
Estudio Molecular de la inhibición de la adhesión entre las bacterias anaerobias y el acero al carbón SAE 1018

Gloria López Jiménez¹, Laura Ramos Casillas²

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional
Departamento de Ciencias Básicas

²Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático

glorialopezj@yahoo.com

Fecha de aceptación: 15 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Las bacterias anaerobias tienen capacidad para adherirse a las estructuras metálicas y producir corrosión. Muchas propuestas se han realizado para inhibir la corrosión utilizando diferentes estrategias; en esta propuesta se ha determinado a que iones constituyentes del cupón de corrosión se unen las proteínas de membrana externa de algunas especies de bacterias anaerobias aisladas de gasoductos, detectando a través de ensayos de competencia y retardamiento en geles de poliacrilamida, la interacción específica que ocurre entre iones y proteínas.

Palabras clave: inhibición de la adhesión, biocorrosión.

ABSTRACT

The anaerobic bacteria have the capacity to adhere into the metallic structures and produce corrosion. Several proposals have been developed to inhibit corrosion using different strategies. However, this approach determines that the corrosion might occur as a consequence of the union between the constituents ions of the corrosion coupon and the proteins of the external membrane of some anaerobic bacteria species. In this study, this specific interaction, between ions and proteins, was detected through competence essays and polyacrylamide gel retardation.

Key words: adhesion inhibition, biocorrosion.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias anaerobias quimiolitotróficas y fermentativas conjuntamente con otras bacterias anaerobias facultativas, y aerobias, pueden formar consorcios microbianos organizados de acuerdo a sus requerimientos metabólicos, de tal forma que se favorece el desarrollo de las bacterias anaerobias adheridas al metal y de las aerobias en la luz de la tubería (Costerton & Lewandowski, 1995; Hamilton, 1998). En el área industrial, se han desarrollado diversas metodologías para evitar la corrosión bacteriana de las estructuras metálicas, se han empleado procesos físicos como la limpieza mecánica de las tuberías, antibióticos (Jayaraman *et al.*, 1999), biopelículas de bacterias aerobias (Jayaraman *et al.*, 1997, 1999), inmunoglobulinas (Videla *et al.*, 1998), péptidos (Örnek *et al.*, 2002). El proceso de adhesión comienza inmediatamente después de la inmersión de una superficie metálica en un medio acuoso industrial o natural, esto conduce a la formación de la biopelícula ⁽¹¹⁾. Se ha determinado que la conformación estructural de la biopelícula se lleva a cabo en varias etapas: en la primera, se establece una unión inespecífica y azarosa con la superficie a colonizar y se le conoce como adhesión temprana. Las células están influenciadas por fuerzas hidrodinámicas y de difusión, movimiento browniano y movilidad de la propia bacteria. En la segunda etapa, los microorganismos se adhieren al metal a través de diferentes enlaces químicos; pueden participar fuerzas fisicoquímicas de atracción hacia el sustrato, fuerzas de Van der Waals, la energía libre de superficies, la tensión superficial, la hidrofobicidad de la célula, enlaces por puente de hidrógeno, formación de pares iónicos o enlaces iónicos. En la tercera etapa, los microorganismos adheridos a la superficie del sustrato, también se adhieren entre sí, a través de moléculas específicas dando lugar a la formación de colonias, en esta fase participan propiedades intrínsecas de los microorganismos, como la presencia de fimbrias, moléculas de adhesión específica al sustrato (adhesinas, lectinas, azúcares, radicales iónicos), exopolisacáridos y moléculas de señalización intra e intercelular.

La adhesión microbiana se debe a la interacción de las adhesinas (proteínas de la membrana externa del microorganismo) y la superficie metálica. En un estudio realizado con *Thiobacillus ferrooxidans* (Ohmura *et al.*, 1996) se encontró que la adhesión es mediante interacción hidrofóbicas y que este microorganismo se adhiere al metal no sólo por estas interacciones sino también por enlaces químicos y por el grupo tiol de cierta proteína de su flagelo que reacciona con el azufre elemental. La adsorción de proteínas a superficies de vidrio bioactivo fue estudiado usando albumina, inmunoglobulina G (IgG), soluciones de fibrinógeno, sus mezclas 1:1:1 además de plasma y suero. Vidrio inerte, titanio e hidroxiapatita fueron usados también para comparar con el vidrio bioactivo. En una patente se afirma que aplicando directamente una cantidad de inmunoglobulina compuesta por una combinación de IgG, IgM e IgA es suficiente para prevenir la adhesión de un grupo selecto de microorganismos consistente de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* a tejidos y biomateriales por prevención de la formación de la biopelícula (Hamilton, 1994)

