

61  
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN



DETECCION DE PLASMIDOS QUE CODIFICAN PARA LA  
RESISTENCIA A ALTAS CONCENTRACIONES DE  
PLATA, EN BACTERIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A

ANTONIO SANCHEZ SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

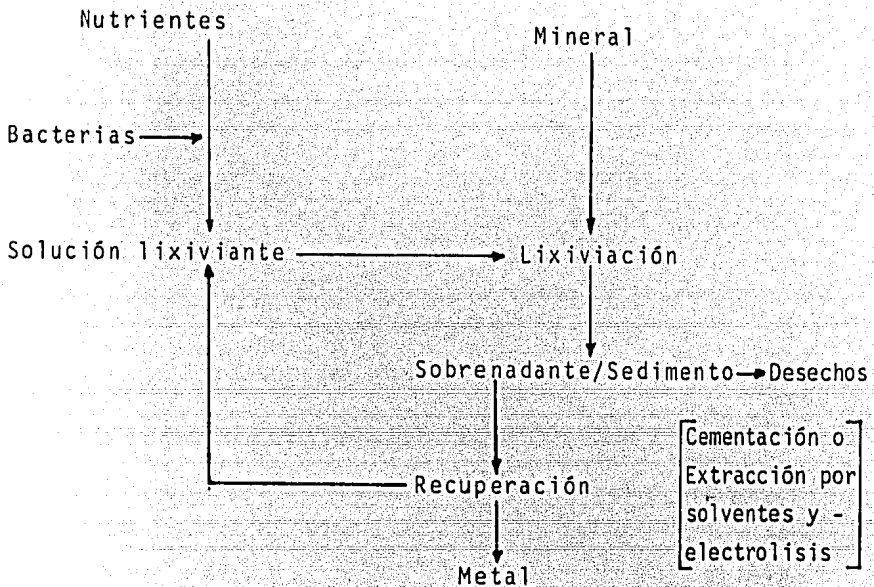
# I N D I C E

	pág.
INTRODUCCION . . . . .	1
OBJETIVOS . . . . .	8
MATERIAL Y METODOS . . . . .	9
RESULTADOS . . . . .	23
DISCUSION . . . . .	36
CONCLUSIONES . . . . .	41
RESUMEN . . . . .	43
BIBLIOGRAFIA . . . . .	45

## I N T R O D U C C I O N

## I N T R O D U C C I O N

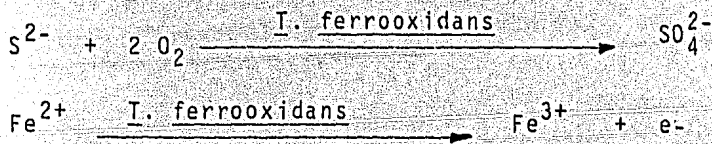
En la actualidad sabemos que existen ciertos microorganismos que participan en la extracción de metales a partir de minerales. La acción que ejercen estos microorganismos es la de acelerar el proceso de disolución de los metales (lixiviación) y podemos considerar que este proceso es similar al proceso donde se utilizan catalizadores químicos sólo que de menor costo, ya que los minerales de los cuales se extraerá el metal son de baja ley se necesitaría de grandes cantidades de este mineral, si el enriquecimiento fuera químico necesitaríamos grandes cantidades de catalizador químico lo que encarecería mucho el proceso, en cambio con el proceso biológico basta con utilizar un inóculo de microorganismos para que se multipliquen y realicen el proceso de lixiviación. Los procesos de lixiviación en los que se involucran microorganismos, pueden ser representados generalmente por el siguiente diagrama de flujo:



Este diagrama sólo se diferencia de los procesos de lixiviación no biológicos, en la presencia de bacterias y éstas se encuentran en condiciones de acidez, mientras son mantenidas en presencia de materiales sulfurados.

En el presente, la técnica de lixiviación bacteriana es aplicada en operaciones comerciales para la recuperación de cobre y uranio a partir de desechos minerales, (5), sin embargo, esta técnica no se limita al tratamiento de materiales de desecho, ya que también puede ser aplicada a minerales de baja ley que contienen un alto grado de sulfuros metálicos.

Uno de los principales microorganismos utilizados en procesos de lixiviación es Thiobacillus ferrooxidans que oxida sulfuros orgánicos y otros compuestos sulfurados de valencia reducida a sulfatos y el ión ferroso al ión férrico; como se muestra en las ecuaciones siguientes:



A nivel industrial, la lixiviación del metal se puede realizar: "in situ", en tanques de lixiviación o por amontonamiento del mineral de baja ley extraído de la mina, agregando después agua y un inóculo de microorganismos. En el caso de utilizar tanques de lixiviación se puede hacer que el proceso sea agitado e incluso se inyecte oxígeno y CO<sub>2</sub> para aumentar el rendimiento. Con este proceso los sulfuros del metal que son insolubles, son oxidados por los microorganismos hasta sulfatos metálicos que son solubles, después de esto se separa el concentrado por flotación y finalmente el metal solubilizado se separa por electrólisis.

Morfológicamente, Thiobacillus ferrooxidans son células móviles que usualmente se encuentran aisladas, raramente en pares y cadenas cortas. Las condiciones de -

crecimiento óptimas de este microorganismo son (17):

Temperatura	35° C
pH	2.3
Concentración de sulfuro metálico	10 - 25%
Concentración del ión ferroso	10 g/lit
Tamaño de partícula del sulfuro metálico	32 $\mu$ m

Los estudios ecológicos de aguas de desagüe (drenaje) de minas muestran la presencia de Thiobacillus ferrooxidans y otros microorganismos, estos estudios nos ofrecen datos concernientes a su tolerancia al metal, que a diferencia de la mayoría de los microorganismos, excepto algunos hongos (18), son afectados por metales pesados a concentraciones bajas ( $\sim 10^{-4}$ M) y a las cuales sólo algunas especies autotróficas de Thiobacillus tienen una tolerancia elevada.

Otros estudios nos indican que los Thiobacillus son tolerantes a ciertos metales como zinc, níquel, cobre, cobalto, manganeso y aluminio, y sensibles a uranio, plata, mercurio y otros (22).

Ahora bien, en el país existen minas que se han dejado de explotar por la baja ley de los metales que existen en ellas, sin embargo, hay minas de plata que a pesar



de tener poca cantidad de metal, si se utiliza un proceso biológico, pueden ser rentables (17). La utilización de un proceso biológico para la extracción de ciertos metales como la plata no se ha podido llevar a cabo debido a que, por el momento, no se han aislado microorganismos del género Thiobacillus que sean resistentes al metal. Se han aislado algunas cepas de T. ferrooxidans que son tolerantes a algunos metales pesados, sólo que para el caso de la plata se determinó que concentraciones de 50 p.p.m. son tóxicas para el microorganismo (22).

Por otro lado puede haber otros microorganismos diferentes que sean resistentes al metal, pero su utilización no se puede llevar a cabo debido a que no producen las condiciones utilizadas en los procesos de lixiviación de metales.

Tomando todo ésto en cuenta, y haciendo uso de los conocimientos dados por la genética microbiana, podríamos tratar de establecer, que por técnicas genéticas se pueda obtener un Thiobacillus que sea resistente a plata, (10, 11). Partiendo del conocimiento de que la resistencia de un microorganismo a los metales pesados generalmente está dada por plásmidos (DNA circular extracromosómico), podemos establecer que por algún mecanismo o proceso microbiano se pueda transferir este plásmido de la bacteria que sea resistente al metal, al Thiobacillus para

ser utilizado en procesos de lixiviación de plata.

Dentro de los mecanismos de transferencia de plásmidos se encuentra el de transformación bacteriana de tipo artificial (20) y que es muy utilizado en procesos genéticos experimentales.

