

Tesis Doctoral

Estudio de las interacciones entre metales de relevancia ambiental y componentes celulares bacterianos, involucrados en procesos de biotratamiento de aguas residuales

Ferreira, María Laura

2016

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ferreira, María Laura. (2016). Estudio de las interacciones entre metales de relevancia ambiental y componentes celulares bacterianos, involucrados en procesos de biotratamiento de aguas residuales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5979_Ferreira

Cita tipo Chicago:

Ferreira, María Laura. "Estudio de las interacciones entre metales de relevancia ambiental y componentes celulares bacterianos, involucrados en procesos de biotratamiento de aguas residuales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5979_Ferreira

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio de las interacciones entre metales de relevancia ambiental y componentes celulares bacterianos, involucrados en procesos de biotratamiento de aguas residuales

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Lic. María Laura Ferreira

Director de Tesis: Dra. Diana Lía Vullo
Dra. Silvana Ramírez
Consejera de Estudios: Dra. Nancy Irene López.
Lugar de trabajo: Instituto de Ciencias, Área de Química,
Universidad Nacional de General Sarmiento.
Fecha: 28 de Marzo, 2016.

RESUMEN

El tratamiento de ambientes contaminados mediante la utilización de métodos químicos requiere una cierta especificidad que normalmente se traduce en elevados costos. Las estrategias de supervivencia que los microorganismos desarrollan en los ecosistemas en presencia de metales son las herramientas con las que se cuenta para diseñar un biotratamiento adecuado. *Pseudomonas veronii* 2E es una bacteria autóctona del río Reconquista (Buenos Aires, Área Metropolitana) que produce sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y sideróforos (SPs) con potencial capacidad de interactuar con metales. Se estudió la producción, aislación, purificación y caracterización del EPS soluble (no unido a la célula) secretado por *P.veronii* 2E. Los mejores resultados para su producción se encontraron en un medio líquido M9, usando glicerol como fuente de carbono. Estudios espectrofotométricos (UV-visible, IR) y titulaciones potenciométricas mostraron que este biopolímero estaba formado principalmente por exopolisacáridos, ADN extracelular, lipopolisacáridos (LPSs) y proteínas, siendo las fracciones mayoritarias los exopolisacáridos y el LPS. Se estudió la habilidad de los productos secretados de interactuar con Cd(II) por voltamperometría de preconcentración electrolítica (VPE), caracterizando a las diferentes fracciones en términos de la concentración de ligandos y la constante condicional de formación de los complejos. Finalmente, se exploró el potencial uso en la eliminación de Cd(II) en aguas residuales.

Los SPs son moléculas orgánicas de baja masa molecular que son secretadas por microorganismos en condiciones de escasez de hierro, con el objeto de hacerlo biodisponible. Nuestros resultados muestran que *P. veronii* 2E, tiene capacidad de producir SPs en ausencia de Fe(III) y en presencia de cationes como Zn(II), Cd(II), Cu(II) y Cr(III) en medio líquido M9 con succinato como fuente de carbono. Los SPs producidos por *P.veronii* 2E poseen grupos hidroxamato y catecol capaces de interactuar con Zn(II), Ni(II) y Cd(II). Se determinó la capacidad complejante frente a Cd(II) utilizando VPE, observando una sola familia de ligandos moderados. Por otro lado, los resultados por LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) muestran que los SPs producidos pertenecen a la familia de las pioverdinas. También se exploró la utilización de SPs en la desorción de Cd(II) retenido en diatomitas.

Palabras clave: sustancias poliméricas extracelulares, sideróforos, interacción metal-microorganismo, biorremediación, cadmio.

ABSTRACT

“Study of the interactions between cellular components and environmentally relevant metals, with application to wastewater biotreatment”.

The treatment of polluted environments using chemical methods requires some highly specialized techniques that usually lead to high costs of the global process. The survival strategies that microorganisms develop in metal polluted ecosystems are the tools available to design an adequate waste biotreatment. *Pseudomonas veronii* 2E is an indigenous bacterium from the Reconquista River (Buenos Aires Metropolitan Area) that produces siderophores (SPs) and extracellular polymeric substances (EPS) with potential metal-binding ability. This fact is particularly interesting since EPS and SP could be used for the removal of environmentally relevant metals. The production, isolation, purification and characterization of soluble EPS (not bound to cell) secreted by *P.veronii* 2E were studied. Optimal production results were obtained using minimal medium M9 with glycerol as carbon source. Spectrophotometric (UV-visible, IR) and potentiometric titration studies showed that this biopolymer consisted mainly of exopolysaccharides, extracellular DNA, lipopolysaccharides (LPSs) and protein, being exopolysaccharides and LPS the major components. The ability of secreted products to interact with Cd(II) was studied by anodic stripping voltammetry (ASV), and it was able to characterize the different fractions in terms of the concentration of ligands and conditional formation constant of the complex. Finally the potential use in removing Cd(II) from wastewaters was explored.

SP are organic molecules with low molecular weight that are secreted by microorganisms under iron-limited conditions, to make the cation bioavailable. Our results show that *P. veronii* 2E is capable of producing SPs in absence of Fe(III) and in presence of metals such as Zn(II), Cd(II) and Cr(III) in minimal medium M9 using succinate as carbon source. The SP produced by *P.veronii* 2E contains catechol and hydroxamate groups able to interact with Zn(II), Ni(II) and Cd(II). Determination of the complexing capacity of SP with Cd(II) was studied using ASV: one family of moderate strength ligands were observed. The LC-MS (Liquid Chromatography -Mass Spectrometry) results showed that the produced SPs belong to the family of pioverdines. Cd(II) desorption retained in diatomite mediated by SPs was also explored.

Keywords: extracellular polymeric substances, metal-microorganism interaction, siderophores, bioremediation, cadmium.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Ponencias presentadas en Reuniones Científicas con referato

-Presentación póster, “Caracterización del exopolisacárido de *Pseudomonas veronii* 2E”, Gustavo J. Cavallero, Adriana C. Casabuono, Maria Ferreira, Diana Vullo y Alicia S. Couto. XX Simposio de Química Orgánica (XX SINAQO), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 2015.

-Presentación póster, “New bacterial compounds with tensioactive properties and biotechnological applications”, Maria Ferreira, M.R. Barrionuevo, Silvana Ramirez, Diana Vullo. XI Congreso Argentino de Microbiología General, Córdoba, Argentina, 2015.

-Presentación póster, “Chemical characterization of *Pseudomonas veronii* 2E soluble exopolymer as Cd(II) ligand for the biotreatment of electroplating wastes”, Maria Ferreira, Adriana Casabuono, Alicia Couto, Silvana Ramirez, Diana Vullo. International Symposium on Microbial Ecology, ISME15, Seoul, Corea del Sur, 2014.

-Presentación póster, “Interactions between metals and exopolymers or siderophores produced by *Pseudomonas veronii* 2E”, Maria Ferreira, Adriana Casabuono, Alicia Couto, Silvana Ramirez, Diana Vullo. X Congreso Argentino de Microbiología General, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 2014.