La adición de ampicilina, cloramfenicol o molibdato de amonio a reactores continuos y en lote después que las bacterias sulfatorreductoras (BSR) hubieran colonizado el metal no tuvo efecto para matar estas bacterias, pero cuando la ampicilina fue adicionada previamente a la colonización, el crecimiento de las bacterias fue completamente inhibido sobre acero inoxidable de un reactor de flujo continuo y en lote. La adición de un péptido antimicrobiano purificado factor de la gramicidina S previo a la adición de las BSR, inhibió la colonización de las bacterias sobre acero inoxidable 304 y retrasó el crecimiento de BSR en acero templado SAE 1018 (Jayaraman *et al.*, 1999). Mclean (investigó la afinidad de γ -poliglutamato producido por *Bacillus licheniformis* y encontró que Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} y Fe^{3+} tiene gran afinidad por la membrana de este microorganismo (Örnek, *et al.*, 2002)

A lo largo del territorio nacional, PEMEX mantiene en operación un sistema de ductos terrestres de alrededor de 54 mil kilómetros por donde transporta petróleo crudo, gas natural, gas amargo, gas dulce, gasolinas, diesel y otros productos refinados. Cuenta además, con 2 mil kilómetros localizados en zonas submarinas. Cerca de la mitad de los ductos tienen más de 30 años en operación, y a pesar del

constante mantenimiento, ocurren problemas provocados por la corrosión y fallas en el material, debido principalmente a la acción de las bacterias sulfatorreductoras (IMP, 2000). Estas bacterias causan corrosión de un amplio rango de metales incluyendo acero al carbón de bajo grado, acero inoxidable y aleaciones de cobre. Se ha estimado que los daños que ocasiona la corrosión por bacterias reductoras de sulfato en los Estados Unidos es de 4 a 6 billones de dólares /año (Koch *et al.*, 2002) además del grave problema de contaminación de suelo y agua producto de la fuga de los combustibles transportados. Las biopelículas que forman estos microorganismos causantes de la corrosión han mostrado ser resistentes a los biocidas y antibióticos. Este estudio pretende ampliar los conocimientos sobre el fenómeno de la biocorrosión y ayudar a crear métodos de control más efectivos, tomando en cuenta que la prevención del proceso de adhesión bacteriana sobre las superficies metálicas es una de las armas potenciales para evitar el fenómeno de la biocorrosión. Para lo cual, se estudiaron algunos ligandos, (Padilla Viveros *et al.*, 2000) y se determinó cómo interactúan las proteínas de membrana externa presentes en bacterias del género *Desulfovibrio alaskensis E2*, *Citrobacter freundii P1* aisladas de un gasoducto y *Dethiosulfovibrio peptidovorans DSM 11002* con algunos metales como el Hierro, manganeso, y Níquel. De tal forma que este conocimiento permita el establecimiento del mecanismo para inhibir la adhesión de estos microorganismos al acero al carbón.

METODOLOGÍA

Cepas. *Dethiosulfovibrio peptidovorans DSM11002*, se empleó como cepa de referencia y fue proporcionada por el Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD-Francia). *Desulfovibrio alaskensis E2* y *Citrobacter freundii P1* son cepas que se aislaron de muestras de incrustaciones obtenidas durante la limpieza mecánica por corrida de diablos de los gasoductos Atasta-Cd. PEMEX, de Petróleos Mexicanos y se identificaron por secuenciación del gen 16S del ARN.

