



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de medicina
Licenciatura en biomedicina
Eje de microbiología

“Uso de lantánidos por *Methylobacterium* en actividad metilotrófica”

**Tesis presentada para obtener el título de:
Licenciado en Biomedicina**

Presenta:

Obeth Cuauhtémoc Tapia Baltazar
201529490

Director de Tesis:

D. C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

Lugar de Realización:

**Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla**

**Heroica Puebla de Zaragoza, Pue.
Junio, 2024**

*“SÓLO EL QUE CONSTRUYE EL FUTURO TIENE DERECHO A
JUZGAR EL PASADO”
- Friedrich Nietzche*

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mis padres, en especial a la memoria de mi madre Rocío Baltazar que siempre me dio fuerza para seguir adelante y que a pesar de que ya no está todo lo que tengo y soy se lo debo a ella. Gracias a mi padre Refugio Tapia por acompañarme en este proceso y sobre todo por confiar en mí, los amo a los dos.

A mis hermanos Alan y Arnold que quiero y amo demasiado, sin el apoyo de ellos en cada decisión que he tomado no hubiera llegado tan lejos.

A mi tía Reina Baltazar por ser una segunda madre para mí.

A mis primos Bianca, Mayu y Abimael que a pesar de la distancia me brindaron su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al D. C Luis Ernesto Fuentes Ramírez y a la D. C Rocío Bustillos Cristales por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana y sobre todo por brindarme el apoyo, confianza, paciencia y conocimientos durante este proceso de investigación.

Agradezco a la D. C Lucía Soto Urzúa por aceptar revisar mi escrito de tesis.

Gracias a mis grandes amigos de Licenciatura, Brisa Uscanga y Amin Mora que siempre estuvieron apoyándome sin importar que lejos estábamos y que jamás me dejaron solo.

Gracias a mi mejor amiga, Tatiana Torres, por el apoyo incondicional, cariño y consejos.

Gracias a la Q.F.B Marisol Cruz por el apoyo brindado durante la fase final de mi tesis.

TABLA DE ABREVIATURAS

REE: Elementos de Tierras Raras

AS III: Colorante Arsenazo III

Ln³⁺: Lantánidos

Ca³⁺: Calcio

La³⁺: Lantano

Ce³⁺: Cerio

Pr³⁺: Praseodimio

Nd³⁺: Neodimio

Pm: Prometio

Sm: Samario

Eu: Europio

Gd: Gadolinio

Tb: Terbio

Dy: Disprosio

Ho: Holmio

Er: Erbio

Tm: Tulio

Yb: Iterbio

Lu: Lutecio

Sc: Escandio

Y: Itrio

Cu: Cobre

Zn: Zinc

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

MMS: Medio Mínimo de Sales Minerales

M. extorquens: *Methylobacterium extorquens*

MDH: Metanol Deshidrogenasa

MDH2: Metanol Deshidrogenasa del tipo 2

PQQ: pirroloquinolinaquinona

Asp301: Aminoácido

MxaF: Metanol Deshidrogenasa del tipo MxaFI dependiente de Ca^{3+}
XoxF: Metanol Deshidrogenasa del tipo XoxF dependiente de REE.
mx: operón que codifica para una MDH del mismo nombre
CO₂: Dióxido de carbono
xoxF1: gen del tipo *xoxF*
xoxF2: gen del tipo *xoxF*
MxbD: Sensor genómico
Mxbm: Regulador genómico
TonB: Gen Receptor
ABC: Transportador
mx: cebador
xoxF: cebador
AM1: Cepa *Methylobacterium extorquens* AM1
Fae: enzima activadora de formaldehído
H₄MPT: tetrahidrometanopterina
TCRS: Sistema de Regulación de Dos Componentes
Lantánidos Ligeros: lantano, cerio, praseodimio, neodimio, prometio y samario
Lantánidos Pesados: europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio y lutecio
PG: Fosfatidilglicerol
PE: Fosfatidiletanolamina
CL: Cardiolipina
NAD⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleótido
UAP0123: Cepa de interés del género *Methylobacterium*
JCM2802: Cepa tipo *Methylobacterium extorquens*
EMM: Ecología Molecular Microbiana
PMMA: Polimetilmetacrilato
pH: Potencial de hidrógeno
mM: Milimolar
μM: Micromolar
nm: Longitud de onda
ICP-MS: Espectrofotometría de masas

TABLA DE ILUSTRACIONES Y FIGURAS

ILUSTRACIÓN 1. RUTA METABÓLICA DE M. EXTORQUENS.....	16
FIGURA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL LANTANO.....	34
FIGURA 2. AGOTAMIENTO DEL LANTANO	35
FIGURA 3. AGOTAMIENTO DEL CERIO.....	36
FIGURA 4. AGOTAMIENTO DEL NEODIMIO	37
GRÁFICA 5. AGOTAMIENTO DEL PRASEODIMIO	38

TABLA DE ANEXOS

FIGURA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CALCIO (CONTROL NEGATIVO) EN LA CEPA JCM2802	45
FIGURA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CALCIO (CONTROL NEGATIVO) EN LA CEPA UAP0123	46
FIGURA 3. AGOTAMIENTO DEL CALCIO.....	47
FIGURA 4. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL LANTANO CON DESGLOSE DE DATOS	48
FIGURA 5. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL LANTANO CON DESGLOSE DE DATOS	49
FIGURA 6. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL CERIO CON DESGLOSE DE DATOS	50
FIGURA 7. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL NEODIMIO CON DESGLOSE DE DATOS.....	51
FIGURA 8. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL PRASEODIMIO CON DESGLOSE DE DATOS	52

ÍNDICE

RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES.....	14
ANTECEDENTES GENERALES	14
ILUSTRACIÓN 1. RUTA METABÓLICA DE M. EXTORQUENS.....	16
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
5. HIPÓTESIS.....	24
6. OBJETIVOS	25
A. OBJETIVO GENERAL	25
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
DISEÑO DEL ESTUDIO	25
UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL	26
ESTRATEGIA DE TRABAJO	27
MUESTREO	27
DEFINICIÓN DE UNIDAD DE POBLACIÓN	27
SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	27
CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS UNIDADES DE MUESTREO.....	27
DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES	28
VARIABLE INDEPENDIENTE	28
VARIABLE DEPENDIENTE	28
MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	28
TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	29
MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	29
8. RESULTADOS.....	32

DEPENDENCIA DEL PH DEL ENSAYO ASIII	32
AGOTAMIENTO DE CALCIO	33
CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DE LANTANO	33
FIGURA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL LANTANO.....	34
FIGURA 2. AGOTAMIENTO DEL LANTANO	35
CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DE CERIO	35
FIGURA 3. AGOTAMIENTO DEL CERIO.....	36
CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL NEODIMIO	36
FIGURA 4. AGOTAMIENTO DEL NEODIMIO	37
CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL PRASEODIMIO.....	37
GRÁFICA 5. AGOTAMIENTO DEL PRASEODIMIO	38
 <u>9. DISCUSIÓN.....</u>	 <u>39</u>
 <u>10. CONCLUSIÓN</u>	 <u>41</u>
 <u>11. BIBLIOGRAFÍA</u>	 <u>42</u>
 <u>12. ANEXOS</u>	 <u>45</u>
 FIGURA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CALCIO (CONTROL NEGATIVO) EN LA CEPA JCM2802	45
FIGURA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CALCIO (CONTROL NEGATIVO) EN LA CEPA UAP0123	46
FIGURA 3. AGOTAMIENTO DEL CALCIO	47
FIGURA 4. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL LANTANO CON DESGLOSE DE DATOS	48
FIGURA 5. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL LANTANO CON DESGLOSE DE DATOS	49
FIGURA 6. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL CERIO CON DESGLOSE DE DATOS	50
FIGURA 7. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL NEODIMIO CON DESGLOSE DE DATOS.....	51
FIGURA 8. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL PRASEODIMIO CON DESGLOSE DE DATOS	52

RESUMEN

Recientemente se descubrió que las bacterias metilotróficas utilizan elementos de tierras raras (REE). Para monitorear el contenido de REE en los medios de cultivo de las bacterias se obtuvo de la bibliografía reciente un método de detección rápida que utiliza el colorante Arsenazo III (AS III) en la detección espectrofotométrica de REE. La técnica empleada está diseñada para seguir el agotamiento de lantánidos en el medio de cultivo inoculado con *Methylobacterium*. En la presente tesis se plantea estimar la incorporación de lantánidos ligeros como lo son La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} y Nd^{3+} .

El ensayo de AS III presenta un método de detección conveniente y rápido para medir los niveles de REE en medios de cultivo y emerge como una alternativa sensible para este fin.

El metabolismo bacteriano dependiente de REE es un campo emergente y la importancia de los REE para las bacterias metilotróficas está firmemente establecida, todavía surgen preguntas de valiosa importancia, como la forma en que estos elementos se absorben en las células.

El presente trabajo tiene como objetivo usar el ensayo basado en el colorante Arsenazo III para determinar de forma rápida, específica y sensible el contenido de REE en medio de cultivo mínimo de sales minerales (MMS). El ensayo presenta una herramienta útil para el control rutinario de REE durante el crecimiento bacteriano sin necesidad de instrumentación analítica especializada.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias metilotróficas son un grupo de microorganismos que pueden utilizar compuestos de un solo carbono como el metano y el metanol como su única fuente de carbono, o bien de más de un carbono, pero sin tener enlaces covalentes entre ellos (Chistoserdova *et al.*, 2011). En sentido estricto, las bacterias metilotróficas utilizan metanol, así como otros compuestos metilados, incluidos la metilamina y el metano clorado. El género *Methylobacterium*, Fam. Methylobacteraceae, es de los microorganismos probablemente más abundantes en la filósfera y muchos de ellos se consideran bacterias simbióticas de plantas (Vorholt, 2012).

Las bacterias que habitan en las hojas aprovechan el metanol que se produce en la planta y por su parte le proporcionan algunos compuestos funcionales con actividad reguladora de crecimiento vegetal (Dourado *et al.*, 2015).

La cepa AM1 de *Methylobacterium extorquens* ha sido objeto de investigación por más de cinco décadas como la cepa modelo de las bacterias metilotróficas gramnegativas y recientemente fue reclasificada a partir del género *Methylobacterium* (Green & Ardley, 2018).

