amigables con el medio ambiente. Una alternativa a su obtención es mediante el empleo de microorganismos capaces de producir nanopartículas.

Debido a que en la naturaleza existen una gran variedad de microorganismos (y consorcios microbianos) capaces de biomineralizar, y muchos de los cuales, aún no han sido identificados, este proyecto de

investigación estuvo dirigido hacia la identificación de microorganismos capaces de biomineralizar óxidos de hierro, en cuerpos de agua existentes en la región norte del país. El propósito del proyecto fue identificar microorganismos capaces de biomineralizar, así como también caracterizar dichos minerales, con el fin de encontrarles aplicaciones útiles.

1.13 Hipótesis

La biomineralización de óxidos de hierro está asociada a la presencia de bacterias nativas en ambientes acuáticos.

1.14 Objetivos

1.14.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar bacterias productoras de nanopartículas de óxidos de hierro.

1.14.2 Objetivos específicos

- ❖ Identificar la presencia de bacterias productoras de nanopartículas de óxidos de hierro en muestras de agua (con principal interés en BMT).
- ❖ Caracterizar las bacterias morfológica y filogenéticamente.
- ❖ Caracterizar las nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y difracción de rayos X.
- ❖ Establecer condiciones de cultivo que favorezcan la producción de las nanopartículas.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras y Materiales

Muestras: las muestras fueron recolectadas de sedimentos de cuerpos de agua de diversas regiones de México, principalmente del noreste.

Materiales: se trabajó con material básico de laboratorio, como tubos, pipetas, matraces, mechero, micropipetas, etc.

2.2 Equipos

- ❖ Laboratorios de Biología Molecular y Biotecnología del CELAES, laboratorio de Difracción de Rayos X, FCQ, UANL: microscopio óptico, autoclave, balanza analítica, difractómetro de rayos X, termociclador e incubadora.
- ❖ Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Saltillo, Coahuila: microscopio electrónico de transmisión.

❖ Universidad de Santiago de Compostela e Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla, España: difractómetro de rayos X.

2.3 Metodología

Para cumplir con los objetivos indicados, la metodología se dividió en 2 etapas:

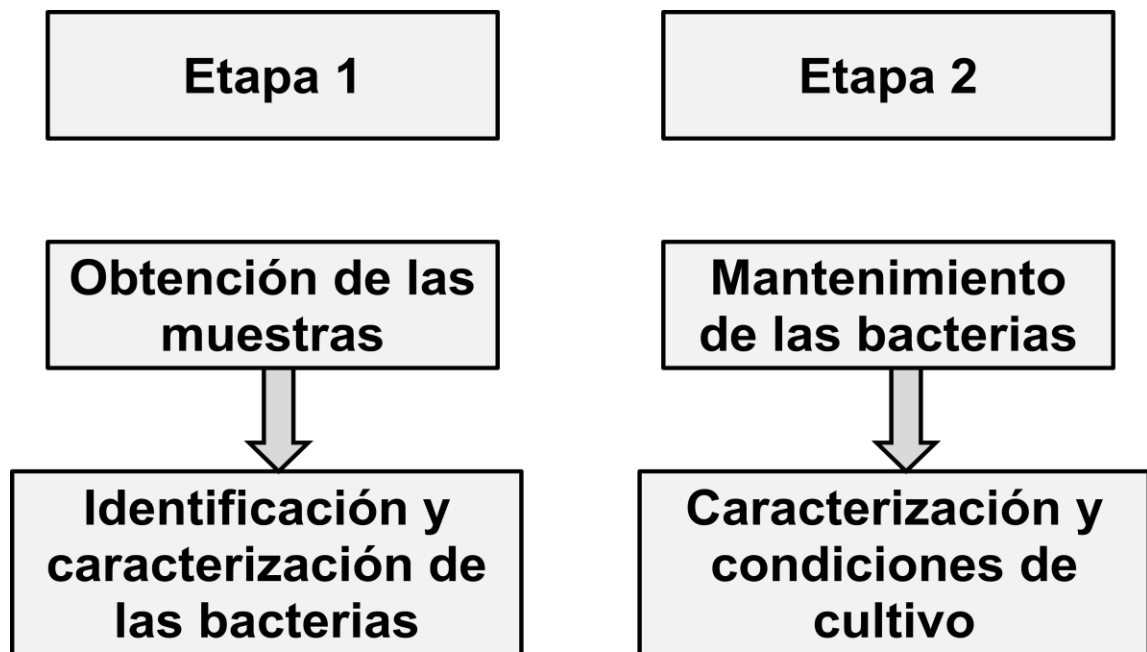


Figura 12.- Diagrama de Metodología

2.3.1 Obtención de las Muestras

Las muestras se recolectaron de diversas regiones de México. Fueron tomadas en frascos con capacidad de 500-1000 mL. El muestreo se realizó a la orilla de cuerpos de agua, a profundidades de 45-50 cm, en la interfase agua-sedimento. Se contó con 13 muestras, las cuales se muestran en la tabla 3. Las muestras de lodos activados y de Mérida nos fueron proporcionadas.

Tabla 3.- Nomenclatura de las muestras recolectadas

Muestra y letra con la que se indica:			
Cuatro Ciénegas (CC)	A	Sinaloa	H
Poza Azul, CC	B	Lodos activados (planta tratadora de agua en Monterrey)	I
Poza la Becerra, CC	C	Monterrey Centro	J
Mina Tayahua, Zacatecas	D	García,	K
Apodaca, N.L.	E	Mérida, Yucatán	L
Monterrey Pte.	F	Parras, Coahuila	M
Galeana, N.L.	G		

2.3.2 Identificación

- ❖ Se realizaron técnicas de tinción para observar la morfología de los microorganismos presentes en las muestras.
- ❖ Técnica de gota pendiente: se utilizó esta técnica con el fin de encontrar la presencia de BMT.
- ❖ Microscopía electrónica: se realizaron observaciones al microscopio con el fin de identificar la presencia de nanopartículas (después de cultivar los microorganismos presentes en las muestras, en un medio de cultivo adecuado para su crecimiento).
- ❖ PCR: se diseñaron 4 pares de *primers* que amplifican un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína Mms6, la cual participa en la formación de los magnetosomas (propios de las BMT).

2.3.2.1 Identificación por PCR

- ❖ *Primers*: en la tabla 4 se muestran las secuencias de los *primers* diseñados.

Tabla 4.- *Primers* diseñados

Cepa	Nombre	Primer	Secuencia 5' > 3'	Longitud del producto	Tm en °C
<i>Magnetospirillum magneticum</i>	pMms6a	forward	CAGATCGCCAACGGAGTTAT	400	57.77
		Reverse	TCATATACGCGTAAACCGCC		58.23
<i>Magnetospirillum magneticum AMB</i>	pMms6b	forward	AATTTGCCGACCAGATAGG	256	57.63
		Reverse	AGGTTGGAGGGCAGATTTT		58.58
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	pMms6c	forward	GCTTCGATATCACGGCTCTT	322	57.86
		Reverse	CCCTGGGTGAAATGGAACG		58.43
<i>Vibrio magnético MV-1</i>	pMms6d	forward	CCAGCTCAAGTTCTTCTTCG	200	57.83
		Reverse	GCAAGTCGCAGTAAGCAAAG		58.87

Los *primers* fueron diseñados utilizando el programa Primer3: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Se utilizó la base de datos del NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> para encontrar las secuencias que codifican para la proteína Mms6 de las BMT.

- ❖ Extracción de DNA genómico: se realizó con el kit comercial High Pure foodproof II Kit.
- ❖ Estandarización de la PCR: se estandarizaron las condiciones de la PCR para encontrar las condiciones óptimas de amplificación. Se trabajó con dos kits diferentes:
 - ❖ Condiciones de la PCR con el kit de Promega con *Gotaq® Flexi DNA polymerase* (tabla 5):

Tabla 5.- PCR por 100 μ L de reacción para el kit Promega

Primer F 5 μ M	2 μ L
Primer R 5 μ M	2 μ L
Muestra	2 μ L
Buffer 5x	20 μ L
DNTPs 10 mM	2 μ L
MgCl ₂ 25 Mm	8 μ L
Enzima 5 u/ μ L	0.5 μ L
Agua	63.5 μ L

- ❖ Condiciones de la PCR con el kit de *GenScript y Green Taq DNA Polymerase* (tabla 6):

Tabla 6.- PCR por 100 μ L de reacción para el kit GenScript

Primer F 2.5 μ M	8 μ L
Primer R 2.5 μ M	8 μ L
Muestra	3 μ L
Buffer 10x	10 μ L
DNTPs 10 Mm	2 μ L
Enzima 5 u/ μ L	1 μ L
Agua	68 μ L

- ❖ Se realizó un gradiente de temperatura (sólo con el kit de Promega) para poder determinar la temperatura óptima de hibridación de los pares de *primers*. Con el fin de ahorrar reactivos, sólo se realizó con las muestras señaladas como A y como D. Se muestran las condiciones de la PCR con el gradiente de temperatura en la siguiente tabla:

Tabla 7.- Gradiente de temperatura con los diferentes *primers*

		56.0°C	57.0°C	58.4°C	59.2°C	60.6°C
Muestra		Carriles en el gel de electroforesis				
D	pMms6d	36	37	38	39	40
	pMms6c	31	32	33	34	35
	pMms6b	26	27	28	29	30
	pMms6a	21	22	23	24	25
A	pMms6d	16	17	18	19	20
	pMms6c	11	12	13	14	15
	pMms6b	6	7	8	9	10
	pMms6a	1	2	3	4	5

Todas las PCR se realizaron a las siguientes condiciones (tabla 8):

Tabla 8.- Condiciones de PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo
Inicial	94° C	2 minutos
Ciclo (35x)	94° C	50 segundos
	57° C	45 segundos
	72° C	45 segundos
Final	4° C	1 minuto

2.3.3 Aislamiento

- ❖ Se utilizó la técnica “*Capillary Racetrack*” con el fin de aislar BMT.

2.3.4 Mantenimiento de los Microorganismos

Los microorganismos obtenidos de las diferentes muestras fueron mantenidos en un medio de cultivo que cumple con los requerimientos nutricionales. El medio de cultivo está basado en medios de cultivo para el aislamiento y mantenimiento de BMT. En este caso se emplearon como

referencia los medios: medio para el crecimiento de *Spirillum magnético* (MSGM) y el medio 2 de *Magnetospirillum* (Atlas, 1996).

Tabla 9.- Medio de cultivo empleado

Composición por litro del medio de cultivo:			
Nutriente	Cantidad	Nutriente	Cantidad
Solución de minerales	2.00 mL	Ácido tartárico	0.50 g
Solución de quinato férrico	2.50 mL	Ácido succínico	0.50 g
Solución de resazurina 0.01%	0.50 mL	NaOAc	0.50 g
KH ₂ PO ₄	0.70 g	Extracto de levadura	1.00 g
NaNO ₃	0.15 g	Agar	0.70 g
Tioglicolato de sodio	0.45 g	pH	6.85 ± 0.02

Tabla 10.- Solución de quinato férrico

Composición por 100 mL	
FeCl ₃	0.27 g
Ácido quínico	0.19 g

Tabla 11.- Solución de minerales

Composición por 250 mL	
MgSO ₄ -7H ₂ O	3.00 g
MnSO ₄ -H ₂ O	0.50 g
NaCl	1.00 g
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.10 g
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.10 g
CaCl ₂	0.10 g
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0.10 g
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.01 g
AlK(SO) ₄ -12H ₂ O	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0.01 g
Ácido nitriloacético	1.50 g
pH	6.50

2.3.5 Condiciones de Cultivo

Para encontrar las condiciones de cultivo adecuadas que favorezcan la producción de nanopartículas de óxidos de hierro, los microorganismos fueron cultivados bajo tres condiciones diferentes:

- 1) Condiciones normales de crecimiento (en el medio de cultivo de mantenimiento).
- 2) 4 veces (4x) la concentración de quinato férrico.
- 3) Atmósfera modificada de nitrógeno. La atmósfera modificada consistió en burbujear nitrógeno con el fin de desplazar el oxígeno del medio y crear condiciones anaerobias. También se utilizó 4x la concentración de quinato férrico.