Condiciones de cultivo. Los géneros *Desulfovibrio alaskensis E2*, y *Citrobacter freundii* se cultivaron a 30°C en un medio base mineral lactato/sulfato, el cual contiene por litro: 5 mL de jarabe de lactato de sodio (60% p/v), 10 mL de solución mineral de Balch (1979), 1 mL de rezarzurina al 0.1%, 1.0g de NH₄Cl, 0.3g de K₂HPO₄, 0.3g de KH₂PO₄, 0.2g de MgCl₂ · 6H₂O, 0.1g de CaCl₂ · 2H₂O, 0.1g de KCl, 2.84g de Na₂SO₄, 0.1 g de extracto de levadura, 0.1g de peptona de caseína, 0.5g de cisteína-HCl, 1.0g de NaCl (Ravot *et al.*, 1995). *Dethiosulfovibrio peptidovorans*, se cultivó en el mismo medio anterior, con las siguientes modificaciones: 1.0g de extracto de levadura, 5.0 g de biotripticasa, 30 g de NaCl, 3.0g de MgCl₂ · 6H₂O, Na₂S₂O₃ y 0.5g de acetato de sodio anhidro. La temperatura de incubación fue a 42°C (Magot *et al.*, 1995). Se prepararon frascos con tapón de terbutilo y casquillo de aluminio con 50 mL del medio de cultivo, se purgaron con nitrógeno para eliminar el oxígeno y se esterilizaron en autoclave a 116°C/45 min. Después de la esterilización, se ajustó el pH a 7.0 con solución estéril y anóxica de bicarbonato de sodio al 10% p/v, y se agregó solución estéril y anóxica de sulfuro de sodio, a una concentración final de 0.2 g/L (Ravot *et al.*, 1995).

Cupones de corrosión. Se emplearon cupones de acero al carbón SAE1018, de 15 x 7 x 2 mm, previamente pulidos por sandblasteo, sin pasivar; se lavaron con etanol seguido de acetona y se mantuvieron en un desecador hasta su uso.

Ensayos de adhesión temprana a metal. Se empleó un cultivo de 48 hr de crecimiento de *Citrobacter freundii P1*, *Desulfovibrio alaskensis E2* y *Dethiosulfovibrio peptidovorans*, por separado. Las células se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7 a 4 °C/5000 rpm/5 min, se realizaron diluciones en PBS1X, pH 7.0 para obtener 3 x 10⁹ bacterias/ mL. Las suspensiones se incubaron durante 30 minutos a 30 °C con agitación de 80 rpm. Al término de la incubación, un mililitro de cada suspensión se puso en contacto con un cupón de corrosión, se incubaron nuevamente a 30 °C. A cada duplicado de cada cepa se le realizó la cuenta directa por microscopía de epifluorescencia, a los tiempos 0, 2, 4 y 6 h de

contacto con el cupón de corrosión. Todas las cinéticas de adhesión e inhibición de la adhesión a metal se realizaron por duplicado. En todos los casos el cupón tomado como blanco se incubó solamente con PBS 1X pH 7 en las mismas condiciones y se le dio el mismo tratamiento.

Inhibición de la adhesión por medio de ensayos de competencia de células completas con iones metálicos Fe, Mn y Ni.

Se empleó un cultivo de 80 mL en fase exponencial de *Citrobacter freundii* (P₁), *Desulfovibrio alaskensis* (E₂), y *Dethiosulfovibrio peptidovorans* DSM11002 (DTH), las células se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7 a 5000 rpm x 5 minutos a 4°C. La solución se ajustó a 3x10⁹ bacterias/mL en 2 mM de FeCl₃, 2 mM de MnCl₂ y 2 mM NiCl₂ por separado y se incubó por 30 minutos a 30°C con agitación de 80 rpm, posteriormente se transfirió 1 mL de cada mezcla a tubos eppendorf conteniendo un cupón de corrosión e acero SAE 1018 y se dejó en contacto durante 0, 2 y 4 horas, se tiñeron y se contaron las células adheridas como se indica en los ensayos de adhesión temprana.

Tratamiento enzimático de las bacterias anaerobias y su efecto sobre la adhesión al acero al carbón SAE1018. Se empleó un cultivo de 80 mL en fase exponencial de *Citrobacter freundii* (P₁), *Desulfovibrio alaskensis* (E₂) y *Dethiosulfovibrio peptidovorans* DSM11002 (DTH), las células se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7 a 5000 rpm x 5 minutos a 4°C, se ajustó a 3x10⁹ bacterias/mL en una solución de 250 µg/mL de Tripsina y 250 µg/mL de Proteínasa K en PBS 1X pH 7, por separado cada enzima, se incubaron ambos tratamientos por 1 hora a temperatura ambiente con agitación de 80 rpm. Un mililitro de cada suspensión bacteriana tratada con cada enzima se puso en contacto con un cupón de corrosión de acero SAE 1018 por separado y se incubaron a temperatura ambiente por 0, 2 y 4 hr, se realizó la cinética de adhesión como se indica en la Cinética de adhesión temprana.