El metanol incorporado es oxidado por metanol deshidrogenasas (MDH). Numerosas gramnegativas entre las que se incluyen las de la familia Methylobacteraceae portan MDHs dependientes de Ca^{2+} o de cationes de lantánidos y de pirroloquinolinaquinona (PQQ). Esas dos MDHs (MxaFI y XoxF) están filogenéticamente relacionadas. MxaFI requiere Ca^{2+} como cofactor, se

considera que Ca^{2+} es un factor esencial exclusivo para el metabolismo del metanol (Chistoserdova *et al.*, 2013).

Hasta recientemente se conocía únicamente de la existencia de la MDH dependiente de Ca^{2+} , debido a que el operón *mx*a se ha encontrado en muchos aislados metilotróficos y se había reportado que cepas deficientes en *mx*aF no podían crecer con metanol como fuente de carbono (Skrovan *et al.*, 2011).

Un homólogo del gen MDH que se encuentra en el genoma de la cepa AM1, es el gen *xoxF1*, el que muestra homología con *Mx*aF. Su conservación de los residuos de aminoácidos de unión a PQQ sugieren una función como MDH, pero los estudios arrojan una actividad muy baja (Schmidt *et al.*, 2010).

Recientemente se reportó que la MDH purificada a partir de una cepa de *Methylobacterium* crecida en presencia de lantánidos (Ln^{3+}) fue una MDH del tipo XoxF (Hibi *et al.*, 2011). Los estudios señalan que una cepa mutante con deficiencia de *Mx*aF de *Methylobacterium extorquens* AM1 fue capaz de crecer en metanol en presencia de La^{3+} y esta cepa mutante presentaba un nivel de actividad óptimo de MDH dependiente de lantánidos (Nakagawa, 2012).

Además, se demostró que la MDH dependiente de lantánidos purificada a partir de cepas de *Methylobacterium* cultivadas en metanol tenían actividad de MDH. En el

mismo estudio se demostró que las cepas poseían La^{3+} como cofactor en la enzima y la MDH dependiente de lantánidos estaba codificada por el gen *xoxF1* (Nakagawa, 2012).

Posteriormente a estos descubrimientos, se ha informado sobre los hallazgos de MDHs dependientes de lantánidos (*XoxF*) de varias bacterias metilotróficas como *Methylothermobacter mobilis* y *Methylobacterium* sp. Gracias a ello se estableció que *xoxF* está ampliamente distribuido en muchos genomas bacterianos metilotróficos y que las bacterias que lo poseen pueden clasificarse filogenéticamente en cinco clados principales (del *XoxF1* al *XoxF5*) (Chistoserdova *et al.*, 2018)

XoxF puede utilizar diversos tipos de Ln^{3+} como cofactor, particularmente lantánidos de los ubicados como ligeros (de La^{3+} al Nd^{3+}) (Jahn *et al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES GENERALES

El metano es el compuesto orgánico más abundante en la atmósfera. El metanol ocupa el segundo puesto además de ser el principal compuesto producido por las plantas y que resulta del metabolismo de la pectina y se excreta principalmente a través de los estomas (Yang *et al.*, 2013). Las bacterias metilotróficas son aquellas que incorporan en su metabolismo compuestos de un solo carbono (como exclusiva fuente de carbono y energía) entre los que se encuentra el metano, el metanol, el formaldehído y la metilamina, así como otros compuestos metilados (Chistoserdova, 2013).

Una característica interesante de *Methylobacterium extorquens* es su capacidad para producir sustancias promotoras del crecimiento de las plantas, como las auxinas y las citoquininas. Estas sustancias desempeñan un papel en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas. Por lo tanto, esta bacteria tiene potenciales aplicaciones en la mejora del crecimiento de las plantas.

Methylobacterium extorquens (actualmente reclasificado como *Methylobacterium extorquens*) se ha empleado por mucho tiempo como organismo modelo de metilótrofos Gram-negativos para estudiar tanto procesos bioquímicos y fisiológicos del metabolismo del metanol (Anthony, 2011).

La ruta metabólica que emplea *M. extorquens* se divide en cuatro pasos, primero se oxida el metanol en formaldehído, este proceso ocurre en el periplasma y para ello emplea la enzima metanol deshidrogenasa (MDH) dependiente de pirroquinolina quinona (PQQ). Posteriormente el formaldehído sufre un proceso oxidativo que da como resultado la formación de formiato, esto ocurre dentro del citoplasma y la vía empleada es la vía de la tetrahidrometanopterina (H_4MPT). Se ha descrito que en esta vía intervienen distintas enzimas que catalizan la reacción, entre ellas encontramos a la enzima activadora de formaldehído (*Fae*), metileno- H_4MPT deshidrogenasas (*MtdA* y *MtdB*), metenil- H_4MPT ciclohidrolasa (*Mch*) y el complejo formiltransferasa / hidrolasa (*Fhc*). Como último paso, el formiato es oxidado a CO_2 mediante la acción de la formiato deshidrogenasa (*Fdh*), también puede ser convertido en metileno-tetrahidrofolato a través de la vía del tetrahidrofolato (H_4F) para que pueda ser asimilado (Peyraud *et al.*, 2011).

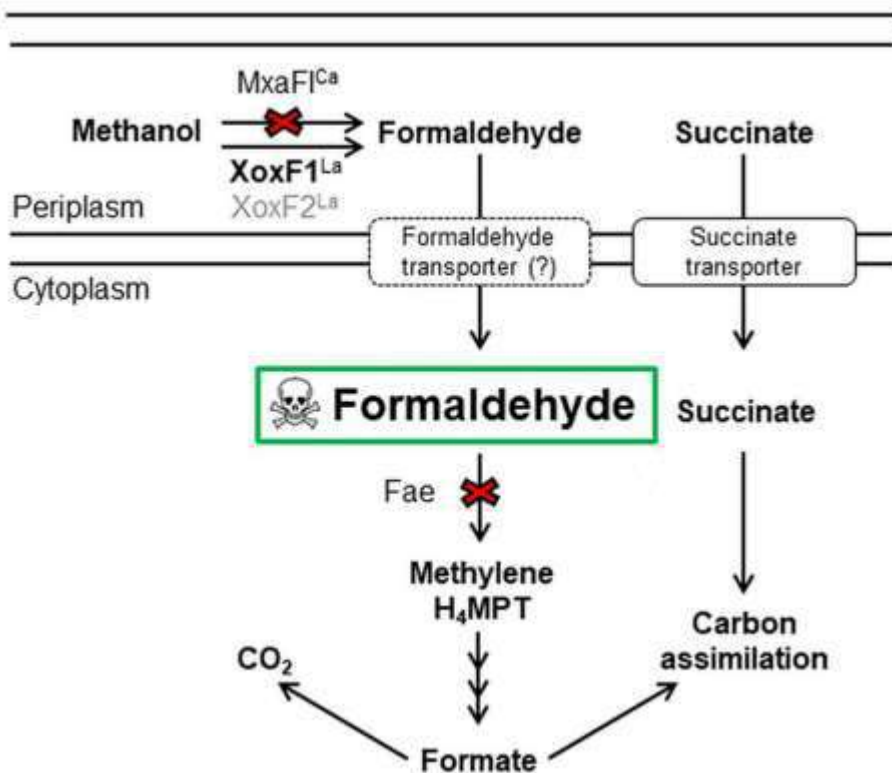


ILUSTRACIÓN 1. RUTA METABÓLICA DE *M. EXTORQUENS* tomada de Peyraud *et al.*, 2011 en su trabajo titulado “Genome-scale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1”.

En el pasado el papel fisiológico de las proteínas XoxF era desconocido hasta que en 2011 se purificó y mostró ser una enzima oxidante de metanol. Diversos estudios muestran que una gran cantidad de metilótrofos requieren de algún elemento de las tierras raras (REE por sus siglas en inglés) cuando crecen en presencia de metanol, esto es gracias a la expresión de una MDH distinta a la estudiada de forma canónica (*MDH-MxaF1*) la cual es una MDH del tipo *XoxF* (Vu *et al.*, 2016 y Zheng *et al.*, 2018).

La metilotrofía, descrita hace más de dos siglos, ha experimentado una revolución debido a que previamente se había asumido que los lantánidos (Ln^{3+}) eran biológicamente inertes (Lim y Franklin, 2004). El descubrimiento de las metanol deshidrogenasas (MDH) dependientes de Ln^{3+} ha representado una puerta de entrada importante a los posibles descubrimientos de las actividades de Ln^{3+} en la catálisis de otras moléculas, por enzimas que pueden o no estar relacionadas con *XoxF*. Así, el descubrimiento del funcionamiento de *XoxF* significó una nueva etapa en la enzimología.

Se han hallado dos genes del tipo *xoxF* en el genoma de *M. extorquens*, llamados *xoxF1* y *xoxF2*, respectivamente.

Cualquiera de los dos productos génicos es capaz de soportar el crecimiento con metanol y Ln^{3+} administrado de forma exógena. Se ha descrito a *XoxF1* como el principal sistema de oxidación de metanol para la metilotrofía dependiente de Ln^{3+} .

Las MDH dependientes de PQQ se pueden clasificar en dos tipos: *MxaFI* y *XoxF*. *MxaFI* es una MDH que presenta una forma heterotetramérica ($\alpha_2 \beta_2$) y es dependiente de calcio (Ca^{2+}), mientras que, como se mencionó en el párrafo anterior, *XoxF* es una MDH que presenta una forma dimérica y depende de Ln^{3+} . Los hallazgos recientes sobre la dependencia de lantánidos por parte de *XoxF* han expandido nuestro conocimiento sobre los microorganismos metilotróficos y han originado nuevas interrogantes. Ante todo, la distribución más amplia de *xoxF* en muchos genomas bacterianos dirigió al descubrimiento de nuevos metilótrofos de

géneros novedosos y el descubrimiento de que ciertos microorganismos comunes pueden participar en procesos metilotróficos.

Las bacterias que contienen ambas MDHs pueden exhibir un fenómeno nombrado "cambio de lantánidos". En *M. extorquens*, el cambio de lantánidos está moderado por un sistema de regulación de dos componentes (TCRS) que consta de *MxbD* (sensor) y *MxbM* (regulador), que es responsable de la expresión de *mxoF* y la represión de *xoxF1* en ausencia de Ln^{3+} .

En cuanto a la incorporación de los lantánidos, un conjunto de genes que codifican el receptor dependiente de *TonB* y el transportador *ABC*, clasificados actualmente como genes *lut* (utilización y transporte), son esenciales para la metilotrofia dependiente de Ln^{3+} en *M. extorquens* (Pol et al., 2014; Skovran et al., 2011; Ochsner et al., 2011 y Roszczenko-Jasiński., 2019).