Se escogieron estas condiciones de crecimiento para observar si la concentración de hierro y una atmósfera reducida (anaerobiosis) influyen tanto en la producción de las nanopartículas como en el tipo de nanopartículas que se forman.

2.3.6 Caracterización de los Microorganismos

- ❖ Sólo se realizó bajo la condición uno; ya que no se esperaba que las condiciones dos y tres tengan un efecto diferente que la condición uno, en cuanto a la morfología o el genoma de las bacterias.
- ❖ Morfológica: se realizó por técnicas de tinción de frotis de los microorganismos.
- ❖ Filogenética: se realizó conforme a la comparación del fragmento amplificado y la secuencia que codifica para la proteína Mms6.

2.3.7 Caracterización de las Nanopartículas

Fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión, análisis químico EDS, difracción de electrones y difracción de rayos X (DRX).

2.3.7.1 Microscopia Electrónica

Se tomaron alícuotas y fueron diluidas en agua desionizada para evitar observar bacterias amontonadas en el microscopio. El microscopio electrónico de transmisión es de la marca FEI modelo TITAN. El voltaje aplicado para la observación de la muestra fue de 300 Kv. El análisis químico EDS 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 pixeles. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Digital Micrograph.

Se analizaron las bacterias de las diferentes muestras, las tres condiciones de cultivo y dos blancos. Los blancos consistieron en los medios de cultivo de las condiciones de cultivo 1 y 3; esto se hizo con el fin de asegurarnos de que las nanopartículas fueran producto de los microorganismos y no como consecuencia de alguna reacción entre los componentes del medio de cultivo.

2.3.7.2 Difracción de Rayos X

Para llevarse a cabo este análisis se requirió de un litro de medio de cultivo para poder obtener una mayor cantidad de nanopartículas y que pudieran dar señal en el equipo. Sólo se analizaron las condiciones de cultivo dos y tres y los dos blancos, ya que la condición uno, tiene muy poca concentración de hierro para dar señal en el equipo. Para obtener un litro de medio de cultivo fue necesario hacer escalamientos. Las condiciones se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 12. Escalamiento de las condiciones de cultivo dos y tres.

Inóculo	Escalamiento	Quinato férrico (por litro)	Tioglicolato (por litro)
1 mL	20 mL	2.5 mL	0.45 g
5 mL	100 mL	2.5 mL	0.45 g
10 mL	250 mL	3.0 mL	0.45 g
15 mL	500 mL	3.5 mL	0.50 g
20 mL	1000 mL	5.0 mL	0.50 g
20 mL	1000 mL	10.0 mL	0.55 g

El escalamiento se realizó cada 7-10 días. Las concentraciones de hierro y tioglicolato se fueron aumentando gradualmente para que los microorganismos se fueran adaptando poco a poco al cambio. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm para precipitar las nanopartículas y se hicieron lavados con agua desionizada para eliminar las sales.

Las muestras fueron secadas y se leyeron en el difractor de rayos X.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Identificación por PCR

3.1.1 Extracción de DNA Genómico

El método aplicado para la obtención de DNA genómico aportó material genético de todas las muestras. Dicho material se obtuvo en condiciones bastante aceptables. En la figura 14 se observa un gel de electroforesis de agarosa con la banda del DNA genómico de algunas de las muestras extraídas, en todos los carriles se puede observar el barrido característico asociado a una muestra de DNA de tipo genómico.

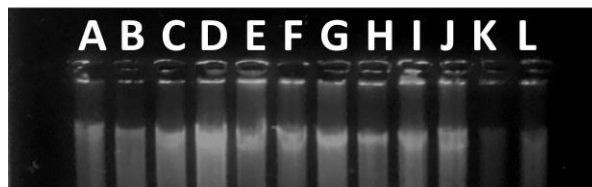


Figura 14.- Gel de agarosa al 1.0% del DNA total extraído de las muestras (muestras A-L indicadas en metodología).

3.1.2 Estandarización de la PCR

La muestra A presentó amplificación con el par de *primers* pMms6b, mientras que la muestra D presentó amplificación con los pares de *primers* pMms6b y pMms6d. Ambos resultados se muestran en la siguiente figura del gel de agarosa:

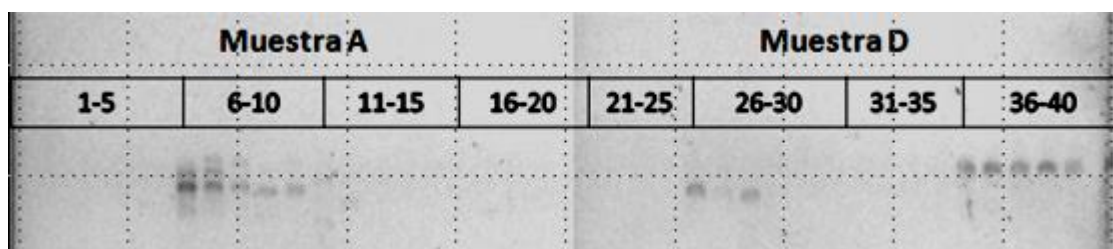


Figura 15.- Gel de agarosa al 2% del gradiente de PCR realizado a las muestras A y D.

Se seleccionó la temperatura de 57°C como la temperatura de alineación de *primers*, ya que a este valor de temperatura se observa una banda con mayor intensidad en el caso de los dos pares de *primers*.

3.1.3 Muestras Positivas a la PCR Realizadas a los Microorganismos de las Muestras

Se corrieron geles de agarosa con los diferentes productos obtenidos de la PCR con los diversos pares de *primers* para observar su amplificación. Las muestras que resultaron positivas, se corrieron en un solo gel de agarosa junto con un marcador para comprobar la longitud del amplicón generado. En la figura 16 se muestran las bandas correspondientes a la amplificación en las muestras positivas a la PCR.

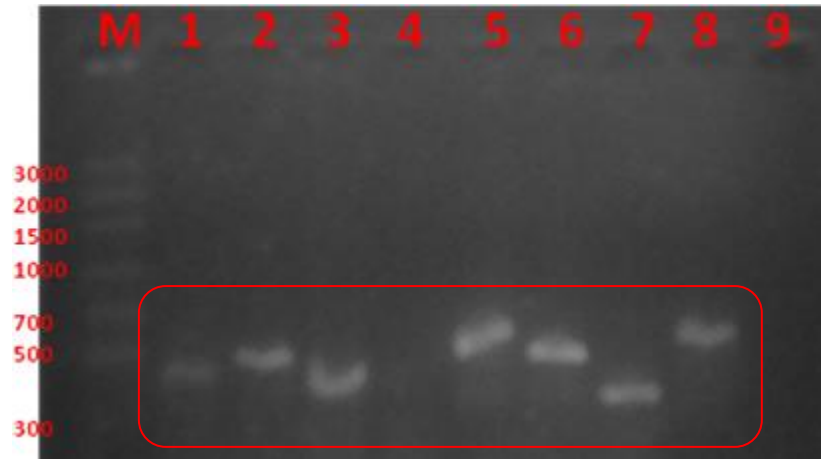


Figura 16.- Gel de agarosa al 2% de PCR de muestras positivas: 1) Cuatro Ciénegas. 2) Poza Azul. 3) Zacatecas. 4) Apodaca. 5) Monterrey Pte. 6) Galeana. 7) Lodos Activados. 8) Monterrey Centro.

Las bandas generadas por la PCR se presentan en longitudes que van desde los 300 pares de bases hasta 700 pares de bases, aproximadamente; y corresponden en lo general con los tamaños de banda de amplificación esperados.

3.2 Tinción Gram de las Muestras Positivas a la PCR

Mediante el análisis por microscopía óptica, de muestras de agua que resultaron positivas en el cribado por PCR, se observó la presencia de una gran variedad de microorganismos, entre ellos: estreptobacilos y diplobacilos, bacilos cortos y largos, espirilos y cocos. En la figura 17 se pueden observar imágenes de la tinción de Gram de las bacterias encontradas. La mayoría de ellas revelaron ser del tipo Gram (-).

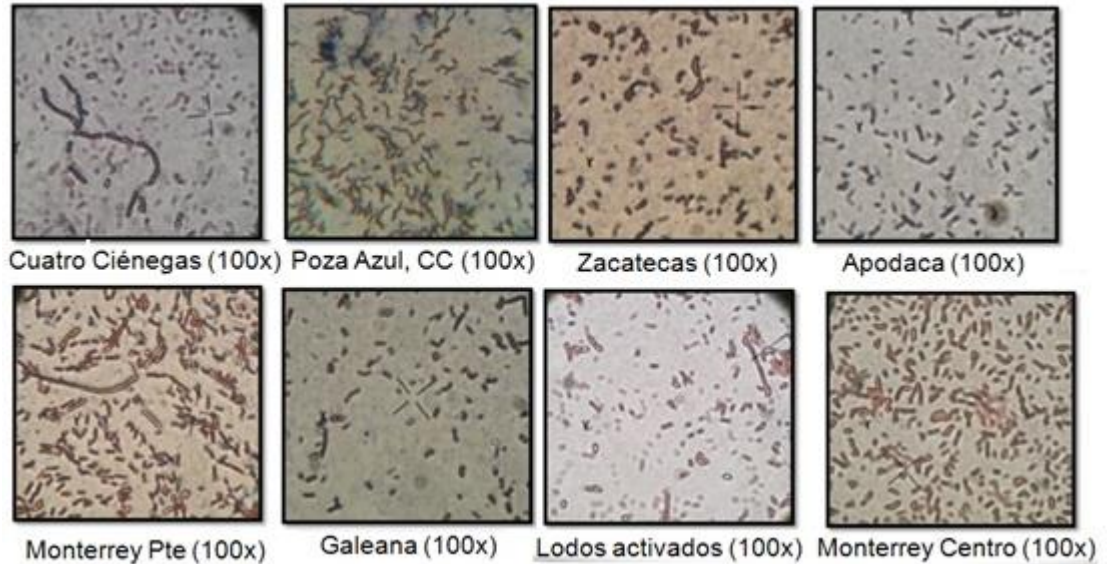


Figura 17.- Tinciones Gram de las muestras positivas a PCR. La procedencia de cada una de las muestras se indica en la parte inferior de cada una de las tinciones.