-Presentación póster, “Exploiting *Pseudomonas veronii* 2E for environmental biotechnologies”, I.C. Lazzarini Behrmann, M.L. Ferreira, M.R. Barrionuevo, M. J. Alessandrello, S.A.M. Ramirez, D.L. Vullo. 114th General Meeting ASM 2014, Boston, EE.UU, 2014.

-Presentación póster, “Characterization of the extracellular polymeric substances produced by *Pseudomonas veronii* 2E”, A.C. Casabuono, M.L. Ferreira, S. Stacchiotti, D. Vullo, A.S. Couto. GLYCOAR 2014, Buenos Aires, Argentina, 2014.

-Disertación oral, “Characterization of EPS in *Pseudomonas veronii* 2E applicable in wastewater biotreatments”, Maria Laura Ferreira, Silvana A. Ramirez, Diana L. Vullo, IX Congreso Argentino de Microbiología General, Rosario, Argentina, 2013.

-Presentación póster, “Autochthonous *Pseudomonas* as potential tools for metal and pesticide bioremediation”, M. Alessandrello, M. R. Barrionuevo, M. L. Ferreira, G. Querejeta, J. M. Montserrat, S.A.M. Ramirez, D. L. Vullo. 113th General Meeting, ASM 2013, Colorado, EE.UU, 2013.

-Presentación póster, “Optimization of EPS and siderophore production in *Pseudomonas veronii* 2E for the application wastewater biotreatments”, Maria Laura Ferreira, Silvana A. Ramirez, Diana L. Vullo 4th International Symposium on Microbial Ecology, ISME14, Copenague, Dinamarca, 2012.

-Disertación oral, “*Pseudomonas veronii* 2E siderophores: production and interaction with Ni(II), Zn(II), Cu(II) and Cd(II) for the application in wastewater biotreatments” Maria Laura Ferreira, Silvana A. Ramirez, Diana L. Vullo, VIII Congreso Argentino de Microbiología General, Mar del Plata, Argentina, 2012.

Colaboración en capítulos de libros

Cápítulo: Towards Understanding the Influence of Cadmium on Microbial Behavior.

Autores: María L. Ferreira, Irene C. Lazzarini Behrmann, Helena M. Ceretti, Anita Zalts, Diana L. Vullo y Silvana A Ramirez.

Libro: "Cadmium: Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental Effects"

In Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-62808-727-7. Pág: 151-170.

Publicaciones en revistas científicas

-“Estrategias bacterianas de supervivencia como herramientas en Biotecnología Ambiental”. Irene C. Lazzarini Behrmann*, Maria Laura Ferreira*, Mauricio J. Alessandrello*, Silvana Ramirez, Diana Vullo, Química Viva,. 2015 vol.14 n°1. p - . ISSN 1666-7948.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de General Sarmiento, por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las becas que me permitieron realizar mi trabajo de investigación doctoral.

A mis directoras de Tesis: Diana y Silvana, por el estímulo permanente y por confiar en mí para el trabajo doctoral. Me siento agradecida por haber tenido esta valiosa oportunidad de crecer profesionalmente.

A la Dra. Alicia Couto, Dra. Adriana Casabuono y al Lic. Gustavo Cavallero, por la ayuda en la caracterización del EPS.

Al Dr. Esteban Gerbino, por la ayuda en los experimentos de FT-IR.

A la Dra. Nancy López, por su gran predisposición y soporte.

A los técnicos del laboratorio: Andrea, Gaby, Uriel y Lau, por estar siempre a disposición de los pedidos de reactivos y materiales de laboratorio.

A Helen por la ayuda en los ensayos de electroquímica y por estar siempre dispuesta a darme una mano.

A mis queridos compañeros de trabajo del área de química de la UNGS: Maca, Vane, Sole, Pedro, Guido, Giselle, Erica, Lau, Peque, Sosita, Ale, Ana, Javi y Belén, por hacer más divertidas las horas de trabajo en la oficina.

A Henry por su ayuda en cuestiones técnicas de laboratorio, y también desde lo personal por sus consejos.

A Ire, por su gran ayuda en el laboratorio, por aguantarme, por su apoyo incondicional y su amistad.

Al Dr. Mauricio, por enseñarme a cebar mates y por su infinita “paciencia”.

A Matías, por su incondicional ayuda en el laboratorio de microbiología y por todas las risas compartidas que hicieron más ameno el trabajo.

A mis amigos, la banda de Castelar, por entenderme y sobre todo por aguantarme.

A Juana por su fiel compañía durante todos estos años.

A Sol y Roly, que me mimaron y ayudaron siempre.

A mis cuñadas con quienes compartí risas y chismes.

A mi papás por todo el cariño, por estar siempre, por todo el apoyo que me brindaron y por enseñarme el valor del esfuerzo y de la educación.

A mis hermanos, que siempre estuvieron ahí y me hicieron el mejor regalo del mundo, mis sobrinos.

A mi compañero, mi amigo y mi amor, Raúl. Por el apoyo incondicional, por estar siempre, por entenderme y por hacer que la vida sea cada día más linda. Todo el esfuerzo está dedicado a vos.

TABLA DE CONTENIDOS

<i>Resumen</i>	<i>ii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>Producción científica</i>	<i>v</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>vii</i>

INTRODUCCIÓN GENERAL

<i>Metales en el medio ambiente</i>	<i>1</i>
<i>Legislación y regulación de descarga de efluentes industriales con contenido de Cr, Cu, Zn, Ni y Cd</i>	<i>5</i>
<i>Clasificación de iones metálicos y su toxicidad</i>	<i>8</i>
<i>Biotratamientos de efluentes con contenido de metales</i>	<i>11</i>
<i>Pseudomonas y su uso en la biotecnología</i>	<i>15</i>
<i>Pseudomonas veronii 2E: antecedentes</i>	<i>18</i>
OBJETIVOS GENERALES	22

CAPÍTULO I

“PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CON Cd(II) DE SUSTANCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS) SOLUBLES PRODUCIDAS POR *Pseudomonas veronii* 2E”

INTRODUCCIÓN	25
<i>Sustancias poliméricas extracelulares: definición</i>	<i>25</i>
<i>Composición</i>	<i>28</i>
Carbohidratos (exopolisacáridos)	31
Proteínas	33
ADN extracelular	34
Lípidos.....	35

