

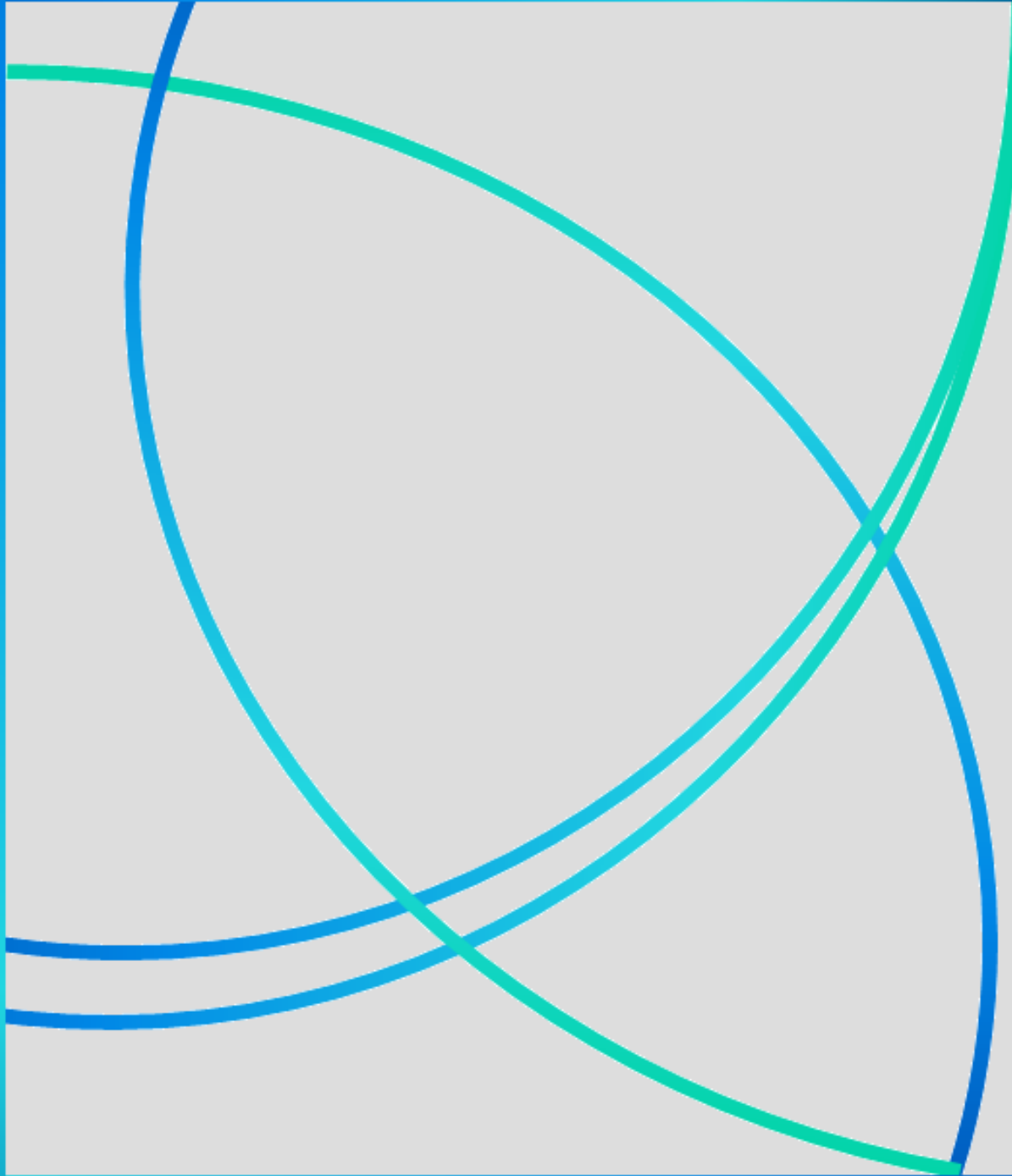
Depósito Legal ppi 201502ZU4668



Vol. 24, N° 3

Julio - Septiembre 2016

# CIEENCIA



Esta publicación científica en  
formato digital es continuidad  
de la revista impresa  
Depósito Legal: pp 199302ZU47  
ISSN: 1315-2076

An International Refereed Scientific Journal  
of the Facultad Experimental de Ciencias  
at the Universidad del Zulia

CIENCIA 24(3), 125-133, 2016  
Maracaibo, Venezuela

## Adquisición de la resistencia a cromo en *E. coli* DH5α por transformación *in vitro* mediada por plásmidos de *Acinetobacter* sp.

Jesús Pérez<sup>1</sup>, Doris Reyes<sup>2</sup>, Arnaldo Armado<sup>1,3</sup> y Oscar Valbuena<sup>2,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, <sup>2</sup> Departamento de Biología, <sup>3</sup>Centro de Investigación y Extensión en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM), <sup>4</sup>Centro de Biotecnología Aplicada (CBA). Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela

Recibido: 02-05-16 Aceptado: 29-07-16

### Resumen

Concentraciones relativamente altas de metales alteran negativamente la biota bacteriana y las condiciones químicas y físicas de suelos y cuerpos de agua, ambientes naturales indispensables para labores agropecuarias y pesqueras. El objetivo de esta investigación fue: evaluar la presencia de plásmidos en bacterias aisladas de suelos contaminados con metales y transferir la resistencia a metales a *E. coli* DH5α (cepa sensible). Doce cepas bacterianas aisladas de muestras de suelo contaminado, crecieron *in vitro* en un medio complementado con metales (Fe<sup>+3</sup>, Pb<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup> y Cr<sup>+6</sup>), nueve de ellas presentaron plásmidos. El material plasmídico de la cepa MT6 (género *Acinetobacter*) fue usado para transformar *E. coli* DH5α mediante un choque térmico a 42 °C. La cepa transformada, *E. coli* DH5αT, creció en medios complementados con Cr<sup>+6</sup> a 3, 6 y 8 mM y mostró en su fracción membranosa (FM) un polipéptido con masa molecular superior a 100 KDa. Estos resultados indican que el material plasmídico de *Acinetobacter* es responsable de la adquisición de la resistencia a Cr<sup>+6</sup> en *E. coli*, induciendo además, la presencia de un polipéptido en su FM.