3.3 Identificación por Gota Pendiente

El análisis microscópico mediante la técnica de la gota pendiente se realizó a todas las muestras, tanto en las que fueron positivas a la PCR como a los que no. En todos los casos se observó la movilidad de los microorganismos en distintas zonas de la gota. Al acercar el magneto a la preparación, en ninguno de los casos se observó influencia alguna del campo magnético, ya que todos los microorganismos se movían aleatoriamente y no en dirección del campo magnético aplicado. Se utilizaron tanto imanes de neodimio, como imanes comunes, con la intención de probar la influencia de la intensidad del campo magnético, sin embargo los microorganismos presentaron movimientos aleatorios en ambos casos.

La figura 18 representa una secuencia de imágenes de video grabado durante la aplicación de un campo magnético externo. Aunque no es posible concluir que las bacterias respondan a la aplicación directa e inmediata de la influencia del campo magnético externo, se aprecia una evidente acumulación de microorganismos en la orilla de la gota.

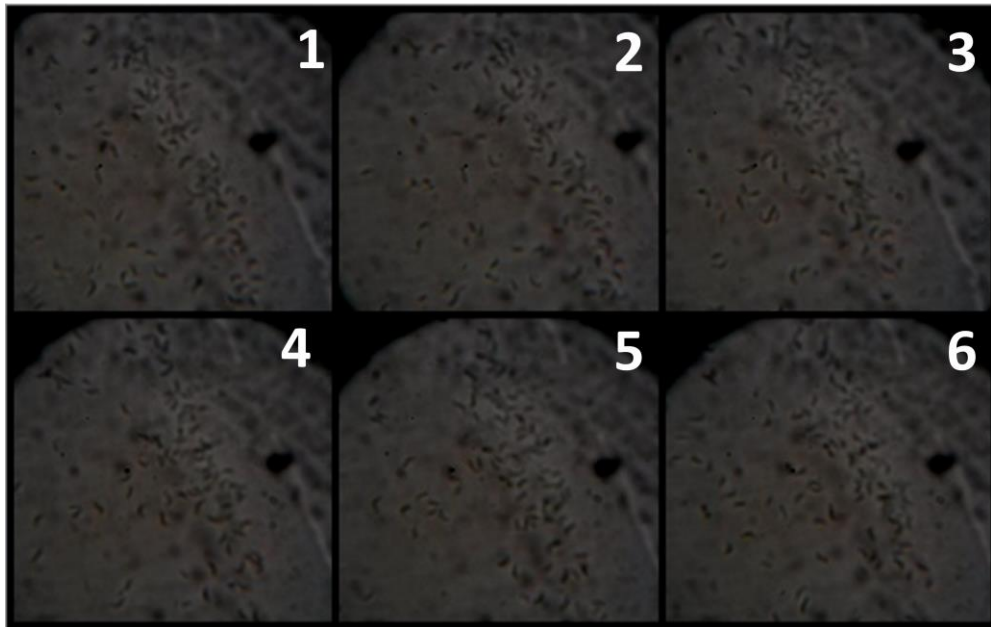


Figura 18.- Secuencia fotográfica de un video de gota pendiente durante la aplicación de un campo magnético externo.

3.4 Identificación y Caracterización por Microscopía Electrónica

Se observaron las diferentes muestras positivas a la PCR por TEM. Se encontraron diversos tipos de microorganismos con diferente morfología, entre ellas cocos y espirilos.

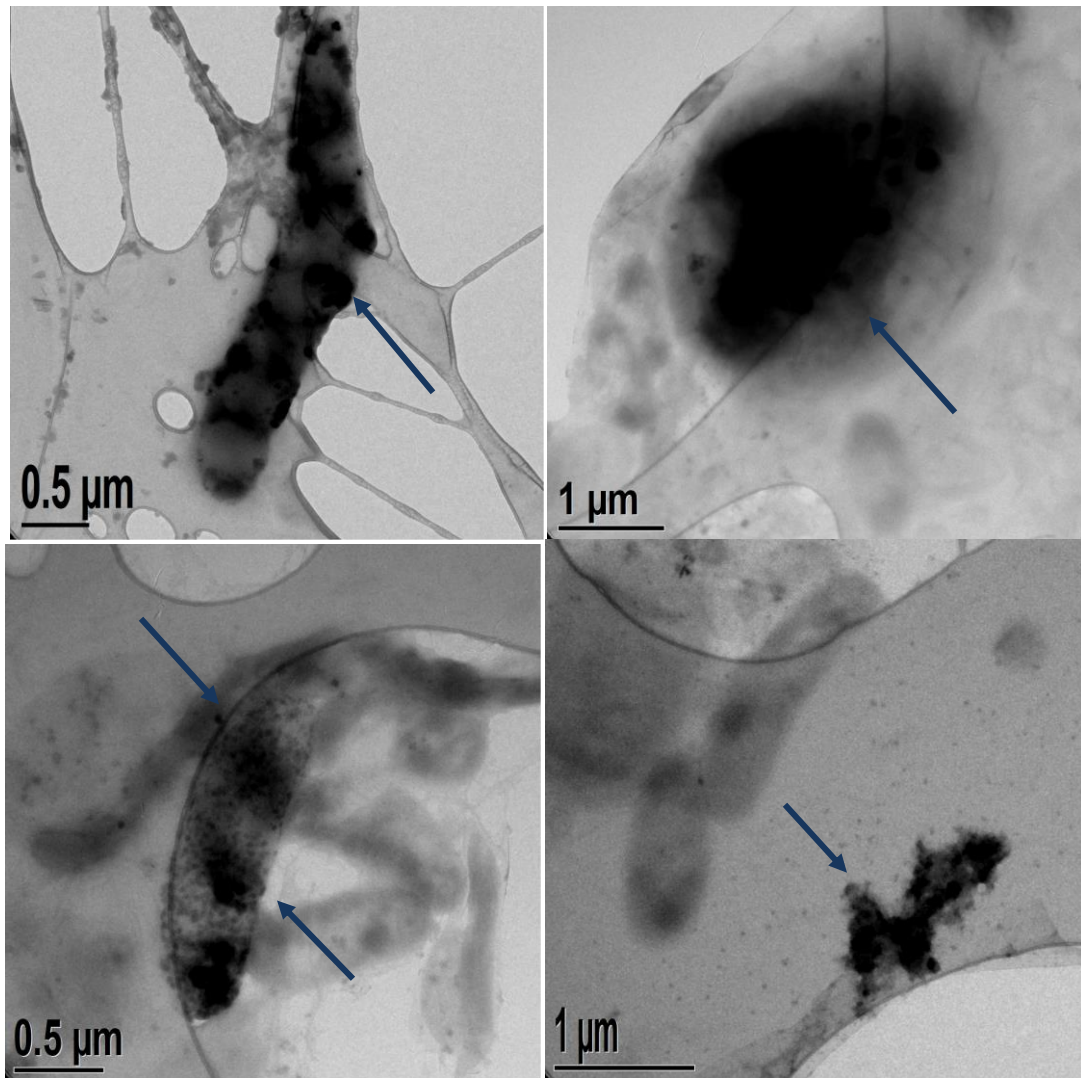


Figura 19.- Micrografías de muestras analizadas por TEM mostrando diferentes formas bacterianas. Las flechas indican zonas con posibles estructuras cristalinas asociadas o no a bacterias.

En la figura 19 se presentan cuatro micrografías donde se observaron estructuras cristalinas aparentemente asociadas a los microorganismos. Las flechas indican algunos sitios donde se observan estas estructuras cristalinas que se muestran asociadas o no al cuerpo de la bacteria.

3.4.1 Difracción de Electrones

En la muestra que corresponde a la Poza Azul se encontró la presencia de estructuras cristalinas asociadas a microorganismos (figura 20a). Se observaron anillos en la imagen de difracción de electrones, lo que indica que es un material policristalino (figura 20b). Se calcularon las distancias interplanares de los cristales y se estableció que coinciden con las distancias interplanares de hematites. Se anexan los índices de Miller correspondientes a los planos (018), (024), (110), (104) y (012) de hematites (figura 20b).

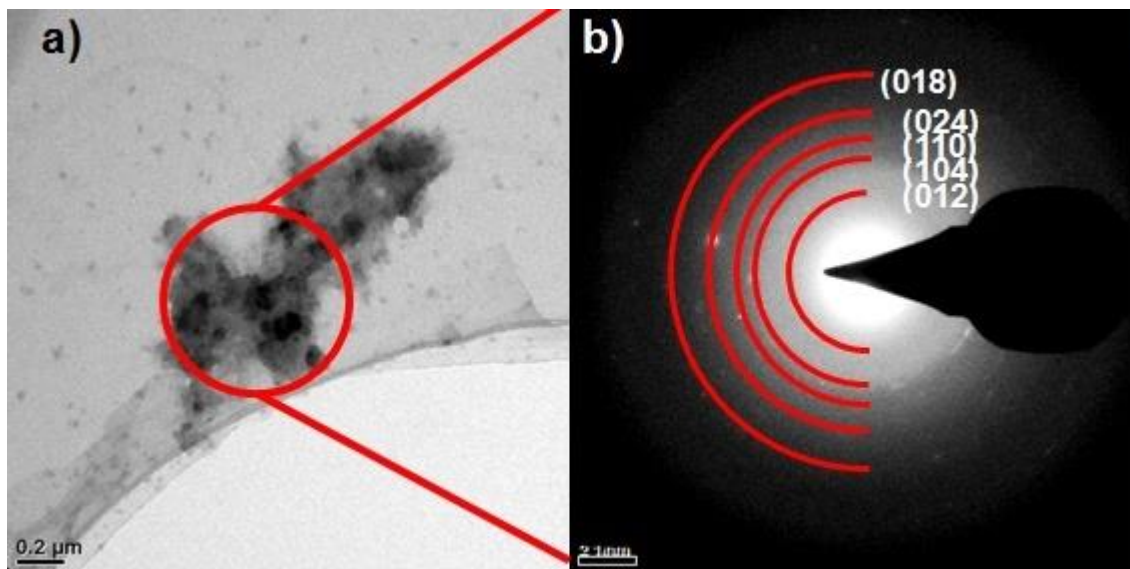


Figura 20.- Difracción de electrones de la muestra de Poza Azul. A) Microorganismo con estructuras asociadas. B) Difracción de electrones del microorganismo.

En la figura 21a se muestra una micrografía de otra sección de la muestra de Poza Azul donde se observaron cristales con un tamaño aproximado de 50 a 100 nm.