Eliminación de proteínas de adhesión por tratamiento enzimático. Se emplearon 3 viales con 80 ml de cultivo de cada bacteria: *Citrobacter freundii* P₁, *Desulfovibrio alaskensis* E₂ y *Dethiosulfovibrio peptidovorans*, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7 centrifugando a 10 000 rpm a 4°C por 15 min. De un vial de cada cepa, se extrajeron las proteínas totales con Ácido Tricloroacético al 10% como lo indican Alderete y col. (1997). Esta pastilla se conservó a - 60 ° C para la electroforesis SDS-PAGE al 7%.

Otra pastilla de cada cepa se resuspendió en 2 ml de una solución de Tripsina (0.025%) y la tercera pastilla de cada cepa se suspendió en 2 ml de una solución de de proteínasa K (0.025%), se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Cada pastilla se lavó 2 veces con PBS 1X pH 7, centrifugando a 10000 rpm a 4 °C por 15 min, se agregó PMSF 0.1M y se dejó reposar toda la noche. Las muestras se sonicaron durante 3 ciclos de 1 minuto con descansos de 30 s y se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7, centrifugando a 10 000 rpm a 4 °C/15 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 100 µl de Ácido Tricloroacético al 10% y se dejó reposar toda la noche a 4°C. Finalmente se lavó centrifugando a 12 000 rpm a 4 °C/3 min. Las pastillas obtenidas se conservaron a - 60 °C para la electroforesis SDS-PAGE al 12%.

Ensayo de ligandos de membrana externa con Fe, Mn y Ni. Se utilizó un litro de cultivo de cada cepa: *Citrobacter freundii* P₁, *Desulfovibrio alaskensis* E₂ y *Dethiosulfovibrio peptidovorans*; las células se centrifugaron a 8000 rpm a 4°C/10 min, se lavaron con PBS 1X pH 7 y posteriormente se extrajeron las proteínas membrana externa como lo indican Dashper y col. (2000). Las proteínas de membrana externa de cada cepa, se incubaron por separado con cada una de las siguientes soluciones: FeCl₂ 2 mM, MnCl₂ 2 mM, y NiCl₂ 2 mM, en proporción 1:1 por 30 minutos a 4 °C y posteriormente se observó el retardamiento del corrimiento de las proteínas en electroforesis SDS- PAGE al 12%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adhesión temprana de los microorganismos a un sustrato es aquella que ocurre en las primeras tres horas de contacto con el sustrato. Se contaron las bacterias adheridas que emitieron fluorescencia de color verdoso; la adhesión a los cupones de corrosión en donde se observó que *D. alaskensis* E2 y *Dethiosulfovibrio peptidovorans*, tuvieron una tendencia al incremento durante las 6 h que duró el estudio, mientras que *Citrobacter freundii* P1, después de las cuatro horas se declinó la adhesión, posiblemente por la formación de microcolonias de 8 a 12 células que se despegaban conforme pasaba el tiempo.

Inhibición de la adhesión por medio de ensayos de competencia de células completas con iones metálicos Fe, Mn y Ni.

Al ponerse en contacto las células completas de cada cepa con los iones de Hierro, Manganeso y Níquel, se bloquearon los sitios de unión que poseen las bacterias a cada ion metálico, de tal forma que en algunos iones se bloqueó la adhesión de la cepa al cupón de corrosión, por ejemplo el ion hierro logró inhibir completamente la adhesión de las bacterias al acero SAE 1018 posiblemente porque al incubar las bacterias con $FeCl_3$ antes de la cinética de adhesión temprana se bloquearon los sitios de las proteínas de membrana externa que tienen afinidad por este ion. Al igual que el hierro el manganeso inhibió al 100% la adhesión de 2 de las cepas tratadas con este ion, sin embargo para *Citrobacter freundii* (P_1) sólo se inhibió un 75% de la adhesión al acero SAE1018. En presencia del ion níquel, se logró inhibir la adhesión de *Citrobacter freundii* (P_1) en 63% los sitios afines a níquel de las proteínas de membrana externa. Para *Desulfovibrio alaskensis* la inhibición fue del 50% y 85% para *Dethiosulfovibrio peptidovorans* (DTH). Los porcentajes de inhibición de la adhesión por competencia con los iones metálicos se obtuvieron comparando con la cinética de adhesión temprana sin tratamiento (Figura 1).