**Palabras clave:** Resistencia a cromo, plásmidos, *Acinetobacter*, *E. coli* DH5α.

### Acquisition of the chromium resistance in *E. coli* DH5α through *in vitro* transformation mediated by *Acinetobacter* sp plasmids

### Abstract

Relatively high concentrations of metals exert negative effects on bacterial communities and change the chemical and physical properties of soils and water bodies, natural environments, for agricultural, cattle rising and fishery activities. The aim of this research was: to evaluate the plasmid presence in bacterial strains isolated from metal contaminated soil and to transfer the metal resistance to *E. coli* DH5α (sensitive strain). Twelve bacterial strains, isolated from metal contaminated soil samples, grew *in vitro* on a medium supplemented with metals (Fe<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup> and Cr<sup>+6</sup>); nine of them bore plasmids. The plasmid material from the MT6 strain (*Acinetobacter* sp) was

\*Autor para la correspondencia: ovalbuena@uc.edu.ve

used to transform *E. coli* DH5 $\alpha$ , through a thermal shock at 42 °C. The transformed *E. coli* (*E. coli* DH5 $\alpha$ T) grew on media containing 3, 6 and 8 mM Cr<sup>+6</sup>, and showed, on its membranous fraction (MF), a polypeptide, with a molecular mass higher than 100 KDa. Therefore, the acquisition of Cr<sup>+6</sup> resistance by *E. coli* DH5 $\alpha$ T is due to both the MT6 plasmid material and to the presence of the 100 KDa polypeptide in its membranes.

**Key words:** Chromium resistance, plasmids, *Acinetobacter*, *E. coli* DH5 $\alpha$ .

## Introducción

Los organismos procariotes y eucariotes participan activamente en fenómenos geológicos, muchos de ellos de naturaleza geomicrobiana, es decir se establecen relaciones entre metales, minerales y microorganismos. Si bien los metales ejercen una función importante en variados procesos de la biosfera, ellos pueden inducir consecuencias beneficiosas o perjudiciales para los ecosistemas. La biorremediación surge como una estrategia para detener, minimizar o eliminar tales efectos negativos (1). De tal manera, los microorganismos juegan un papel central en el mantenimiento de las condiciones óptimas de los ecosistemas. Inherente a sus necesidades metabólicas y reproductivas, los seres vivos requieren de concentraciones definidas de metales, los cuales conforman sistemas enzimáticos y estructuras celulares indispensables para satisfacer diversas funciones vitales. No obstante, si tales concentraciones superan o bajan a una concentración crítica, se producen eventos nocivos para la célula; bajas concentraciones dan origen a desordenes metabólicos que pueden atentar contra la viabilidad celular y altos valores generan, entre otros, efectos tóxicos (2-6). La toxicidad se origina mediante la interacción de los metales con sitios definidos en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, eventos que pueden causar inhibición de enzimas, bloqueo y/o inactivación de receptores y transportadores celulares, modificación de membranas, entre otras acciones (7,8)

bajo tales circunstancias, y particularmente en los microorganismos (bacterias, hongos y algas), se establecen una variedad de mecanismos que tienden a eliminar los efectos de las elevadas concentraciones del agente nocivo, estas estrategias constituyen la resistencia a tales elementos. Entre las resistencias más estudiadas se citan la resistencia a antibióticos y metales (8). Los mecanismos para desarrollar la resistencia son variados (9,10), ellos incluyen la modificación de estado de oxidación del metal por enzimas específicas (11,12), el secuestro del metal por quelación con compuestos intracelulares o extracelulares (2,13-15), secuestro en compartimientos subcelulares, la síntesis de proteínas integrantes de bombas moleculares eyectoras de metales o canales que facilitan su expulsión del ambiente intracelular (9,10), síntesis de enzimas o proteínas que por su estructura no son sensibles al metal. La resistencia a sustancias químicas, entre estas los metales, se encuentran codificadas genéticamente en los cromosomas (15) o en elementos extra cromosomales conocidos como plásmidos, estos últimos muy comunes en los microorganismos y particularmente en bacterias. (7,15,16). En este trabajo se presentan evidencias indicativas de que la resistencia a Cr<sup>+6</sup> en bacterias, está de alguna manera asociada a la presencia de proteínas en membranas, cuya síntesis es inducida por plásmidos obtenidos de cepas bacterianas aisladas de terrenos contaminados con metales.