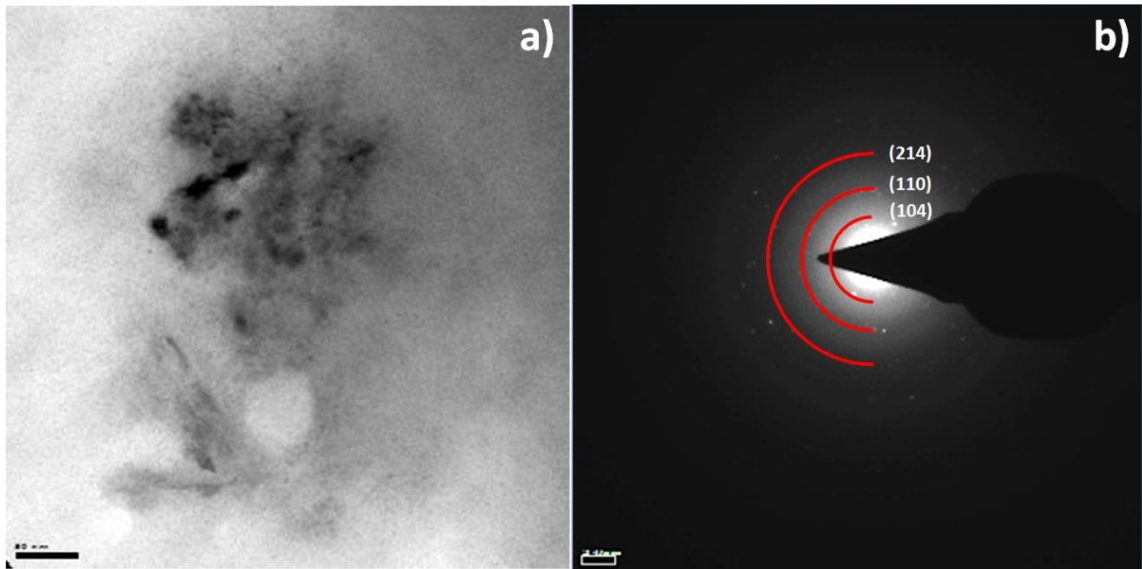


Figura 21.- Difracción de electrones de la muestra de Poza Azul. A) Micrografía B) Difracción de electrones de esa región.

En la imagen 21b se muestra la difracción de electrones de esta muestra donde se encontraron puntos de difracción asociados a la fase de hematites con distancias interplanares de 0.2700, 0.2591 y 0.1485 nm correspondientes a los planos (104), (110) y (214) respectivamente.

En la figura 22a, se muestra otra micrografía de alta resolución de la muestra de Poza Azul, en la que se observa material nanoestructurado de un tamaño de 20 nm, se observó que presenta una distancia interplanar que corresponde a 2.5 Å (figura 22b) en congruencia con el plano (110) de la hematites. En la imagen 22c se muestra la transformada de Fourier (FFT) para esta imagen la cual corresponde al plano 110.

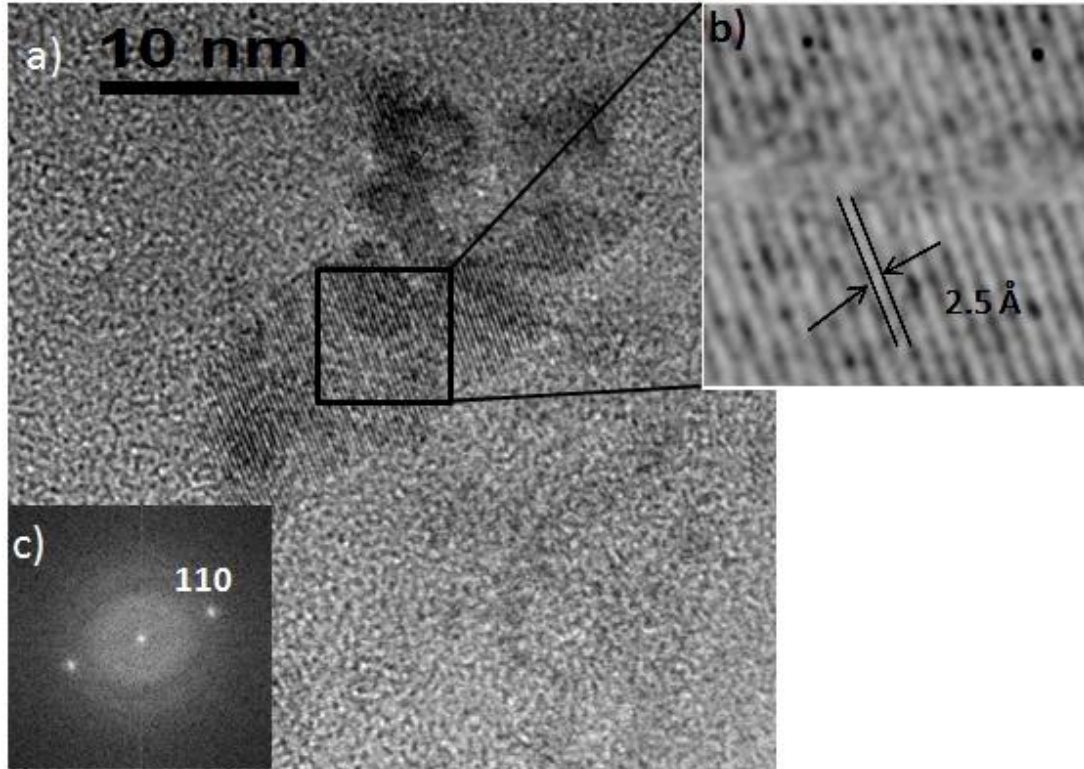


Figura 22.- Micrografía de las nanopartículas. A) Nanopartículas B) Distancia interplanar C) Difracción de electrones de las nanopartículas.

3.5 Secuenciación de Producto de PCR

La secuenciación del producto de la PCR de la muestra de Poza Azul fue elegida para dicho análisis debido a que en ella se encontraron nanopartículas de hematites. El par de *primers* que amplificó la muestra de Poza Azul fue pMms6a.

Secuencia amplificada en dirección 5' > 3':

(CAGATCGCCAACGGAGTTAT)GCTGGAAGTGTTGGCTGACAGTATCAATGA
AAAGGCGATTGACACGATTGGTGATAACATTCTTGAAGTTGACGATAGTTTG

GCTATATATGAAGAATATATAAATAAAAATTAAGGAAATGGTGTAAATATAATGG
AAAATAAATTGCCGTTAAGGATAGCAAATATACTAATCAATGCATTAAAGGG
TGGTGTTCGTTCCCCGCATAGGACTTGAATACATTACCGTAGGGCGAACACA
GGAAATCGCAGCGATTTTACATGATATTGAAATGATTGAGGATGGAAGTGC
TTCTTTTCGATTTATTGTTGGGAAGTATGGCAGCGGTAAGAGCTTTTTACTT
CAAACCATACGCAATTATGCGACTGCAAAGGCTTTGCTGTGGTTGATGCT
GACCTTCCCCTGAGC(GGCGGTTTACGCGTATATGA)

Longitud del fragmento: 448 pares de bases. Las bases entre paréntesis corresponden a los *primers* empleados.

Se comparó con la secuencia de DNA que codifica para la proteína Mms6 de *Magnetospirillum magneticum* con el fin de encontrar similitudes.

Ésta es la secuencia de la proteína Mms6 amplificada con los pares de *primers* Mms6a. Dirección 5' > 3':

(CAGATCGCCAACGGAGTTAT)TTGCCCCCCAGGGGCCCGGCCGGAACCA
AGGCCGCCGCCGCCATGGGCGAGATGGAGCGCGAGGGCGCCGCCGCCA
AGGCCGGGGCTGCCAAGACGGGCGCCGCCAAGACCGGAACCGTCGCCAA
GACCGGCATCGCCGCCAAGACGGGTGTTGCCACCGCCGTTGCCGCTCCG
GCGGCTCCTGCCAATGTTGCCGCCGCCAGGGCGCCGGGACCAAGGTCCG
CCCTTGGCGCGGGCAAGGCCGCCGCCGGTGCCAAGGTCTCGGTGGAAC
CATCTGGACCGGTAAGGGGCTGGGCCTCGGTCTGGGTCTCGGTCTGGGC

GCGTGGGGGCCGATCATTCTCGGCGTTGTTGGCGCCGG(GGCGGTTTACG
CGTATATGA)

Longitud del fragmento: 400 pares de bases. Las bases entre paréntesis corresponden a los *primers* empleados.

Se compararon las dos secuencias utilizando los programas ClustalW, CodonCode Aligner y Blast (de la base de datos del NCBI) para encontrar alguna relación entre las secuencias, sin embargo no se encontraron similitudes significantes. Sólo hay coincidencia en la zona de los *primers*. También se ingresó la secuencia en la base de datos del NCBI para compararla con todas las secuencias de DNA dadas de alta, sin embargo tampoco se encontró relación alguna, solo la zona de los *primers* que coincide con la bacteria *Magnetospirillum magneticum*.

En la figura 23 se muestra parte de la comparación de las secuencias realizada con el programa CodonCode Aligner. Se observa similitud sólo en la zona de los *primers*.

Magnetospi	AGATCGCCCAACGGAGTTATTT---GCCCCCGGGGCCCGGCCGAAACCAAGGCCCGCCCGC@ATGGGGA@A-----TGGAGC@CGA									
Poza Azul	AGATCGCCCAACGGAGTTATGCTGGAAGTGTGGCTGACAGTATCAATGAAAAGGCCATTGACAC@ATTGGTGATAACATTCTTGAACTTGAC									
Contigl:	AGATCGCCCAACGGAGTTATKVTGGEMSYSYVGGF@MCM@SKRYCR@EM@MAAGGC@RYVGM@KRC@ATGGYGA@AACATTCTKGA@K@YGA@									
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Magnetospi	--CCTCG@TCTGG@TCTCG@TCTG@G--CGC@T@G@GG@CC@GATCATTCTCG@CG@T@G---TTGGC@C@GG--GCG@TTTAC@CG@TATATGA									
Poza Azul	TACTTCAAA@CCATAC@G@AATTATG@GAC@G@CAAAA@GG@CTTT@G@T@T@G@T@G@TGACCTTTC@CTG@G@CG@CG@TTTAC@CG@TATATGA									
Contigl:	T@CYT@R@N@CYR@R@SYM@R@T@T@G@G@C@T@C@R@R@G@G@Y@R@Y@T@K@T@Y@R@Y@TGACCTTTC@C@T@G@G@CG@G@TTTAC@CG@TATATGA									
	360	370	380	390	400	410	420	430	440	

Figura 23.- Comparación de secuencias.

3.6 Caracterización de los Medios de Cultivo

Se analizaron los dos blancos con el fin de encontrar la presencia de nanopartículas de óxidos de hierro o microorganismos. En la figura 24a se muestra una micrografía a bajos aumentos del medio de cultivo de mantenimiento en el cual se pueden apreciar contrastes de grises del material analizado. En la figura 24b se muestra la imagen de medio de cultivo de la condición de cultivo 3 (atmósfera modificada y 4x de quinato férrico). Además se realizó una difracción de electrones de esta zona, en la figura 24c podemos observar que no presenta halos de difracción o puntos brillantes que indiquen la presencia de material cristalino. No se observó presencia de microorganismos ni tampoco se observaron cristales en el análisis por TEM.