Tabla 1. Inhibición de la adhesión de las células completas por medio de ensayos de competencia con iones metálicos

Cepas	Inhibición de la adhesión por competencia con iones metálicos (%)		
	Fe	Mn	Ni
<i>Desulfovibrio alaskensis</i>	100	100	50
<i>Citrobacter freundii</i>	100	75	63
<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>	100	100	85
Blanco	0	0	0

Tratamiento enzimático de las bacterias anaerobias y su efecto sobre la adhesión al acero al carbón SAE1018.

Ninguna de las cepas tratadas con Proteinasa K presentó adhesión a acero al carbón SAE 1018, debido a que esta enzima eliminó las proteínas de membrana externa de las bacterias y con estas las proteínas que emplea el microorganismo para adherirse al metal. Las células tratadas con tripsina presentaron diferentes tendencias de adhesión, el mayor porcentaje de inhibición (85%) se obtuvo para *Dethiosulfovibrio peptidovorans* (DTH), *Citrobacter freundii* (P_1) tuvo un 38 % de inhibición y 50% para *Desulfovibrio alaskensis* (E_2) como se observa en la Tabla 2. Posiblemente se debe a que la tripsina hidroliza los enlaces lisina o arginina⁽⁴⁾ de las proteínas, estos aminoácidos pueden estar ubicados antes o después del sitio o sitios receptores al metal de cada proteína de membrana externa, el efecto de esta enzima dependerá de la estructura de las proteínas de membrana externa de cada bacteria.

Los porcentajes de inhibición de la adhesión por el tratamiento enzimático se obtuvieron comparando con la cinética de adhesión temprana sin tratamiento (Figura 1).

Se han empleado enzimas proteolíticas para examinar el efecto de estas sobre la adhesión bacteriana a una variedad de superficies. En este estudio se observó que al incubar *Desulfovibrio alaskensis* (E2), *Dethiosulfovibrio peptidovorans* (DTH) y *Citrobacter freundii* (P₁) con proteinasa K y Tripsina, la adhesión de las bacterias al acero SAE 1018 fue afectada, aunque la tripsina fue la enzima menos efectiva para inhibir la adhesión. Estos resultados son comparables con Frank C. ⁽⁸⁾ que trató de inhibir la adhesión de *Shewanella alga* a hidróxido de hierro (HFO) con tratamiento enzimático con quimiotripsina, tripsina y proteasa de *Streptomyces griseus* y la tripsina fue la enzima menos efectiva en inhibir la adhesión a HFO.

Tabla 2. Inhibición de la adhesión de las células completas por medio del tratamiento enzimático con *Proteinasa K* y *Tripsina*.

Cepas	Inhibición de la adhesión por Tratamiento enzimático (%)	
	Proteinasa K	Tripsina
<i>Desulfovibrio alaskensis</i>	100	50
<i>Citrobacter freundii</i>	100	38
<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>	100	85
Blanco	0	0

Ensayos de Ligandos entre proteínas de membrana externa (pme) de las bacterias anaerobias y Tratamiento enzimático

Los resultados sugieren que los iones Fe, Mn y Ni tienen la habilidad de influenciar la movilidad de las proteínas de membrana externa, en los geles de poliacrilamida, en donde se muestra el retardamiento que sufren las proteínas de membrana externa ligadas a los iones de Fe, Mn y Ni (estos iones forman parte constitutiva de los cupones de corrosión usados en los ensayos de adhesión temprana). Rech *et al.*, identificaron una proteína de 22.5 kDa que tiene la función de capturar molibdeno, se observó que la proteína unida a este ión tenía un desplazamiento diferente que la proteína sola al correr un gel de electroforesis, como se observó en este ensayo (Figura 2).