Algunos trabajos previos han mostrado que hay un intervalo de pH (12.0 - 12.5) en el cual se produce una desnaturalización del DNA lineal, pero no del DNA circular cerrado, lo que nos permite aprovechar esta propiedad para la purificación del DNA del plásmido.

Las células que contienen plásmidos son tratadas con lisozima que debilita la pared celular, para después lisarlas con dodecilsulfato de sodio (SDS) e hidróxido de sodio (NaOH).

El DNA cromosómico, estable en una forma de alto peso molecular, es selectivamente desnaturalizado por el acetato de sodio acidificado, se renaturaliza la masa de DNA cromosómico y se agrega para formar una cadena insoluble. Simultáneamente, la alta concentración de acetato de sodio causa la precipitación de los complejos proteína-SDS y de RNA de alto peso molecular. Por este método, gran cantidad de las tres macromoléculas contaminantes son coprecipitadas y pueden ser removidas por una

simple centrifugación. Los plásmidos (y RNA residual de bajo peso molecular) son recobrados del sobrenadante por medio de su precipitación con etanol. El DNA de plásmidos puede ser analizado por electroforesis en forma intacta o después de su digestión con endonucleasas de restricción, (2,6).

En este trabajo se tratará de aislar y caracterizar cepas que sean resistentes a plata y que además contengan los plásmidos que confieren dicha resistencia, con el fin de extraerlos para que en un trabajo futuro se pueda hacer una transferencia de estos plásmidos a un bacilo (posiblemente Thiobacillus ferrooxidans) que produzca las condiciones necesarias para la lixiviación de plata de minerales y que sea resistente al mismo metal.

## OBJETIVOS

## O B J E T I V O S

1.- Aislamiento y purificación de especies bacterianas que sean resistentes a plata.

2.- Detección de plásmidos que confieren resistencia a plata.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

## MATERIALES Y METODOS

### - MEDIOS DE CULTIVO:

#### 1) Medio modificado de Horikoshi-Akiba, MM-HA. (13)

Sacarosa	10.0 g
Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1.0 l

Para medio líquido no se añade el agar.

#### 2) Medio modificado de Horikoshi-Akiba con $\text{Ag}^+$ .

-Hacer una solución de  $\text{AgNO}_3$  conteniendo 10.0 mg/ml y esterilizar.

-Por otro lado se hace el medio sólido MM-HA y se enfría a 50-55°C.

-Se adiciona la cantidad de plata en solución requerida y se vacía en cajas de Petri.

#### 3) Agar nutritivo.

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne de res	3.0 g
Agua destilada	1.0 l

4) Medio para aislamiento de Thiobacillus ferrooxidans.  
 Sólo se utilizan las soluciones II, IV y V especificadas en la bibliografía (15).

Solución V:

Glucosa	10.0 g	MgSO <sub>4</sub>	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	7.5 ml
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	2.0 g	Agua destilada	1.0 l

Solución IV:

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.0 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.4 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.2 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.2 g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
Acido P-amino- benzoico	0.01 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	5.0 ml
Agua destilada	1.0 l

Solución II:

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	167.0 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	50.0 ml
Agua destilada	1.0 l

Se esterilizan las soluciones en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez estériles las soluciones, se le adicionan 10.0 ml de la solución IV y 10.0 mg de sulfato ferroso (0.15 ml de solución II) a la solución V.

- Soluciones:

a) Regulador E (14)

Tris-acetato 40 mM



Etilendiaminotetracético disódico            2 mM  
(E.D.T.A.)

Ajustar a pH 7.9 con ácido acético glacial.

b) Solución cloroformo-fenol. 50:50 (vol/vol)

Calentar fenol en baño maría hasta que funda, tomar  
50 ml de fenol y mezclarlos con 50 ml de cloroformo.

c) Solución lisante:

Dodecilsulfato de sodio                            3.0 %

Tris.HCl    50 mM

NaOH 2N para ajustar a pH 12.6.

Filtrar por membrana "Millipore" de 0.2  $\mu$ m

d) Geles de agarosa:

Gel de agarosa al 0.7% en regulador E, pH 7.9.

Gel de agarosa al 0.8% en regulador E, pH 7.9.

Gel de agarosa al 1.0% en regulador E, pH 7.9.

- Cepas utilizadas como testigo:

Salmonella enteritidis.

Staphylococcus aureus.

Bacillus megaterium.

Escherichia coli J53/RP4

- Aparatos utilizados:

1) Potenciómetro Expandomatic, Beckman.

Modelo 76A.

- 2) Balanza analítica Mettler  
Modelo H3/AR.
- 3) Sistema de electroforesis para preparaciones en tubo con fuente de poder LAMBDA Modelo LP0-425A-FM con capacidad de 250 V y 0.15 A.
- 4) Centrifuga refrigerada Sorvall  
Modelo RC-5B  
Dupont Instruments.  
Capacidad 25,000 r.p.m. con rotor SS34.
- 5) Lámpara de luz ultravioleta BLAK RAY  
Modelo UVL-22 Onda larga.  
Capacidad 115 V, 0.17 A y 60 ciclos.  
ULTRA-VIOLET PRODUCTS, INC.

- Reactivos:

- 1) Bromuro de Etidio  
Sigma Chemical Company.  
Obsequio del Instituto Nacional de Investigaciones Biomédicas. U.N.A.M.
- 2) Nitrato de Plata ( $\text{AgNO}_3$ )  
Mallincrodt.
- 3) Agarosa Tipo I  
Sigma Chemical Company.
- 4) Tris (hidroximetil-amino-metano)  
Merck.

5) Acetato de sodio.

J.T. Baker.

6) Etilendiaminotetracético disódico (E.D.T.A.)

J.T. Baker.

- Antibióticos:

Se utilizaron antibióticos en multidisco para diagnóstico clínico. El multidisco contiene 12 antimicrobianos que son: cefotaxima, ampicilina, cefalosporina, cloxacilina, eritromicina, gentamicina, lincomicina, kanamicina, penicilina, estreptomina, sulfametoxazol-trimetoprim y tetraciclina.

Elaborado por Productos Bioclin, S.A.

## METODOS:

### 1.- MUESTREO EN LA MINA DE PLATA SAN ACASIO EN ZACATECAS, ZAC.

Se bajó al nivel 200 (200 metros de profundidad) y se inició un recorrido por diferentes zonas de la mina. Se tomaron muestras de minerales conteniendo óxidos de plata, sulfuros de plata y pirita de plata. Además se tomaron muestras de agua, sales minerales de una grieta húmeda y de agua con lodo. Se midieron pH y temperatura de las muestras líquidas.

En la zona donde se realiza la lixiviación química se realizaron muestreos en diferentes puntos del proceso, en donde se tienen finos y concentrados de plata, se muestreó agua de lixiviación y se determinó temperatura y pH de la misma en la zona donde se tomó.

### 2.- CULTIVO DE MUESTRAS

De las muestras obtenidas en la mina, se prosiguió a la realización de las siguientes siembras:

- De las muestras de agua obtenidas, tanto de la mina como de la zona de lixiviación, se sembró 1 ml de cada una en dos tubos con medio MM-HA conteniendo 0, 50, 100 y 150 p.p.m. de plata y en dos tubos con medio para

el aislamiento de Thiobacillus ferrooxidans. Se sembraron masivamente varias cajas de Petri conteniendo medio MM-HA sólido con 100 y 200 p.p.m. de plata.

- Por otro lado se sembró una caja con agar nutritivo, y por último se hizo una suspensión de tierra mineral obtenida de la mina en medio MM-HA líquido, se tomó después 1 ml de esta suspensión y se sembró en otro tubo con el medio líquido.