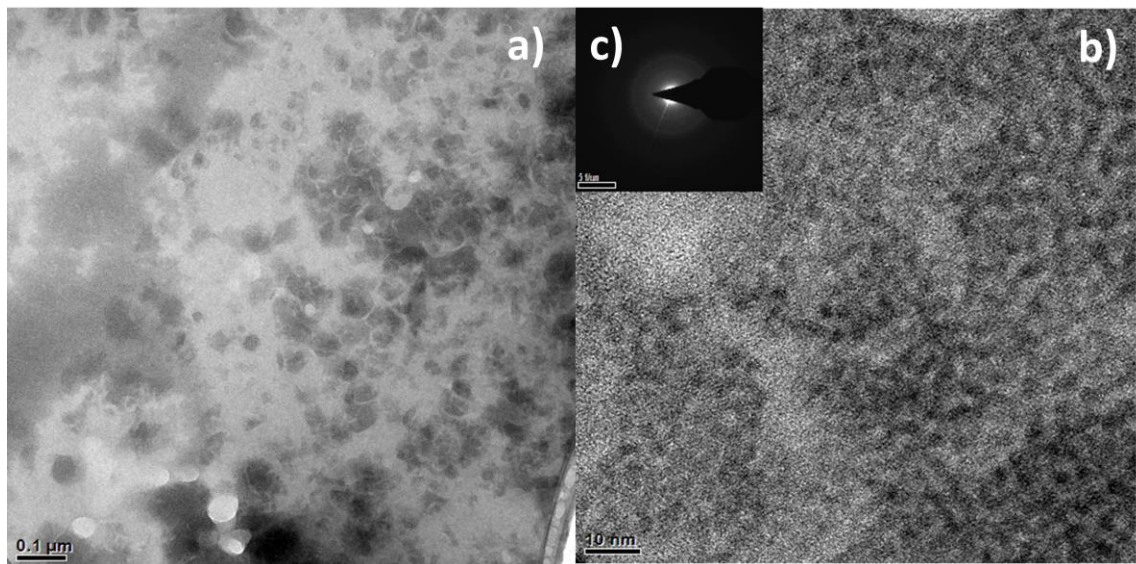


Figura 24.- Micrografías A) Micrografía del medio de cultivo de mantenimiento B) Micrografía de medio de cultivo de la condición de cultivo 3 C) Difracción de electrones.

Se realizó un análisis EDS del medio de cultivo de la condición de cultivo 3 (figura 25) donde se aprecia la señal del Cu proveniente de la rejilla donde se

depositó la muestra, además de señal de K del medio de cultivo, no se aprecia la presencia de Fe.

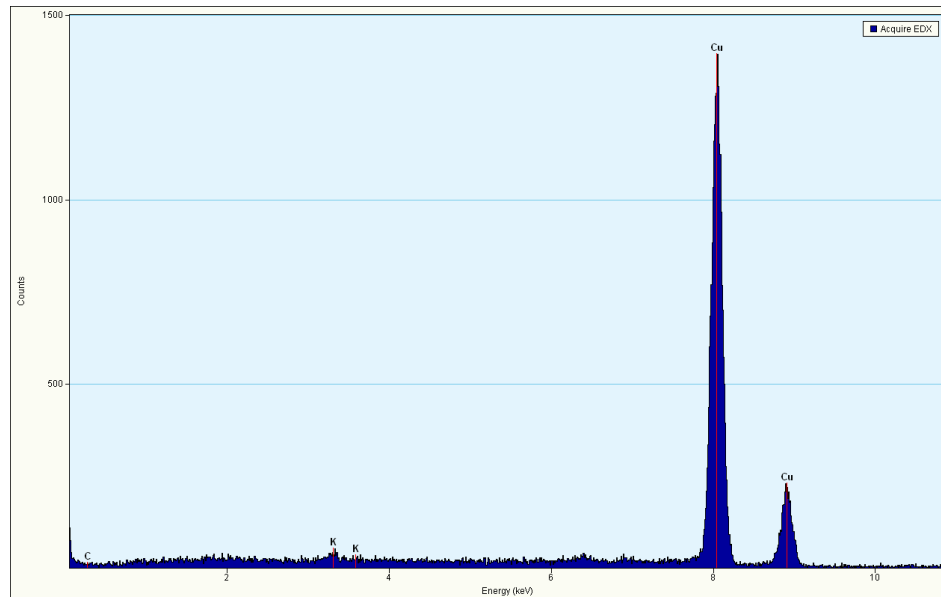


Figura 25.- Análisis EDS del medio de cultivo de la condición de cultivo 3.

También se realizaron análisis por DRX de los medios de cultivo, en la figura 26 se presenta la caracterización por DRX de los blancos. En los difractogramas se contrastó contra los posibles óxidos de hierro (hematites, acaganeíta y lepidocrocita) y se comprobó que no se forman en ninguno de los medios de cultivo. Se aprecian picos de difracción con muy poca intensidad, probablemente provenientes de las sales del mismo medio.

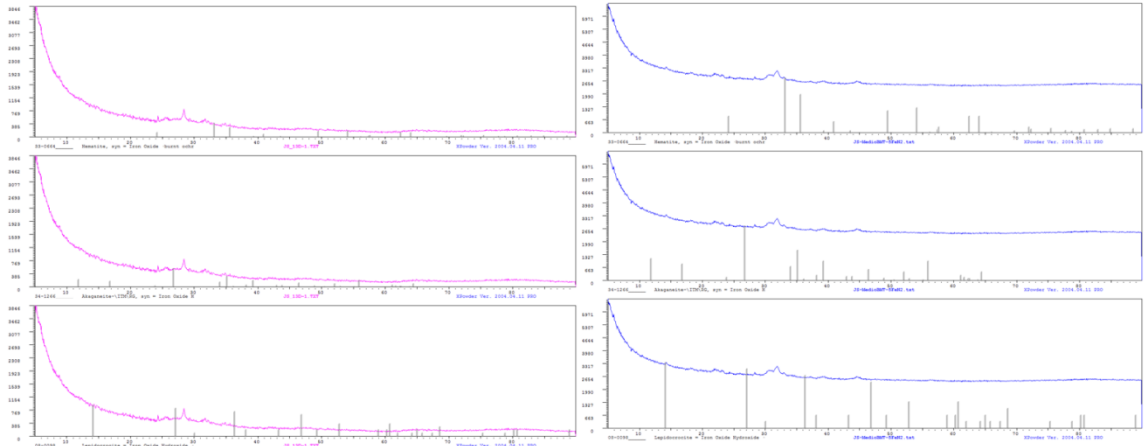


Figura 26.- Difractograma de los blancos de las condiciones de cultivo 1 (izquierda) y 3 (derecha) contrastados con hematites, acaganeíta y lepidocrocita.

3.7 Caracterización de las Condiciones de Cultivo

3.7.1 Condición de Cultivo 2

En la figura 27 se presenta la caracterización por DRX realizada a las bacterias crecidas en la condición de cultivo 2. En el difractograma se observa material amorfo. Se contrastó contra los posibles óxidos de hierro (hematites, acaganeíta y lepidocrocita) y se comprobó que no se encuentran en este medio de cultivo en concentraciones mayores del 5% que es el límite de detección de la técnica de caracterización por DRX.

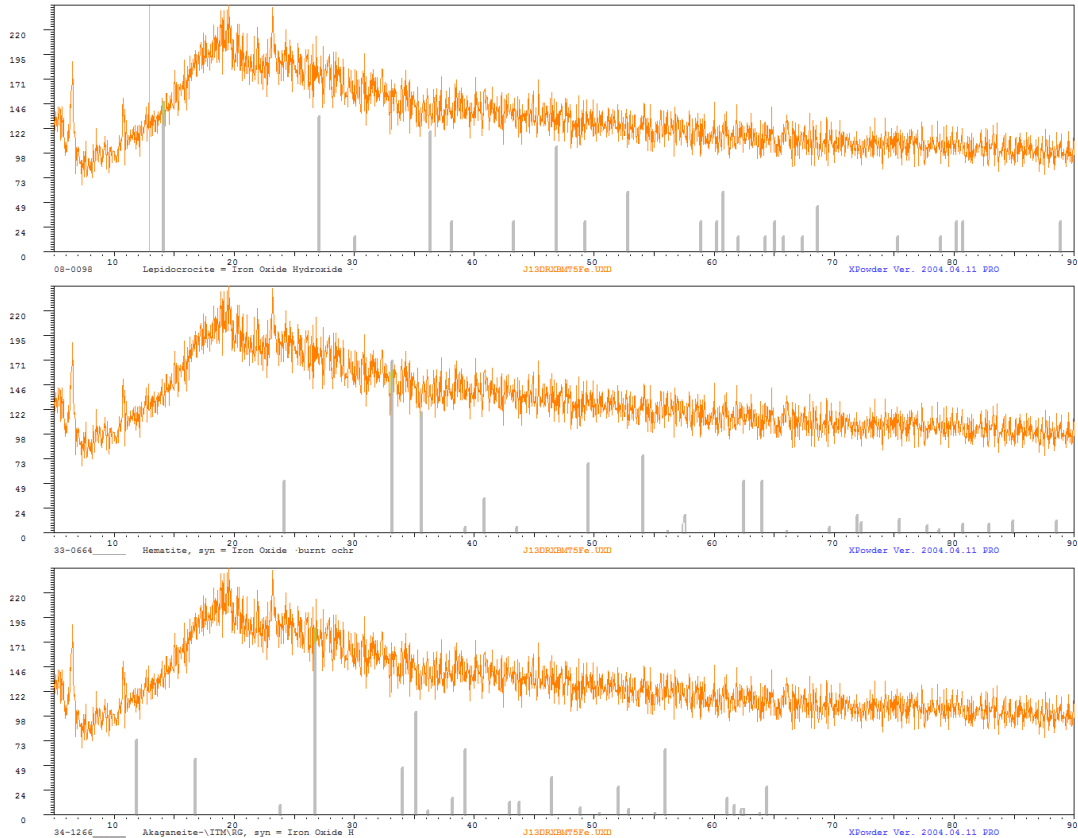


Figura 27.- Difractograma de la condición de cultivo 2 contrastada con hematites, acaganeíta y lepidocrocita.

En la figura 28a se muestra una micrografía a bajos aumentos de la condición de cultivo 2 donde se observa material algo amorfo en forma de coco. En la figura 28b se presenta el EDS correspondiente, en el cual se detecta la presencia de Fe. Se realizó una difracción de electrones en la zona caracterizada (figura 28c) y se observa que esta difracción presenta halos de difracción que indican posible material amorfo probablemente proveniente de restos de bacterias que pueden apantallar la cristalinidad de las nanopartículas en esta zona.

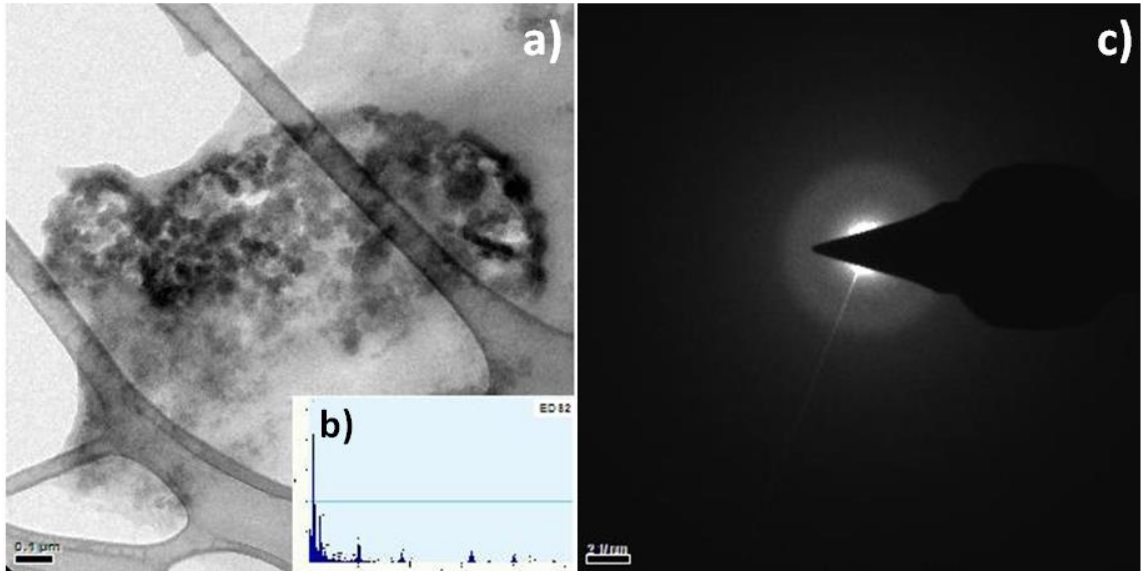


Figura 28.- Condición de cultivo 2 A) Micrografía B) EDS de la micrografía C) Difracción de electrones de la micrografía.