## Materiales y Métodos

### 1.- Cepas bacterianas

Las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* BL21 fueron suministradas por el Laboratorio de Biotecnología y las 12 autóctonas del suelo, cepas MT1 a MT12, por el Laboratorio de Microbiología, ambos laboratorios del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

### 2. - Cultivo de cepas bacterianas

Muestras de las cepas bacterianas se incorporaron a caldo Luria Bertoni (LB) (HIMEDIA, India), pH 7,5 y luego de 24 h a 23 °C, alícuotas de 100  $\mu$ L fueron transferidas a medio LB complementado con metales (caldo restrictivo, CR) conteniendo: Fe 30 ppm (537  $\mu$ M), Pb 20 ppm (96  $\mu$ M), Zn 20 ppm (305  $\mu$ M), Cr 2,5 ppm (48  $\mu$ M), Ni 2 ppm (34  $\mu$ M) y Co 1 ppm (17  $\mu$ M), ajustado a pH 9,0 con NaOH y esterilizado por 20 min a 121 °C y 15 psi de presión y se incubó a 33 °C durante 48 h. Los metales fueron añadidos a los medios como sales, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (17).

### 3.- Aislamiento y caracterización de ADN plasmídico

Volúmenes (3 mL) de los cultivos bacterianos en CR, se crecieron hasta una absorbancia de 1,0 a 540 nm y se procesaron, de acuerdo al método de lisis alcalina descrito por Kado y Liu, para aislar el material plasmídico (18), el cual se resuspendió en 30  $\mu$ L de tampón Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5, almacenándose a -80 °C. Las preparaciones se caracterizaron por electroforesis en geles de agarosa 0,7 % (19), analizando 15  $\mu$ L de cada muestra,

incluyendo como control positivo de la extracción, el plásmido pBBM11 de *E. coli* BL21 y dos marcadores de peso molecular, ADN 10 Kpb (Promega) y Lambda DNA/Hind III de 2-23 Kpb (Promega). La corrida se efectuó a 100 voltios por 1 h a temperatura ambiente. La visualización del ADN se efectuó con un transiluminador UVP Bio-Rad (USA). Las cepas que mostraron mayor abundancia de material plasmídico (cepas MT4, Mt5, MT6 y MT11) fueron posteriormente identificadas a nivel de género por pruebas bioquímicas y aspectos morfológicos (17).

### 4.-Pruebas de resistencia a metales

Alícuotas (100  $\mu$ L) de los cultivos de las cepas bacterianas identificadas, crecidas por 18 h en caldo LB a una densidad óptica de 0,5, se sembraron por extensión sobre agar nutritivo (AN) a pH 8,0. Seguidamente, discos de papel de filtro esterilizados, de 8 mm de diámetro se colocaron, sobre la superficie de las placas de agar, agregándoseles 20  $\mu$ L de sales 100  $\mu$ M correspondientes a Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Cr<sup>+6</sup> y Na<sup>+</sup> (12,20). Las placas se incubaron a 35 °C por 18 h, los halos de inhibición se observaron sobre un fondo negro y se determinó su diámetro (20).

### 5.-Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ por plásmidos

Volúmenes de 1 mL del cultivo de *E. coli* en caldo LB, se procesaron para obtener el estado de competencia (19); luego del tratamiento las bacterias, en un volumen de 2 mL, se almacenaron a -80 °C. Posteriormente, alícuotas (100  $\mu$ L) de bacterias competentes se mezclaron con 10  $\mu$ L de la solución de ADN plasmídico aislado de la cepa MT6, sometiéndose al procedimiento de transformación (19) mediante un choque térmico de 42 °C durante 2 min, la preparación se diluyó hasta 1,0 mL con caldo LB y se agitó a 37

°C por una hora. La cepa transformada se denominará *E. coli* DH5 $\alpha$ T. Para evidenciar que la transformación de *E. coli* fue efectiva, se inoculó superficialmente 100  $\mu$ L del cultivo bacteriano sometido a transformación, sobre AN complementado con Cr<sup>+6</sup> 8 mM (ANCr<sup>+6</sup>) y se incubó durante 24 h a 37 °C. Adicionalmente, cultivos de *Acinetobacter* (cepa MT6) y de *E. coli* DH5 $\alpha$  no transformada, fueron analizados. Posteriormente, se determinó el crecimiento de las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* DH5 $\alpha$ T, en caldo LB y caldo LB suplementado con Cr<sup>+6</sup> (LBCr<sup>+6</sup>). Los datos fueron analizados aplicando un ANOVA.

### 6.-Análisis de perfiles polipeptídicos electroforeticos

Alícuotas (2 mL) de cultivos en CR de las cepas MT6, *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* DH5 $\alpha$ T, se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min.

Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 100  $\mu$ L de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 25 mM, sacarosa 10 %, pH 8,0) y se sonicaron con tres ciclos de 10 s de duración a 75 MHz. Seguidamente, después de centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante (fracción citoplasmática, FC) se trasvasó a un tubo esterilizado y el sedimento (fracción membranosa, FM) se disolvió en 100  $\mu$ L de tampón de lisis. Estas preparaciones fueron analizadas en electroforesis de geles de poliacrilamida al 7,5 % en condiciones desnaturalizantes (19).