### 3.- AISLAMIENTO DE CEPAS

El aislamiento de cepas bacterianas puras, resistentes a plata se realizó de la siguiente manera:

- De las cajas sembradas conteniendo agar con plata (100 p.p.m.) se tomaron las colonias que se observaron aisladas y diferentes, sembrándolas en agar nutritivo e incubándolas 24 h a 37°C.
- Una vez aisladas las colonias, se procedió a sembrarlas tanto en medio MM-HA líquido como en medio sólido conteniendo diferentes concentraciones de plata (100 y 200 p.p.m.) a diferentes pH (5, 7, 8 y 10) y a diferentes temperaturas de incubación (37, 45 y 55°C).
- De los tubos en donde se observó crecimiento se tomó una muestra y se sembró en medio MM-HA con 10, 50 y 100 p.p.m. de plata, así como en agar nutritivo,

observándose la pureza del cultivo por medio de la morfología colonial. Además, como testigos se sembraron cepas de Staphylococcus aureus, Salmonella enteritidis y Bacillus megaterium en los mismos medios.

#### 4.- CARACTERIZACION

De cada una de las cepas que crecieron en las placas de medio sólido con plata, se tomó una asada y se sembraron en placas de agar nutritivo incubándose toda la noche a 37°C, se describió la morfología colonial de las colonias aisladas.

Por otro lado se hicieron tinciones: de Gram, para cápsula (Rojo Congo y Tinta China) y para esporas (Schaeffer y Fulton), para la descripción de la morfología microbiana. Así mismo, se realizaron pruebas bioquímicas tales como fermentación de carbohidratos (sacarosa, dextrosa, manitol), prueba de Voges-Proskauer y rojo de metilo, producción de indol, utilización de citrato, reducción de nitratos a nitritos, producción de catalasa y oxidasa, crecimiento en NaCl al 4% y prueba de oxidación-fermentación.

Por último, se efectuó una prueba de sensibilidad a los antibióticos (cefotaxima, ampicilina, cefalosporina, eritromicina, gentamicina, lincomicina, kanamicina, -

penicilina, estreptomycin y tetraciclina) y a sulfameto  
xazol-trimetoprim.

## 5.- DETECCION DE PLASMIDOS POR MEDIO DE ELECTROFORESIS

La detección de plásmidos se realizó utilizando la técnica de Kado-Liu (14), con algunas modificaciones en base a la técnica de Takahashi-Nagano (21), la cual se describe a continuación:

### a) Cultivo de las células

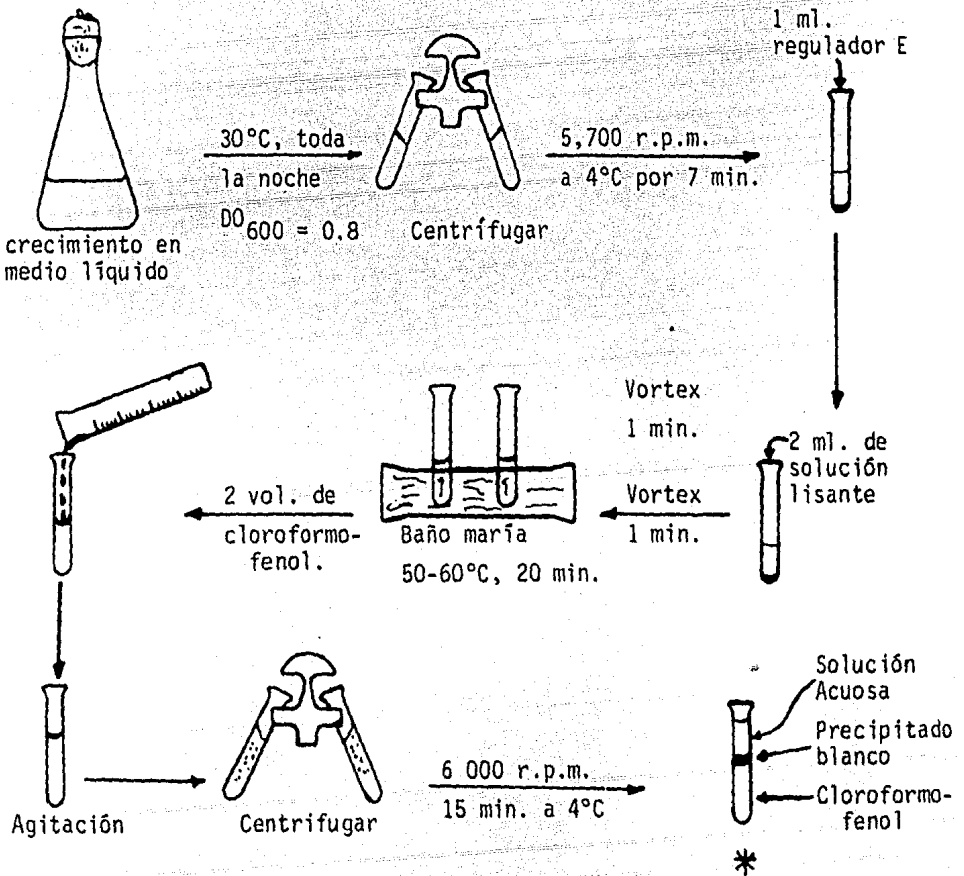
Se inocularon dos tubos conteniendo 5 ml de medio MM-HA líquido con cada una de las cepas aisladas y se incubaron a 37°C toda la noche.

### b) Extracción de plásmidos

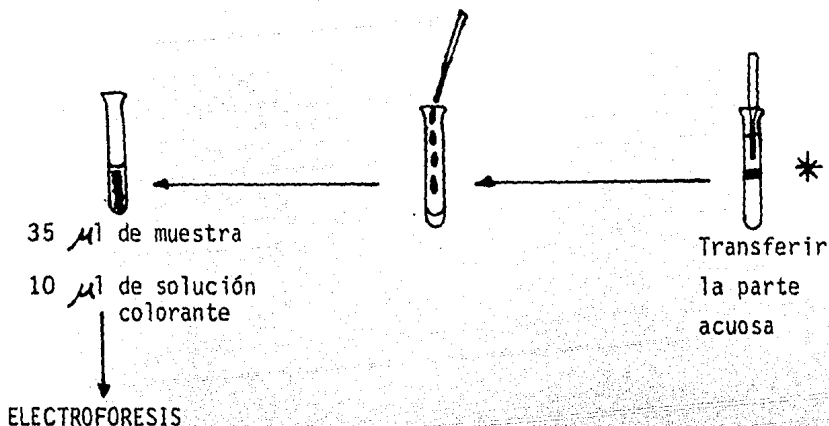
Se centrifugó a 6 000 r.p.m., a 4°C durante 10 minutos desechándose el sobrenadante y resuspendiéndose el sedimento celular en 1 ml de regulador E, adicionando 0.5 ml de una solución de lisozima (10 mg/ml) en regulador E, dejándose reposar durante 15 minutos. Se lisaron las bacterias por medio de la adición de 2 ml de solución lisante, manteniendo la solución entre 50 y 60° C en baño maría durante 20 minutos. Se adicionaron dos volúmenes de la mezcla cloroformo-fenol, emulsificando la solución por agitación breve y se centrifugó a 6 000 r.p.m. a 4°C por 15 minutos para romper la emulsión. Librando el

precipitado de la interfase, se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo con tapón de rosca utilizando una pipeta Pasteur.

Se efectuó el mismo proceso para Escherichia coli - J53/RP4 la cual se utilizó como testigo debido a que contiene el plásmido RP4.







Esquema de la obtención de plásmidos por el método de Kado-Liu.

c) Electroforesis en gel de agarosa (1,7,8,16).

La agarosa se solubilizó en regulador E por calentamiento a  $115^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos en autoclave, se dejó enfriar a  $60^{\circ}\text{C}$  y se colocó en tubos de vidrio, dejándolos en reposo hasta que gelificaron. Una vez gelificados, los tubos se montaron en la cámara de electroforesis y se llenaron las dos cubas con regulador E.

