

COMPORTAMIENTO DE BIOTEJIDO EN PRESENCIA DE CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO

Jiménez Avalos Iveth Monserrat (1), Córdova-Fraga Teodoro (2)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, DCNE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico:
[jivethmas@gmail.com]

2 [Departamento de Ingeniería Física, DCI, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico:
[theo@fisica.ugto.mx]

Resumen

Diariamente los seres vivos están en contacto con campos electromagnéticos muy bajos, dado que algunos estudios aseguran que esto es benéfico, se han ideado experimentos con instrumentos que permitan la exposición controlada para observar sus consecuencias. Existen muchos instrumentos que lo permiten, uno de ellos son las bobinas de Helmholtz que en conjunción con programas computacionales permite que la exposición a los campos magnéticos sea controlada y específica. Algunas bacterias han sido objeto de estudio para determinar las consecuencias de estas exposiciones, una de ellas son las PPFMs, este grupo son capaces de producir ciertos sustratos de interés biotecnológico, es por eso que la optimización en la producción de este sustrato es de gran importancia. Esto ha logrado probando la exposición a diversas frecuencias (60 Hz, 260 Hz, 460 Hz, 760 Hz) por 30 minutos cada una. Se obtuvo un incremento en la proliferación celular, con esto se pudo concluir que la frecuencia que le genera un mayor beneficio a la bacteria es la frecuencia de 260 Hz. El biopolímero producido, se analizó mediante un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier, observando un cambio en la estructura del mismo, debido a que el sustrato fue consumido por las bacterias.

Abstract

Daily living beings are in contact with very low electromagnetic fields, since some studies say that this is beneficial, experiments have been devised instruments that allow controlled exposure to observe its consequences. There are many tools that allow it, one of them are Helmholtz coils in conjunction with computer programs it allows exposure to magnetic fields is controlled and specific. Some bacteria have been studied to determine the consequences of these exposures, one of them are PPFMs this group are capable of producing certain substrates of biotechnological interest, it is why the optimization in the production of this substrate is of great importance. This has been achieved exposure testing at various frequencies (60 Hz, 260 Hz, 460 Hz, 760 Hz) for 30 minutes each. an increase in cell proliferation was obtained with this it was concluded that the frequency that generates a greater benefit to the bacteria is the frequency of 260 Hz. The biopolymer produced was analyzed by an infrared spectrophotometer Transform Fourier, observing a change in its structure, because the substrate was consumed by bacteria.

Palabras Clave

Campo magnético; *Metylobacterium spp*; PHB; Helmholtz.

INTRODUCCIÓN

Producción de PHB por PPFMs inducidos por un campo magnético externo

Campo magnético

Los seres vivos están expuestos diariamente a campos magnéticos y electromagnéticos muy bajos, muchos de estos son generados por las fuentes ambientales y el hogar. Algunos estudios defienden que esta exposición trae consecuencias negativas para los seres vivos otros mantienen su postura que esta genera cambios positivos. En consecuencia algunos estudios han tenido por objetivo el establecimiento de una relación entre la exposición al campo y las consecuencias biológicas posibles en los seres vivos. Una de las tantas consecuencias de la exposición a los campos magnéticos es el crecimiento y la proliferación celular. [1-3]. Algunas terapias establecidas ayudan en la proliferación de las células en heridas, ya que la exposición a los campos produce una migración de las células a las capas externa de la piel. Para que esto sea posible la exposición al campo magnético debe ser de una controlada, esto se logra con la ayuda de varios instrumentos como los Tomógrafos, muy utilizados en la medicina, algunos otros usados en la investigación o en la docencia. [4-7]

Unos de estos instrumentos son las bobinas de Helmholtz se usan principalmente para generar campos magnéticos pequeños pero uniformes que pueden ser controlados mediante el uso de programas computacionales. Este campo uniforme se genera gracias a las propiedades físicas de las mismas bobinas, generando con el tiempo diferentes usos de estas, uno de los tantos usos es la aplicación de campos magnéticos a diferentes frecuencias en muestras de diferente índole (brotejido, cultivos bacterianos, etc.). [8,9]

Una de las muestras que han llamado la atención debido a su versatilidad son las muestras de cultivos bacterianos ya que estas pueden ser modificadas o sometidas a diversos procesos físicos que le proporcionarían ciertas características.