### Resultados

Luego de su crecimiento en caldo CR, el ADN de las 12 cepas bacterianas, fue aislado y caracterizado por electroforesis en agarosa, los patrones se muestran en la figura 1. La intensidad del material plasmídico fue variable, fue alta en cuatro de las cepas (MT4, MT5, MT6 y MT11), reducida en cinco cepas (MT3, MT7, MT8, MT9, MT10) y ausente en MT1, MT2 y MT12. El peso molecular de los plásmidos se ubicó entre 18 y 23 Kpb, aunque se evidencia presencia de material genético en los bolsillos del gel. Únicamente las cepas con abundante material plasmídico se identificaron mediante pruebas bioquímicas y aspectos morfológicos (17), asignándose MT4 al género *Vibrio*, MT5 a *Klebsiella*, MT6 a *Acinetobacter* y MT11 a *Raoultella* (17). Los halos de inhibición en las pruebas de sensibilidad a Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Cr<sup>+6</sup> y Na<sup>+</sup>, a concentración de 100  $\mu$ M y pH 8,0 se muestran en la tabla 1. Las cuatro cepas mostraron halos de inhibición a Co<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup> y Cr<sup>+6</sup>, adicionalmente MT5 y MT11 lo mostraron para Ni<sup>+2</sup>, mientras que para el Na<sup>+</sup> (incluido como un control) no se observó inhibición. Los menores halos de inhibición (prueba de su resistencia) correspondieron a la cepa MT6, con 13,0 y 10,5 mm de diámetro para Cr<sup>+3</sup> y Cr<sup>+6</sup> respectivamente y su ausencia para Ni<sup>+2</sup>. En base a estos resultados, a la abundancia de material plasmídico y su reportada capacidad en procesos de transformación, transducción y conjugación bacterianas, la cepa MT6 fue elegida para la ejecución de los siguientes experimentos (21).

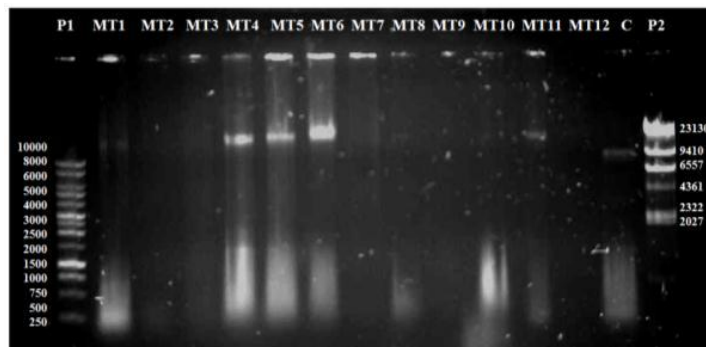


Figura 1. Perfil plasmídico de bacterias aisladas de suelos contaminados con metales pesados. (P1) Patrón de masa molecular de ADN 10 kpb, (MT1–MT12) cepas bacterianas aisladas de suelos contaminados con metales, (C) control positivo (*Escherichia coli* pBBM11), (P2) patrón de masa molecular Lambda DNA/HindIII 23 Kpb

Tabla 1. Halos de inhibición en diferentes cepas bacterianas en presencia de metales (100  $\mu$ M)

Cepa	Diámetro del halo (mm)				
	Co <sup>+2</sup>	Ni <sup>+2</sup>	Cr <sup>+3</sup>	Cr <sup>+6</sup>	Na <sup>+</sup>
<i>Vibrio</i> MT4	26,0	0,0	14,0	10,5	0,0
<i>Klebsiella</i> MT5	25,0	12,0	14,0	13,0	0,0
<i>Actinobacter</i> MT6	25,0	0,0	13,0	10,5	0,0
<i>Raoultella</i> MT11	26,0	10,0	14,5	15,0	0,0

Para estudiar la influencia de plásmidos en la resistencia bacteriana a metales y la posible transformación de cepas bacterianas (incapaces de crecer en tales medios) con plásmidos aislados de la cepa MT6, se incluyó en el estudio la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , la cual no crece en medios de cultivo suplementados con Cr<sup>+6</sup>. En la figura 2 se muestra el crecimiento de la cepa MT6, *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* DH5 $\alpha$ T en ANCr<sup>+6</sup> (3, 6 y 8 mM) y agar LB; es evidente el crecimiento de la cepa MT6 en todos los medios ensayados, *E. coli* DH5 $\alpha$  creció en agar LB y fue incapaz de hacerlo en ANCr<sup>+6</sup> 6 mM, creciendo muy incipientemente en Cr<sup>+6</sup> 3 mM. *E. coli* DH5 $\alpha$ T creció en ANCr<sup>+6</sup> 8mM indicando la adquisición de la resistencia a Cr<sup>+6</sup>. Las curvas de crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* DH5 $\alpha$ T en caldo LB y en LBCr<sup>+6</sup> 3 mM, se muestra en la figura 3.

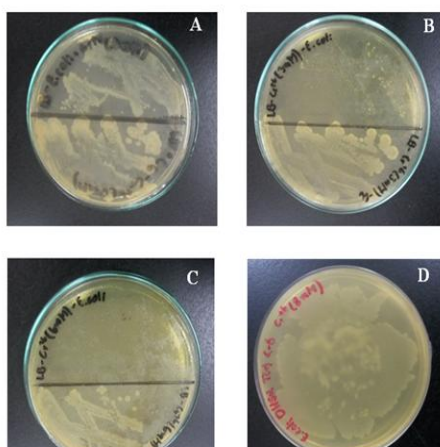


Figura 2. Crecimiento de cepas bacterianas en medios suplementados con concentraciones crecientes de Cr<sup>+6</sup>.