Se colocaron 50  $\mu$ l de muestra (40  $\mu$ l de muestra con 10  $\mu$ l de bromocresol (0.25%) en glicerol (50%) y tris-acetato 0.05 M pH 7.9) en la parte superior de los tubos y se sumergieron en el mismo regulador E. Se conectó la fuente de poder a 120 V hasta que el color penetró en el gel, después se disminuyó el voltaje a 100 V y se dejó correr hasta que el color descendió a la base del tubo (aprox. 3 h). Los geles se guardaron individualmente

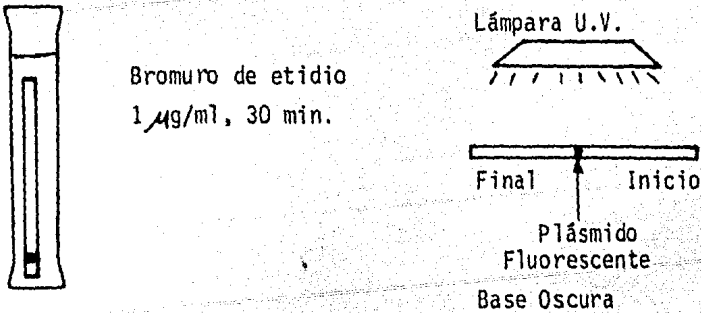
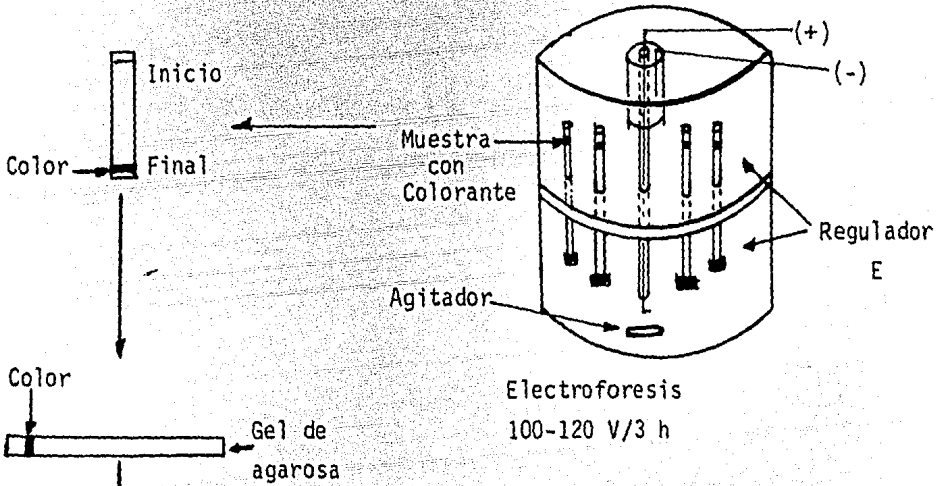
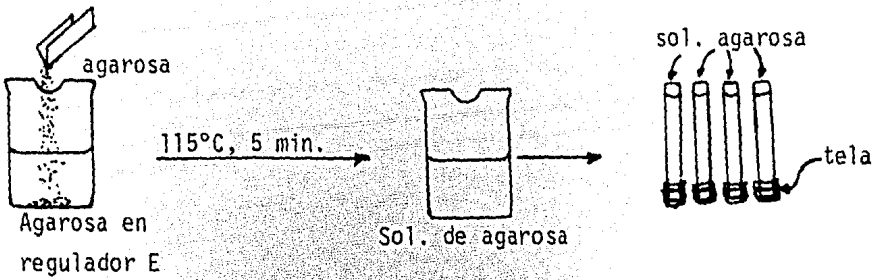
en tubos con tapón de rosca conteniendo una solución de bromuro de etidio ( 1  $\mu$ g/ml) y se dejaron 60 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Se observó el revelado de bandas por medio de la utilización de una lámpara de luz ultravioleta.

## 6.- ELIMINACION DE PLASMIDOS EN LAS CEPAS AISLADAS

De un cultivo de toda la noche en medio MM-HA líquido se inoculó 0.1 ml en tubos conteniendo 5.0 ml de caldo nutritivo y 10  $\mu$ g del agente curante (bromuro de etidio), se incubó toda la noche a 32°C (3).

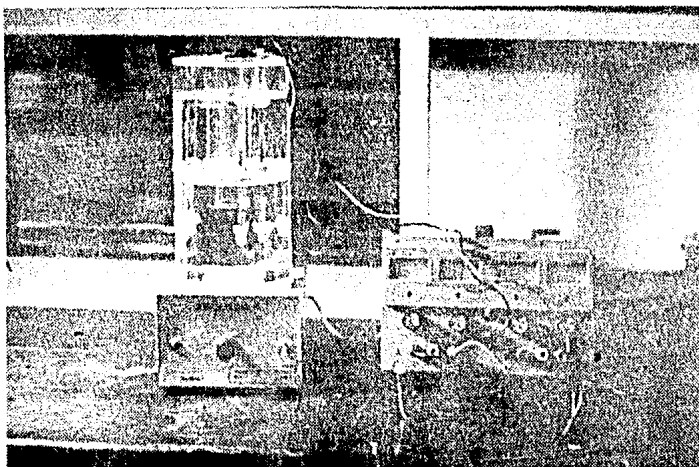
Se seleccionó un cultivo con buen crecimiento y se sembró en agar nutritivo e incubándose a 37°C toda la noche. Se tomaron las colonias aisladas con un palillo estéril y se sembraron en agar nutritivo con ayuda de una cuadrícula, dejándose incubar toda la noche a 37°C.

Una vez que crecieron todas las colonias se procedió a realizar una replicación de placas sobre medio conteniendo 50 p.p.m. de plata y se incubaron toda la noche a 37°C. Se seleccionaron las colonias que no crecieron en el medio con plata y se sembraron en agar nutritivo, se incubó a 37°C por 24 h., por último se guardaron las cajas en refrigeración a 4°C hasta su uso.



Esquema del proceso de electroforesis

Una vez aisladas las cepas curadas se realizaron pruebas de resistencia a metales pesados (plata, zinc, cobalto, plomo, níquel y mercurio) a la cepa curada y a las cepas de origen, también se hicieron las mismas pruebas bioquímicas hechas a las cepas aisladas y se compararon los resultados.



Sistema de electroforesis en tubo

## R E S U L T A D O S

## R E S U L T A D O S

TABLA 1. Muestreo en la mina SAN ACASIO en Zacatecas, Zac.

Muestra	Sitio	Tipo de muestra	pH	Temperatura
1	Extracción nivel 200	agua con lodo	5.0	17°C
2	Gotera dentro de la mina	agua	5.0	16°C
3	Salida de la mina	agua de drenaje	5.0-6.0	17°C
4	Extracción y tamizado de materiales	agua de mezcla	5.0-6.0	22°C
5	Entrada del nivel 200	pedra mineral con sulfuro de plata y pirita de plata		
6	Zona de minerales que provienen del nivel 160	pedra mineral con óxido de plata		
7	Lixiviación química de plata	muestreo de finos y concentrados de plata (tierra mineral molida y tamizada)		

De acuerdo con el muestreo realizado en la mina de plata San Acasio en Zacatecas, Zac., se obtuvo una serie de muestras y se determinaron las condiciones del sitio de donde se extrajeron. Tanto las muestras como las determinaciones realizadas se resumen en la Tabla 1.