<i>Funciones biológicas</i>	35
<i>EPS y sus aplicaciones en el medio ambiente</i>	38
Floculación	38
Deshidratación	39
Remoción de compuestos orgánicos: colorantes e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	39
Remoción de metales de relevancia ambiental.....	40
OBJETIVOS	46
RESUMEN	47
MATERIALES Y MÉTODOS	48
<i>Producción de EPS soluble</i>	48
Efecto de la fuente de carbono y de nitrógeno en la producción de EPS soluble	48
Efecto de la temperatura en la producción de EPS soluble.	49
<i>Extracción y purificación parcial de EPS soluble</i>	49
Purificación enzimática	51
Obtención de exopolisacáridos: tratamiento con Desoxicolato (DOC)	51
<i>Caracterización de la estructura química del EPS</i>	52
Métodos espectrofotométricos	52
Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) del material	55
Determinación de pKa de grupos funcionales con características ácido-base.....	56
Análisis por SDS-PAGE y DOC-PAGE.....	56
Análisis de la composición de exopolisacáridos	57
Caracterización del material como ligando de Cd(II).....	58
<i>Estudio de aplicaciones biotecnológicas del EPSpp</i>	62
Floculación	62
Remoción de colorantes: verde de malaquita.....	62
Remoción de Cd(II) en biorreactor de flujo continuo.....	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
<i>Producción de EPS soluble</i>	65
Efecto de la fuente de carbono, nitrógeno y temperatura.....	65
<i>Extracción y purificación parcial de EPS soluble</i>	70
<i>Caracterización de la estructura química del EPSpp</i>	71
Métodos espectrofotométricos	71
Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	73

Determinación de pKa de grupos funcionales con características ácido-base.....	76
Caracterización del EPSpp como ligando de Cd(II).....	78
<i>Enriquecimiento de la fracción polisacáridica</i>	85
Análisis por SDS-PAGE y DOC-PAGE.....	85
Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	88
Análisis de la composición de exopolisacáridos	89
<i>Caracterización de EPS enz, ExP y LPS como ligandos de Cd(II)</i>	92
EPSenz como ligando de Cd(II).....	92
ExP como ligando de Cd(II)	93
LPS como ligando de Cd(II).....	94
<i>Estudio de aplicaciones biotecnológicas del EPSpp</i>	96
Floculación y remoción de colorantes	97
Remoción de Cd(II) en biorreactor de flujo continuo.....	98
CONCLUSIONES.....	102

CAPÍTULO II

“EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN ESTRUCTURAL Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE SIDERÓFOROS PRODUCIDOS POR *Pseudomonas veronii* 2E”

INTRODUCCIÓN.....	104
<i>Importancia del hierro en microorganismos</i>	104
<i>Propiedades fisicoquímicas de los sideróforos</i>	106
Tipos de sideróforos	107
<i>Rol de los sideróforos en la naturaleza</i>	110
Solubilización de minerales sólidos	110
Ciclo Biogeoquímico del hierro en el océano	110
<i>Funciones biológicas de los sideróforos bacterianos</i>	111
<i>Aplicaciones biotecnológicas de los sideróforos microbianos en el medio ambiente</i>	114
Aumento del crecimiento vegetal y biocontrol de patógenos en plantas	114
Biocontrol de patógenos en peces	115
Taxonomía microbiana.....	115

Biosensores	116
Reprocesamiento de combustible nuclear.....	117
Blanqueamiento de pulpa de papel.....	117
Biorremediación de derrames de hidrocarburos derivados del petróleo	118
Biorremediación de metales	119
<i>Pioverdinas, principal grupo de sideróforos producidos por Pseudomonas</i>	<i>121</i>
OBJETIVOS.....	123
RESUMEN	124
MATERIALES Y MÉTODOS	125
<i>Estudio de la producción de sideróforos</i>	<i>125</i>
<i>Optimización en la producción de sideróforos.....</i>	<i>125</i>
Efecto de la temperatura	126
Efecto del pH.....	126
Efecto del tiempo de crecimiento bacteriano	126
<i>Detección y caracterización de sideróforos.....</i>	<i>127</i>
Agar-CAS	127
Ensayo CAS Líquido.....	128
Ensayo rápido en FeCl ₃	129
Espectro de absorción.....	129
<i>Determinación de grupos funcionales en los sideróforos producidos</i>	<i>130</i>
Detección de grupo catecol.....	130
Detección de grupo hidroxamato	132
<i>Estimulación o represión de la síntesis de sideróforos.....</i>	<i>134</i>
<i>Estudio de la interacción del sideróforo con Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ni(II) y Cr(III)</i>	<i>134</i>
<i>Caracterización del sideróforo como ligando de Cd(II).....</i>	<i>135</i>
<i>Purificación de sideróforos.....</i>	<i>136</i>
Purificación parcial	136
Extracción complejo sideróforo-Fe(III).....	136
Utilización de resinas	137
<i>Análisis de sideróforos por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....</i>	<i>137</i>
<i>Caracterización de sideróforos por LC-MS (Liquid chromatography -Mass Spectrometry).....</i>	<i>138</i>
<i>Estudio de aplicaciones biotecnológicas de los sideróforos</i>	<i>140</i>

Sorción de Cd(II) en diatomitas	140
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	141
<i>Estudio de la producción de sideróforos</i>	<i>141</i>
Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno.....	141
<i>Optimización en la producción de sideróforos.....</i>	<i>142</i>
Efecto de la temperatura y el pH.....	142
Efecto del tiempo de crecimiento bacteriano	146
<i>Detección y caracterización de sideróforos.....</i>	<i>147</i>
Estudio del espectro de absorción	147
Grupos funcionales.....	149
<i>Estimulación o represión de la síntesis de sideróforos.....</i>	<i>151</i>
<i>Estudio de la interacción del sideróforo con Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ni(II) y Cr(III)</i>	<i>154</i>
<i>Caracterización del sideróforo como ligando de Cd(II).....</i>	<i>155</i>
<i>Análisis de sideróforos por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....</i>	<i>157</i>
<i>Caracterización de sideróforos por LC-MS.....</i>	<i>160</i>
Elucidación estructural utilizando MS/MS	162
<i>Estudio de aplicaciones biotecnológicas de los sideróforos</i>	<i>163</i>
Sorción de Cd(II) en diatomitas	163
CONCLUSIONES.....	165
DISCUSIÓN FINAL	166
PROYECCIONES	172
ANEXO I: Composición Medios de Cultivo	175
ANEXO II: VPE-Fundamentos Electroquímicos	176
BIBLIOGRAFÍA.....	190

Abreviaturas

DO: densidad óptica a 600 nm.

Fig.: Figura

Ec: ecuación

MRAs: metales de relevancia ambiental.

EPS: conjunto de sustancias poliméricas extracelulares.

EPSpp: EPS parcialmente purificado.

EPSenz: EPS obtenido luego de tratamiento enzimático.

ExP: exopolisacárido.

LPS: lipopolisacárido.

UV: Ultravioleta.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

SP: sideróforo.

Pvd: pioverdina

INTRODUCCIÓN GENERAL



La contaminación por metales de origen natural o antropogénico se ha convertido en las últimas décadas en un tema de preocupación ambiental. Debido a que los metales persisten prácticamente de manera indefinida en el medio ambiente y no son degradables como los contaminantes orgánicos, estos pueden biomagnificarse y acumularse en la cadena alimentaria. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2025 la mitad de la población mundial vivirá en zonas con escasez de agua. Además, la demanda de agua para alimentar a la creciente población mundial y las necesidades de procesamientos industriales y agrícolas crece año a año. Por lo tanto, la remoción de metales de relevancia ambiental en aguas contaminadas y en efluentes residuales es importante para la protección del ambiente y de los seres vivos.