PPFM's

Uno de estos que ha tenido impacto en la actualidad son el grupo de bacterias conocidas como metilotroficas facultativas de pigmentación rosada o PPFMs por sus siglas en inglés o *Metylobacterium spp*, este grupo de microorganismos son capaces de crecer en un ambiente rico en metanol, metilamina, formaldehído, así como en presencia de alcoholes que contengan 2, 3, o 4 carbonos en su estructura. La practicidad de esta bacteria recae en su capacidad de convertir algunos sustratos no útiles en productos útiles para otros organismos, la biosíntesis de aminoácidos, la producción de vitaminas y hormonas, ayudando en la germinación de la semilla y el desarrollo de la planta; en la actualidad se tiene conocimiento que este tipo de bacterias son capaces de generar una respuesta en la planta contra algunos patógenos de las mismas.[10-12]

La *Metylobacterium extorquens* es una de lo más usadas como modelos de estudio en los últimos 50 años debido a que el genoma de las cepas de este microorganismo está completamente identificado y se tiene una noción acerca de las enzimas capaces de producir compuestos de gran utilidad. [13-15]

Uno de los sustratos sintetizados por la *Metylobacterium extorquens* y por otras bacterias es el poli- β -hidroxibutirato o PHB, este es un componente intracelular que proporciona una reserva de carbono en varios tipos de microorganismos. El PHB es un compuesto termoplástico biodegradable y biocompatible que tiene propiedades físicas muy similares al polipropileno. Tiene muchas aplicaciones en la medicina, la industria y la agricultura debido a su biodegradabilidad. Pero debido a sus altos costos de producción aun es preferible el uso de plásticos derivados del petróleo por sobre el PHB. [16-20]

Es por eso que se busca una forma de obtención de este biopolímero a partir de cepas de *Metylobacterium extorquens*, cultivadas en un medio mineral y metanol como sustrato, haciendo incidir campo magnético mediante el uso de bobinas de Helmholtz, observando el crecimiento y la producción del PHB a diferentes frecuencias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento del Microorganismo

Se utilizó una cepa pura de *Metylobacterium extorquens*, que se hizo crecer en 300 mL de medio mineral compuesto por: K_2HPO_4 0.165 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.16 g/L, Extracto de Levadura 0.1 g/L, NaCl 0.096 g/L, Cysteina HCl 0.05 g/L, $CaCl_2$ 0.0096 g/L, $MgSO_4$ 0.0096 g/L, metanol 0.5 % v/v, a 45 °C a 60 rpm, posteriormente se prepararon 15 matraces con 80 mL de medio mineral con 10 % de inóculo de la bacteria contenidos en un matraz Erlenmeyer, con los siguientes componentes: $(NH_4)_2SO_4$ 1.75 g/L; K_2HPO_4 0.68 g/L; Na_2HPO_4 7H₂O 4.69 g/L; $MgSO_4$ 7H₂O 0.1 g/L; $FeSO_4$ 7H₂O 20 mg/L; $CaCl_2$ 2H₂O 20 mg/L; $MnSO_4$ H₂O 3.1 mg/L; $ZnSO_4$ 7H₂O 1.5 mg/L; Na_2MoO_4 2H₂O 0.04 mg/L; $CuSO_4$ 5H₂O 0.04 mg/L; $CoCl_2$ 6H₂O 0.6 mg/L; H_3BO_3 0.2 mg/L y 0.6% (v/v) metanol, a 22°C.

Irradiación del campo

Se indujo el campo en el microorganismo a las 20 y a las 44 horas de haber sido inculado en diferentes frecuencias, 60 Hz, 260 Hz, 460 Hz y 760 Hz, en ciclos de 3 minutos dejando 3 minutos sin irradiar para evitar que la bacteria se acostumbrara, completando un tiempo total de irradiación de 30 minutos. Esta irradiación se llevó a cabo gracias a las Bobinas de Helmholtz (18 cm de diámetro interno, 23 cm de diámetro externo, 14 vueltas con 7 capas en cada bobina) y el programa Nationals Instruments LabVIEW 2009.

Métodos analíticos

Se filtró cada una de las muestras con papel filtro dejándolo secar a 40 °C por 24 horas. Se realizó un análisis de espectroscopia infrarroja en un Thermo scientific modelo Nicolet iS5 con transformada de Fourier.