A, B y C Parte superior *E. coli* DH5 $\alpha$ , parte inferior *Acinetobacter* MT6 (A) 0 mM, (B) 3 mM, (C) 6 mM y (D) *E. coli* DH5 $\alpha$ T, 8 mM

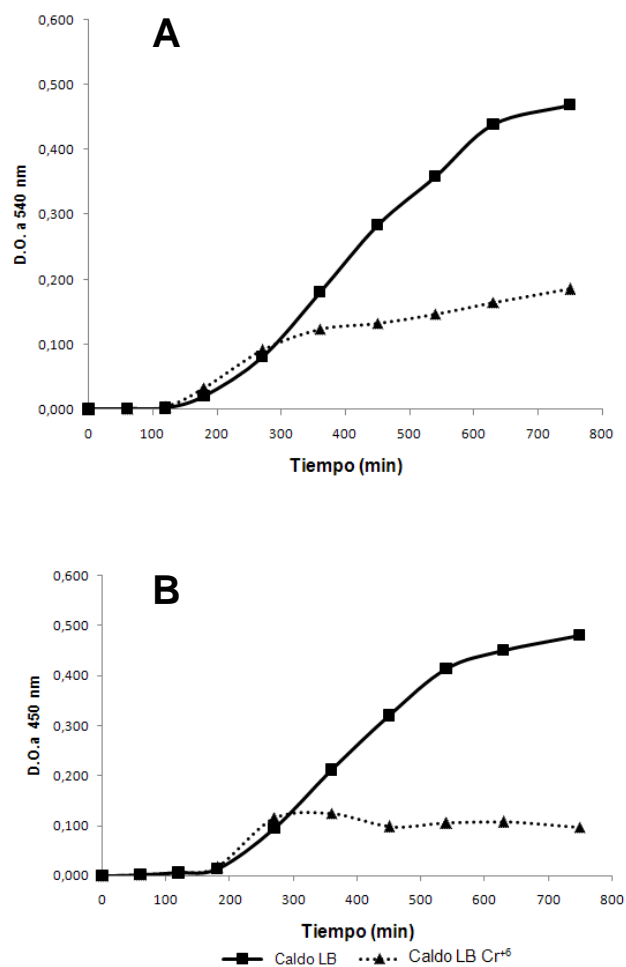
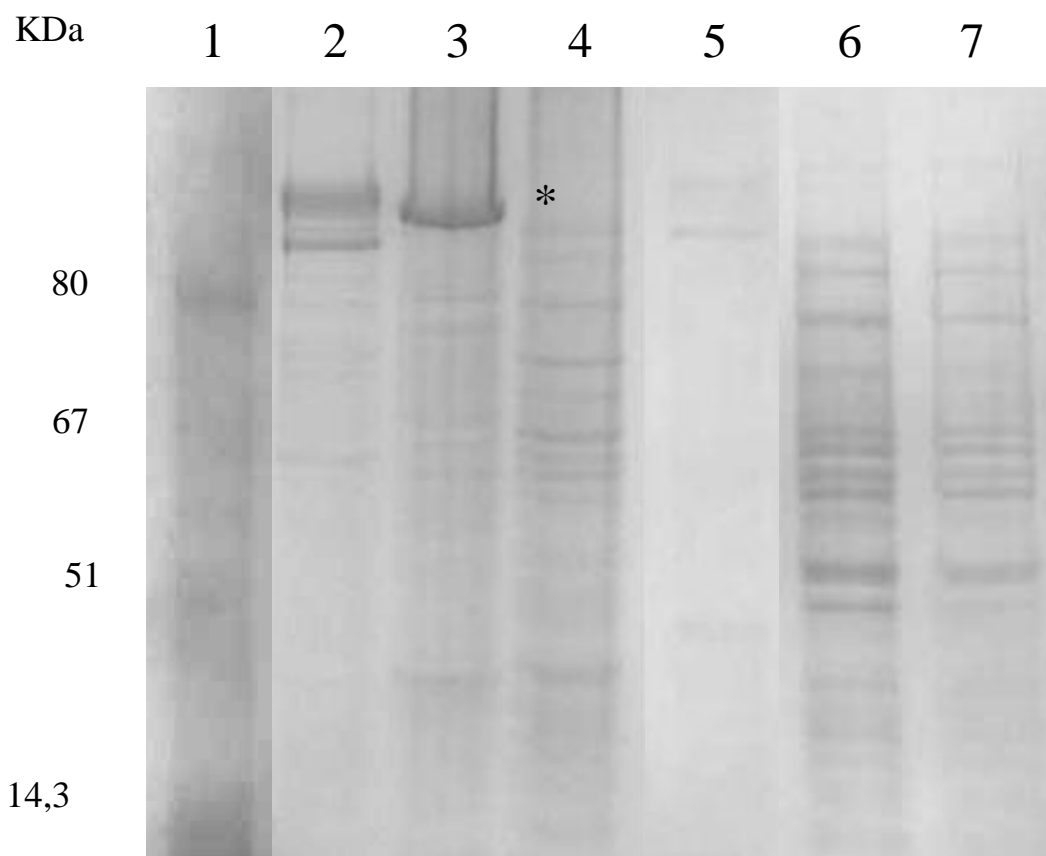


Figura 3.: Curvas de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia de Cr<sup>+6</sup> 3mM, a 37 °C y pH 7,5. (A) *E. coli* DH5 $\alpha$  T, (B) *E. coli* DH5 $\alpha$

En caldo LB ambas cepas crecieron de manera similar, mostrando una fase de latencia hasta los 150-180 min de incubación y luego una fase exponencial de crecimiento hasta alcanzar densidades ópticas de 0,5 unidades de absorbancia (ua) a los 750-800 min de incubación a 37 °C y pH 7,5. Al adicionar Cr<sup>+6</sup> al caldo LB, *E. coli* DH5 $\alpha$  detuvo su crecimiento, manteniendo una absorbancia de 0,12 ua y descendió ligeramente a la finalización del periodo de incubación, contrariamente *E. coli* DH5 $\alpha$ T incrementó

su absorbancia (de 0,12 a 0,200 ua) con tendencia a seguir aumentando. Finalmente, en los patrones polipeptídicos de las FM (figura 4), se detectaron polipéptidos con masas moleculares superiores a 100 kDa, correspondientes a *Acinetobacter* sp y *E. coli* DH5 $\alpha$ T (carriles 2 y 3, respectivamente), y su ausencia en la FM de *E. coli* DH5 $\alpha$  (carril 4).