Industrias tales como galvanicas¹, mineras, productoras de energía nuclear, de fertilizantes y textiles, entre otras, producen efluentes² que contienen metales. Estos efluentes deben cumplir con las concentraciones máximas permitidas por la legislación vigente para su disposición final. Por tal motivo, las industrias utilizan tratamientos físicos y químicos para alcanzar dichas concentraciones, pero estos procesamientos suelen tener costos elevados debido a la especificidad requerida. En este contexto, la eliminación de metales utilizando tratamientos biológicos se presenta como una tecnología alternativa e innovadora más eficiente, de menores costos y amigable con el medio ambiente.

Metales en el medio ambiente

Los metales son ubicuos en el ambiente. Algunos son esenciales para los organismos, conocidos como oligoelementos o micronutrientes y son requeridos en pequeñas cantidades o cantidades traza por plantas y animales, siendo necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Ejemplos de este tipo de metales: K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo. Por otra parte, encontramos otros metales sin función

¹ La galvanoplastia es una técnica que consiste en la electrodeposición de un recubrimiento metálico sobre una superficie que puede ser o no metálica, con el fin de mejorar su resistencia a la corrosión, dureza, apariencia y conductividad eléctrica, o para cumplir fines decorativos

² Los efluentes residuales son las aguas y sólidos utilizados en los procesos industriales que por uno u otro medio se introducen en las cloacas y son transportadas en el sistema de alcantarillado.

biológica conocida. Dentro de este grupo se encuentran: Al, Ag, Cd, Sn, Au, Sr, Hg y Pb (Prasad y col., 2005). A pesar de que algunos metales tengan una función biológica específica, todos los elementos en concentraciones elevadas resultan tóxicos. Dentro de los más nocivos y de mayor preocupación en los últimos años se encuentran el Hg, el Pb, el Cd y el metaloide As^3 . La toxicidad de estos elementos genera gran preocupación en todo el mundo debido a su carga ambiental.

Cu

El Cu(II) es un elemento esencial en cantidades traza, y es un componente importante de una variedad de metaloenzimas. Tiene muchos usos industriales: se utiliza para fabricar tuberías, válvulas y accesorios de plomería, así como en aleaciones para otros usos y en revestimientos. En ocasiones se añade $CuSO_4 \cdot H_2O$ a las aguas superficiales para el control del crecimiento de algas. Las concentraciones de Cu en el agua de consumo varían mucho, y su origen más frecuente es la corrosión/erosión de las tuberías interiores, ya que en su mayoría están construidas con aleaciones de base Cu (OMS, 2008).

Cr

El Cr(III) es un nutriente esencial requerido en concentraciones traza para el correcto funcionamiento del metabolismo de azúcares y grasas, mientras que el Cr(VI) es conocido por ser carcinógeno. A pesar de que el Cr(III) no se le ha asociado efectos tóxicos, esta especie puede oxidarse a Cr(VI), en especial en presencia de óxidos de Mn(IV) (Zhitkovich, 2011). Debido a que este metal soporta altas temperaturas y posee resistencia a la corrosión, se lo utiliza ampliamente como elemento de aleación en las tuberías y válvulas de la industria petroquímica y de procesamiento químico (ICDACr, 2015). El 90% de este metal se utiliza en la industria de cromado de piezas. En la industria textil se utiliza el $K_2Cr_2O_7$ como fijador de colorantes y en la industria del cuero se utilizan sales de Cr(III) como agentes curtidores.

³ El arsénico no es un metal, si no un metaloide, pero debido a los efectos tóxicos semejantes a los otros metales de importancia ambiental se lo suele incorporar en dicho grupo. Es una de las diez sustancias químicas que la OMS considera más preocupantes para la salud pública (OMS, 2012).

Zn

El Zn es un oligoelemento que se encuentra en prácticamente todos los alimentos y en el agua potable en forma de sales o complejos orgánicos. Generalmente, la principal fuente de Zn en el consumo humano son los alimentos (legumbres, mariscos y frutos secos). Sólo la exposición a dosis muy elevadas tiene efectos tóxicos, por lo que la intoxicación aguda de Zn es un evento raro. Además de la intoxicación aguda, a largo plazo, la suplementación de altas dosis de Zn interfiere con la absorción de Cu. Por lo tanto, muchos de sus efectos tóxicos son, de hecho, debido a la deficiencia de Cu (Plum y col., 2010). Si bien este metal no tiene un gran impacto en la salud humana, si se lo considera peligroso para ciertos ecosistemas, como la vida acuática. La principal aplicación del Zn (cerca del 50% del consumo anual) es el galvanizado del acero, pero también se utiliza en menor medida en la industria automotriz y aeroespacial (AGA, 2016).

Ni

Al igual que el Zn, el Ni es un elemento esencial en cantidades traza. Se utiliza principalmente en la producción de acero inoxidable, de aleaciones (cuproníqueles), y en joyería. Este metal también se utiliza en galvanoplastia y como electrodo en baterías recargables. Los alimentos son la principal fuente de exposición a este metal en personas no fumadoras y no expuestas a este elemento por motivos laborales. La concentración de Ni en el agua de consumo es normalmente menor que $0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ motivo por el cual la ingesta de Ni por agua de consumo suele ser baja. No obstante, en zonas contaminadas la contribución podría ser significativa (OMS, 2008), y el Ni que liberan los grifos y accesorios podría elevar la concentración de este metal en el agua de consumo hasta valores cercanos a $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Cd

El Cd no es un elemento esencial y se encuentra en el séptimo lugar en la lista de prioridades de sustancias peligrosas (ATSDR, 2015). Está presente en la naturaleza como óxidos complejos, como sulfuros y como elemento de sustitución en los carbonatos de Zn, Pb y Cu. Se utiliza ampliamente en las industrias galvánicas, en soldaduras, como estabilizante en productos de PVC, en pigmentos, en varias aleaciones, como electrodo en baterías de Ni-Cd y en actividades metalúrgicas (Järup, 2003; Gautam y col., 2015; ICdA). En 2015 la producción primaria mundial de Cd fue de 24'200 Toneladas métricas, el valor

máximo registrado en los últimos 20 años, y representa un incremento del 35% respecto a la producción registrada en el año 2005 (USGS, 2016). La mayor parte de este elemento se extrae en China, Japón y la República de Corea, seguidos por Europa Central y Eurasia, América del Norte y Europa Occidental. Los productos que contienen este metal rara vez se reciclan.

A pesar la disminución y reemplazo de las baterías de Ni-Cd, las nuevas tecnologías que utilizan semiconductores de tipo *quantum dots*⁴, como televisores de LCD, ha aumentado masivamente. Es por eso que la Unión Europea ha emitido una restricción⁵ para eliminar el Cd para el año 2017 en la tecnología *quantum dots*.

Sin embargo, en el futuro la fabricación de celdas solares a partir de compuestos de Cd puede ser un mercado potencial para incrementar su consumo significativamente, y éste tipo de consumo aún no se encuentra regulado (USGS, 2016).