A los datos que fueron obtenidos de los pesos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rango múltiple con el método de Dunnett para determinar si había cambios de crecimiento en las muestras y si lo había cual era la mejor frecuencia utilizada, estos se realizaron en Microsoft Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El crecimiento de la bacteria se dio en un ambiente favorable ya que se necesitó mantener el ambiente a una temperatura de 22.4°C, presento un crecimiento en el medio de tal forma que se adhería a las paredes del matraz a lo que se le dio la denominación de "tela", se obtuvieron dos "telas" de diferente color, una de ellas de color amarillo resultado de la producción del biopolímero (PHB) por la bacteria y la otra de color rosa, resultado del crecimiento la bacteria (Figura 1). A las 72 horas después de haber sido inducido el campo, se filtró el contenido de cada uno de los matraces, se dejó secando en estufa a 40 °C por 24 horas. Obteniendo ambas "telas" sin humedad (Figura 2).



Figura 1. PHB ("tela" color amarillo) y crecimiento bacteriano ("tela" color rosa).



Figura 2. Muestra deshidratada en horno.

Después de esto se pesó el papel filtro y por diferencias del papel filtro con muestra y sin muestra, obteniendo como resultado un incremento en el crecimiento bacteriano de las

muestras a las que se les hizo incidir los diferentes campos. En comparación con el control, como se muestra en la Figura 3.

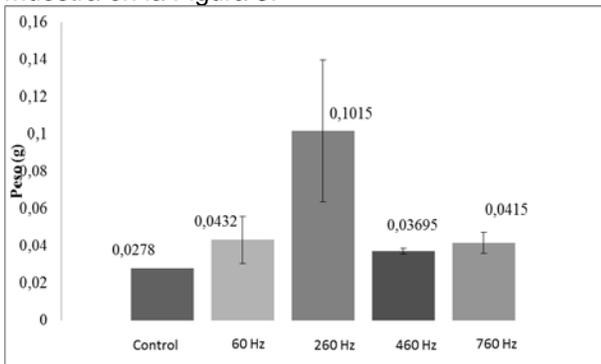


Figura 3. Pesos promedio del crecimiento bacteriano, filtrado a las 116 horas después de haber sido inoculado el medio.

Después del pesado de las muestras, se realizó un espectro IR de la “tela” de color amarillo de cada una de las muestras, se observa un cambio en la estructura del biopolímero producido por la bacteria (Figura 4), esto le pudo provocar un cambio morfológico a la bacteria o debido al crecimiento observado en los cultivos.

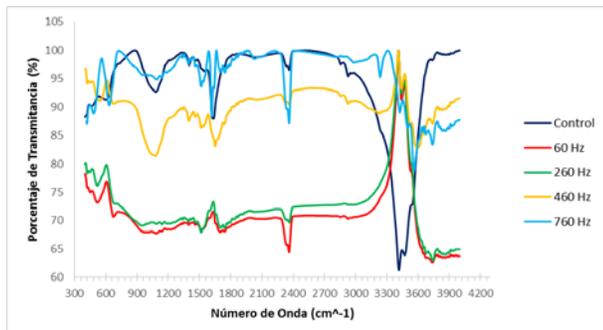


Figura 4. Espectros de IR de las muestras que fueron inducidas al campo, se pueden observar diferencias notables entre los IR de cada una de las frecuencias del campo magnético.

Mediante el análisis de datos con un Análisis de Varianza de un factor (ANOVA), se hizo la comparación entre el valor de F calculado y el valor crítico para F. El F calculado al ser mayor que el F crítico determina que si hay un cambio favorable en el crecimiento bacteriano. Se comparó el cultivo control con los cultivos que fueron sometidos al campo magnético y se determinó que todas las frecuencias son favorables, pero al analizar los pesos promedio

que se muestran en la Figura 4 se determinó que en la frecuencia que se encontraba un cambio más drástico de peso fue la muestra que fue sometida a la frecuencia de 260 Hz.

CONCLUSIONES

Se logró observar el comportamiento de ciertas bacterias frente al campo magnético externo, esto en diferentes frecuencias, en este caso la exposición al campo provocó un incremento en la proliferación celular, además de un cambio en la estructura de los PHB. Se determinó que todas las frecuencias favorecieron el crecimiento bacteriano, pero la que presentó un mayor cambio fue la frecuencia de 260 Hz.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la División de Ciencias e Ingenierías en especial al Dr. Teodoro Córdova Fraga por haberme dado la oportunidad de trabajar en su proyecto. En especial al Dr. Carlos Eduardo Molina Guerrero, por haberme brindado su apoyo en la realización de este proyecto. A mi familia por estar a mi lado en los buenos y malos momentos.