En las FC de las tres cepas analizadas se detectaron una variedad de polipéptidos con masas moleculares inferiores y superiores a 100 KD, no observándose preponderancia de algún polipéptido en estas fracciones tal como ocurre en las FM. En la FM de MT6 (carril 2) se detectaron básicamente 2 polipéptidos (125 y 155 KDa), y aparentemente solo uno (130 KDa) en *E. coli* DH5 $\alpha$ T (carril 3).



**Figura 4:** Patrones polipeptídicos de fracciones subcelulares de cepas bacterianas cultivadas en presencia de Cr<sup>+6</sup>. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carriles 2,3 y 4: Fracciones membranosas de *Acinetobacter* MT6, *E. coli* DH5 $\alpha$ T y *E. coli* DH5 $\alpha$ , respectivamente. Carriles 5,6 y 7: Fracciones citoplasmáticas de *Acinetobacter* MT6, *E. coli* DH5 $\alpha$ T y *E. coli* DH5 $\alpha$ , respectivamente

### Discusión

El análisis de ADN de las cepas bacterianas detectó en 9 de ellas señales correspondientes a plásmidos, cuya masa molecular se ubicó entre 18 y 23 Kpb (figura 1); la presencia de estos plásmidos en diferentes géneros bacterianos

y sus aparentes tamaños, indica la posibilidad de que ocurran naturalmente procesos de conjugación/transformación en poblaciones bacterianas heterogéneas en suelos contaminados (21-24).

La alta intensidad de las bandas plasmídicas en las cepas MT4, MT5,

MT6 y MT11, posiblemente indican múltiples copias del plásmido. En las otras 5 cepas, MT3, MT7, MT8, MT9 y MT10, la intensidad de la señal fue reducida; en las cepas MT1, MT2 y MT12, no se detectaron señales, lo que indicó la posible ausencia de plásmidos, pudiendo implicar que la resistencia mostrada por estas cepas esta codificada en el cromosoma bacteriano (15), o las cantidades de ellos son muy bajas, no presentes en todas los individuos de la población, siendo imposible detectarlos por el método utilizado. En cepas de *Vibrio* sp, *Klebsiella* sp, *Acinetobacter* sp y *Raoultella* sp, otros estudios han reportado resistencia a metales demostrándose la presencia de plásmidos en *Vibrio* (25,26), *Klebsiella* (14,27,28), *Acinetobacter* (21,29) y *Raoultella* (30-32). En los ensayos de resistencia a metales ( $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+1}$ ) en placas de agar *Acinetobacter* no presentó halo de inhibición para  $\text{Ni}^{+2}$  mientras que para  $\text{Cr}^{+6}$  presentó un halo muy reducido, no obstante este resultado, se optó por este último metal para los siguientes experimentos porque a pH 9,0 el  $\text{Ni}^{+2}$  precipita como  $\text{Ni}(\text{OH})_2$ , disminuyendo su concentración efectiva, lo cual justifica la ausencia de halo de inhibición en el ensayo descrito. El crecimiento (resistencia) de la cepa MT6 y la incapacidad de crecimiento (sensibilidad) de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue demostrada a concentraciones de 3 y 6 mM de  $\text{Cr}^{+6}$  en placas de agar y el crecimiento (resistencia) de *E. coli* DH5 $\alpha$ T bajo estas condiciones restrictivas, indicó el éxito del proceso de transformación por el material plasmídico de *Acinetobacter*. Estos resultados fueron corroborados por las curvas de crecimiento en LB y LBCr $^{+6}$  de *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* DH5 $\alpha$ T. El comportamiento de ambas cepas en caldo LB fue igual, indicando que la incorporación de material plasmídico de MT6 a *E. coli* no modificó aparentemente su condición metabólica, no ejerciendo efectos tóxicos. En presencia de  $\text{Cr}^{+6}$ , la