En la micrografía anterior, también se hicieron dos difracciones de electrones en zonas específicas, en estas zonas de nuevo se detectó material amorfo proveniente de las bacterias. Los halos de difracción se encuentran a una distancia interplanar de 0.2710 nm aproximadamente, esta distancia corresponde al plano (104) de hematites (figura 29).

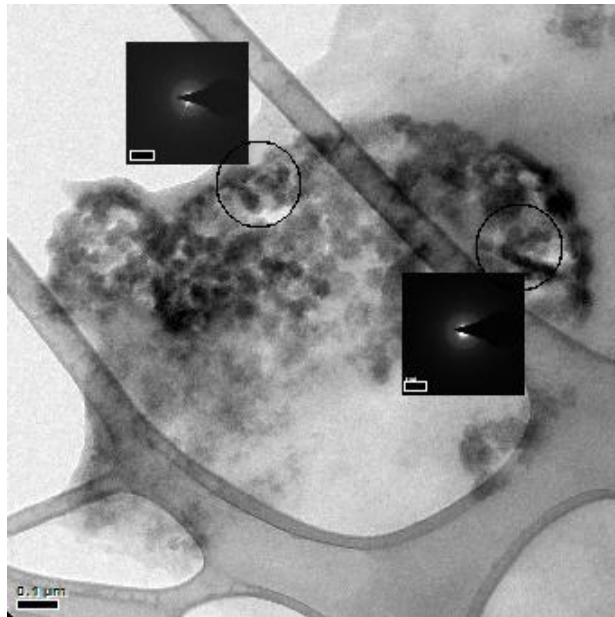


Figura 29.- Difracciones de electrones en zonas específicas.

En la figura 30a se presenta una zona donde se detectó material que sugiere posibles cristales. En la imagen 30b se presenta la difracción de electrones que nos indica nuevamente material amorfo o si hay cristales es posible que sean apantallados por el material orgánico de las bacterias. Se incluye la distancia interplanar al *primer* halo de difracción y corresponde al plano (104) de la hematites. La caracterización química por EDS (imagen 30c) nos indica la presencia de Fe en la muestra.

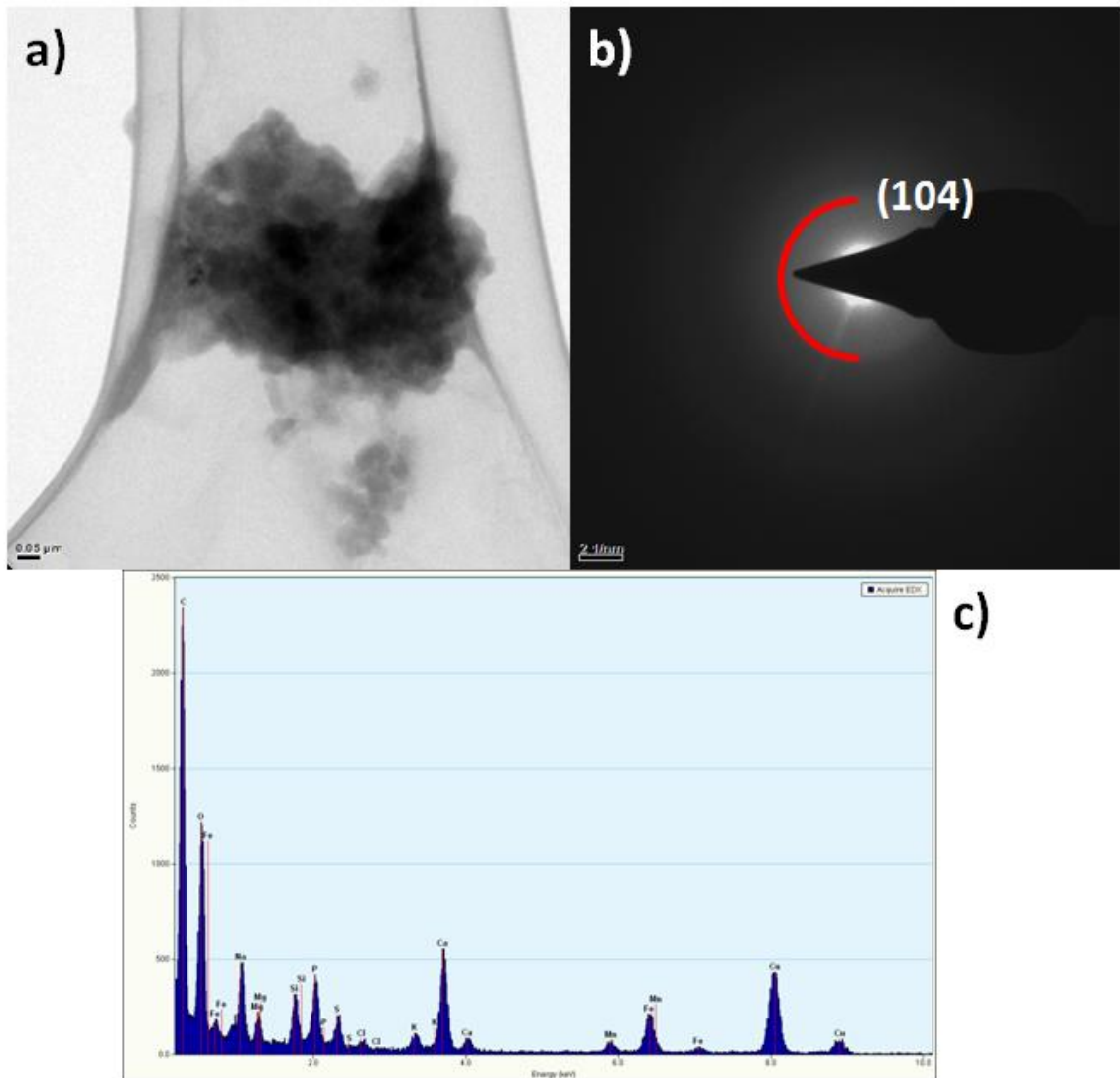


Figura 30.- Micrografía de la condición de cultivo 2: A) Micrografía de material cristalino B) Difracción de rayos X C) Análisis EDS.

Con las micrografías se confirma la presencia de hematites en la condición de cultivo 2.

3.7.2 Condición de Cultivo 3

En la figura 31 se presenta la caracterización por DRX de las bacterias crecidas en la condición de cultivo 3. El difractograma se contrastó con hematites, acaganeíta y lepidocrocita. Se observa material cristalino que corresponde a las fases de oxidos de hierro de hematites y acaganeíta.

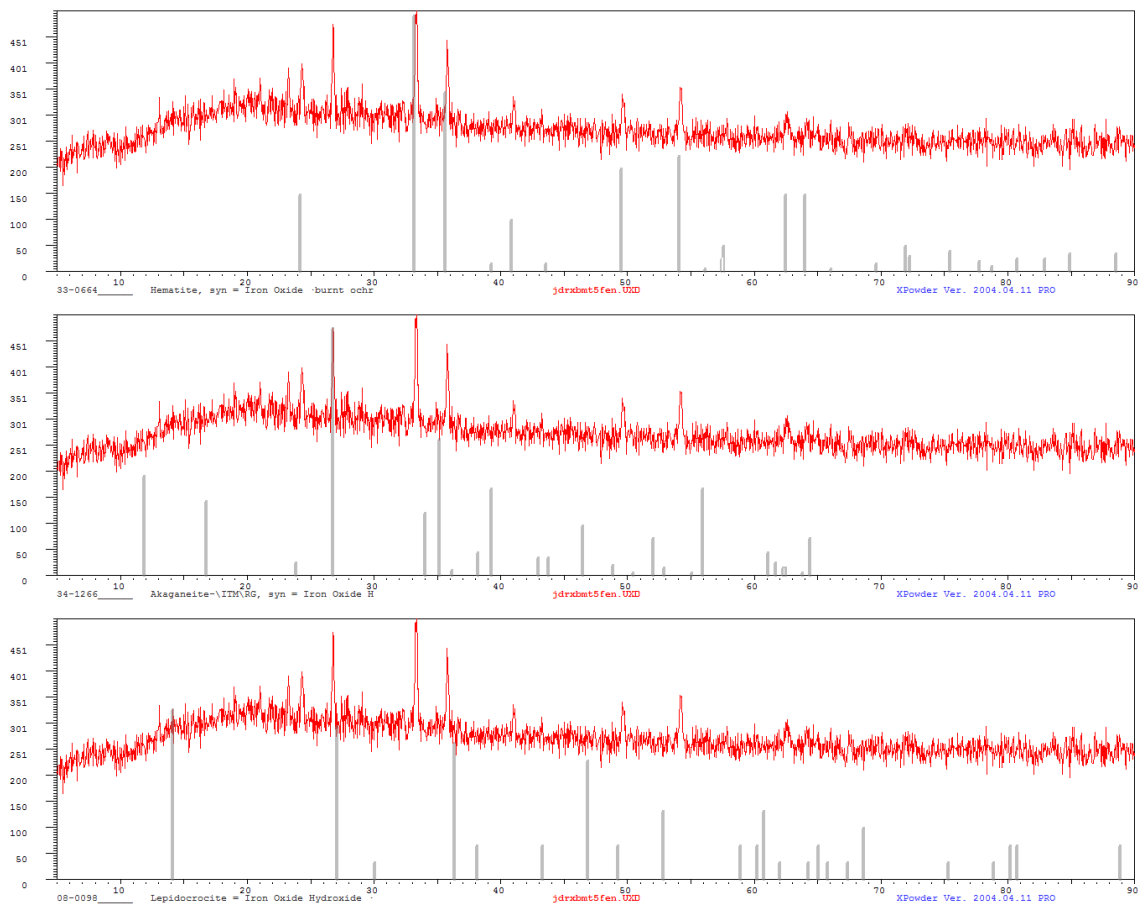


Figura 31.- Difractograma de la condición de cultivo 3 Contrastado con hematites, acaganeíta y lepidocrocita.

En la figura 32a se muestra una micrografía a bajos aumentos de los microorganismos cultivados en la condición de cultivo 3, se observa gran cantidad de material orgánico. Se realizó una caracterización química por EDS (imagen 32b) donde se puede apreciar los elementos presentes, en los que destaca el cobre (proveniente de la rejilla en la que se coloca la muestra), la cantidad de hierro es pequeña pero se detecta, además de minerales como P, Ca, K y Na provenientes del medio de cultivo.