En la **Tabla 1** se muestra una lista de la abundancia de este metal en el medio ambiente.

Tabla 1 Concentraciones de Cd en el medio ambiente (adaptación de Cox, 1995)

Localización	Concentración
Corteza terrestre	0,01ppm (0,89 μM)
Agua de mar	
Superficie	0,001 ppb ($8,9 \times 10^{-6} \mu\text{M}$)
Profundidad	0,1 ppb ($8,9 \times 10^{-4} \mu\text{M}$)
Costas contaminadas	> 15 ppb (0,1 μM)
Agua dulce	
Zona minera	< 1ppb ($8,9 \times 10^{-3} \mu\text{M}$)
Contaminadas	100 – 700 ppb ($8,9 \times 10^2 \mu\text{M}$ - $6,2 \times 10^3 \mu\text{M}$)
Suelos	
Sin contaminar	0,35 ppm (3,1 μM)
Contaminados	>1000 ppm ($8,9 \times 10^3 \mu\text{M}$)

⁴ Son semiconductores fluorescentes con tamaño del orden de los nanómetros. Esta característica ha posibilitado su uso en diferentes campos (energía solar, medicina, catálisis química, etc.)

⁵ European Unión Directive 2011/65/EU.

Legislación y regulación de descarga de efluentes industriales con contenido de Cr, Cu, Zn, Ni y Cd.

En el mundo existen leyes que regulan la descarga y concentraciones máximas admisibles de metales en aguas de desechos (*cCFR* y la *EPA* en EE.UU; *PRTR* en España). En la Argentina, la Ley N°24051 de residuos peligrosos reglamenta la manipulación, transporte, tratamiento y disposición final de los metales en cualquiera de sus formas (aguas de desechos, sólidos contaminados, etc.). En el anexo II de dicha ley se establecen los niveles guía de calidad de agua de consumos humano y de ganado, de riego, como también para diferentes cuerpos de agua, en suelo y en atmósfera. Por otro lado, la Ley nacional N°26221, Artículo 122, Anexo B, regula las concentraciones máximas de metales que pueden ser vertidos a desagües cloacales. Para el caso del Cd, la Resolución 242/93 define las Normas para los vertidos de establecimientos industriales o especiales alcanzados por el Decreto 674/89 que contengan sustancias peligrosas de naturaleza ecotóxica.

En la **Tabla 2** se muestran las concentraciones máximas permitidas en el agua de consumo humano, de descarga cloacal, las concentraciones límite de descarga industriales en agua y suelo, y sus efectos en la salud humana.

Tabla 2: Concentraciones máximas admisibles para Cr, Cu, Zn, Ni y Cd en distintas aguas y breve descripción de efectos en la salud.¹ permitida en agua de consumo según Ley nacional N°24051, Anexo II; ² según Ley nacional N°26221, Artículo 122, Anexo B, en desagüe cloacal; Descargas industriales globales (x 1000 ton/año), (adaptación Nriagu, 1997).

Metal	Conc.máx consumo ¹ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Conc.máx descarga ² ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Efectos en la salud	Descarga en	
				ecosistema acuático ($\times 10^3 \text{ ton}\cdot\text{año}^{-1}$)	suelo ($\times 10^3 \text{ ton}\cdot\text{año}^{-1}$)
Cr_{total}	50	-	Daños en el sistema digestivo, riñón e hígado. El Cr(VI) es cancerígeno, el Cr(III) produce daños en el corazón.	143	900
Cr(III)		2			
Cr(VI)		0,2			
Cu_{total}	1000	-	Efectos sobre el aparato digestivo, daños en hígado y riñón, anorexia.	110	970
Zn_{total}	5000	-	Impacto negativo sobre el crecimiento, el desarrollo neuronal, y la inmunidad, y en casos graves letales.	240	1400
Ni_{total}	25	-	Desarrollo de cáncer de pulmón, de nariz, laringe y de próstata; daño renal. Dermatitis (por contacto dérmico), trastornos gastrointestinales	110	290
Cd_{total}	5	0,1	Daños renales, degeneración ósea, hígado y sangre. cardiovasculares, hipertensión, anemia.	9,1	22

En los procesos de la industria galvánica se generan efluentes enriquecidos principalmente en especies inorgánicas, que por sus características de toxicidad resultan nocivos para el ser humano y su entorno, por la presencia de metales de relevancia ambiental. Todos los metales nombrados en la **Tabla 2** se usan, en mayor o menor medida, en este tipo de industrias.

En la República Argentina, una de las zonas más afectadas son las cuencas asociadas al Área Metropolitana (Provincia de Buenos Aires) donde un aporte importante de la contaminación proviene de industrias galvánicas⁶. La actividad produce fundamentalmente efluentes líquidos con altas concentraciones de metales de relevancia ambiental en volúmenes relativamente pequeños, como también efluentes con cargas

⁶ Relevamiento realizado por el Comité Ejecutor Matanza Riachuelo 1998-2004.

contaminantes diluidas en grandes volúmenes; por otro lado, la generación de desechos sólidos o semisólidos es el principal problema en importancia después de los vertidos líquidos. El 90% de las industrias descargan los efluentes en las alcantarillas (una opción utilizada con frecuencia ya que los límites de descarga de sustancias son menos estrictos que los requeridos para cuerpos de agua). El restante 10% descarga directamente en los cuerpos de agua (40% a la Cuenca Matanza-Riachuelo, 49% a la Cuenca del Reconquista y 21% directamente al Río de la Plata). Cerca del 60% de los efluentes descargados poseen algún tipo de tratamiento, pero en muchos casos son inadecuados; el 40% restante no tiene ningún tipo de tratamiento previo a la descarga de los efluentes⁷, por lo que a menudo las descargas no cumplen con las normas vigentes.

Por otro lado en los últimos años, derivado de los avances en las industrias de tecnología y electrónica, se comenzaron a acumular desechos que se originan por el descarte de los dispositivos electrónicos cuando finaliza su vida útil. A esta clase de basura se la conoce como RAEEs (Residuos de Aparatos Eléctricos y Electrónicos) y contienen metales como Cd, Pb y Ni, además de Hg y plásticos bromados. Actualmente el 85% de estos residuos se disponen en rellenos sanitarios o basurales comunes sin ningún tipo de tratamiento, y según un informe de la Dirección de Residuos Peligrosos, perteneciente al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable, en 2008 los argentinos desecharon 2 Kg de RAEEs por habitante. Un informe del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) estimó que en 2012 se desecharon 7 Kg de RAEEs por habitante en la Ciudad de Buenos Aires, y 3 Kg de RAEEs por habitante en todo el país, lo que representa una tasa de crecimiento del 12,5% interanual entre 2008 y 2012 (INTI, 2012).

Por todo lo expuesto se evidencia que el diseño y la implementación de alternativas de tratamiento para reducir el impacto tóxico de las descargas urbanas e industriales resulta de importancia fundamental.