REFERENCIAS

- [1]. Balcavage, W. X., Alvager, T., Swez, J., Goff, C. W., Fox, M., Abdullyava, S. & King, M. W. (1996). A Mechanism for Action of Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields on Biological Systems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222; 374-378.
- [2]. Panagopoulos, D. J., Messini, N., Karabarbounis, A., Phillipetis, A. L. & Margaritis, L. H. (2000). A Mechanisma for Action of Oscillating Electric Fields on Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272; 634-640.
- [3]. Goodman, R., Chizmadzev, Y. & Shirley-Henderson, A. (1993). Electromagnetic Fields and Cells. *Journal of Biochemistry*, 51; 436-441.
- [4]. Cordova-Fraga, T., Espinoza García, A. A., Barbosa Sabanero, G., Pérez Olivas, H. A., Rosas Padilla, E. F., Martínez-Espinosa, J.C. & Bernal Alvarado, J.J. (2014). Increasing survival study of kidney HEK-293T cells in magnetic field vortices and nano-fluid. *International Journal of Engineering and Innovative Technology (IJEIT)*, 4 (1); 222-225.

- [5]. Funk, R., Mosees, T. & Özkucur, N. (2009). Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 43; 177-264.
- [6]. Potenza, L., Ubaldi, L., De Sanctis, R., De Bellis, R., Cucchiari, L. & Dachà, M. (2004). Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 561; 53–62.
- [7]. Strašák, L., Vetterl, V. & Šmarda, J. (2002). Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry*. 55; 161-164.
- [8]. Bronaugh, E. L. (1995). Helmholtz Coils for Calibration of Probes and Sensors: Limits of Magnetic Field Accuracy and Uniformity. *IEEE Transactions on Magnetics*, 14; 72-75.
- [9]. Trout, S., (1988). Use of Helmholtz coils for magnetic measurements. *IEEE Transactions on Magnetics*, 24 (4); 2108-2111.
- [10]. Knani, M., Corpe, W. A. & Rohmer, M. (1994). Bacterial hopanoids from pink-pigmented facultative methylotrophs (PPFMs) and from green plant surfaces. *Microbiology*, 140; 2755-2759.
- [11]. Mokhtari-Hosseini, Z. B., Vasheghani-Farahani, E., Heidarzadeh-Vazifekhoran, A., Abbas Shojaosadati, S., Karimzadeh, R. & Khosravi Darani, K. (2009). Statistical media optimization for growth and PHB production for methanol by methylotrophic bacterium. *Bioresource Technology*, 100; 2436-2443.
- [12]. Chanprame, S., Todd, J. J. & Witholdm, J. M. (1996). Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissue cultures. *Plant Cell Reports*, 16; 222-225.
- [13]. Ochsner, A. M., Sonntag, F., Buchhaupt, M., Schrader, J. & Vorholt, J. A. (2015). *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99; 517-534.
- [14]. Jayashree, S., Lalitha, R., Vadivukkarasi, P., Kato, Y. & Seshadri, S. (2011). Cellulase Production by Pink Pigmented Facultative Methylotrophic Strains (PPFMs). *Appl Biochem Biotechnol* 164:666–680.
- [15]. Bourque, D., Pomerleau, Y. & Groleau, D. (1995). High-cell-density production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: Production of high-molecular-mass PHB. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44; 367-376.
- [16]. Zinn, M., Witholt, B. & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advance Drug Delivery Reviews*, 53; 5-21.
- [17]. Braunegg, G., Sonnleimer, B. & Lafferty, R.M. (1978). A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly-β-hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6; 29-37.
- [18]. Mokhtari-Hosseini, Z. B., Vasheghani-Farahani, E., Heidarzadeh-Vazifekhorana, A., Shojaosadati, S. A., Karimzadeh, R. & Khosravi Darani, K. (2009). Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium. *Bioresource Technology* 100 (2009): 2436–2443.
- [19]. Mokhtari-Hosseini, Z. B., Vasheghani-Farahani, E., Shojaosadati, S. A., Karimzadeh, R. & Heidarzadeh-Vazifekhorana, A. (2009). Effect of feed composition on PHB production from methanol by HCD of *Methylobacterium extorquens* (DSMZ 1340). *J Chem Technol Biotechnol*, 84; 1136-1139.
- [20]. Reusch, R. N. & Sadoff, H. L. (1988). Putative structure and functions of poly-β-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasmamembranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85; 1476-1480.