La regulación descrita anteriormente denominada 'ascendente/descendente' se observa principalmente en organismos que codifican una sola enzima *XoxF*, mientras que en organismos que codifican múltiples *XoxF*, la regulación puede ser más compleja (Yu et al., 2017 y Krause et al., 2017).

Gracias a los avances recientes en el estudio de los microorganismos metilotróficos se ha caracterizado bioquímicamente a *MDH XoxF1* de *M. extorquens*. También se ha demostrado que el formaldehído se puede oxidar mediante la enzima pura, lo

que demuestra que la enzima pura exhibe propiedades similares a las reportadas para *MxaFI* y otras enzimas de tipo *XoxF* (Good *et al.*, 2019).

Los elementos de tierras raras incluyen 15 lantánidos (lantano (La), cerio (Ce), praseodimio (Pr), neodimio (Nd), prometio (Pm), samario (Sm), europio (Eu), gadolinio (Gd), terbio (Tb), disprosio (Dy), holmio (Ho), erbio (Er), tulio (Tm), iterbio (Yb) y lutecio (Lu) y dos elementos químicamente similares (escandio (Sc) e itrio (Y). Por su masa, los lantánidos suelen clasificarse en ligeros (lantano, cerio, praseodimio, neodimio, prometio y samario) y lantánidos pesados (europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio y lutecio) (Krauze *et al.*, 2017).

En *Methylobacterium extorquens*, el nucleóide contiene la información genética de la bacteria en forma de un único cromosoma circular. Este cromosoma lleva los genes necesarios para el crecimiento, el metabolismo y otras funciones celulares de la bacteria.

Vale la pena señalar que, si bien *M. extorquens* puede interactuar con el cerio y potencialmente acumular lantánidos, los detalles específicos de esta interacción y el papel del nucleóide en este proceso requieren más estudios. (Chistoserdova, *et al.*, 2017)

Sobre la interacción de calcio, metanol deshidrogenasa (MDH) y la membrana de *M. extorquens* se sabe que el calcio (Ca) es un elemento esencial que juega un papel crucial en muchos procesos biológicos. En esa bacteria, los iones de calcio

están involucrados en diversas funciones celulares, incluyendo el funcionamiento de las enzimas y la estabilidad de la membrana celular.

La membrana de *Methylobacterium extorquens* es un componente vital de la célula bacteriana que proporciona estructura, regula el flujo de moléculas dentro y fuera de la célula, y sirve como plataforma para diversos procesos celulares. Los iones de calcio están involucrados en el mantenimiento de la integridad y estabilidad de la membrana celular. Ayudan en el plegamiento y posicionamiento adecuados de las proteínas de membrana y contribuyen a la estabilidad general y la función de la membrana.

La interacción entre el praseodimio y *XoxF* permite a las bacterias utilizar eficientemente el metanol como fuente de carbono y energía.

La incorporación de praseodimio en la proteína *XoxF* está mediada por sitios de unión específicos dentro de la cavidad del sitio activo. Estos sitios de unión están altamente conservados a través de varias bacterias que poseen enzimas *XoxF*. El praseodimio interactúa con residuos de aminoácidos específicos dentro del sitio activo, formando enlaces de coordinación para estabilizar la estructura de la proteína y facilitar la oxidación del metanol.

Además, se ha encontrado que el praseodimio interactúa con los componentes de membrana de *M. extorquens*. La naturaleza exacta de esta interacción y su significado funcional aún no se comprenden completamente. Sin embargo, se especula que el praseodimio puede influir en las propiedades de la membrana, como la fluidez o la permeabilidad, y por lo tanto desempeñar un papel en la regulación del transporte de metanol u otros sustratos (Jahn *et al.*, 2018).

EL LANTANO CON LA METANOL DESHIDROGENASA (MDH), XOXF Y LA MEMBRANA DE *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS*.

La membrana de *Methylobacterium extorquens* está compuesta de fosfolípidos, principalmente fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) y cardiolipina (CL). Estos lípidos proporcionan integridad estructural a la membrana celular. La membrana también contiene una variedad de proteínas integrales de membrana, incluyendo MDH y otras enzimas involucradas en el metabolismo del metanol (Krause *et al.*, 2017).

El término "tierras raras" es engañoso, ya que los lantánidos son relativamente abundantes en la corteza terrestre y se encuentran en niveles similares a los observados para el cobre y el zinc (Ce, 66 ppm; La 39 ppm; Cu, 60 ppm, Zn, 70 ppm). Sin embargo, los lantánidos son altamente insolubles y rara vez se encuentran en forma pura (Vu *et al.*, 2016).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Durante las investigaciones del grupo de trabajo y realizadas en el período 2014 a 2017 se estudiaron 38 aislamientos, los cuales fueron microorganismos metilotróficos facultativos. Su clasificación incluye las clases *Actinobacteria*,

Sphingobacteriia, *Alpha*-, *Beta*- y *Gammaproteobacteria*. Los aislados fueron obtenidos de la superficie la cactácea *Neobuxbaumia macrocephala* específicamente de la rizósfera y del interior del tallo (Bustillos, C.M.R. *et al.*, 2017).

Todos los aislados metilotróficos mostraron crecimiento con metanol como fuente de carbono y energía y Ca^{2+} o REE, Ce^{3+} , como cofactores.

Diferentes aislamientos mostraron distintas tasas de crecimiento metilotrófico. Por tanto, el tiempo de su máximo crecimiento en presencia de Ce^{3+} osciló entre 72 y 144 hrs. de incubación. La mayoría de los aislados no mostraron preferencia por ninguno de los cofactores, mientras que para algunos fue evidente que uno de los cofactores mejoró el crecimiento metilotrófico (Bustillos, C.M.R. *et al.*, 2017).

Se extrajo DNA genómico de los aislamientos y se detectó la presencia de amplicones de *mxoF* y *xoxF* en el 34,2% de los aislamientos que utilizaron para determinar la presencia de los amplicones. Todas las secuencias eran más similares a los genes de las metanol deshidrogenasas XoxF que a los de las metanol deshidrogenasas MxoF.

Además, se identificó el codón del aminoácido Asp301, característico de MDH-XoxF, en todos los amplicones que cubrían esa región (Bustillos, *et al.*, 2017).

Entre los veinticinco aislados de los cuales no se pudieron obtener amplicones con los primers dirigidos a *mxoF* y *xoxF*, once hibridaron con una sonda XoxF5 de *M.*

extorquens. Los catorce aislados restantes no hibridaron con la sonda *XoxF5* o no se amplificaron con los primers *mxaxoxF*, incluyendo a una *Actinobacteria*, una *Sphingobacteria*, dos Alphaproteobacteria y diez Gammaproteobacteria.

Aunque la hibridación con la sonda *mxaxF* fue muy débil existe la posibilidad que esos organismos posean un loci *mxaxF* (Bustillos, et al., 2017).

Todas las secuencias de deshidrogenasa obtenidas fueron similares a *XoxF5*, estos genes están relacionados filogenéticamente con otras subfamilias de *XoxF* y con *MxaxF*.

Debe destacarse que algunos de los aislados que no se hibridaron con las sondas *XoxF5* y *MxaxF*, o que no fueron amplificados con cebadores *MxaxF*-*XoxF* pueden poseer otras secuencias de *XoxF* u otras metanol deshidrogenasas como la MDH2 o metanol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. En algunos de los casos en los que se detectó hibridación con *mxaxF* o *xoxF*, no se obtuvieron amplicones de genes de metanol deshidrogenasa. Los autores señalan que esa inconsistencia puede estar relacionada con el diseño de los primers. Todos los aislamientos probados en el ensayo de metilotrofía crecieron usando Ce³⁺, como se esperaba, pero también usaron Ca²⁺ como cofactor. Por lo tanto, actualmente no está claro si las enzimas *XoxF* aceptan o requieren o son dependientes de Ca²⁺ además de REE (Bustillos, et al., 2017).

La cepa UAP0123 fue aislada de la rizósfera de la cactácea *Neobuxmania macrocephala*. Mostró ligera hibridación con Mxa e hibridación positiva con XoxF. También mostró crecimiento con metanol como fuente de carbono y energía y Ca^{2+} o REE como el Ce^{3+} , se clasificó como *Methylobacterium* gracias al análisis del 16S ribosomal (Bustillos, et al., 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Es necesaria la generación de nuevo conocimiento que contribuya a dilucidar el requerimiento de lantánidos en el metabolismo de bacterias metilotróficas debido al impacto ambiental que estos generan al ser contaminantes de ecosistemas acuáticos. Particularmente, no se tiene bien claro si las metilobacterias también son capaces de incorporar lantánidos en condiciones de crecimiento no metilotróficas. Por lo que se propone a *Methylobacterium* y organismos relacionados como modelo biológico para este estudio.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué porcentaje de lantánidos ligeros en cultivos en medio mínimo de sales minerales se incorporan a las cepas de *Methylobacterium* y organismos relacionados?

5. HIPÓTESIS

Los lantánidos ligeros se incorporan a las cepas de *Methylobacterium* y organismos relacionados.

6. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Estimar la incorporación de lantánidos ligeros en cepas de *Methylobacterium* y organismos relacionados.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la disminución de la concentración de lantánidos ligeros en cultivos de medio mínimo de sales minerales utilizado para el crecimiento metilotrófico de cepas de *Methylobacterium* y organismos relacionados.

Comparar la incorporación de los distintos lantánidos ligeros de las cepas de *Methylobacterium* y organismos relacionados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se midió de forma cuantitativa la concentración de lantánidos presente en cada medio de cultivo previamente inoculado con la cepa *Methylobacterium* UAPS0123, del cepario interno del laboratorio EMM y o bien con la cepa *Methylobacterium extorquens* JCM 2802.

Los lantánidos a usar son: La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} y Nd^{3+} . Lo anterior tiene como base una modificación en un ensayo que detecta la absorción de otros REE, como Pr^{3+} , o para monitorear el agotamiento de La^{3+} de los medios de crecimiento en metilótrofos neutrófilos como *Methylobacterium extorquens* cepa AM1. El ensayo AS III presenta

un método de detección conveniente y rápido para los niveles de REE en medios de cultivo (Hogendoorn C., *et. al.*, 2018).

El Ca^{2+} fue usado como control positivo de crecimiento y como control negativo de la técnica espectrofotométrica para medir la concentración de cada lantánido que utiliza Arsenazo III.