Una vez obtenidas las muestras se procedió a sembrarlas en medio MM-HA conteniendo plata, en medio para el aislamiento de Thiobacillus ferrooxidans así como en agar nutritivo y cuyos resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

TABLA 2. CULTIVO DE MUESTRAS ACUOSAS

MUESTRA	CRECIMIENTO EN				
	* A.N.	MM-HA + Ag <sup>+</sup> (p.p.m.)			** M.T.
		0	50	100	
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-

- \* Agar Nutritivo
- \*\* Medio Thiobacillus
- + crecimiento positivo
- crecimiento negativo

TABLA 3. RESISTENCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLATA

CEPA	Crecimiento en MM-HA + Ag <sup>+</sup> (p.p.m.)						
	0	10	20	30	40	50	70
<u>S. aureus</u> *	+	+	-	-	-	-	-
<u>S. enteritidis</u> *	+	+	+	-	-	-	-
<u>B. megaterium</u> *	+	+	-	-	-	-	-
CMSA-1 **	+	+	+	+	+	+	+
CMSA-3.3 **	+	+	+	+	+	+	+
CMSA-4 **	+	+	+	+	+	+	+

- \* Cepas testigo
- \*\* CMSA = Compañía Minera San Acasio
- + crecimiento positivo
- crecimiento negativo

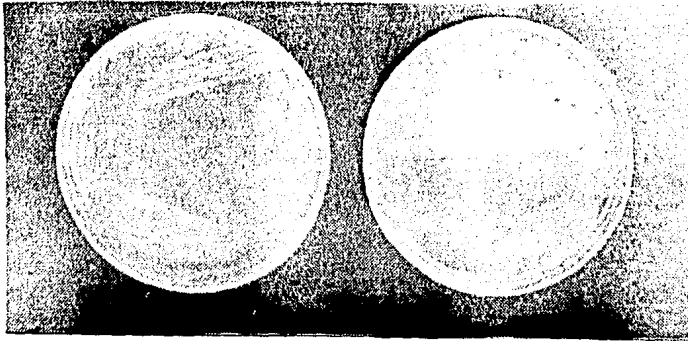
Una vez aisladas las cepas, se determinaron las condiciones de crecimiento en medio MM-HA con plata a concentraciones de 100 y 200 p.p.m. obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 4, además, se determinó el pH, la temperatura y el tiempo de incubación óptimos para el crecimiento de las cepas aisladas de tierra mineral. También se sembraron las cepas en medio MM-HA con diferentes concentraciones de plata a diferentes tiempos de incubación, resumiéndose los resultados en la Tabla 5.

Se observó también la morfología, tanto macroscópica (colonial) como microscópica de las cepas aisladas, lo cual podemos ver en las figuras 1, 2 y 3, y que se describen en la Tabla 6.



TABLA 4: Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento

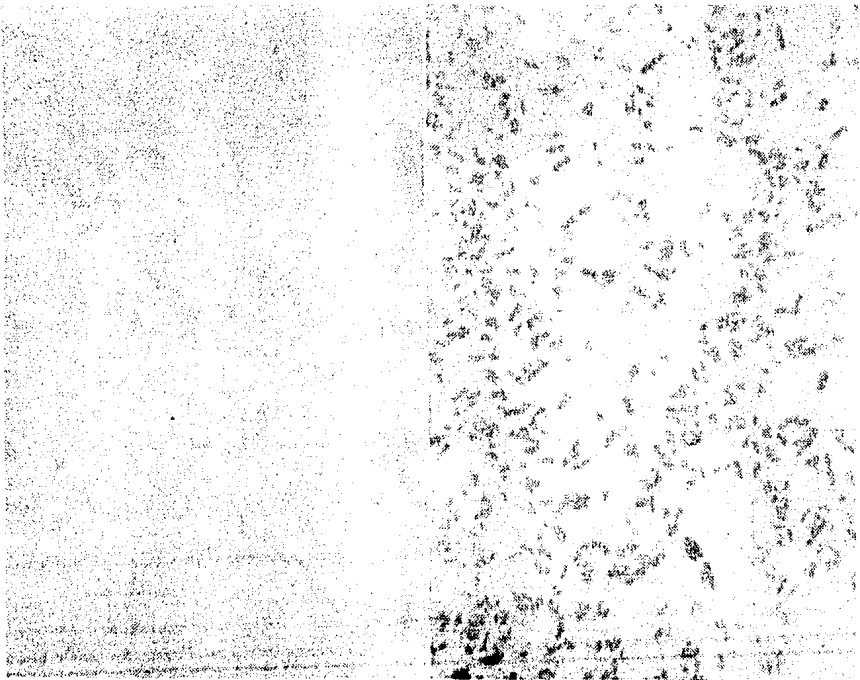
Temperatura °C	pH	Conc. Ag <sup>+</sup> p.p.m.	CMSA-1			CMSA-3.3			CMSA-4			h
			24	48	72	24	48	72	24	48	72	
37	5.0	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7.0	100	+	+	++	+	+	+	+	++	+++	—
		200	+	+	++	—	+	+	+	++	+++	—
	8.0	100	+	+	++	—	+	+	+	++	+++	—
		200	+	+	++	—	+	+	+	++	+++	—
10.0	100	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
45	5.0	100	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—
		200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7.0	100	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
		200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8.0	100	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+
		200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10.0	100	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	
	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
55	5.0	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7.0	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8.0	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10.0	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	



Agar Nutritivo

Medio MM-HA con 50  
p.p.m. de plata

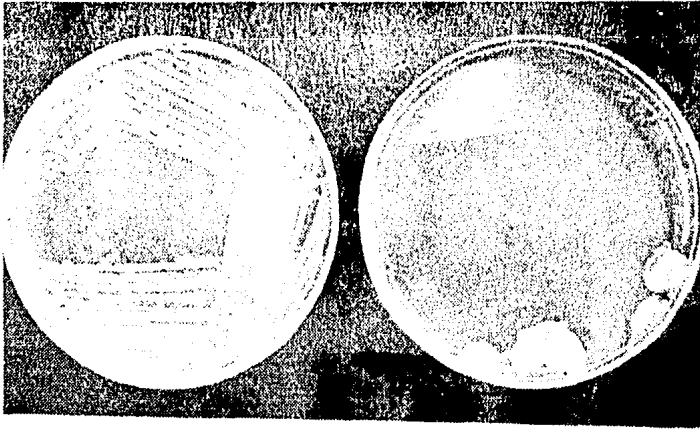
C.M.S.A. - 1



Sin plata

Con 50 p.p.m. de plata

Figura 1. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa CMSA-1 de un crecimiento en medio sin plata y en medio MM-HA con plata.



Agar nutritivo

Medio MM-HA con 50 p.p.m. de plata.

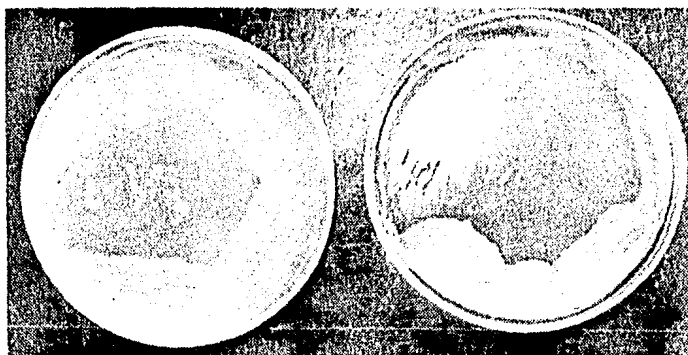
C.M.S.A. - 3.3.



Sin plata

Con 50 p.p.m. de plata

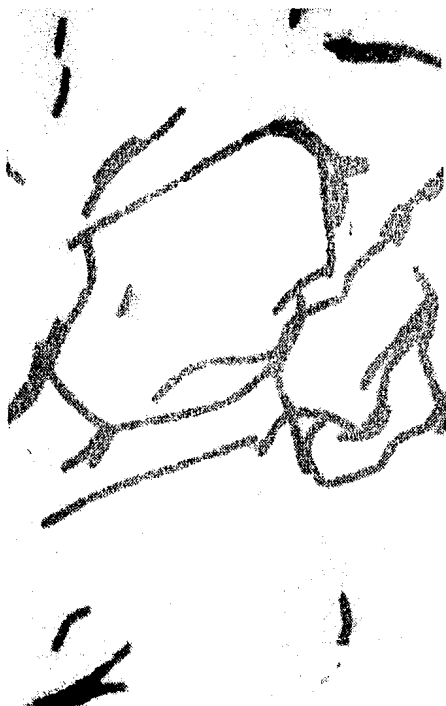
Figura 2. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa CMSA-3.3 de un crecimiento en medio sin plata y en medio MM-HA con plata.