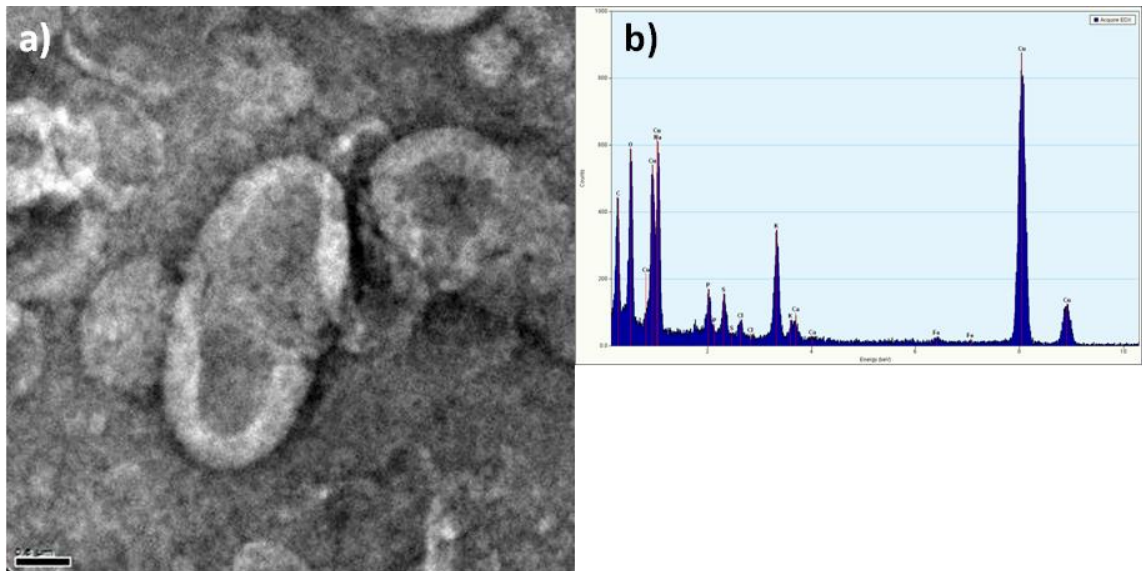


Figura 32.- Condición de cultivo 3: A) Micrografía de las bacterias crecidas. B) Análisis EDS.

Con el análisis de DRX se confirma la presencia de óxidos de hierro en las fases de hematites y acaganeíta en la condición de cultivo 3.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Bacterias Magnetotácticas

Es un hecho establecido que las comunidades de microorganismos interactúan generando entre ellos mismos condiciones favorables para el desarrollo de unos, declive de otros, y adecuación de condiciones en la que muchos de ellos reciben, al menos temporalmente, un impacto nulo en su desarrollo o número de integrantes de la colonia. Desde su descubrimiento por Blakemore en 1975, las bacterias de tipo magnetotáctico (BMT) son detonadoras de un gran interés a nivel mundial por el aprovechamiento de sus capacidades para generar óxidos de hierro con propiedades magnéticas. Blakemore identificó BMT con forma de espirilos, siendo su principal aportación a la taxonomía del *Magnetospirillum magnetotacticum* (Blakemore, 1975).

A partir de este hallazgo, los reportes de descripciones de otras formas bacterianas asociadas a la biomineralización directa o indirecta de óxidos de

hierro con propiedades magnéticas o no, aumentan año tras año. En este estudio se evidenció la presencia de diversos grupos bacterianos, si bien, sólo en las muestras donde se describieron bacilos, cocos y espirilos se llevaron a cabo los estudios confirmatorios para la presencia de cristales de óxidos de hierro. La presencia de estas formas bacterianas coincide con lo descrito en un estudio llevado a cabo en Colombia, donde encontraron BMT con forma de cocos (Morillo *et al.*, 2010). Lin *et al.*, en 2009, reportaron en Japón el aislamiento de BMT con diferentes formas, entre ellas cocos, bacilos, vibrios y espirilos (Lin *et al.*, 2009).

Hemos podido hacer un acercamiento a los estudios de identificación molecular de las bacterias magnetotácticas nativas empleando la amplificación y secuenciación del gen que codifica para la proteína *Mms6*, con relativo éxito. En el caso de los microorganismos provenientes de Poza Azul, el amplicón obtenido presenta un tamaño de banda en un gel de electroforesis que coincide con el tamaño esperado, pero su secuencia no presenta homología en comparación con la reportada. Por tanto, no puede considerarse que el microorganismo del cual se amplificó esta secuencia sea del tipo magnetotáctico, lo cual no descarta que se trate de alguno de los múltiples y variados grupos de microorganismos que participan o llevan a cabo procesos de biomineralización de óxidos de hierro, esto a juzgar por la presencia de estos mismos en las muestras analizadas. Lo anterior se confirma con los resultados de las otras técnicas realizadas. A pesar de que los otros amplicones obtenidos

presentan los tamaños de banda esperados, en los análisis por microscopía no mostraron presencia de nanopartículas, por lo tanto no pueden considerarse que sean del tipo magnetotáctico.

En relación a los resultados obtenidos en la microscopía con gota pendiente, específicamente hablando de la nula influencia del campo magnético sobre los microorganismos observados, se pueden mencionar distintas razones para tal comportamiento, aunque en concreto se trata de la ausencia de material magnetizable en la porción de muestra tomada. Más aún, la ausencia de cristales de magnetita en la muestra cultivada, tal como lo confirman los análisis por microscopía electrónica y DRX, nos lleva a considerar que no hay bacterias magnetotácticas en las muestras analizadas. La presencia de magnetosomas no es un requisito indispensable para este tipo de bacterias, es decir, pueden desarrollarse igualmente en ausencia de las funciones dadas por dicho organelo. Aunque la evidencia de material cristalino confirmado por microscopía electrónica y DRX, de los óxidos de hierro hematites y acaganeíta, indican la presencia de bacterias capaces de llevar a cabo procesos de biomineralización.

4.2 Nanopartículas de Óxidos de Hierro

Aunque se observaron estructuras cristalinas de óxidos de hierro hematites y acaganeíta, no se ha podido establecer la manera de cómo se encuentran asociadas a los microorganismos; si están dentro o fuera de la bacteria. Debido

a la alta potencia a la que trabaja el microscopio electrónico y al vacío aplicado durante la metodología, muchas de las células se destruyen, por lo tanto es difícil lograr apreciar bien las formas de las bacterias, por eso en las imágenes se observa, además de los cristales, mucho material amorfo proveniente de los microorganismos y acumulados de sales y del agar del medio de cultivo.

En el caso de las difracciones de electrones en las imágenes 20b, 21b, 22c y 30b, se observan halos de difracción y en algunos casos puntos de difracción, los cuáles indican la presencia de material cristalino. Se midieron las distancias interplanares y se observó que son similares a las distancias interplanares de la hematites, además con los análisis por DRX se confirmó que la fase del óxido de hierro analizada es hematites. En la tabla 13 se muestra una comparación de las distancias interplanares reportadas para la hematites (Cornell y Schwertmann, 2000) y las observadas en las micrografías.

Tabla 13.- Comparación de las distancias interplanares de la hematites, con las distancias interplanares de la muestra.

Hematites	Muestra	Plano hkl
0.2591	0.2591	110
0.14859	0.14871	214
0.3684	0.3703	012
0.11632	0.11594	020
0.2207	0.2218	113
0.12592	0.12541	220
0.18406	0.1869	024
0.15992	0.1597	018

Las nanopartículas de hematites que se obtuvieron en este trabajo son diferentes a las reportadas por otros grupos de investigación con intereses similares. En la figura 33 se muestra una imagen comparativa entre las partículas obtenidas por Pósfai en el 2006, y las obtenidas en este proyecto. Se observa que las nanopartículas producidas por *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 (una bacteria magnetotáctica) son monopartículas y de un tamaño superior a los 50 nm, las partículas son producidas de manera extracelular por una BMT capaz de producir también hematites (Pósfai *et al*, 2006).

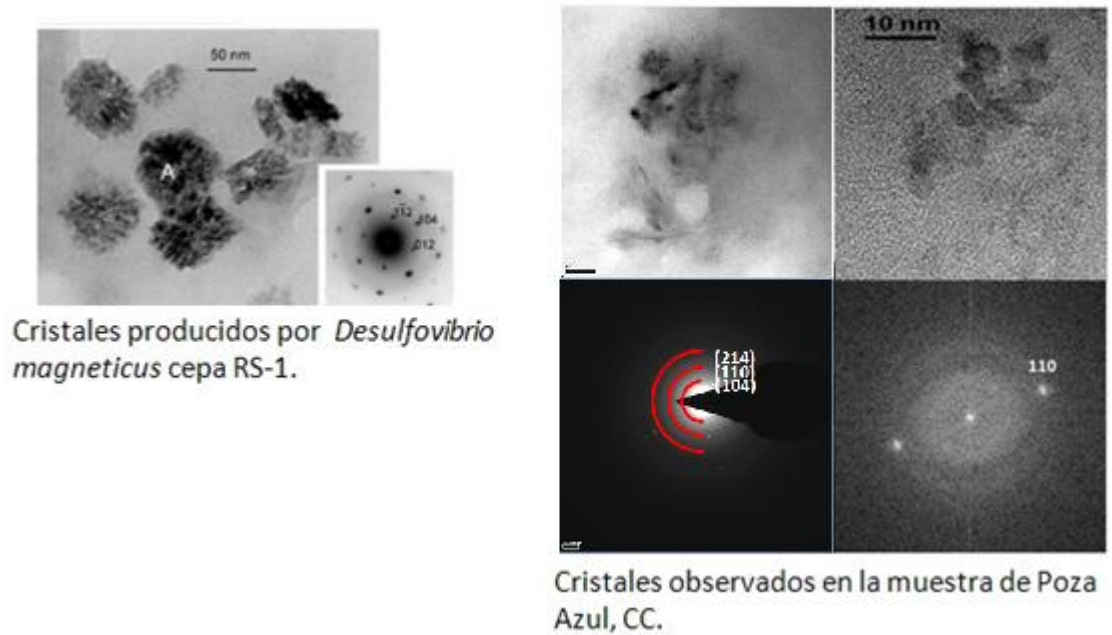


Figura 33.- Comparación de hematites producidas por microorganismos.

En el caso particular de este proyecto se obtuvieron nanopartículas también de tamaños de entre 50-100 nm, pero además, también se obtuvieron partículas de cristales con tamaños inferiores a 20 nm, las cuáles son capaces de presentar superparamagnetismo, por lo que su potencial como material

nanométrico con dichas propiedades las postula como material de interés en el área de la nanotecnología.

4.3 Condiciones de Cultivo

Se ha encontrado que se pueden obtener óxidos y oxihidróxidos de hierro en sus diferentes fases, a partir de microorganismos (Frankel y Bazylinski, 2003). Por lo general, se ha encontrado que la presencia simultánea de iones férricos y ferrosos en el medio de cultivo lleva a la formación de diversas fases específicas, como óxidos verdes, magnetita, maghemita, hematites, acaganeíta, entre otros (Cornell y Schwertmann, 1996). La formación de esta mezcla de las fases depende de muchos factores, tales como la concentración de hierro, el pH, el oxígeno, y la relación $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ (Brayner *et al.*, 2009), además del tipo de microorganismo.