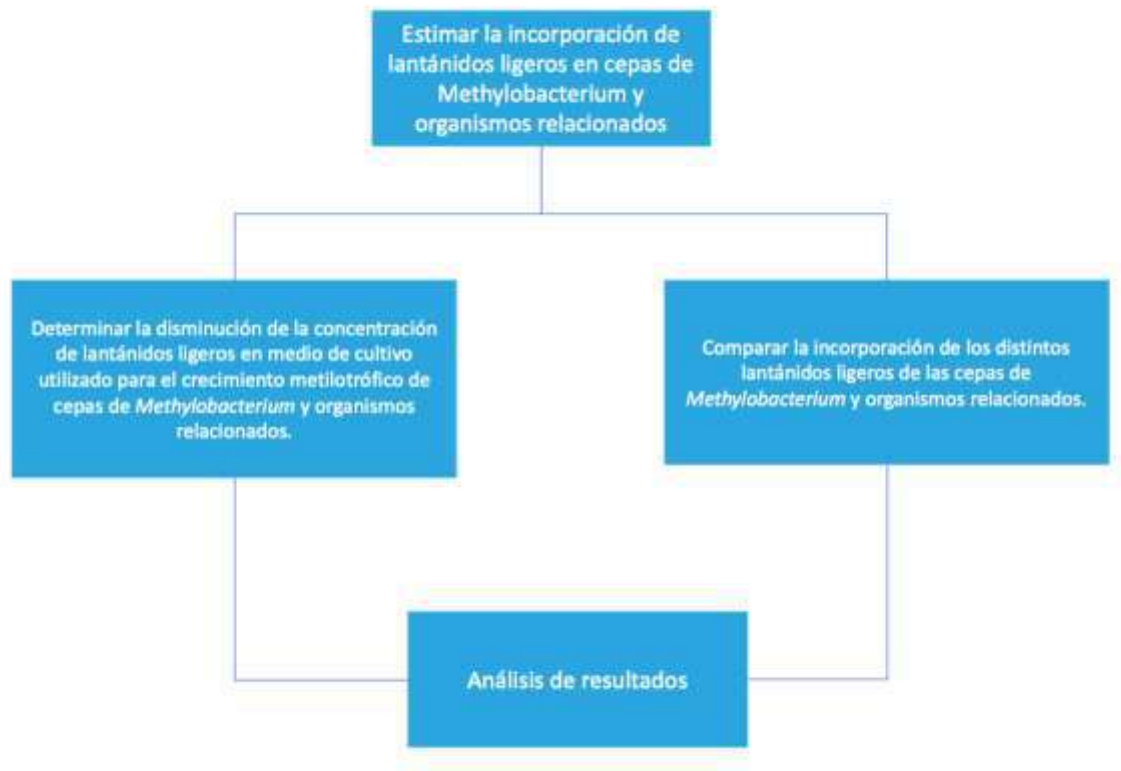
Se usó medio mínimo de sales minerales (MMS) diluido en relación 1:3 y adicionado con metanol al 0.5%. Las concentraciones a emplearse en cada muestra fueron 20 mM, 30 mM y 50 mM de cada lantánido a emplearse. Posteriormente se implementó una técnica espectrofotométrica para determinar si la concentración de lantánidos disminuye en el medio por la presencia de inóculo en cada muestra.

.

UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

La tesis se realizó en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana perteneciente al área de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

ESTRATEGIA DE TRABAJO



MUESTREO

DEFINICIÓN DE UNIDAD DE POBLACIÓN

Cepa de *Methylobacterium* spp. aislada de *Neobuxbaumia macrocephala*.

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se usó una cepa aislada de *Neobuxbaumia macrocephala* recolectada en 2014 y que forma parte del cepario del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana que crezca en medio mínimo de sales minerales con metanol diluido y adicionado con diferentes lantánidos ligeros

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS UNIDADES DE MUESTREO

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Cepa *Methylobacterium* spp. que **crezca** en medio MMS adicionado con lantánidos ligeros.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Cepa *Methylobacterium* spp. con **bajo** o **nulo** crecimiento en medio MMS adicionado con lantánidos ligeros.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras que se encuentren contaminadas.

DISEÑO Y TIPO DE MUESTREO

Estudio correlacional, comparativo y experimental.

Se usará un muestreo probabilístico correlacional analizando los patrones de crecimiento de cada muestra. Así como el estudio comparativo para evaluar también el crecimiento y grado de asimilación de lantánidos ligeros en las cepas de *Metylobacterium* y otros organismos relacionados.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se usarán 2 cepas (cepa *Methylobacterium* sp. UAPS0123 y cepa *M. extorquens* JCM 2802 de la colección del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

Crecimiento en medio de sales minerales (MMS) adicionado con metanol al 0.5%

VARIABLE DEPENDIENTE

Crecimiento en medio de sales minerales diluido y adicionado con metanol al 0.5% y cuatro lantánidos ligeros.

MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La recolección de los datos obtenidos por el crecimiento de las cepas se hizo por confirmación de viabilidad mediante el uso de espectrofotometría de las muestras con los lantánidos ligeros probados.

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Medio de crecimiento Mínimo de Sales Minerales para metilótrofos:

El medio de crecimiento mínimo consistió en 30 mM, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,45 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1,88 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,5 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 8 mM, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 45,6 μ M, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2 μ M, $MnCl_2$ 1 μ M $\cdot 4H_2O$, $FeSO_4$ 18 μ M $\cdot 7H_2O$, 2 μ M $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 1 μ M $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2 μ M $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,33 μ M $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, 20 μ M $CaCl_2$ y metanol 125 mM de acuerdo a lo publicado por Delaney et. al., 2013.

Cultivo de las cepas *Methylobacterium* UAPS0123 y la cepa *Methylorubrum extorquens* JCM 2802

La cepa *Methylobacterium* UAPS0123 y la cepa tipo *Methylorubrum extorquens* JCM 2802 se resembraron en placas de medio PY, se incubaron a 37°C por 48 horas y se realizó una identificación por morfología colonial para después resembrarlas en 30 ml de medio de cultivo líquido MMS diluido en relación 1:3. Se adicionaron los lantánidos correspondientes en una concentración de 20mM, 30mM y 50 mM, se agregó metanol al 0.5% y fueron incubadas a 37°C de 8 a 10 días en agitación de 150 rpm Se obtuvieron sobrenadantes libres de células mediante centrifugación los cuales fueron empleados para las pruebas espectrofotométricas correspondientes usando Arsenazo III.

Técnica de Arsenazo III

El ensayo AS III presenta un método de detección rápido y conveniente para los niveles de REE en los medios de cultivo. Este método de cribado rápido usa el colorante Arsenazo III (AS III) para la detección espectrofotométrica de REE en el rango medio de μM (0.1 a 15 μM).

El arsenazo III (AS III) y las sales de REE se adquirieron de Sigma-Aldrich y se usaron en los experimentos sin purificación adicional. El colorante se usó a un 85 % de pureza. Se almacenó la solución AS III en un vial oscuro y se preparó una solución fresca conservando la misma concentración cada semana. La absorbancia general de esta solución de colorante disminuye ligeramente con el tiempo; por lo tanto, las mediciones de la curva de calibración y el ensayo se realizaron el mismo día con la misma solución madre de AS III. $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tenía una pureza del 99,999%. $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{PrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se obtuvieron con una pureza del 99,99%. Las soluciones de tampón, de material metálico y de colorante se prepararon en agua Millipore desionizada. No fue necesario un tratamiento adicional del agua de Millipore con Chelex. El ensayo se probó en cubetas de cuarzo Hellma Suprasil, así como con cubetas desechables (polimetilmetacrilato [PMMA]) y placas de 96 pocillos, y se encontró que todas eran adecuadas para este ensayo. El ensayo se probó en espectrómetros UV-visible (UV-Vis) convencionales de matriz de diodos y lámpara de flash de xenón, que se pueden usar, ya que AS III no muestra una descomposición significativa durante el breve tiempo de duración del ensayo cuando se lo somete a luz ultravioleta. El ensayo también se puede realizar utilizando un lector de microplacas (p. ej., BioTek EpochII; Winooski, VT).

Protocolo general para el ensayo AS III

Escenario	Paso No.	Descripción ^{un}
Preparación de solución madre	1	Preparar una solución madre de Arsenazo III 1 mM en agua Millipore.
	2	Preparar tampón de ácido cítrico/fosfato. Para 100 ml, combine 84,15 ml de una solución de ácido cítrico 0,1 M y 15,85 ml de una solución de Na_2HPO_4 0,2 M. El pH final de esta solución tampón debe ser de 2,8.
	3	Preparar soluciones madre de medio de crecimiento. El pH de la solución del medio de crecimiento de la cepas empleadas se ajusta a 2,7–2,8 con ácido sulfúrico si es necesario. Para metilotrofos neutrofilicos como <i>M. extorquens</i> AM1, se utilizó el medio MP. El pH de esta solución de medio de crecimiento es de 6,7 y, por lo tanto, debe ajustarse a un pH de 2,7 a 2,8 con ácido clorhídrico 5 M. Después de acidificar el medio, se recomienda centrifugar para eliminar el tampón PIPES precipitado.
	4	Prepare una solución madre de La^{III} 1 mM disolviendo $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua Millipore. Tenga en cuenta que los recipientes de plástico, al igual que los de vidrio, pueden absorber o liberar lantánidos en el medio, por lo que esta solución debe prepararse fresca para las mediciones de la curva de calibración .
Preparación de muestra de calibración	5	Prepare diluciones para la curva de calibración (por ejemplo, 0, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 y 2 μM La^{III} en soluciones madre de medio de cultivo). Compruebe el pH de estas soluciones de calibración; debe estar entre pH 2.7–2.8.
Curva de calibración	6	Transfiera 500 μl del tampón citrato/fosfato (pH 2,8) a una cubeta y agregue 490 μl de solución media (0 μM La) o la solución de calibración respectiva (0,1–2 μM La). Registre un blanco en el instrumento UV-Vis en esta solución.
	7	Agregar 10 μl de la solución de Arsenazo III 1 mM, mezclar y registrar el espectro UV-Vis. Tenga en cuenta la absorbancia a 650 nm.
	8	Añadir otros 20 μl de caldo de Arsenazo III. Registro del espectro UV-Vis. Tenga en cuenta la absorbancia a 650 nm.

Escenario	Paso No.	Descripción ^{un}
Medición de muestra	9	Repita los pasos 6 a 8 para toda la serie de diluciones. Grafique la absorbancia frente a la concentración de La^{III} . ^b
	10	Transfiera 500 μl de tampón de citrato/fosfato (pH 2,8) a una cubeta y agregue 490 μl de la solución de medio de crecimiento que se va a analizar. Asegúrese de que el pH esté entre 2,7 y 2,8, ajustando el pH de la muestra antes de este paso si es necesario. Registre un blanco en el instrumento UV-Vis en esta solución.
	11	Agregar 10 μl de la solución de Arsenazo III 1 mM y registrar el espectro UV-Vis. Tenga en cuenta la absorbancia a 650 nm.
	12	Añadir otros 20 μl de caldo de Arsenazo III. Registro del espectro UV-Vis. Tenga en cuenta la absorbancia a 650 nm.
	13	Determinar la concentración de La^{III} a partir de las curvas de calibración.