cepa no transformada detuvo su crecimiento, mientras la cepa transformada creció durante todo el intervalo de tiempo. El análisis de la diferencia en crecimiento entre *E. coli* DH5 $\alpha$ T y *E. coli* DH5 $\alpha$  (luego de 12 h de incubación) resultó estadísticamente significativo ( $\alpha < 0,05$ ). No obstante, el efecto nocivo del metal, sobre la capacidad de duplicación de ambas cepas de *E. coli* se manifestó por la drástica reducción de la biomasa en el medio restrictivo (60-76%). Se ha reportado la transferencia de la resistencia a metales en experimentos de conjugación *in vitro* entre diferentes cepas de *E. coli* (33). Finalmente, los patrones polipeptídicos de las FM de *Acinetobacter* y *E. coli* DH5 $\alpha$ T mostraron la presencia de proteínas con masas moleculares superiores a los 100 KDa, y su ausencia en la FM de *E. coli* DH5 $\alpha$  y en todas las FC ensayadas. La presencia en las FC de pequeñas cantidades de las proteínas de elevado peso molecular detectadas en las FM, de ser cierta, se podría justificar al considerar que la síntesis de proteínas ocurre en el citoplasma y debería de transcurrir un tiempo limitado de permanencia de ellas en el citoplasma hasta alcanzar las membranas, sitio de su posible actividad biológica. Otra alternativa, es el posible desprendimiento de una pequeña fracción de las proteínas unidas a membrana por el proceso de preparación de las fracciones subcelulares. La adquisición de la resistencia por parte de *E. coli* DH5 $\alpha$  estuvo asociada a la presencia de proteínas en su FM. En el caso de *Acinetobacter* las dos proteínas presentaron pesos moleculares diferentes entre si y entre las detectadas en *E. coli* DH5 $\alpha$ T. La presencia de proteínas bacterianas unidas a membranas e implicadas en la resistencia a metales, ha sido reportada por otros laboratorios; una cromo reductasa ha sido ubicada en la membrana y citosol de *Lactobacillus*



(12); una proteína de 23 KDa ha sido localizada en *E. coli* DH5 $\alpha$ , luego de transformación con plásmidos de *E. coli* ASU7 (20) y proteínas eyectoras de metales han sido localizadas en la membrana citoplasmática de *Ralstonia metallidurans* (5). Consecuentemente, la incorporación de proteínas a la fracción membranosa en bacterias, implicadas en la resistencia a metales, parece constituir un fenómeno general en estos microorganismos (34,35). Su codificación podría estar ubicada en el plásmido, lo cual implicaría genes estructurales diferentes, localizados en un mismo plásmido y su transcripción diferencial de acuerdo al género bacteriano. También es posible que la codificación esté localizada en el cromosoma bacteriano y su transcripción sea activada por proteína(s) reguladora(s) cuya codificación este ubicada en el plásmido, esto podría implicar que las proteínas detectadas en las FM son específicas para cada cepa bacteriana. Aunque la función de estas proteínas es desconocida, se ha reportado la presencia en membranas de bombas moleculares para la eyección de metales (5,9,10,14,34); la reducción del metal por oxidasas (5,9,10,12-14,31,35); captura del metal por interacciones con proteínas tipo metalotioninas (36) y lipopolisacáridos (37). Estos resultados aportan evidencias sobre las estrategias empleadas por las bacterias en sus mecanismos de resistencias.

### Conclusión

Plásmidos de *Acinetobacter* sp, bacteria autóctona de suelos contaminados con metales, transfirieron a *E. coli* DH5 $\alpha$  la resistencia a Cr<sup>+6</sup>, mediante protocolos de transferencia de ADN. La fracción membranosa de *E. coli* DH5 $\alpha$ T, mostró una señal que podría corresponder a una o dos proteínas con pesos moleculares superiores a 100 KDa, estando ausentes en *E. coli* DH5 $\alpha$  no transformada. La resistencia a Cr<sup>+2</sup> esta

relacionada a la presencia de plásmidos y de proteínas en la FM de las bacterias.

### Referencias bibliográficas

- GAD, G.M. *Microbiology* 165:609-643. 2010.
- MUSTAPHA, MU; HALIMOON, N. *J. Microb Biochem Technol* 7:253-256. 2015.
- LEMIRE, J; HARRISON, J; TURNER, R. *Nat Rev Microbiol* 11(6):371-384. 2013.
- MARRERO-COTO, J; DÍA-VALDIVIA, A; COTO-PÉREZ, O. *CENIC. Ciencias Biológicas* 41(1):67-78. 2010.
- NIES, D. *FEMS Microbiol Rev* 27(3):313-339. 2003.
- SHI, W; BECKER, J; BISCHOFF, M; TURCO, RF; KONOPKA, AE. *Appl Environ Microbiol* 68(8):3859-3866. 2002.
- HOBMAN, JL; CROSSMAN, LC. *J Med Microbiol* 64:471-497. 2015.
- NARVÁEZ, P; PEDROZA, R; ALONSO, G; RODRÍGUEZ-LEMOINE, V. *Rev Soc Venez Microbiol* 25(1):29-34. 2005.
- JOUTEY, NT; SAYEL, H; BAHAFID, W; EL GHACHTOULI, N. *Rev Environ Contam T* 233:45-69. 2015.
- VITI, C; MARCHI, E; DECOROSI, F; GIOVANNETTI, L. *FEMS Microbiol Rev* 38(4):633-659. 2014.
- NARAYAN, M; SHETTY, KV. *Crit Rev EnvSci Tec* 43(9):955-1009. 2013.
- MISHRA, R; SINHA, V; KANNAN, A; UPRETI, RJ. *Toxicol Int* 19(1):25-30. 2012.
- DAS, S; PANDEY, S; PRADHAN, SK; SUDARSHAN, M; CHAKRABORTY, A; THATOI, HN. *Soil Sed Contam* 24(2):206-221. 2015.
- TORIBIO-JIMÉNEZ, J; RODRÍGUEZ-BARRERA, MA; VÁLDEZ-LUCENA, M; BARRERA-FLORES, A; SEGURA, D; WILSON-CORRAL, V; FLORES-ALFARO, E; ROMERO, Y. *J Bacteriol Res* 6(4):23-31. 2014.