⁷Carsen, A.E. y Carlos Gómez. Localización e identificación de establecimientos industriales generadores de efluentes líquidos residuales, de actividades industriales y zonas geográficas críticas en la Ciudad de Buenos Aires y Partidos del Área Metropolitana para implementación de planes de reducción de la contaminación. FREPLATA/SAyDS, Diciembre 2005.

Clasificación de iones metálicos y su toxicidad

El término “metales pesados” se ha utilizado y se utiliza actualmente para clasificar a metales y metaloides que producen contaminación, con potencial tóxico y ecotóxico. Sin embargo, el término “Metal”, en el uso convencional, se refiere al elemento puro o una aleación de elementos metálicos; mientras que el término “pesado” se encuentra relacionado con la densidad de los elementos, comprendiendo a los elementos con una densidad específica entre 4,5 y 22,5. El valor de la densidad contribuye poco a la predicción de los efectos biológicos de los metales; según esta clasificación no serían considerados metales pesados ningún lantánido o actínido (Nieboer y Richardson, 1980), y la mayoría de ellos resultan altamente tóxicos (Lizon y Fritsch, 1999). Otros autores han formulado la definición de “metales pesados” en términos de peso o masa atómica relativa, o inclusive utilizando el número atómico (Duffus, 2002). De modo que, está claro que la clasificación de metales utilizando términos como “metales pesados”, no tienen ninguna base científica sólida.

Con el fin de reemplazar la terminología actual con un término para la evaluación de toxicidad o de los posibles efectos biológicos, *Nieboer y Richardson* (1980), y más recientemente un reporte técnico de la IUPAC (Duffus, 2002), definieron una clasificación basándose en la teoría de ácidos y bases de Lewis. Esta teoría tiene en cuenta la interacción de los cationes en términos de ácidos de Lewis, definidos como especies receptoras de pares de electrones. Además, la interacción de los iones metálicos con los seres vivos está dominada por sus características como ácidos, lo que determina la posibilidad de formar complejos.

En la **Tabla 3** se encuentra la clasificación de los iones metálicos como de Clase A, Clase B, o Intermedios, en función de su afinidad para diferentes ligandos. A partir de ella puede predecirse el comportamiento de los metales en la formación de complejos.

Tabla 3 Clasificación de iones metálicos y preferencia de ligandos según Nieboer y Richardson, 1980; Duffus, 2002. R representa un radical alquilo.

Clasificación de metal	Tipo de ligando
<p>Clase A: Ác. de Lewis (aceptores de electrones) de pequeño tamaño y baja polarizabilidad (o duros).</p> <p><u>Ejemplos:</u> Li, Be, Na, Mg, Al, K, Ca, Sc, Fe(III), Rb, Sr, Y, Cs, Ba, La, Hf, Fr, Ra, Ac</p>	<p>Ligandos “duros”, que contengan átomos de oxígeno donores. La interacción metal-ligando presenta un marcado carácter iónico.</p> <p><u>Ejemplos:</u> H_2O, F^-, O^{2-}, OH^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, ROSO_3^-, NO_3^-, HPO_4^{2-}, PO_4^{3-}, ROH, RCOO^-, $\text{C}=\text{O}$, ROR</p>
<p>Clase B: Ác. de Lewis (aceptores de electrones) de gran tamaño y alta polarizabilidad (blandos).</p> <p><u>Ejemplos:</u> Cu(I), Pd, Ag, Ir, Pt, Au, Hg, Bi, Pb(IV), Ti</p>	<p>Ligandos “blandos” o polarizables. La interacción metal-ligando presenta un carácter covalente.</p> <p><u>Ejemplos:</u> H^-, I^-, R^-, CN^-, CO, S^{2-}, RS^-, R_2S, R_3As.</p>
<p>Intermedios</p> <p><u>Ejemplo:</u> V(II), Cr, Mn, Fe(II), Co, Ni, Cu(II), Zn(II), Sn, Cd(II), Pb(II).</p>	<p>Ligandos “duros” o “blandos”.</p> <p><u>Ejemplos:</u> Cl^-, Br^-, NO_2^-, SO_3^{2-}, NH_3, N_2, RNH_2, $-\text{CO}-\text{N}-\text{R}$, O_2, O_2^-, O_2^{2-}</p>

El Ca(II) y el K(I) son macronutrientes esenciales y pertenecen a la Clase A, forman complejos de carácter mayormente iónico. Este tipo de interacción permite que el metal sea fácilmente movilizadado y por lo tanto resulta no tóxico. Los metales que pertenecen a la Clase B forman complejos de carácter mayormente covalente con grupos biológicos que poseen nitrógeno o azufre, formando uniones donde los iones metálicos no son fácilmente desplazados y quedan inmovilizados. Su acción se hace efectiva a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos.

Por otro lado, los iones de metales de Clase Intermedia, forman complejos estables con ligandos tanto “duros” como “blandos”. En esta última clasificación se encuentran la mayoría de los micronutrientes. Sin embargo, también se encuentran el Pb(II) y el Cd(II).

Según Nieboer y Richardson, los metales de Clase B, a pesar de su preferencia por los ligandos “blandos”, pueden en ocasiones reaccionar con ligandos “duros”, formando complejos estables. Estas mismas observaciones se mantienen para los metales Intermedios. Como consecuencia, esto podría explicar la toxicidad causada a las membranas celulares por los metales pertenecientes a estos grupos: los iones cuya relación Z^2/r (r el radio iónico

y Z es su carga) comparable a la del ion Ca(II) poseen gran afinidad por los ligandos de tipos fosfato, y esta similitud podría explicar en parte los efectos dañinos de esta clase de metales.

La clasificación anterior ayuda a comprender algunos aspectos tóxicos de los iones metálicos en el medio ambiente y en los seres vivos, pero el análisis de la toxicidad de un compuesto necesita tener en cuenta la biodisponibilidad de los metales en el sistema que se desea estudiar. El concepto de biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente bajo análisis; este determina la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre y su labilidad (*ver Anexo II: VPE- Fundamentos Electroquímicos*). En los cuerpos de agua, los cationes metálicos se encuentran como iones hidratados o formando complejos inorgánicos u orgánicos. Estos complejos a su vez son especies dinámicas que pueden disociarse y resorberse. En general si la interacción metal-ligando es muy intensa la especie no resultará biodisponible y su efecto tóxico será relativamente bajo, en cambio, el ion libre (hidratado) es la forma más tóxica en el ambiente acuático. Por lo tanto, el daño provocado por descarga de iones metálicos en un cuerpo de agua va a depender de su sorción a partículas suspendidas, a la sedimentación y coprecipitación, la hidrólisis y la formación de compuestos insolubles, y su acumulación o adsorción en la biota (Linnik, 2000).

Dado que el término metales tóxicos tampoco resulta adecuado, de aquí en adelante se utilizará la sigla MRA para referirse a un Metal de Relevancia Ambiental (MRAs en plural). Este término se utilizará para todos aquellos iones metálicos y especies metálicas que, independientemente de su clase, causan efectos dañinos al medio ambiente o a los seres vivos.