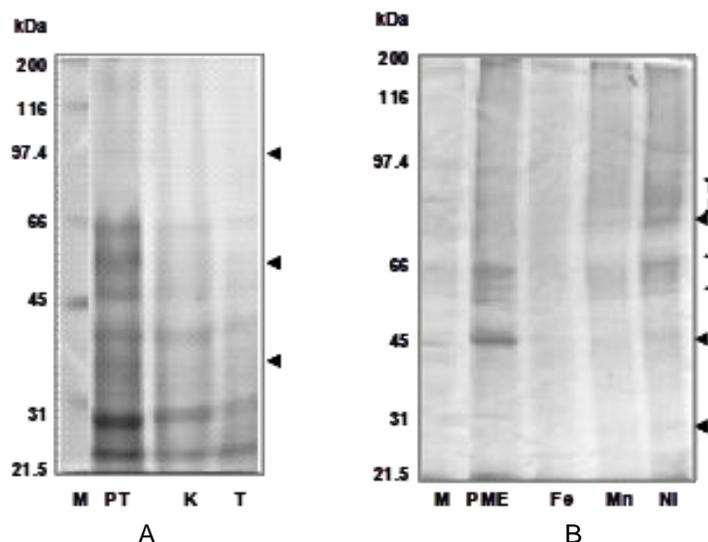


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE al 12%.

A) Tratamiento enzimático de las proteínas de membrana externa en *Citrobacter freundii* P1. M) Standards broad range BIO-RAD; PT) proteínas totales; K) Tratamiento con proteinasa K; T) Tratamiento con Tripsina

B) Ensayo de Ligandos de proteínas de membrana externa a iones metálicos. M) Standards broad range BIO-RAD; PME) Proteínas de membrana externa; Fe) ión hierro; Mn) ión manganeso; Ni) ión níquel

***Citrobacter freundii* P1.-** Se identificaron las siguientes proteínas de membrana externa: 76, 70, 66, 59, 55, 52, 45 y 34 KDa. Con tratamiento enzimático en presencia de proteinasa K se eliminaron las proteínas de 114, 76, 70, 66, 55, 52, 49, 42 y 39 KDa este efecto inhibió la adhesión de las bacterias al metal en la cinética de inhibición con tratamiento enzimático; la tripsina eliminó 70, 66, 55, 52, 49, 42 y 39 KDa (Figura 2 A). En el ensayo con hierro, la cinética de tratamiento con esta enzima si hubo adhesión, lo cual indica que la enzima no elimina los sitios de unión con este metal. En los ensayos de ligandos (Figura 2 B) se observó retardamiento en la migración de proteínas unidas al Hierro, ya que no observa ninguna banda bien definida, lo que indica que existe una fuerte atracción entre estas proteínas y el ion. Esto se comprobó con el ensayo de competencia de células completas con Fe, en donde no se observaron bacterias adheridas al cupón de corrosión al ponerse en contacto previo con el ión Hierro, Con el manganeso se unen a las proteínas 76, 70, 59 y 52 KDa. Con Níquel Se unieron las mismas proteínas que con Manganeso, además de la proteína de 45 kDa.

Como resultado de estos ensayos se pueden proponer como adhesinas a las proteínas de 76, 70, 59, 55, 52 y 45 KDa ya que tienen afinidad por los tres iones Fe, Mn y Ni, además algunas de estas al ser eliminadas con proteinasa k, se inhibe también la adhesión al cupón de corrosión.

***Desulfovibrio alaskensis* E2.-** Las proteínas de membrana externa son de: 116, 72, 66, 60, 51, 40, 35 y 21 KDa (Figura 3 B). al ión Hierro se unen las proteínas de 72, 66, 40, 35 y 21, para el manganeso y níquel se notan las mismas bandas de 116, 68, 64, 57, 44, 40 y 21 en los tres casos la proteína de 66 KDa se unen con mayor intensidad, pero no se observa retardamiento. La proteinasa K eliminó las proteínas 116, 102, 72, 66, 51 y 40 KDa, y con ello se demuestra que la proteinasa K, elimina las proteínas de membrana externa con las cuales se unen las bacterias al cupón de corrosión, como se

demuestra en la cinética de inhibición de la adhesión de células completas tratadas con esta enzima en donde se muestra que se inhibió la adhesión en un cien por ciento de todas las cepas (Tabla 2). El tratamiento con la tripsina eliminó las proteínas de 116, 72, 66, 51 y 40 KDa, estas no son adhesinas pues hubo bacterias adheridas al acero SAE 1018 en la cinética de inhibición de adhesión con esta enzima.