Agar Nutritivo

Medio MM-HA con 50 p.p.m.  
de plata

C.M.S.A. - 4



Sin plata



Con 50 p.p.m. de plata

Figura 3.- Morfología macroscópica y microscópica de la cepa CMSA - 4 de un crecimiento en medio sin plata y en medio MM-HA con plata.

TABLA 5. Crecimiento de las cepas problema en medio con diferentes concentraciones de plata

Concentración de Ag <sup>+</sup> (p.p.m.)	Tiempo de Incubación	CMSA-1	CMSA-3.3	CMSA-4
0	24 h	++++	++++	++++
	48	++++	++++	++++
	72	++++	++++	++++
10	24	+	+	+++
	48	++	+++	+++
	72	+++	+++	+++
50	24	+	+	++
	48	++	+	+++
	72	++	++	+++
100	24	+	+	+
	48	+	+	++
	72	+	+	++

TABLA 6. Morfología de cepas crecidas en agar nutritivo a 37°C

CEPA	MORFOLOGIA	
	Macroscópica	Microscópica
CMSA-1	Colonias de 0.5-1.0 mm circulares, amarillas, de bordes regulares, convexas y duras.	Bacilos de 0.5 x 1.0 $\mu$ m Gram negativo y no esporulados.
CMSA-3.3	Colonias de 3.0-8.0 mm crema, circulares, de bordes regulares, aplanadas y ligeramente viscosas.	Bacilos de 1.0 x 4.0 $\mu$ m Gram positivos, forman cadenas de no más de 7 miembros. Esporulados.
CMSA-4	Colonias de 2.0-8.0 mm crema, bordes irregulares, un poco duras y aplanadas.	Bacilos de 0.7 x 4.0 $\mu$ m Gram positivos, forman cadenas de 11 o más miembros. Esporulados.
CMSA-4 C-1	Colonias de 2.0-8.0 mm crema, bordes irregulares, un poco duras y aplanadas.	Bacilos de 0.7 x 4.0 $\mu$ m Gram positivos, forman cadenas de 11 o más miembros. Esporulados.

También se realizaron tinciones para cápsula y esporas en medio con y sin plata, resumiéndose estos resultados en la Tabla 7. Más adelante se realizaron pruebas bioquímicas a cada una de las cepas aisladas obteniéndose los resultados que se observan en la Tabla 8 y que nos mostraron que son diferentes las cepas, así mismo se llevó a cabo la prueba de sensibilidad a antibióticos y a sulfametoxazol-trimetoprim, mostrándose los resultados en la Tabla 9.

TABLA 7. Tinciones de bacilos problema crecidos en medio MM-HA sin plata y en medio MM-HA con 50 p.p.m. de plata.

TINCION	CMSA-1		CMSA-3.3		CMSA-4	
	MM-HA sin Ag <sup>+</sup>	MM-HA con Ag <sup>+</sup>	MM-HA sin Ag <sup>+</sup>	MM-HA con Ag <sup>+</sup>	MM-HA sin ag <sup>+</sup>	MM-HA con Ag <sup>+</sup>
Cápsula Rojo Congo	—	—	—	+	—	+
Tinta China	—	—	—	—	—	—
Esporas Schaefer y Fulton	—	—	+	+	+	+
Gram	—	—	+	+	+	+

TABLA 8. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas problema

Prueba	CMSA-1	CMSA-3.3	CMSA-4	CMSA-4 C-1*
Fermentación de carbohidratos:				
Lactosa	+	—	+	+
Sacarosa	+	—	+	+
Xilosa	+	—	+	+
Glucosa	+	—	+	+
Manitol	+	—	+	+
Voges Proskauer	—	—	—	—
Rojo de metilo	+	—	+	+
Producción de indol	+	+	+	+
Citrato	—	+	+	+
Producción de Catalasa	+	+	+	+
Producción de Oxidasa	—	—	—	—
Crecimiento en NaCl al 4%	—	+	+	+
Oxid./Ferm.	-/+			

\* Cepa curada

TABLA 9. Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos efectuada a las cepas problema

Antibiótico	Conc.	CMSA-1	CMSA-3.3	CMSA-4	CMSA-4 C-1
Cefotaxima	30 mcg.	S*	S/R**	R*	R
Ampicilina	10 "	S	S/R	R	R
Cefalosporina	30 "	S	S	R	R
Cloxacilina	1 "	S	S	R	R
Eritromicina	15 "	S	S	R	R
Gentamicina	10 "	S	S	S	S
Lincomicina	2 "	S	S	R	S
Kanamicina	30 "	S	S	S	S
Estreptomicina	10 "	S	S/R	R	R
Sulfametoxazol-Trimetoprim	25 "	S	S	S	S
Tetraciclina	30 "	S	S	S	S
Penicilina	10 U	S	S	R	S

\*S = Sensible, R = resistente. \*\* Cepa sensible con algunas colonias resistentes al antibiótico

En los corrimientos electroforéticos realizados a las muestras obtenidas de las diferentes cepas problema, así como a la cepa utilizada como testigo, se observa que las distancias recorridas por cada uno de los plásmidos varía conforme se utiliza diferente concentración de agarosa en el gel, sin embargo podemos ver también que el plásmido de la cepa CMSA-4 corre a una distancia igual a el de la cepa testigo no así los plásmidos de las otras cepas que corren una mayor distancia de acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 10 y figura 4.

Por último, se realizó una curación del plásmido con bromuro de etidio obteniéndose una colonia bacteriana (CMSA-4 C-1) que pierde su resistencia a plata. Se hicieron las mismas pruebas bioquímicas hechas a las cepas problema, mostrándose los resultados en la misma Tabla 8 para dar un punto de comparación con las cepas problema que contienen plásmidos. Además se corrió una prueba de resistencia a otros metales pesados tanto para la cepa curada como para las cepas resistentes a plata y cuyos resultados nos muestran que la cepa curada es diferente (en cuanto a resistencia a metales pesados) a la cepa original como se observa en la Tabla 11.



TABLA 10. Corrimiento electroforético de plásmidos

Cepa	Agarosa (%)	Rf
CMSA -1	1.0	0.13
CMSA-3.3	1.0	0.13
CMSA-4	1.0	0.09
<u>E. coli</u> J53/RP4	1.0	0.09
CMSA-1	0.8	0.25
CMSA-3.3	0.8	0.22
CMSA-4	0.8	0.18
<u>E. coli</u> J53/RP4	0.8	0.18
CMSA-1	0.7	0.32
CMSA-3.3	0.7	0.28
CMSA-4	0.7	0.23
<u>E. coli</u> J53/RP4	0.7	0.23

TABLA 11. Prueba de resistencia a metales pesados

Cepa	A.N.*	Ag+	Zn <sup>2+</sup>	Co <sup>+2</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
	0	50	20	20	20	20	20 p.p.m.
CMSA-1	+	+	+	—	+	+/-	—
CMSA-3.3	+	+	+	+	+	+	+
CMSA-4	+	+	—	—	+	+	+
CMSA-4 C-1	+	—	—	—	+/-	—	—
<u>E. coli</u> J53/RP4	+	—	+	+	+	+	—