15. AKTAN, Y; TAN, S; ICGEN, B. *Environ Monit Assess* 185:5285-5293. 2013.
16. PIOTROWSKA-SEGET, Z; CYCON, M; KOZDRÓJ, J. *Appl Soil Ecol* 28(3):237-246. 2005.
17. PÉREZ, J. Aislamiento y análisis del perfil plasmídico de bacterias provenientes de suelos contaminados con metales (Para obtener el título de Licenciado en Química). Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. 99 pp. 2015.
18. KADO, C; LIU, S. *J. Bacteriol* 145:1365-1373. 1981.
19. SAMBROOK, J; RUSSELL, BW. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor. New York (USA). 1116-1122; A40-A49. 2001.
20. ABSKHARON, RNN; HASSAN; SHAH; GAD EL-RAB, SMF; SHORIET, RM. *B Environ Contam Toxicol* 81:309-315. 2008.
21. SMITKIN, ES; ZELAZNY, AM; MONTERO, CI; STOCK, F; MIJARES, L; NISC COMPARATIVE SEQUENCE PROGRAM, MURRAY, PC, SEGRE, JA. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 108(33):13758-13763. 2011.
22. MA, Y; WANG, L; SHAO, Z. *Environ Microbiol* 8:455-465. 2006.
23. DOBRINDT, U; HOUCHUT, B; HEUTSCHEL, U; HACKER, J. *Nat Rev Microbiol* 2:414-424. 2004.
24. OCHMAN, R; LAWRENCE, JG; GROISMAN, EA. *Nature* 405:299-304. 2000.
25. ZHANG, R; PAN, L; ZHAO, Z; GU, JD. *Ecotoxicology* 21(6):1661-1668. 2012.
26. ROIG, FJ; AMARO, C. *Microbiology* 155:489-497. 2009.
27. MATASEJE, LF; BOYD, DA; WILLEY, BM; PRAYITNO, N; KREISWIRTH, N; ET AL. *J Antimicrob Chemoth* 66(6):1273-1277. 2011.
28. LEAVITT, A; CARMELI, Y; CHMELNITSKY, I; GOREN, M; OFEK, I; NAVON-VENEZIA, S. *Antimicrob Agents Chemoth* 54(7):3002-3006. 2010.
29. ESSAHALE, A; MALKI, M; MARIN, I; MOUMNI, M. *Indian J Microbiol* 52(1), 48-53. 2012.
30. SUN, F; YIN, Z; FENG, J; QIU, Y; ZHANG, D; LUO, W; YANG, H; YANG, W; WANG, J; CHON, W; XIA, P; ZHOU, D. *Front Microbiol* 6:458. 2015.
31. LI, J; LAU, R; XIONG, Y; YE, M; YUAN, M; LIU, X; CHEM, X; DESHAN, Y; LIU, B; LIN, W; BAL, X; WANG, Y; SUN, Q; ET AL. *PLoS One* 93(2):e89893. 2014.
32. KOC, S; KABATAS, B; ICGEN, B. *B Environ Contam Toxicol* 91(2):177-183. 2013.
33. SIKKA, R; SABHERWAL, U; ARORA, D. *Indian J Pathol Micr* 32(1):16-21. 1989.
34. CERVANTES, C; ESPINO-SALDAÑA, AE; ACEVEDO-AGUILAR, F; LEÓN-RODRÍGUEZ, I; ET AL. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2): 203-210. 2006.
35. SILVER, S; PHUNG, L. *J Ind Microbiol Biot* 32(11-12):587-605. 2005.
36. BOZO, L; FERNÁNDEZ, M; LÓPEZ, M; ROJAS, R; SÚAREZ, P. *Interciencia* 32(1):8-13. 2007.
37. SHUNHONG, Y; MEIPING, Z; HONG, Y; HAN, W; SHAN, X, ET AL. *Carbohydr Polym* 101:50-56. 2014.

**BIOLOGÍA/BIOLOGY**

Adquisición de la resistencia a cromo en *E. coli* DH5α por transformación *in vitro* mediada por plásmidos de *Acinetobacter* sp.

**Acquisition of the chromium resistance in *E. coli* DH5α through *in vitro* transformation mediated by *Acinetobacter* sp plasmids**

125

Jesús Pérez, Doris Reyes, Arnaldo Armado y Oscar Valbuena  
(Valencia, Venezuela)

**QUÍMICA/ CHEMISTRY**

Formación de complejos ternarios entre el sistema Niquel(II)-Ácido Dipicolínico y algunos ligandos bidentados

**Ternary complexes formation between the Nickel(II)-Dipicolinic acid system and some bidentate ligands**

134

Isaac Barrera, Mary Lorena Araujo, Felipe Brito, Alejandro Pérez, Lino Hernández, Edgar Del Carpio y Vito Lubes  
(Caracas, Venezuela)

Especiación de metales en sedimentos del río Cuchivero, Venezuela

**Speciation of heavy metals in sediments of the Cuchivero River, Venezuela**

142

Aristide Márquez, Gregorio Martínez, Julio Figuera, William Senior, Antonio Benítez, Ángel González

(Sucre, Venezuela)

Authentication of the protected designation of origin “Kaki Ribera del Xúquer” from its mineral profile

**Autenticación de la denominación de origen protegida “Kaki Ribera del Xúquer” a partir de su perfil mineral**

153

Alba Mir-Marqués, Maria Luisa Cervera, Miguel de la Guardia  
(Valencia, Spain)