8. RESULTADOS

DEPENDENCIA DEL PH DEL ENSAYO ASIII

Tanto el colorante AS-III como su respuesta a iones metálicos son sensible al pH. De acuerdo con Hogendoorn *et. al.*, (2018) el contenido de REE debe determinarse a un pH inferior a 2.9. Además de la mayor especificidad para los REE, un pH ácido

también asegura una mayor solubilidad de los iones REE en presencia de iones fosfato. La solubilidad de los fosfatos de REE es baja, y a pH neutro los fosfatos de REE precipitarán fácilmente de la solución, especialmente en ausencia de quelantes como el citrato o el ácido nitrilotriacético (Firsching *et al.*, 1991).

AGOTAMIENTO DE CALCIO

La incorporación de Calcio²⁺ por parte de la cepa *Methylobacterium extorquens* JCM 2802 se pudo constatar gracias a que la absorbancia cambia entre 10 µl, 20 µl y 30 µl de AS-III 1mM. Se observa que la absorbancia cambia cuando se aumenta el volumen de AS-III. Los datos de medición de Calcio²⁺ se utilizaron como controles negativos debido a que la concentración de calcio no puede medirse mediante esta técnica.

CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DE LANTANO

Curva de calibración con la solución madre del medio de cultivo (Fig. 1). La absorbancia AS III La³⁺ sigue una correlación lineal hasta 15 µM de La³⁺, esta correlación depende en gran medida de las condiciones del ensayo como por ejemplo pH, presencia del tampón y presencia de otros iones metálicos lo cual aplica para cada una de las curvas de calibración para cada lantánido.

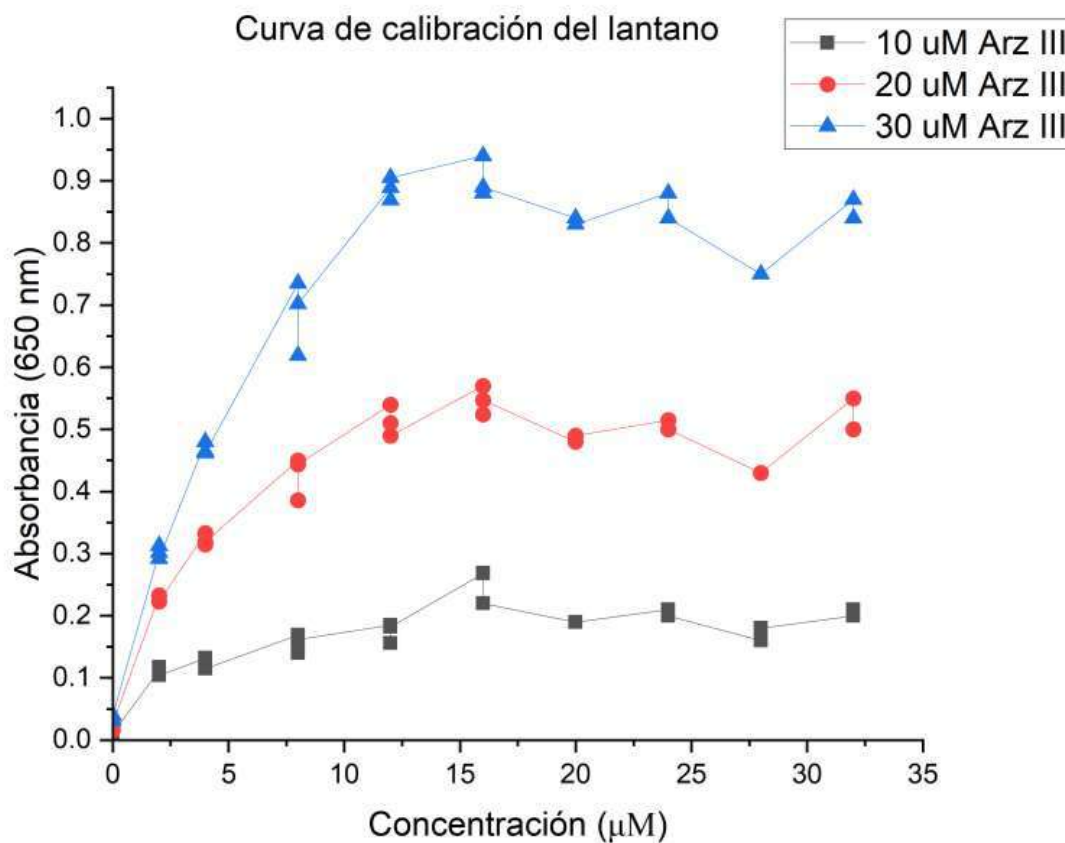


FIGURA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL LANTANO

Se emplearon 3 muestras con 30 μL de MMS donde creció cada cepa y una muestra sin inóculo, se midió el agotamiento del lantano, dando como resultado que efectivamente las cepas absorbieron La^{3+} . El Lantano en concentración desde 5 μM hasta 15 μM es medido teniendo su mejor pico en 16 μM. Se puede observar una disminución de la concentración desde una inicial de 30 μM hasta menor a 5 μM con las dos cepas UAP0123 y JCM2802 (Fig. 2).

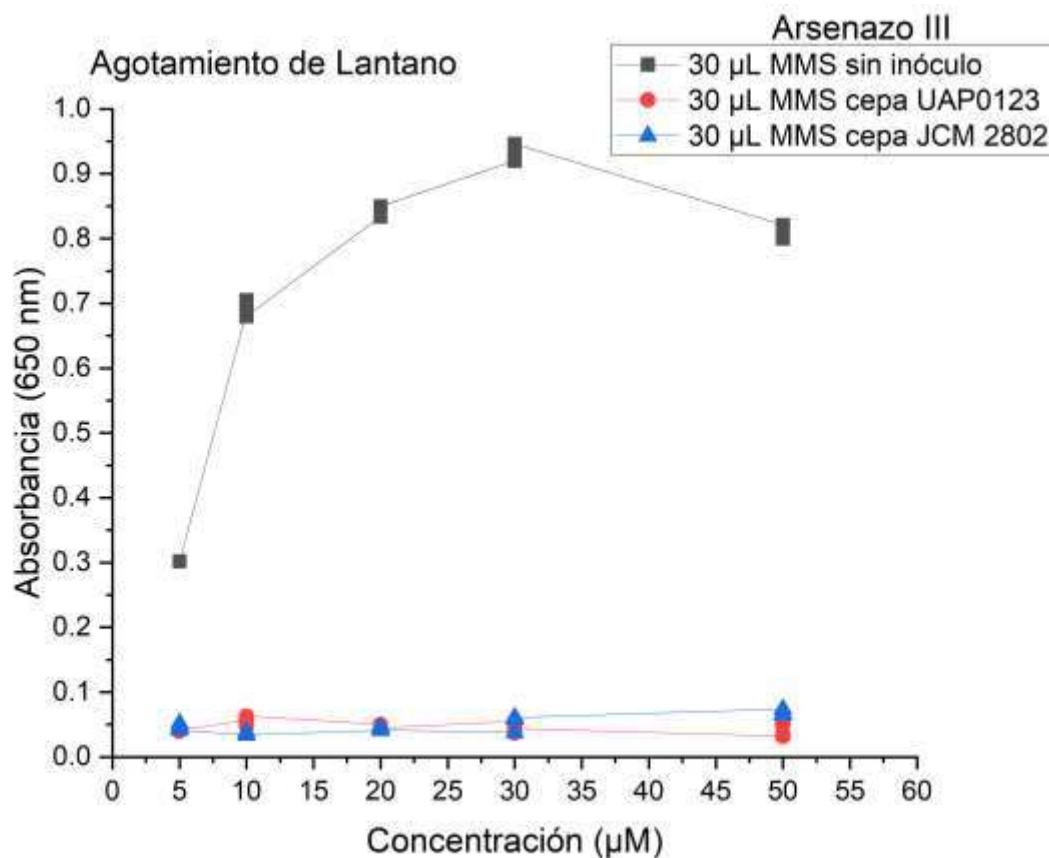


FIGURA 2. AGOTAMIENTO DEL LANTANO

CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DE CERIO

Posteriormente se realizó la curva de calibración para cada uno de los REE empleados en el estudio como se muestra en las siguientes gráficas, en esta podemos ver que el cerio alcanza un pico en su medición a los 30 μ M y una vez inoculadas las cepas en cada muestra se observa el agotamiento de este REE pasando de una concentración inicial de 50 μ M hasta una concentración menor a 5

μM una disminución del casi 90%, en este caso la cepa JCM2802 fue en la que hubo un mayor agotamiento de Ce^{3+} (Fig 3).

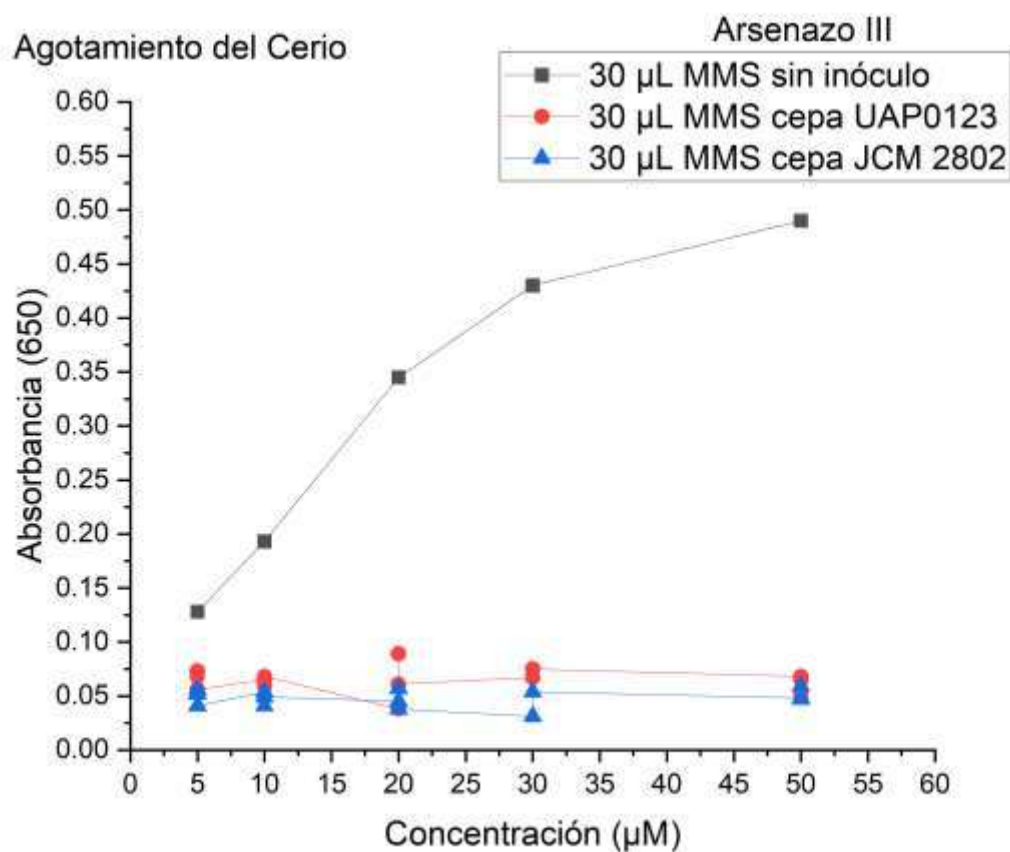


FIGURA 3. AGOTAMIENTO DEL CERIO

CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL NEODIMIO

El consumo de REE se determinó mediante el ensayo AS III, el crecimiento bacteriano redujo la concentración del neodimio. En la Fig. 4 se puede observar

