



REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR *Escherichia coli* GENÉTICAMENTE MODIFICADA CON EL GEN DE LA METALOTIONEINA I MURINA

Hugo Eduardo Lara Cruz, Juan de Dios Reyna Olvera, Hilda Patricia Dávila Reyes, Ma. Elena Cantú Cárdenas, Ma. Teresa Garza González, Isaías Balderas Rentería
Facultad de Ciencias Químicas, UANL, fax 8183 529025, e-mail: ibalderas@infosel.com.

Palabras clave: metalotioneína, biosorción, OGM.

Introducción. La utilización de microorganismos como biosorbentes de metales es una alternativa prometedora, sin embargo, un riesgo natural en su empleo es la latente patogenicidad de algunos de ellos que pudiesen ya sea alterar el ecosistema en el cual sean utilizados para biosorber metales o bien generar un foco de infección en potencia para especies vivas en el ecosistema que originalmente se pretendía corregir. Por ello, un valor agregado muy importante, sería el poder utilizar especies ampliamente conocidas que permitan aminorar los posibles riesgos de patogenicidad. Para ello, los microorganismos genéticamente modificados y en particular *Escherichia coli* ofrecen una alternativa atractiva a utilizar, ya que por un lado, su genoma es completamente conocido y ha sido considerada flora natural, y por otro lado, son fácilmente manipulables, introduciendo en ellos genes recombinantes que potencien su natural acción biosorbente como las metalotioneínas, proteínas nativas de los mamíferos que poseen una afinidad natural hacia los metales a través de los sulfuros presentes en las cisteínas que las conforman (1).

En este trabajo se presenta la generación de una bacteria modificada genéticamente de la especie *Escherichia coli* con el gen de la metalotioneína I de ratón (2), y su aplicación en la remoción de cadmio, de muestras acuosas artificialmente contaminadas.

Metodología. Se extrajo RNA de hígado de ratón al cual se le administró una solución de metales para inducir la expresión del gen que codifica para la Metalotioneína I (MT1) (3), se sintetizó cDNA y posteriormente se amplificó el gen de interés mediante el uso de iniciadores diseñados por nosotros y después de optimizar el protocolo de amplificación. El gen amplificado fue clonado en el vector de expresión bacteriano pThioHisA como proteína de fusión a la tioredoxina. El vector fue introducido a la cepa Top10 de *E. coli* y se determinaron las condiciones de fermentación ideales para obtener una óptima expresión de la MT1 recombinante. Mediante Espectrofotometría de Absorción atómica se determinó la capacidad del sistema para remover metales.

Resultados y discusión. Se logró amplificar y posteriormente clonar el gen de la metalotioneína I murina de 186 nucleótidos en *Escherichia coli*, confirmando la expresión de la proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante. Procedimos al análisis de la actividad biológica mediante bioensayos con el cultivo inducido para expresión de la MT1 recombinante al añadir

IPTG. Se probó la remoción de cadmio y plomo. La bacteria nativa, aunque presentó cierta capacidad basal de remoción de Cadmio de aproximadamente un 20%, la bacteria recombinante inducida, presentó durante las primeras cuatro horas de cultivo, mas del 90% de remoción del metal. En el caso de plomo, pudimos confirmar la remoción de un 70% . Además de probar la remoción del metal con bacterias metabólicamente activas, probamos también la capacidad de remoción de la biomasa aislada del medio de cultivo. En dicha prueba, los resultados fueron negativos en lo que respecta a remoción de metales, por lo que dentro de las aportaciones de este trabajo se encuentran el hecho de que al menos en nuestro sistema, la MT1 presenta actividad de remoción sólo si las bacterias portadoras del gen recombinante se encuentran metabólicamente activas. Esto habla de la probable bioacumulación, mas que la biosorción del metal por las bacterias, es decir, mas que un proceso pasivo, se trata de un proceso activo de retención del metal en la superficie bacteriana.

Conclusiones. a) Se clonó el gen de la Metalotioneína I de Ratón de 186 nucleótidos, a partir de tejido hepático, en *Escherichia coli*, b) Se logró expresar la proteína de 62 aminoácidos en la superficie de las bacterias, c) Fue posible remover aproximadamente el 90% del Cadmio y 70% de Plomo con la clona bacteriana inducida con IPTG durante las primeras 4 horas de incubación a 37°C con agitación de 200 rpm a pH 5.6, y d) La remoción se logra solamente con bacterias metabólicamente activas, ya que la biomasa *per se* no presentó actividad de remoción, de lo que se puede inferir que el mecanismo de remoción fue la bioacumulación intracelular y no la bioadsorción extracelular.

Agradecimiento. Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAICYT CN-946-04 de la UANL. Los autores agradecen el apoyo técnico brindado por el LQI Enrique Valdez Cerda.

Bibliografía.

1. Suzuki KT. Structure and function of metallothionein. Nippon Rinsho. 1996 Jan;54(1):33-9.
2. Sato M, Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. Tohoku J Exp Med. 2002 Jan; 196(1):9-22.
3. Sogawa N, Sogawa CA, Oda N, Fugioka T, Onodera K, Furuta H. Induction of metallothionein mRNA expresión in the mouse liver after cadmium injection as measured by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. Methods Find Clin Pharmacol. 2000 Nov;22(9):663-6.