Biotratamientos de efluentes con contenido de metales

La contaminación ambiental causada por metales ha aumentado drásticamente desde el comienzo del período industrial debido a la descarga de sustancias a la atmósfera, el suelo y el agua.

En el caso particular del agua, pueden mencionarse diversos métodos convencionales utilizados para tratar los efluentes industriales cuando el contenido de metales sobrepasa los límites permitidos, tales como la precipitación o floculación de los iones metálicos, la sedimentación, la ósmosis reversa, la microfiltración por membrana, la electrodiálisis, la evaporación, el intercambio iónico, y la adsorción en carbono activado (Rajendran y col., 2003; Prasad y col., 2005). A pesar de la existencia de diferentes alternativas, muchas de estas técnicas se vuelven ineficientes cuando las concentraciones de iones metálicos son menores a $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ruchita y col., 2015). Por otro lado, algunos métodos poseen otras desventajas como los altos costos de inversión, operación y mantenimiento de instalaciones, la generación de gran cantidad de lodos con contenido de metal para su disposición final, la utilización de grandes cantidades de solventes, la baja selectividad, la baja capacidad de regeneración o reutilización de los iones metálicos en el proceso principal, etc. (O'Connell y col., 2008).

Durante las últimas décadas, la comunidad científica se ha enfocado en el desarrollo de tecnologías de menor costo y más amigables con el ambiente para el tratamiento de los efluentes. Los métodos de fotocatalisis, la utilización de nanomateriales, la fitorremediación asistida por microorganismos y la sorción sobre adsorbentes de bajo costo son algunos ejemplos de métodos desarrollados con éxito (O'Connell y col., 2008; Wang y Chen, 2009; Rajkumar y col., 2010; Das y col., 2012). En este contexto, la utilización de estos métodos biológicos es una tecnología innovadora y prometedora, disponible para la eliminación de contaminantes metálicos y su potencial recuperación en el agua y/o suelos contaminados. Estas tecnologías se basan en el uso de microorganismos o compuestos derivados de microorganismos para eliminar/remover contaminantes (Durga y col., 2014).

La hipótesis científica detrás de estos métodos es la siguiente: los microorganismos han desarrollado varios mecanismos de resistencia, mediante los cuales pueden inmovilizar, movilizar o transformar los metales, reduciendo de esta manera la toxicidad de los iones

metálicos (ver **Fig.1**, ejemplo célula bacteriana). Estas interacciones metal-microbiota son estudiadas en el ámbito de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales y radionucleidos (Vullo, 2003). Algunos de los procesos utilizados son:

Biolixiviación: es el mecanismo por el cual y como producto de la acción microbiana un metal es movilizado, generalmente, desde minerales. Por ejemplo, la producción de sideróforos y biosurfactantes movilizan metales de minerales o suelos (Elouzi y col., 2012; Ahmed y Holmstrom, 2014). Otro ejemplo muy estudiado y utilizado en la industria minera es la extracción en fase acuosa de Cu por la oxidación de las menas de Cu_2S a CuSO_4 por la acción de las bacterias *Acidithiobacillus ferroxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* (Madigan y col., 2000).

Biotransformación: este es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal, como puede ser el cambio del estado de oxidación o la metilación. Por ejemplo, se ha reportado el aislamiento de diferentes bacterias (*Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Desulfovibrio* sp., *E.coli* sp., *Serratia* sp) y hongos (*Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus flavus*) capaces de reducir Cr(VI) a Cr(III) (Srivastava y Thakur, 2012; Garg y col., 2012; Guria y col., 2014; Alessandrello y col., 2014).

Bioprecipitación: este método consiste en la formación de un compuesto insoluble, como puede ser un hidróxido, un sulfuro o un fosfato. Puede citarse la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato (Gadd, 2000; Tsezos, 2009).

Bioacumulación: este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal presente en el entorno celular acompañado con gasto de energía. Una vez incorporado el metal, el mismo es secuestrado por las proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas, o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como en algunos hongos como *Saccharomyces cerevisiae* (Vullo, 2003).

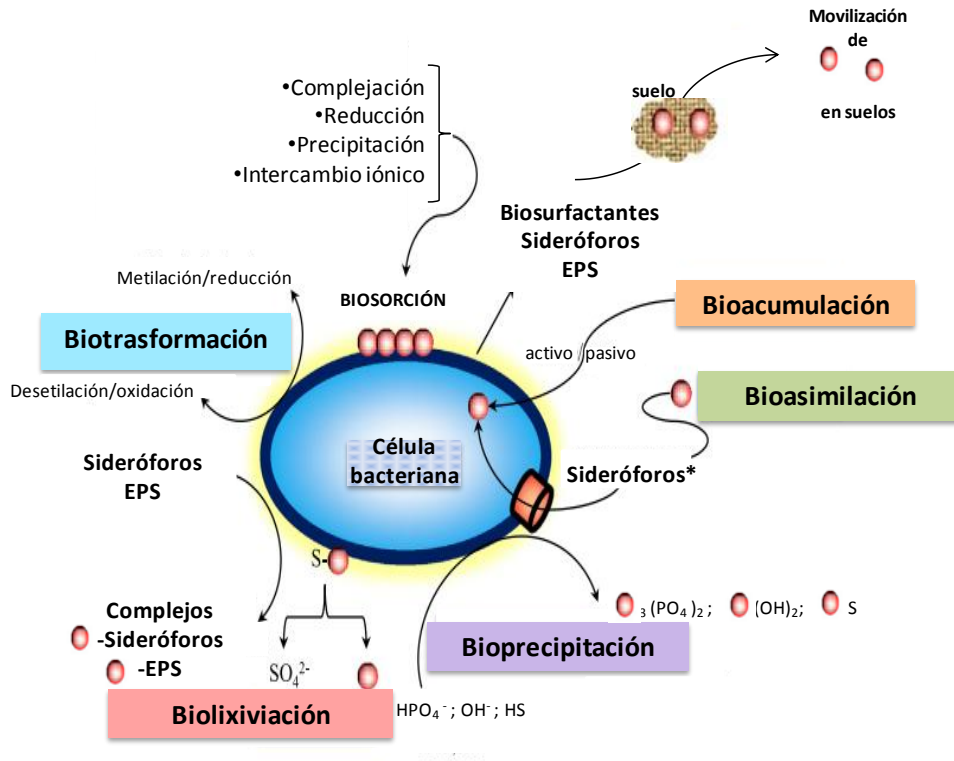


Fig.11 Esquema de la célula bacteriana y los diferentes mecanismos de interacción con metales pesados (adaptación de Tsezos, 2009). EPS hace referencia al conjunto de sustancias poliméricas extracelulares. *la bioasimilación de iones metálicos por parte de sideróforos, distintos que Fe(III), fue observada en pequeñas concentraciones de Ni(II), Co(II), Cu(II), Ga(III), Al(III) (Schalk y col., 2011).