En los carriles de Fe, Mn y Ni se muestran tres bandas que se unen más intensamente a cada uno de los iones 72, 66 y 35 KDa, estas pueden ser proteínas de adhesión (Figura 3B)

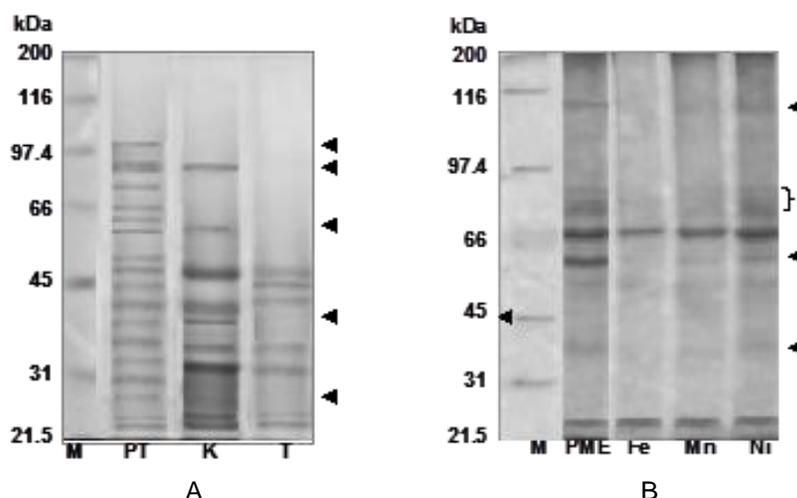


Figura 3. Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE al 12%.

A) Tratamiento enzimático de las proteínas de membrana externa en *Desulfovibrio alaskensis* E2.

M) Standards broad range BIO-RAD; PT) proteínas totales; K) Tratamiento con proteinasa K; T) Tratamiento con Tripsina.

B) Ensayo de Ligandos de proteínas de membrana externa a iones metálicos. M) Standards broad range BIO-RAD; PME) Proteínas de membrana externa; Fe) ion hierro; Mn) ion manganeso; Ni) ion níquel

Figura 4. A) Tratamiento enzimático de las proteínas de membrana externa en *Dethiosulfovibrio peptidovorans*.

M) Standards broad range BIO-RAD; PT) proteínas totales; K) Tratamiento con proteinasa K; T) Tratamiento con Tripsina; B) Ensayo de Ligandos de proteínas de membrana externa a iones metálicos. M) Standards broad range BIO-RAD; PME) Proteínas de membrana externa; Fe) ion hierro; Mn) ion manganeso; Ni) ion níquel

Dethiosulfovibrio peptidovorans.-En el tratamiento con proteinasa K se eliminó 110, 78, 46 y 25 KDa (Figura 4 A). Las células tratadas con esta enzima no se adhieren al acero al carbón SAE 1018 como se observa en la cinética de inhibición de la adhesión. La tripsina sólo eliminó las proteínas 121 y 25 KDa estas proteínas no las utiliza el microorganismo para adherirse al metal ya que en la cinética se observaron bacterias adheridas (Tabla 2).

Las proteínas de membrana externa son de: 160, 121, 110, 78, 62, 57, 48, 36, 34 y 30 KDa. En el ensayo e ligandos, al interactuar los iones del Hierro con las proteínas de la membrana externa de *Dethiosulfovibrio peptidovorans* (DTH), el perfil proteico prácticamente desaparece, lo cual indica que las proteínas sufren un retardamiento importante en su migración a través de la malla del gel debido a una fuerte unión con el metal (Figura 4B). Con ión manganeso se unen las proteínas 160, 121 y 48, hubo retardamiento debido a que las proteínas se encuentran ligadas al ion lo cual se notó también al realizar el ensayo de competencia con Mn (Tabla 1).

Con níquel se unen 160, 121, 62, 57, 48, y 34 KDa, al parecer esta unión no es lo suficientemente fuerte para inhibir la adhesión de las bacterias al acero como se pudo observar en la cinética de inhibición con ión Níquel (Tabla 1).

Posibles adhesinas son las proteínas de 160, 121 y 48 KDa, son la bandas que se notan más intensas en los ensayos de ligandos de proteínas de membrana externa a Fe, Mn y Ni.