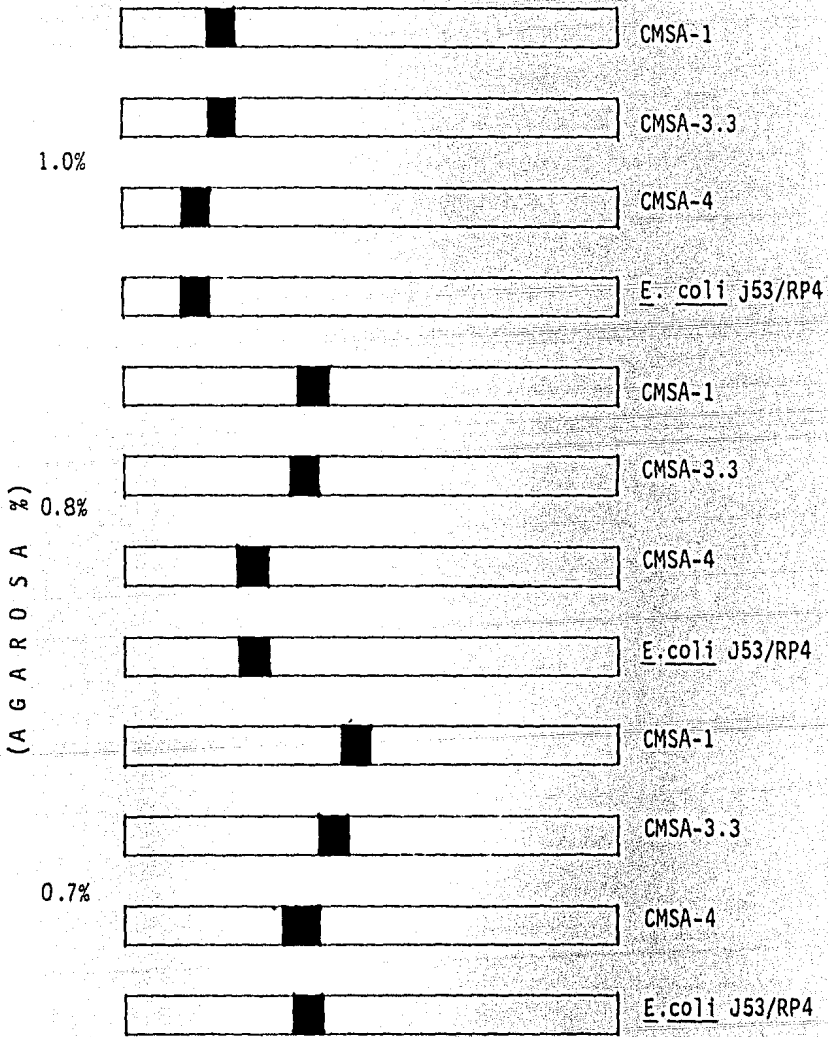


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa

## D I S C U S S I O N

## D I S C U S I O N

Conforme el muestreo realizado en la mina de plata, podemos decir que las condiciones que predominan en la mina, en cuanto a las muestras acuosas tomadas, fueron pH de 5.0 a 6.0 y temperatura de 16°C. Por otro lado tenemos que las muestras sólidas obtenidas contienen plata formando diferentes compuestos (óxidos, sulfuros y pirita de plata) lo cual en un momento dado nos plantea la posibilidad de que esta plata pueda ser extraída de estos minerales por medio de un proceso biológico.

Se aislaron algunas cepas a partir de las muestras acuosas sembradas en medio MM-HA (Tabla 2), pero no se obtuvo ninguna cepa de las muestras sembradas en el medio para Thiobacillus. De las cepas aisladas se obtuvieron tres cepas diferentes (CMSA-1, CMSA-3.3 y CMSA-4) - que mostraron ser resistentes a plata en comparación con las cepas testigo, teniéndose que la cepa CMSA-4 es la más resistente al metal y siguiéndole en el orden de resistencia la cepa CMSA-1 y por último la cepa CMSA-3.3.

Por otro lado, de acuerdo a los resultados de la Tabla 4, podemos decir que las condiciones óptimas para el crecimiento, en el laboratorio, de estos microorganismos son pH de 7.0 a 8.0, temperatura de 37°C y crecimiento de colonias grandes en medio MM-HA con 100 y 200 p.p.m.

de plata a las 72 h, mostrándonos al mismo tiempo que estas cepas pueden resistir 200 p.p.m. de plata o más, como se observa en la Tabla 5, en donde los resultados reflejan el efecto inhibitorio de la plata sobre el crecimiento de las bacterias, a 0 p.p.m. de plata el crecimiento es óptimo a las 24 h, no siendo así con las demás concentraciones de plata (10, 50 y 100 p.p.m.) ya que para poder detectar el crecimiento de las colonias se tuvo que incubar hasta 72 h, teniéndose que la cepa CMSA-4 es la que crece mejor en este lapso.

Durante la caracterización parcial de las cepas, se encontró lo siguiente:

- i) La morfología colonial de las tres cepas fue diferente como se muestra en las figuras 1, 2 y 3 así como en la Tabla 6.
- ii) Dos cepas de bacilos (CMSA-3.3 y CMSA-4) son Gram positivos, largos y esporulados, de crecimiento aerobio y que de acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas y sensibilidad a antibióticos, pertenecen al género Bacillus (4).

La otra cepa (CMSA-1) consta de bacilos cortos - Gram negativos, no esporulados y de crecimiento aerobio la cual no fue posible asignarla a un género determinado de acuerdo con el manual -

Bergey, ya que las características morfológicas, de cultivo, metabólicas (pruebas bioquímicas) y de sensibilidad a antibióticos no lo permitieron, sin embargo, en el futuro se tratará de identificar las cepas hasta especie.

iii) En el caso de dos de las cepas (CMSA-3.3 y CMSA-4) en un medio con 50 p.p.m. de plata hay crecimiento de pocas colonias de gran tamaño y aspecto húmedo, lo que nos hace pensar que hay una alta mortalidad celular y que las células que sobreviven dan colonias de aspecto mucoso, con bacterias que producen cápsula.

La inducción de la cápsula puede ser debida a una respuesta de la bacteria contra un medio con elevada concentración de cationes (12). Sin embargo, el ión plata se encontró a bajas concentraciones en el medio, habiendo producción de cápsula por el bacilo y cuando se sembró en un medio con elevada concentración de cationes (NaCl al 4%) no se produjo cápsula (resultados no mostrados), lo cual nos lleva a la alternativa de que la producción de cápsula pueda ser inducida por el ión plata o bien podría ser la selección de las células espontáneamente capsuladas que hay en la población bacteriana, lo que podría

explicar la alta mortalidad celular que se presenta al pasar de un medio sin plata a un medio con plata. En cualquier caso, la producción de cápsula podría ser un mecanismo de defensa contra el ión plata. Para demostrar alguna de las posibilidades anteriores se requiere de más trabajo experimental.

- iv) Se comprobó que las cepas pueden resistir al menos 200 p.p.m. de plata y se encontró que esta resistencia también es extensiva a otros metales pesados como lo son los iones  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , y  $Hg^{2+}$ .

Para saber si la resistencia a plata de las cepas, estaba codificada en plásmidos o en el genoma bacteriano, se hizo una electroforesis, encontrándose un plásmido en cada cepa que se probó. Para el caso del plásmido de la cepa CMSA-4 el peso molecular de éste es aproximadamente de  $36 \times 10^6$  d, puesto que corrió igual que el plásmido RP4 de Escherichia coli y en el caso de las cepas CMSA-1 y CMSA-3.3 los plásmidos correspondientes parecen ser de menor peso molecular (21).

Las bandas en los geles de electroforesis se ven tenues debido a que tal vez estos plásmidos se segregan espontáneamente, lo que nos explicaría la alta mortalidad que se produce al sembrar en un medio fresco con plata a

partir de un medio con plata. Y si relacionamos la producción de cápsula con la resistencia a plata, podríamos pensar en las pocas bacterias que producen cápsula se protegen a sí mismas y a las otras bacterias de la colonia que no producen cápsula y/o no tienen plásmido.