que el Nd^{3+} pasó de 0.46 a 0.033 siendo la cepa JCM2802 la que más lo incorporó.

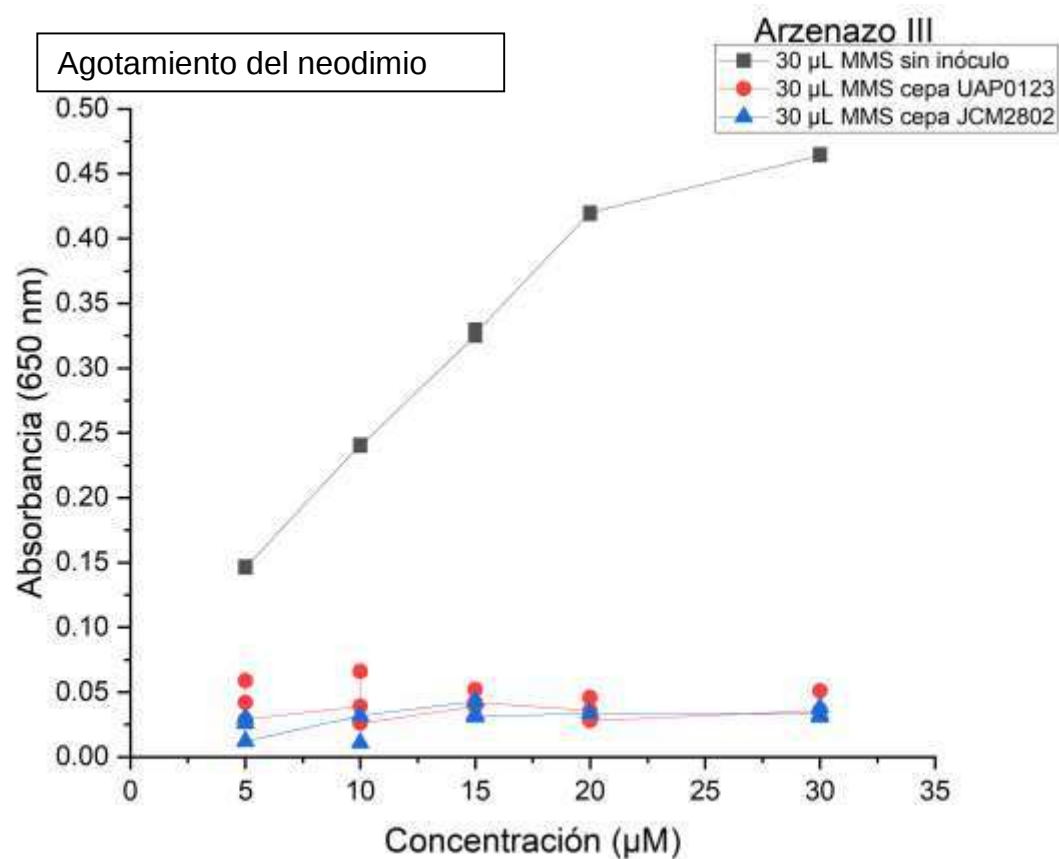
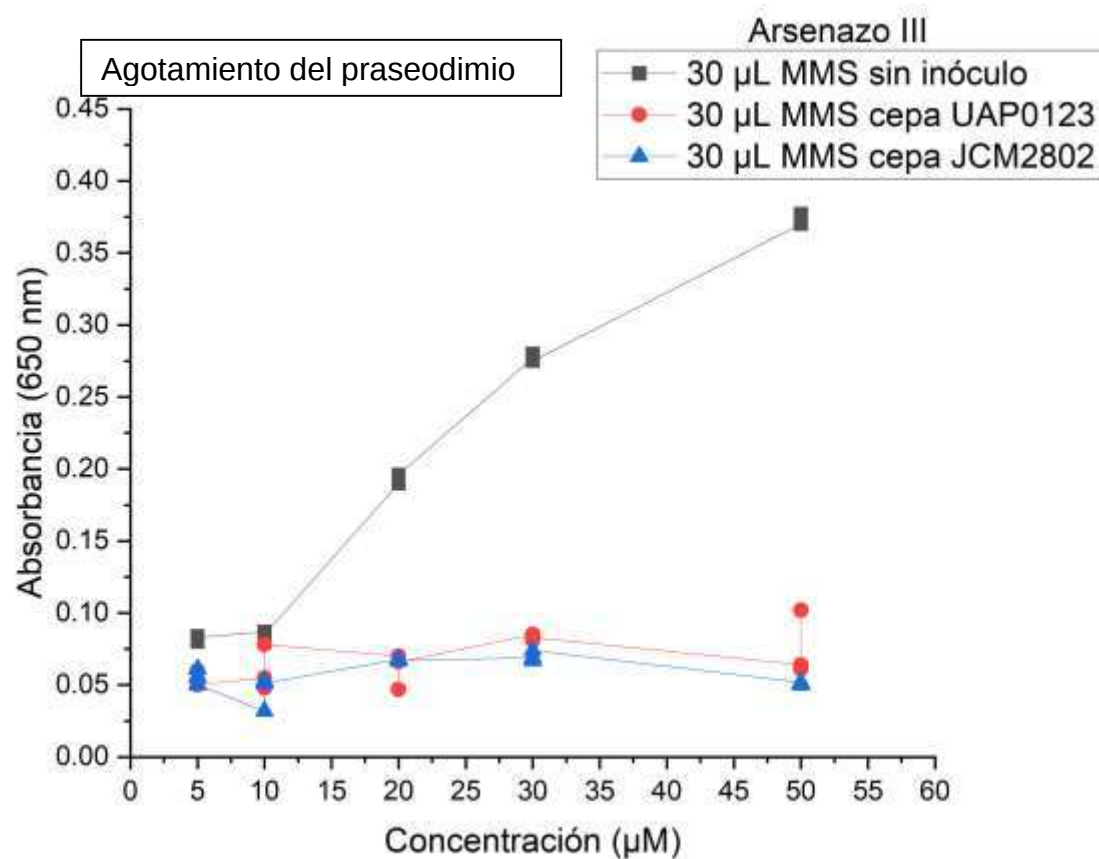


FIGURA 4. AGOTAMIENTO DEL NEODIMIO

CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL PRASEODIMIO

Las concentraciones evaluadas de Pr^{3+} se redujeron notablemente, siendo la cepa JCM2802 la que absorbió mayor cantidad de este ión seguida de la cepa

UAP0123, en la curva de calibración se alcanzó un pico de absorbancia de 0.37 y disminuye hasta 0.05.



GRÁFICA 5. AGOTAMIENTO DEL PRASEODIMIO

9. DISCUSIÓN

A pH más alto, otros iones metálicos pueden unirse a AS III e interferir en el ensayo. Para evitar la interferencia de otros iones como el Calcio²⁺, el contenido de REE debe determinarse a un pH inferior a 2.9, estudios anteriores muestran que AS III exhibe un pico amplio entre 450 y 700 nm, en este estudio se empleó una absorbancia máxima a 650 nm. Dado que el pH del medio de cultivo varía durante el crecimiento bacteriano, el pH se monitoreó y ajustó para el ensayo, esto se logró mediante el uso de un sistema tampón citrato/fosfato (pH 2.8).

Para aumentar la precisión se realizó una curva de calibración con la solución madre del medio de crecimiento siguiendo paso a paso el protocolo antes mencionado. Se registraron las curvas de calibración individuales para cada REE empleado.

Los resultados demuestran que los ensayos se pueden emplear con más REE y que proporciona una alternativa fiable a la ICP-MS.

Es interesante notar que además de diferentes tasas de crecimiento con La³⁺, Ce³⁺, Nd³⁺ y Pr³⁺ los agotamientos de estos iones metálicos por parte de las dos cepas UAP0123 y JCM2802 confluyen en el sentido en que son muy parecidas las tasas de agotamiento compartiendo agotamientos mayores al 90% teniendo predilección por el lantano y siendo semejante en los lantánidos posteriores.

Ochsner (2019) demostró que la cepa *M. extorquens* PA1 es capaz de crecer en metanol en presencia de REE La^{3+} y en ausencia de una enzima MxaFI funcional. XoxF es responsable del crecimiento observado y participa en la regulación tanto del grupo de genes *mx* como de su propio grupo de genes.

En presencia de La^{3+} , la expresión génica cambia de *mx* a *xox* de manera dependiente de la dosis. Esto implica que el XoxF dependiente de La^{3+} se ve favorecido sobre el MxaFI dependiente de Ca^{2+} y que la bacteria sintoniza el nivel de expresión de sus dos sistemas MDH en respuesta a la concentración de La^{3+} . En su ensayo usaron concentraciones de 10 μM de La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} y Sm^{3+} , destacando que en el presente estudio se usaron concentraciones de 10 μM , 20 μM y 30 μM las cuales fueron seleccionadas gracias a las curvas de calibración respectivas.

En conjunto, nuestros resultados amplían nuestro conocimiento sobre la metilotrofia dependiente de REE tanto a nivel molecular como en términos de importancia ambiental.

