

## Actinobacteria poliextremófila: estudio de resistencia a plomo por microscopía electrónica de barrido y análisis genómico

*Polyextremophile actinobacteria: study of lead resistance by scanning electron microscopy and genomic analysis*

Alvarado N.<sup>1</sup>, Palopoli N.<sup>2</sup>, Esquivel H.<sup>1</sup>, Martinez L.<sup>1</sup>, Albarracín V.H.<sup>1</sup>

### RESUMEN

*Nesterenkonia* es un género de Actinobacterias halófilas, con sus microorganismos más representativos aislados de ambientes extremos. Estamos particularmente interesados en la cepa *Nesterenkonia* Act 20 (Act20), que prospera en condiciones extremas en las lagunas de altura Punoandinas en el Andes Centrales de América del Sur, a altitudes superiores a los 3.500 msnm, donde se recibe la radiación UV-B más alta del mundo. Allí se desarrolla la biodiversidad con mecanismos únicos de adaptación a la hipersalinidad, desecación, la alta radiación ultravioleta y la presencia de metales pesados.

Por otro lado, la contaminación ambiental por plomo (Pb) generada por la actividad industrial es una problemática que crece año a año. El plomo es un metal pesado muy contaminante, tóxico en bajas concentraciones que induce cambios en la conformación de ácidos nucleicos y proteínas, inhibe la actividad enzimática, genera alteraciones en las membranas y en la fosforilación oxidativa. (Bruins *et al.*, 2000, Vallee y Ulmer, 1972). A pesar de su alta toxicidad, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia al Pb (Jarosławiecka y Piotrowska-Seget, 2014).

En trabajos anteriores demostramos que la cepa Act20 exhibe perfiles de resistencia a plomo y radiación UV-B superiores a los de *Nesterenkonia* halotolerans (NH), una cepa de referencia procedente de suelos de alta salinidad en China.

En este trabajo, buscamos aproximarnos al estudio de la multirresistencia utilizando microscopía electrónica de barrido, y un análisis bioinformático comparando las anotaciones computacionales del genoma de Act20 y NH con el objetivo de identificar genes candidatos que puedan explicar la multirresistencia a condiciones extremas en *Nesterenkonia* Act20.

Se utilizaron cultivos crecidos en medio LB7 de NH y Act20, adicionados con 2 mM de plomo durante 48 hs. Por otro lado, se irradiaron cultivos de ambas cepas durante 20 min con radiación UV-B utilizando una lámpara Vilbert Lourmat VL-4 y se incubó durante 48 horas (estas dosis fueron ensayadas en trabajos anteriores). Posteriormente, se tomaron muestras para microscopía electrónica de barrido, las cuales fueron centrifugadas y lavadas dos veces con buffer fosfato y posteriormente fueron fijadas con glutaraldehído 3% v / v. Luego se deshidrataron con soluciones de concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) y acetona. La deshidratación final se realizó con la técnica de punto crítico. Luego las muestras se montaron stubs y se metalizaron. Posteriormente se observaron bajo vacío con un microscopio electrónico de barrido. Zeiss SUPRA 55VP (Carl Zeiss NTS GmbH, Alemania) y analizadas químicamente con un espectrómetro Oxford Instrument modelo Inca PentaFETX3. En los cultivos tratados con UV-B observamos abundante material extracelular, estructuras semejantes a nanotubos y agregación bacteriana, esta última más notoria en Act20. En los cultivos tratados con plomo, se observa abundante material extracelular, agregación bacteriana y divisiones incompletas, en NH se destacan algunas estructuras semejantes a nanotubos, y el análisis elemental nos indica la presencia de plomo.

Para el análisis bioinformático, realizamos una búsqueda en bases de datos públicas de los genomas en el NCBI, utilizamos el anotador RAST para la anotación de genes, Interpro para el estudio de conservación de arquitectura de dominios. El análisis reveló que el sistema de biosíntesis de ectoína, que incluye las proteínas, etc. A, B, C y D, que son cruciales para la osmoprotección y la absorción de UV-B, están presentes en Act20 y NH.

También encontramos que la resistencia a plomo podría estar relacionada con la presencia de 6 genes que codifican proteínas putativas involucradas en la respuesta celular frente a plomo, un transportador familiar EamA; P-type ATPasa, transportador ABC, Czcv efflux, Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> antiporter, LipA, esta última está involucrada en la precipitación de Pb<sup>2+</sup> en el material extracelular.

<sup>1</sup> Centro de Integral de Microscopía Electrónica (CIME), CCT-CONICET, UNT, Tucumán, Argentina.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes - CONICET, Bernal, Buenos Aires, Argentina

En cuanto a la reparación de ADN ante daños producidos por UV-B, encontramos la presencia de las fotoliasas BCP Fe-S y CDP. Realizamos una profundización en el estudio de esta última, donde realizamos un análisis de conservación de residuos funcionales, tomando como parámetro una fotoliasa modelo de *Agrobacterium tumefaciens*, en este estudio se evidencia la presencia de aminoácidos involucrados en la función en Act20, los cuales en su mayoría se encuentran ausentes en NH. Lo cual podría explicar la mayor viabilidad de Act20 frente a radiación UV-B.

En conclusión, *Nesterenkonia Act20* posee genes de resistencia que le permitirían la viabilidad frente a condiciones extremas y una superioridad con respecto a NH, lo cual está respaldado por experimentos previos in vitro realizados en nuestro laboratorio.

En cuanto al análisis de las micrografías, si bien se observan algunas alteraciones morfológicas no hay indicios de colapso y se mantiene la viabilidad en esas condiciones (ensayos previos). Además, la presencia de abundante material extracelular en los cultivos con plomo, podría ser un indicio de que la bacteria está adoptando una estrategia de bioadsorción, dado a que el plomo en muchos microorganismos actúa estimulando la síntesis de exopolisacáridos, actuando este último como primera línea de defensa frente al metal pesado (Mathew and Krishnamurthy 2018). Dado a que se trata de un estudio preliminar, es importante destacar que nuestros próximos pasos serán profundizar en las microscopías utilizando la técnica de TEM con EDS para poder detectar la ubicación del plomo, y de ensayos de proteómica para definir las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia.

*Palabras clave: Actinobacteria, plomo, análisis genómico, microscopía electrónica de barrido*

## Referencias

- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), 198-207.
- Jaroslawska, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology*, 160(1), 12-25.
- Mathew, B. B., & Krishnamurthy, N. B. (2018). Screening and identification of bacteria isolated from industrial area groundwater to study lead sorption: Kinetics and statistical optimization of biosorption parameters. *Groundwater for sustainable development*, 7, 313-327.
- Rasuk, M. C., Ferrer, G. M., Kurth, D., Portero, L. R., Fariás, M. E., & Albarracín, V. H. (2017). UV-Resistant Actinobacteria from High-Altitude Andean Lakes: Isolation, Characterization and Antagonistic Activities. *Photochemistry and photobiology*, 93(3), 865-880.
- Vallee, B. L., & Ulmer, D. D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annual review of biochemistry*, 41(1), 91-128.