Es por eso que si se varían estos factores se puede llegar a obtener diversas fases de los óxidos y oxihidróxidos de hierro, o en su caso, una mezcla de éstas fases, ya que los óxidos y los oxihidróxidos de hierro están compuestos principalmente por Fe, O, y H en el caso de los oxihidróxidos. La fórmula de la hematites es $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, los átomos de hierro se encuentran en la forma de Fe^{3+} , por lo tanto se considera que la hematites es el óxido de hierro en estado más oxidado, es por esto que se puede formar cuando las condiciones del medio son

aeróbicas o microaerofílicas, dependiendo también de los demás factores antes mencionados.

En el caso de las condiciones de cultivo 1 y 2, donde se manejaron condiciones microaerofílicas, se logró la formación de hematites, pero cuando los microorganismos se cultivaron con una atmósfera modificada con nitrógeno (condición 3) se creó una condición anaeróbica, la cual pudo llevar a la aparición de acaganeíta en el medio. La fórmula de la acaganeíta es $\beta\text{-FeOOH}$, aquí el hierro también está en forma de Fe^{3+} , pero por la presencia del $(\text{OH})^-$ el cristal se encuentra en una forma menos oxidada (como oxihidróxido).

En el caso de los métodos convencionales, varios óxidos y oxihidróxidos de hierro se pueden convertir fácilmente a hematites, ya sea mediante la aplicación de tensión mecánica y calentamiento en seco o por calentamiento en solución a temperaturas hidrotermales (Glotch y Kraft, 2008), por ejemplo magnetita, ferrihidrita, akaganeíta, lepidocrocita, entre otros (Cornell y Schwertmann, 2003).

En la naturaleza, la acaganeíta se encuentra a menudo en asociación con otros óxidos y oxihidróxidos de hierro (Herbert 1995; Cornell y Schwertmann 2003) pero condiciones ambientales específicas pueden favorecer o

desfavorecer su formación. Existen algunos microorganismos que son capaces de producirla como las cianobacterias *Anabaena flos-aquae* y *Calothrix pulvinata* y la alga verde *Klebsormidium flaccidum*, que lo hacen de forma intracelular, por mineralización controlada (Brayner *et al*, 2009). Debido a que se carece de microscopías de acaganeíta en los análisis (sólo se detectó por DRX), no se pueden comparar con los cristales de acaganeíta producidos por estos microorganismos.

Probablemente por éstas razones la acaganeíta no se obtuvo en las condiciones de cultivo 1 y 2, sólo en la condición 3 donde había las condiciones adecuadas para que se conservara. Y si se llegó a producir en las condiciones 1 y 2, probablemente no era estable por las condiciones y pasó a convertirse en hematites.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- ❖ Se logró amplificar fragmentos de DNA de los microorganismos provenientes de las muestras de Cuatro Ciénegas, Zacatecas, Apodaca, Monterrey y Galeana. Estos fragmentos pueden estar relacionados con el gen que codifica para la proteína Mms6 presente en las bacterias magnetotácticas.
- ❖ Mediante microscopía electrónica se logró encontrar la presencia de estructuras cristalinas asociadas a los microorganismos provenientes de la muestra de Poza Azul, Cuatro Ciénegas.
- ❖ Mediante microscopía electrónica y difracción de rayos X, se encontró que los cristales producidos por los microorganismos corresponden a óxidos de hierro en las fases de hematites y acaganeíta.
- ❖ Los cristales de hematites encontrados tienen un diámetro inferior a 100 nm, por lo tanto son considerados como nanopartículas.
- ❖ Los microorganismos provenientes de Poza Azul, tienen forma de cocos, bacilos y espirilos (la mayoría presenta forma de espirilo) y son Gram (-).

- ❖ Las fases de los óxidos de hierro varían con las condiciones del medio de cultivo.
- ❖ La condición de cultivo 3 (4x la concentración de hierro y atmósfera modificada con nitrógeno) hace posible la obtención de acaganeíta.
- ❖ El proceso de mineralización observado está relacionado con la presencia de las bacterias presentes en cuerpos de agua.

BIBLIOGRAFÍA

- Atlas R., L. C. Parks. Handbook of Microbiological Media. 2^a ed. 1996. CRC Press. Pp 797-798.
- Banfield JF, Zhang H (2001) Nanoparticles in the environment. Rev Mineral Geochem. 44:1-58.
- Bäuerlein E. (2003) Biomineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. Angew Chem Int Ed. 42:614-641.
- Bazylnski D. (1999) Synthesis of the bacterial magnetosome: the making of a magnetic personality. International Microbiology. 2: 71-80.
- Bazylnski D., T. J. Willimas. Ecophysiology of Magnetotactic Bacteria. En D. Schüler. Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006. Pp 37-75.
- Bazylnski D., A. Dean, T. Williams, L. Long, S. Middleton, B. Dubbels (2004) Chemolithoautotrophy in the marine, magnetotactic bacterial strains MV-1 and MV-2. Archives of Microbiology. 182: 373-387.
- Blakemore R. (1975) Magnetotactic bacteria. Science 190:377–379.

- Brayner R., C. Yéprémian, C. Djediat, T. Coradin, F. Herbst, J. Livaje, F. Fiévet y A. Couté (2009) Photosynthetic microorganism-mediated synthesis of akaganeite (β -FeOOH) nanorods. American Chemical Society. Langmuir. 25(17): 10062–10067.
- Brown D., D. Choudari, J. Sawicki, T. Beveridge (1994) Minerals associated with biofilms occurring on exposed rock in a granitic underground research laboratory. Applied and Environmental Microbiology. 60 (9): 3182-3191.
- Callister W.D. (2007) Materials Science and Engineering: An introduction. 8a Edición. New York, Wiley, 668 pp, 2007.
- Christen J. Hurst, Ronald L. Crawford. Manual of environmental microbiology, 3ª ed. 2004. American Society of Microbiology, ISBN-13: 978-1-55581-379-6, ISBN-10: 1-55581379-1, pp: 1129-1135.
- Erro J. (2011) La seguridad y la salud en la exposición a nanopartículas. Instituto Riojano de Salud Laboral Logroño. Realizado por el Área de Higiene Industrial. Depósito Legal: LR-101-2011.
- Frankel R., D. A. Bazylinski (2003) Biologically induced mineralization by bacteria.
- Glotch T., M. Kraft (2008) Thermal transformations of akaganéite and lepidocrocite to hematite: assessment of possible precursors to Martian crystalline hematite. Physic Chemical Minerals. 35: 569–581.
- Guerrego R., M. Berlanga (2000) Bacterias magnetotácticas, hoy y hace 3800 millones de años. SEM 29: 14-20.

- Helgason O., J.-M. Greneche, F.J. Berry, F. Mosselmans (2003) Journal of Physics: Condensed Matter. 15 (17): 2907-2915.
- Heyen U., D. Schüler (2003) Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. Applied Microbiology Biotechnology. 61: 536-544.
- Hook J. R., Hall H. E. Solid State Physics. 2^a ed. 1995. ISBN: 978-0-471-92805-8.
- Komeili A. (2011) Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review. 36:232-255.
- Konhauser KO (1998) Diversity of bacterial iron mineralization. Earth-Sci Rev. 43:91-121.
- Liu. Y., G. R. Li, F. F. Guo, W. Jiang, Y. Li, L. J. Li (2010) Large-scale production of magnetosomes by chemostat culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* at high cell density. Microbiol Cell Factories. 9: 99-106.
- Lowenstam HA (1981) Minerals formed by organisms. Science. 211:1126-1131.
- Beveridge TJ (1989) Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. Annu Rev Microbiol. 43:147-171.
- Luna C., (2012) Nuevos Fenómenos y Aplicaciones en Nanoestructuras Magnéticas. 2º Foro de Divulgación Científica y Tecnológica. FCFM. UANL.
- Madigan M., J. Martinko, J. Parker. Brock, Biología de los microorganismos, 10^a edición. Pearson, Prentice Hall. Pp: 92-94, 384,385.

- Manilla K. (2011) Aislamiento y caracterización de bacterias sintetizadoras de partículas magnéticas. Tesis Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Industrial. UANL.
- Matsunaga T., Y. Okamura, Y. Fukuda, A. T. Wahyudi, Y. Murase, H. Takeyama (2005) Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. Strain AMB-1. DNA Research 12:157-166.
- Matsunaga T., M. Kawasaki, X. Yu, N. Tsujimura, N. Nakamura (1996) Chemiluminescence enzyme immunoassay using bacterial magnetic particles. Analytical Chemistry. 68: 3551-3554.
- Mazo-Zuluaga J. (2011) Una mirada al estudio y las aplicaciones tecnológicas y biomédicas de la magnetita. Revista EIA. 16:207-223.
- Muyzer G., E. C. de Wall, A. G. Uitterlinden (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 59 (3): 695-700.
- Ortega Ortiz F., (2006) Biosensores y Biochips: Herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. Instituto de España. Real Academia de Farmacia. Pp.: 22, 57, 58 101-108.
- Pérez-González T., C. Valverde, C. Jimenez (2004) Biomineralización bacteriana de magnetita y aplicaciones. Seminario SEM 07. 1:58-74.
- R.M. Cornell, U. Schwertmann, The Iron Oxides: Structure, Properties Reactions, Occurrences and Uses, seconded. Wiley-VCH, Weinheim, 2003.

- Schübbe S., C. Wüdemann, J. Peplies, U. Heyen, C. Waver, F. Glockner, D.
- Tanaka M., E. Mazuyama, A. Arakaki, T. Matsunaga (2010) Mms6 protein regulates crystal morphology during nano-sized magnetite biomineralization in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 286: 6386-6392.
- Schüler D., U. Heyen (2003) Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. *Applied Microbiology Biotechnology*. 61: 536-544.
- Schüler D., D. Bazylinski. Techniques for studying uncultured and cultured magnetotactic bacteria. In Hurst K., R. Crawford. *Manual of environmental microbiology*. American Society of Microbiology. 2009. Pp 1129-1136
- Schüler D. (1999) Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 1 (1): 79-86.
- Schüler (2006) Transcriptional organization and regulation of magnetosome operons in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (9): 5757-5765.
- Simmons S. L., S. M. Sievert, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, K. J. Edwards (2004) Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (10): 6230-6239.
- Spring S. R. Amann, W. Ludwig, K. Shleifer, H. Van Gemerden, N. Petersen (1993) Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (8): 2397-2403.

- Strobel, R. & y S. E. Pratsinis. (2009) Direct synthesis of maghemite, magnetite and wustite nanoparticles by flame spray pyrolysis. *Advanced Powder Technology* 20: 190–194.
- Sun Jian-Bo, F. Zhao, T. Tang, W. Jiang, J. Tian, Y. Li, J. Li (2008) High-yield growth and magnetosome formation by *Magnetospirillum gryphiwaldense* MSR-1 in an oxygen-controlled fermentor supplied solely with air. *Applied Microbiology Biotechnology* (79): 389-397.
- Teja, A. S., P.-Y Koh. (2009) Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. 55: 22–45.
- Wang Y., G. Ouyang, L.L. Wang, L.M. Tang, D.S. Tang, C.Q. Sun (2008) Size- and composition-induced band-gap change of nanostructured compound of II–VI semiconductors, *Chemical Physics Letters*. 463: 383-386.
- Zanella R (2012) Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo nano* 5 (1) 69-81.
- Zhang Y., X. Zhang, W. Jiang, Y. Li, J. Li (2011) Semicontinuous culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 cells in an autofermentor by nutrient-balanced and isosmotic feeding strategies. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (17): 5851-5856.