10. CONCLUSIÓN

Las mediciones de AS III muestran la correlación que existe entre el crecimiento de *Methylobacterium* y el agotamiento de lantánidos. *Methylobacterium* muestra una disminución lineal en el contenido de REE durante el período de crecimiento. El uso de la técnica de AS III representa un ensayo rápido y simple para la determinación directa de las concentraciones de REE en el medio de crecimiento de bacterias metilotróficas. Las dos especies bacterianas siguen los mismos mecanismos de absorción. Las dos especies muestran una disminución lineal en el contenido de REE al final de su período de crecimiento.

El ensayo fue empleado con cuatro diferentes lantánidos: La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} y Nd^{3+} . Gracias a estudios anteriores se sabe que cuanto mayor sea el REE, más sensible es el ensayo. El agotamiento de REE se puede monitorear en cepas bacterianas neutrófilas. El control del pH en las muestras de las diferentes curvas de calibración y las soluciones empleadas es esencial para poder precisar la determinación del contenido de REE.

Este breve trabajo emplea un ensayo rápido y sencillo para la determinación directa de las concentraciones de REE en los medios de crecimiento de bacterias metilotróficas utilizando el colorante Arsenazo III, se utilizaron diferentes REEs donde se observó que cuanto mayor es el REE más sensible es el ensayo, encontrando en cada curva de calibración teniendo una concentración máxima de medición. Es importante resaltar que el control del pH en las muestras de las curvas de calibración y las soluciones del ensayo son esenciales para la precisión de la determinación del contenido de REE.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Anthony, C. (2011). How half a century of research was required to understand bacterial growth on C1 and C2 compounds; the story of the serine cycle and the ethylmalonyl-CoA pathway. *Sci. Prog.* 2011, 94, 109–137.
2. Chistoserdova, L. (2011) Modularity of methylotrophy, revisited. *Environ. Microbiol.* 13, 2603–2622.
3. Good, N.M., Moore, R.S., Suriano, C.J. et al. (2019). Contrasting in vitro and in vivo methanol oxidation activities of lanthanide-dependent alcohol dehydrogenases XoxF1 and ExaF from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Sci Rep* 9, 4248
4. Goodwin PM, Anthony C (1998) The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol* 40:1–80
5. Keltjens, J.T.; Pol, A.; Reimann, J.; Op den Camp, H.J.M. (2014). PQQ-dependent methanol dehydrogenases: Rare-earth elements make a difference. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6163–6183.
6. Krause, S. M. B., Johnson, T., Samadhi Karunaratne, Y., Fu, Y., Beck, D. A. C., Chistoserdova, L., et al. (2017). Lanthanide-dependent cross-feeding of methane derived carbon is linked by microbial community interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
7. Lim, S., and Franklin, S. J. (2004). Lanthanide-binding peptides and the enzymes that might have been. *Cell Mol. Life. Sci.* 61, 2184–2188.
8. Nakagawa, T. et al. (2012). A catalytic role of XoxF1 as La³⁺-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *PLoS One* 7, e50480 .
9. Ochsner, A.M.; Hemmerle, L.; Vonderach, T.; Nüssli, R.; Bortfeld-Miller, M.; Hattendorf, B.; Vorholt, J.A. (2019). Use of rare-earth elements in the phyllosphere colonizer *Methylobacterium extorquens* PA1. *Mol. Microbiol.*, 111, 1152–1166.
10. Peyraud, R.; Schneider, K.; Kiefer, P.; Massou, S.; Vorholt, J.A.; Portais, J.-C. (2011). Genome-scale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1. *BMC Syst. Biol.* 5, 189.
11. Pol, A.; Barends, T.R.M.; Dietl, A.; Khadem, A.F.; Eygensteyn, J.; Jetten, M.S.M.; Op den Camp, H.J.M. (2014). Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots. *Environ. Microbiol.* 16, 255–264.
12. Roszczenko-Jasińska, P.; Vu, H.N.; Subuyuj, G.A.; Crisostomo, R.V.; Cai, J.; Raghuraman, C.; Ayala, E.M.; Clippard, E.J.; Lien, N.F.; Ngo, R.T.; et al. (2019). Lanthanide transport, storage, and beyond: Genes and processes contributing to XoxF function in *Methylobacterium extorquens* AM1. *bioRxiv*.
13. Sambrook, J. (2012). [Molecular cloning A Laboratory Manual. Zool. Res.

14. Skovran, E.; Palmer, A.D.; Rountree, A.M.; Good, N.M. Lidstrom M.E. (2011); XoxF is required for expression of methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. J. Bacteriol. 193, 6032–6038
15. Vu, H.N., Subuyuj, G.A, Vijayakumar S., Good, N.M, Martínez G. C., and Skovran, E. (2016) Lanthanide-dependent regulation of methanol oxidation systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and their contribution to methanol growth. J. Bacteriol. 198, 1250–59
16. Yang M, Nightingale PD, Beale R, Liss PS, Blomquist B, Fairall C (2013) Atmospheric deposition of methanol over the Atlantic Ocean. Proc Natl Acad Sci U S A 110(50):20034–20039
17. Yu, Z., Beck, D. A. C., and Chistoserdova, L. (2017). Natural selection in synthetic communities highlights the roles of *Methylococcaceae* and *Methylophilaceae* and suggests differential roles for alternative methanol dehydrogenases in methane consumption. Front. Microbiol. 8:2392.
18. Zheng, Y., Huang, J., Zhao, F., and Chistoserdova, L. (2018). Physiological effect of XoxG(4) on lanthanide-dependent methanotrophy. mBio 9:e02430-17.
19. Bustillos, C.M.R., Corona, G. I., Castañeda, L. M., Águila, Z. C., Seynos, G. E., Hernández, L. I., Muñoz, R J., Medina, A. L., & Fuentes, R. L. E. (2017). Culturable facultative methylotrophic bacteria from the cactus *Neobuxbaumia macrocephala* possess the locus *xoxF* and consume methanol in the presence of Ce^{3+} and Ca^{2+} . *Microbes and environments*, 32(3), 244–251.
20. Yanpirat, P., Nakatsuji, Y., Hiraga, S., Fujitani, Y., Izumi, T., Masuda, S., Mitsui, R., Nakagawa, T. y Tani, A. (2020). Lanthanide-dependent oxidation of methanol and formaldehyde in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A. *Microorganisms* , 8 (6), 822.
21. L. Chistoserdova, (2011). Modularity of methylotrophy, revisited, *Environ. Microbiol.* 13 pág. 2603–2622.
22. J.A. Vorholt, (2012). Microbial life in the phyllosphere, *Nat. Rev. Microbiol.* 10 828–840.
23. M.N. Dourado, A.A. Camargo Neves, D.S. Santos, W.L. Araújo, (2015). Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp., *Biomed Res. Int.*
24. P.N. Green, J.K. Ardley, (2018). Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: A proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68 pág. 2727–2748.
25. L. Chistoserdova, M.E. Lidstrom, (2013). Aerobic Methylotrophic Prokaryotes, in: *The Prokaryotes*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pág. 267–285.

26. E. Skovran, A.D. Palmer, A.M. Rountree, N.M. Good, M.E. Lidstrom, (2011). XoxF is required for expression of methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1, J. Bacteriol. 193 pág. 6032–6038. .
27. Y. Hibi, K. Asai, H. Arafuka, M. Hamajima, T. Iwama, K. Kawai, (2011). Molecular structure of La^{3+} -induced methanol dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans*, J. Biosci. Bioeng. 111 pág. 547–549.
28. T. Nakagawa, R. Mitsui, A. Tani, K. Sasa, S. Tashiro, T. Iwama, T. Hayakawa, K. Kawai, (2012) A Catalytic Role of XoxF1 as La^{3+} -Dependent Methanol Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* Strain AM1, PLoS One. .
29. L. Chistoserdova, (2016). Lanthanides: New life metals?, World J. Microbiol. Biotechnol. 32 pág. 1–7.
30. J.T. Keltjens, A. Pol, J. Reimann, H.J.M. Op Den Camp, (2014). PQQ-dependent methanol dehydrogenases: Rare-earth elements make a difference, Appl. Microbiol. Biotechnol. 98 pág. 6163–6183.
31. L. Chistoserdova, M.G. Kalyuzhnaya, (2018) Current Trends in Methylophony, Trends Microbiol. 26 pág. 703–714
32. B. Jahn, A. Pol, H. Lumpe, T. Barends, A. Dietl, C. Hogendoorn, H. Op den Camp, L. Daumann, (2018). Similar but not the same: First Kinetic and Structural Analyses of a Methanol Dehydrogenase Containing a Europium Ion in the Active Site, ChemBioChem. pág 1147–1153.
33. Delaney NF, Kaczmarek ME, Ward LM, Swanson PK, Lee M-C, Marx CJ. (2013). Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*. PLoS One 8:e62957. doi: 10.1371/journal.pone.0062957.

12. ANEXOS

FIGURA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CALCIO (CONTROL NEGATIVO) EN LA CEPA JCM2802

Absorbancia (650 nm)			Concentración (μM)
10 μL	20 μL	30 μL	
0.035	0.127	0.265	5
0.035	0.128	0.265	5
0.034	0.126	0.263	5
0.035	0.131	0.277	10
0.035	0.138	0.275	10
0.036	0.135	0.277	10
0.037	0.132	0.265	15
0.036	0.136	0.262	15
0.034	0.128	0.262	15
0.034	0.128	0.27	20
0.034	0.127	0.269	20
0.034	0.128	0.271	20
0.037	0.125	0.268	30
0.035	0.124	0.263	30
0.037	0.125	0.264	30
0.041	0.134	0.268	50
0.04	0.136	0.267	50
0.04	0.135	0.267	50

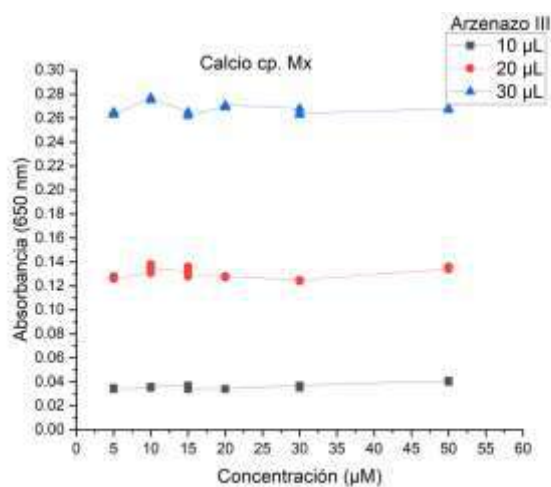


FIGURA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CALCIO (CONTROL NEGATIVO) EN LA CEPA UAP0123

Absorbancia 650 nm			Concentración μM
10 μL	20 μL	30 μL	
0.042	0.136	0.278	5
0.043	0.136	0.28	5
0.042	0.135	0.278	5
0.048	0.142	0.273	10
0.048	0.142	0.27	10
0.049	0.14	0.27	10
0.042	0.133	0.267	15
0.042	0.133	0.267	15
0.043	0.135	0.265	15
0.042	0.135	0.28	20
0.043	0.135	0.28	20
0.042	0.135	0.28	20
0.042	0.135	0.268	30
0.042	0.135	0.269	30
0.042	0.134	0.27	30
0.035	0.138	0.258	50
0.035	0.135	0.258	50
0.035	0.139	0.259	50