También se intentó hacer la curación de los plásmidos lo que sólo se consiguió para la cepa CMSA-4, obteniéndose una cepa de características idénticas a las de la cepa de origen salvo a la resistencia a los metales pesados (en especial plata) y a algunos antibióticos. - En este caso no se observó producción de cápsula ya que la cepa no creció en medio MM-HA con plata. Todo esto nos indica que el plásmido eliminado es el que le confiere la resistencia a plata al bacilo.

Resumiendo todos los datos y resultados obtenidos, podemos decir que la cepa CMSA-4 (dada su resistencia a altas concentraciones de plata, a su plásmido de gran tamaño, a su buen crecimiento en medio con plata así como a su gran resistencia a antibióticos), es la mejor cepa para realizar la extracción y transferencia de plásmidos a una cepa de Thiobacillus adecuada a los procesos de lixiviación biológica de metales.



## CONCLUSIONES

## C O N C L U S I O N E S

- 1.- Se aislaron tres cepas de bacilos que son resistentes a altas concentraciones de iones plata. Dos cepas son bacilos Gram positivos, esporulados (CMSA-3.3 y CMSA-4) y una cepa es un bacilo Gram negativo no esporulado (CMSA-1).
- 2.- Las cepas aisladas tienen una resistencia a más de 200 p.p.m. de plata, así como a otros metales pesados como  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Hg^{2+}$ .
- 3.- Sólo se observan células capsuladas cuando los bacilos Gram positivos son cultivados en medio con plata, lo que nos hace suponer que ésta es parte de un mecanismo de defensa contra el efecto inhibitorio de los iones plata.
- 4.- Se detectó por electroforesis un plásmido en cada cepa aislada. El peso molecular del plásmido detectado en la cepa CMSA-4 es aproximadamente de  $36 \times 10^6$  d, siendo los plásmidos de las otras dos cepas de menor peso molecular.
- 5.- Sólo se logró la eliminación del plásmido en una de las cepas aisladas (CMSA-4).

6.- Se determinó que el plásmido detectado en los bacilos aislados, es el que confiere la resistencia a los iones plata.

7.- La cepa aislada que reúne las características necesarias para realizar la extracción y aislamiento de plásmidos y que se podría utilizar en un trabajo futuro para la transferencia de estos plásmidos que confieren resistencia a iones plata a un Thiobacillus es la cepa CMSA-4.

# R E S U M E N

## R E S U M E N

En el país existen minas de plata que contienen poca cantidad de metal y en las cuales si se quiere llevar un proceso de extracción del metal (a nivel industrial) por métodos químicos resulta de costo elevado. Ahora - bien, hay microorganismos como el Thiobacillus ferrooxidans que se utiliza en la extracción de metales como cobre y uranio produciendo condiciones ácidas. Si tratáramos de implantar un proceso biológico para la extracción de plata, lo intentaríamos hacer con I. ferrooxidans, - sin embargo, no se han obtenido cepas que sean resistentes a este metal. Por lo que recurrimos al aislamiento de bacterias (Bacillus) de minas de plata que fueran resistentes a este metal y que presenten plásmidos que codifiquen para la resistencia a plata con el fin de transferirlos a I. ferrooxidans.

Se aislaron tres cepas de bacilos; dos Gram positivas y una Gram negativa, con resistencia a más de 200 - p.p.m. de plata en medio sólido. Los bacilos Gram positivos produjeron una cápsula densa visible aún con tinción de Gram, sólo cuando fueron crecidos en medio con plata y no se detectó cápsula alguna en el bacilo Gram negativo.

En las dos cepas capsuladas se ha detectado la presencia de un plásmido por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, lo que nos hizo pensar que la resistencia a la plata sea debida a este plásmido por lo que al realizar la curación de la bacteria se observa la pérdida de resistencia al metal, corroborando que el plásmido es el que codifica para la resistencia a plata, así como que la cápsula puede ser un mecanismo de defensa en contra de los iones plata ya que sólo se produce en presencia de ésta.

## BIBLIOGRAFIA

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Aldrich Meyers J., D. Sánchez, L.P. Elwell y S. - Falkow. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bact.* 127 (3): 1529-1537.
- 2.- Birhboim H.C. y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6):1513-1523.
- 3.- Bruce C.C. y B.J. Brown. Gene mutation. En "Manual of methods for general bacteriology". Gerhardt et. al., eds. ASM, E.U.A. 1981. Cap. 13, pp. 223-228.
- 4.- Buchanan y N.E. Gibbons. "Bergey's manual of determinative bacteriology". 8th Ed. The William & Wilkins Company. Baltimore. E.U.A. - 1974. pp. 290-424 y 529-598.
- 5.- Bull M.J. "Progress in industrial microbiology". Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam-Oxford-New York. E.U.A. 1982. Vol. 16, pp. 78-118.
- 6.- Currier C.T. y E. Nestor. 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* 76:431-441.



- 7.- Eckhardt T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584-588.
- 8.- Finkelstein M. y R. H. Rownd. 1978. A rapid method for extracting DNA from agarose gels. *Plasmid* 1:557-562.
- 9.- Foster T. J. 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* 47 (3):361-409.
- 10.- Hardman D. J. y P.C. Gowland. 1985. Large plasmids in bacteria. Part 1. A survey of associated phenotypes in bacteria. *Microbiol. Sciences* 2 (3): 90-94.
- 11.- Hardman D. J. y P.C. Gowland. 1985. Large plasmids in bacteria. Part 2. Genetics and Evolution. *Microbiol. Sciences* 2 (6):184-190.
- 12.- Higham P.D., P.J. Sadler y M.D. Scawen. 1984. Cadmium resistant *Pseudomonas putida* synthesizes. Novel cadmium proteins. *Science* 225:1043-1046.
- 13.- Horikoshi K. y Akiba T. "Alkalophilic microorganism, a new microbial world". Japan Scientific Societies Press. Tokio y Springer-Verlag. Japón. 1982.
- 14.- Kado C. I. y Liu S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bact.* 145 (3):1365-1373.

- 15.- Klueven Gijs J. y Olli H. Tuovinen. The genera Thio  
bacilli and Thiomicrospira. En "The Prokaryotes".  
Starr P.M., H. Stolp, H.G. Trupper, A Ballows and  
Shilegel, Eds.  
Springer-Verlag - Berlin. Alemania. 1981.  
Vol. 1, Cap. 81 pp. 1023-1034
- 16.- Maniatis T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. "Molecular  
cloning laboratory manual". Cold Spring Harbor La  
boratory.  
E.U.A., 1982.  
pp. 88-96 y 150-172.
- 17.- Marshall Sittig. "Geophysical and geochemical tech  
niques for exploration of hydrocarbons and mine  
rals".  
Noyes Data Corporation.  
New York. E.U.A., 1980.  
pp. 24-32.
- 18.- Silver M. y O. Dinardo. 1981. Factors affecting -  
oxidation of thiosalts by Thiobacilli.  
App. and Env. Microb. 41 (6):1301-1309.
- 19.- Silverman P.M. y E. F. Muñoz. 1971. Fungal lea-  
ching of titanium from rock.  
App. Microb. 22 (5):923-924.
- 20.- Smith O. H., D.B. Danner y R.A. Deich. 1981. Gene-  
tic transformation.  
Ann. Rev. Biochem. 50:41-68.

- 21.- Takahashi S. y Y. Nagano. 1984. Rapid procedure -  
for isolation of plasmid DNA and application to -  
epidemiological analysis.  
J. of Clin. Microb. 20 (4):608-613.
- 22.- Tuovinen O.H., S.I. Niemela y H. G. Gylleberg. -  
1971. Tolerance of Thiobacillus ferrooxidans to so  
me metals.  
Antoine van Leeuwenhoek 37:489-496.