CONCLUSIONES

Las bacterias estudiadas expresaron proteínas de unión al metal que se encuentran en la membrana externa. Se inhibió la adhesión de células completas de *Desulfovibrio alaskensis E2*, *Citrobacter freundii* y *Dethiosulfovibrio peptidovorans* al acero al carbón tipo SAE1018 al realizar ensayos de competencia con fierro, manganeso y níquel que son constituyentes del metal del cupón de corrosión. Asimismo se demostró que las proteínas de membrana externa que estos microorganismo sufrieron retardamiento en el gel de poliacrilamida cuando se pusieron en contacto con cada uno de estos iones, logrando modificar la migración de la proteína unida al ion metálico en el gel de poliacrilamida. La presencia de estos iones metálicos inhibió la adhesión de las bacterias al metal. Algunas de las proteínas de membrana externa posiblemente sean las responsables de la adhesión del microorganismo al metal, ya que al ser eliminadas con Proteinasa K y Tripsina disminuyó la adhesión bacteriana, por lo que se propone que algunas proteínas de estas proteínas son adhesinas al acero al carbón, como las proteínas de 160, 121 y 48 KDa en *Dethiosulfovibrio peptidovorans* (DTH), de 72, 66 y 35 KDa para *Desulfovibrio alaskensis E2* y de 76, 70, 59, 55, 52 y 45 KDa para *Citrobacter freundii P1*.

REFERENCIAS

- Alderete J.F, Lehker M.W., Arroyo R. (1995). The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol today*, 11: 70-74.
- Brook T. D. (1987). Grupos Prokarióticos Representativos. Prentice-Hall. Cuarta edición. pp.759 –765.
- Caccavo F., Patrick C.Schamberger, Kristian Keiding and Per Halkjaer Nielsen (1997). "Role of hydrophobicity in adhesion of the dissimilatory Fe (III)- reducing bacterium *Shewanella alga* to amorphous FE (III) oxide". *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3837 – 3843.
- Caccavo F. (1999). "Protein – Mediated adhesión of the dissimilatory Fe (III) – reducing bacterium *Shewanella alga*-BrY to hydrous ferric oxide". *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5017 – 5022.
- Dashper S.G., Slakeski H.N., Jackson C., Cross K.J., Brownfield L., Hamilton R., Barr I., Reynolds E. (2000). "Characterization of a novel outer membrane hemin – binding proteín of *Porphyromonas gingivalis*". *J. Bacteriol.* 182: 6456 – 6462
- Geesey G.G, Weiner R.M. (2000). "Polysaccharide-specific probes inhibit adhesión of *Hyphomonas rosenbergii* strain VP-6 to hydrophilic surfaces". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 81-85
- IMP. La investigación en el Instituto Mexicano del Petróleo (2000). Ductos pp.107 107
- Jayaraman, ET. Cheng, JC. Earthman and TK Wood (1997). Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *Journal of industrial Microbiology & biotechnology.* 187: 396 – 401.
- Jayaraman, P. J. Hallock, R. M. Carson (1999). Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generate in situ. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52 : 267 –275

Koch G.H, Brongers M.P.H, Thompson N.G., Virmani Y. P., Payer J.H. (2002). Corrosion cost and preventive strategies in United States. *Material performance suppl.* July 2002.NACE, p. 3-8

Noaya Ohmura, Katsuyuki Tsugita, Jun – Ichi Koizumi and Hiroshi Saiki (oct.1996). Sulfur-binding protein flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology.* 5776 – 5780.

Örnek D., Jayaraman A., Syrett B., Hsu C., Wood T.K (2002). Pitting corrosion inhibition of aluminium 2024 by Bacillus biofilm secreting polyaspartate or γ - polyglutamate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58651 – 657

Padilla Viveros A. (1999). Tesis: Determinación de la influencia de las adhesinas de bacterias sulfato-reductoras en la biocorrosión de líneas de transporte de hidrocarburos de la industria petrolera. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología – IPN.

Rech S., Wolin C., Gunsalus R.P. "Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli* (1996). *J. Biol. Chem.* 271: 2557-25562

T.I. Ladd. And J. W. Costerton (1990). Methods for studying biofilm bacteria. *Methods in Microbiology.* Vol. 22 pp .286 – 307

Videla Héctor, Guiamet Patricia and Gómez Sandra (1998). Preventing MIC through microbial adhesion inhibition. No. 290 pp. 1 -10

W. A. Hamilton (1994). Biocorrosion: the action of sulphate - reducing bacteria. *Biochemistry of microbial degradation.* 555 – 570