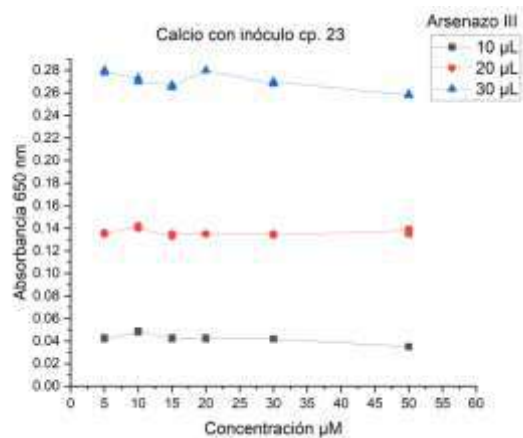


FIGURA 3. AGOTAMIENTO DEL CALCIO

Absorbancia (650 nm)			Concentración (μ M)
30 μ L MMS sin inóculo	30 μ L MMS cepa 23	30 μ L MMS cepa Mx	
0.255	0.278	0.265	5
0.265	0.28	0.265	5
0.269	0.278	0.263	5
0.27	0.273	0.277	10
0.274	0.27	0.275	10
0.273	0.27	0.277	10
0.26	0.267	0.265	15
0.269	0.267	0.262	15
0.262	0.265	0.262	15
0.273	0.28	0.27	20
0.264	0.28	0.269	20
0.271	0.28	0.271	20
0.247	0.268	0.264	30
0.258	0.269	0.265	30
0.267	0.27	0.272	30
0.268	0.258	0.268	50
0.269	0.258	0.267	50
0.263	0.259	0.267	50

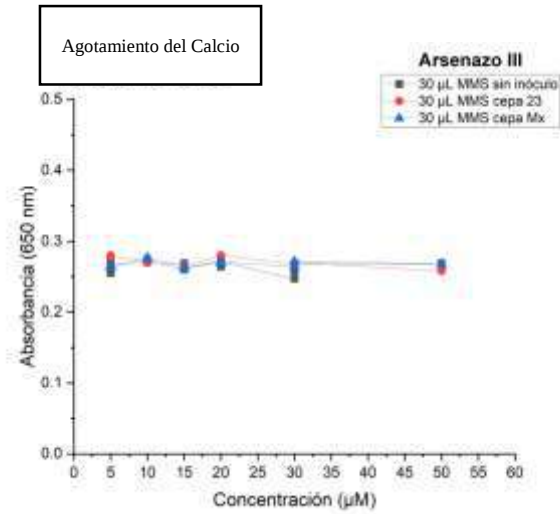


FIGURA 4. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL LANTANO CON DESGLOSE DE DATOS

MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE LANTANO ANTES DEL CULTIVO Y DESPUÉS DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS

CURVA DE CALIBRACIÓN Y MEDICIÓN DE AGOTAMIENTO DE LANTANO

Absorbancia 650 nm			Concentracion $\lambda f: g(\mu)m$
10 uM Arz III	20 uM Arz III	30 uM Arz III	
0.007	0.016	0.04	0
0.005	0.016	0.031	0
0.01	0.027	0.04	0
0.113	0.233	0.302	2
0.117	0.232	0.313	2
0.104	0.223	0.292	2
0.132	0.333	0.48	4
0.118	0.315	0.465	4
0.115	0.319	0.462	4
0.169	0.45	0.735	8
0.14	0.386	0.619	8
0.162	0.444	0.702	8
0.185	0.54	0.889	12
0.156	0.51	0.869	12
0.182	0.49	0.905	12
0.268	0.57	0.94	16
0.269	0.524	0.88	16

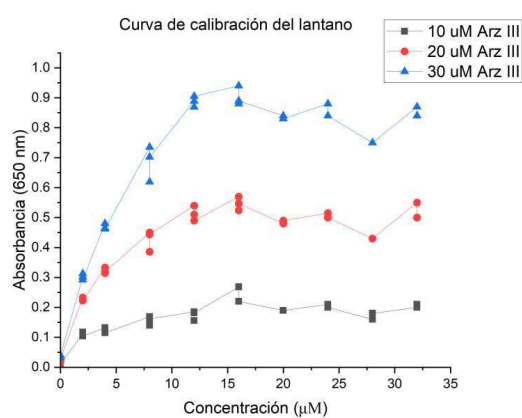


FIGURA 5. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL LANTANO CON
DESGLASE DE DATOS

Lantano con inóculo y sin inóculo, medición del agotamiento de lantano

Absorbancia (650 nm)			Concentración (μ M)
30 μ L MMS sin inóculo	30 μ L MMS cepa 23	30 μ L MMS cepa Mx	
0.302	0.04	0.045	5
0.302	0.04	0.052	5
0.302	0.041	0.042	5
0.685	0.057	0.034	10
0.705	0.047	0.039	10
0.68	0.063	0.034	10
0.834	0.05	0.041	20
0.844	0.05	0.046	20
0.85	0.045	0.042	20
0.92	0.055	0.038	30
0.935	0.037	0.058	30
0.946	0.044	0.061	30
0.821	0.032	0.074	50
0.816	0.051	0.067	50
0.8	0.036	0.065	50

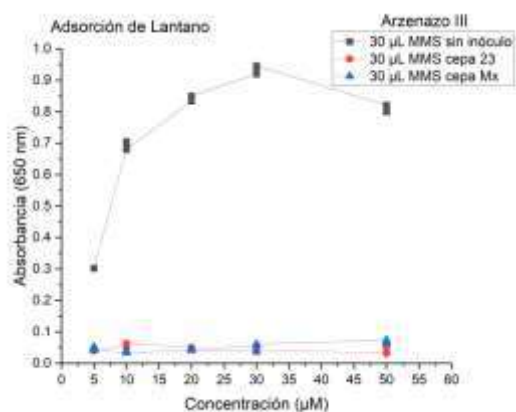


FIGURA 6. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL CERIO CON
DESGLOSE DE DATOS

Curva de calibración del cerio y el agotamiento de este elemento en medio con inóculo

Absorbancia (650)			Concentración (μM)
30 μL MMS sin inóculo	30 μL MMS cepa 23	30 μL MMS cepa Mx	
0.128	0.068	0.056	5
0.128	0.073	0.052	5
0.128	0.056	0.041	5
0.193	0.065	0.054	10
0.193	0.059	0.041	10
0.193	0.068	0.049	10
0.345	0.038	0.045	20
0.345	0.089	0.057	20
0.345	0.061	0.038	20
0.43	0.067	0.031	30
0.43	0.067	0.054	30
0.43	0.075	0.054	30
0.49	0.068	0.048	50
0.49	0.05	0.047	50
0.49	0.065	0.059	50

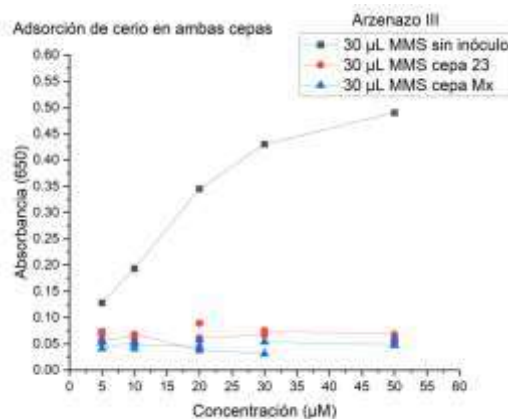


FIGURA 7. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL NEODIMIO CON DESGLOSE DE DATOS

Curva de calibración del neodimio y el agotamiento de este elemento en medio con inóculo

Absorbancia (650 nm)			Concentración (μM)
30 μL MMS sin inóculo	30 μL MMS cepa 23	30 μL MMS cepa Mx	
0.146	0.059	0.026	5
0.147	0.042	0.03	5
0.146	0.029	0.012	5
0.241	0.039	0.032	10
0.24	0.066	0.011	10
0.24	0.026	0.032	10
0.325	0.039	0.043	15
0.33	0.052	0.033	15
0.327	0.042	0.031	15
0.42	0.036	0.034	20
0.419	0.046	0.034	20
0.42	0.028	0.034	20
0.464	0.036	0.033	30
0.465	0.051	0.038	30
0.465	0.036	0.031	30

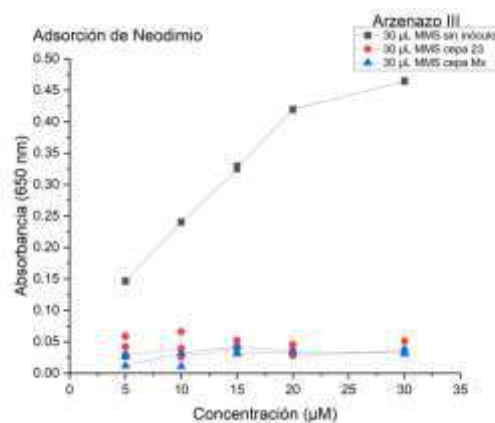


FIGURA 8. CURVA DE CALIBRACIÓN Y AGOTAMIENTO DEL PRASEODIMIO CON DESGLOSE DE DATOS

Curva de calibración del praseodimio y el agotamiento de este elemento en medio con inóculo

Absorbancia (650 nm)			Concentración (μM)
30 μL MMS sin inóculo	30 μL MMS cepa 23	30 μL MMS cepa Mx	
0.084	0.052	0.056	5
0.08	0.06	0.061	5
0.083	0.05	0.05	5
0.087	0.055	0.032	10
0.08	0.048	0.053	10
0.085	0.078	0.051	10
0.19	0.07	0.068	20
0.195	0.047	0.067	20
0.196	0.066	0.067	20
0.277	0.085	0.069	30
0.28	0.081	0.067	30
0.275	0.083	0.074	30
0.37	0.064	0.052	50
0.375	0.102	0.051	50
0.377	0.061	0.05	50