Bioasimilación: este método se refiere al transporte intracelular del metal mediante la formación de un complejo. Uno de los metabolitos secretados por microorganismos más conocidos son los sideróforos. Éstos son selectivos para Fe(III), lo complejan y lo transportan al interior de la célula para su utilización. Sin embargo, se ha reportado que ciertos iones metálicos, como por ejemplo el Ni(II), Cu(II), Co(II), Al(III) y Ga(III), se unen a dichas moléculas y luego son transportadas al interior de la célula llevando consigo al ion metálico unido (Schalk y col., 2011).

Biosorción: este proceso consiste en el uso de biomasa, activa o inactiva, para la inmovilización de cationes en solución. La superficie de las células de bacterias y hongos presenta una variedad de grupos funcionales que están involucrados en la retención del ion por distintos mecanismos tales como: complejación, adsorción física, intercambio iónico, y precipitación de los cationes. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a fragmentos de moléculas que componen las

paredes celulares. Ejemplos de ellos son los grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo. Dichas interacciones resultan en una inmovilización de los iones metálicos (Chen y col., 1995; Arundhati y Paul, 2008).

El mecanismo de la biosorción no sólo involucra la superficie celular, sino también algunos productos secretados por los microorganismos con capacidad de unirse e inmovilizar los cationes en solución (Guibaud y col., 2012). Por ejemplo, los biopolímeros extracelulares, que se encuentran en las biopelículas⁸ aumentan la retención en la inmovilización de los iones metálicos, actuando de esta manera como biosorbentes (Teitzel y Parsek, 2003). En conclusión, los microorganismos y/o sus productos pueden ser muy eficientes reteniendo iones metálicos. No obstante, la utilización de células vivas está limitado a la toxicidad de la especie metálica. El uso de biomasa muerta o productos derivados de ella elimina dicho problema, no solo la provocada por metales disueltos, sino también por condiciones de operación, además que presenta una ventaja económica de mantenimiento debido a que no se requiere suplemento de nutrientes (Villanueva, 2000).

Existen muchas variables que pueden afectar el proceso de biosorción de metales, como por ejemplo: el tipo de biomasa estudiada, el pH, la fuerza iónica y la presencia de otros iones metálicos que puedan competir por los sitios de interacción.

Por otro lado, el proceso de biorremediación está siendo ampliamente estudiado en los últimos años debido a que presenta una serie de ventajas sobre los métodos convencionales. Dentro de estas se encuentra:

- especificidad para movilizar o inmovilizar un tipo particular de metal;
- son más eficientes;
- pueden ser aplicados *in situ* o *ex situ*;
- requieren menos energía y materiales para el proceso;
- por lo general, no producen cantidades importantes de residuos secundarios.

⁸ Son comunidades microbianas asociadas a la superficie donde los microorganismos forman agregados. Se encuentran embebidos en una matriz formada por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por los propios microorganismos.

***Pseudomonas* y su uso en la biotecnología**

El género *Pseudomonas* incluye a un número considerable de bacterias Gram negativas aeróbicas, pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*. Son metabólicamente y fisiológicamente diversas, y por lo tanto son capaces de prosperar en una vasta diversidad de ambientes. Algunas especies son patógenas para plantas, como *P. syringae*, y para animales, como por ejemplo *P. aeruginosa*, patógeno oportunista en humanos.

Las especies de *Pseudomonas* contienen plásmidos que son principalmente catabólicos, con genes que codifican para enzimas involucradas en la degradación de una amplia variedad de compuestos. Algunos plásmidos catabólicos y de resistencia pueden ser transferidos a otras bacterias de tipo Gram negativas por conjugación, por lo tanto, la resistencia a factores selectivos como antibióticos, diversos agentes antibacterianos, y sistemas de degradación de compuestos tóxicos, parecen estar codificados por genes localizados en elementos extracromosomales (Boronin, 1992). Por ello, las especies de *Pseudomonas* son una fuente extremadamente rica en plásmidos catabólicos y de elevada resistencia a factores de degradación, lo cual ha aumentado el interés sobre estos microorganismos desde el punto de vista de aplicaciones biotecnológicas.

Actualmente, *Pseudomonas* está siendo considerada para su utilización en diversos procesos tales como la biorremediación y la producción de biopolímeros, de compuestos de baja masa molecular y de proteínas terapéuticas (ver **Fig. 2**).

Los biopolímeros son compuestos valiosos producidos por *Pseudomonas* y ha crecido el interés de la comunidad científica por los mismos, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y diversidad de aplicaciones. Dentro de los más conocidos se encuentran el alginato y los polihidroxicanoatos (PHAs). Ambos polímeros se producen de manera eficiente por la mayoría de las especies de *Pseudomonas*. En el caso de los alginatos, se los utiliza como agentes estabilizantes en la industria alimenticia y como inmovilizantes de células en la industria farmacéutica. Los PHAs son polímeros / resinas termoestables con varias aplicaciones en la industria del empaque de protección de productos de consumo, en medicina (por ejemplo los R-3-hidroxi), agricultura, y en la industria alimenticia (Preusting y col., 1990; Boyd y Chakrabarty, 1995; Rehm, 2009).

Dentro de la industria farmacéutica se destaca la conversión de morfina y codeína a hidromorfina por *P. putida* (Hailes y Bruce, 1993). Recientemente se reportó en la literatura que *P. fluorescens* podría utilizarse en la obtención de interferon- γ , resultando en la tecnología PfenexTM (Dowpharma, USA) (Montgomery, 2008).

Muchas enzimas aisladas a partir de *Pseudomonas* se utilizan en la actualidad como catalizadores en procesos de producción de sustancias químicas. Por ejemplo, una de las más utilizada es la enzima acrilonitrilo hidrolasa, utilizada en la producción de polímeros de base monomérica acrilamida. Esta enzima es obtenida a partir de *P. chloraphis* B23 (Nagasawa y col., 1987). En la industria también se utilizan enzimas que catalizan o biotransforman compuestos. Como ejemplo se puede citar: lipasas, proteasas neutras, benzonasas, desalogenasas, monooxigenasas, vainillin deshidrogenasa, entre otras (Overhage y col., 1999; Rehm, 2009).

Por otro lado, *Pseudomonas* es capaz de sintetizar y secretar moléculas de baja masa molecular tales como biosurfactantes. En contraste con los surfactantes sintéticos, estos compuestos naturales son biodegradables y poseen baja toxicidad. Los más conocidos y más utilizados son los ramnolípidos y son producidos, por ejemplo, por *P. aeruginosa* (Soberón-Chávez y col., 2005).

En agricultura se han aplicado directamente en suelos cultivados o en semillas de cereales ciertas especies de *Pseudomonas* que viven en la rizósfera con el fin de evitar infecciones en las raíces. Estas especies de *Pseudomonas* secretan compuestos que promueven el crecimiento de la planta y actúan evitando el crecimiento de patógenos (*plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR*) (Haas y Défago, 2005).

Por otro lado, algunos miembros del género *Pseudomonas* son capaces de metabolizar productos químicos en el medio ambiente, y como tal pueden ser utilizados para la biorremediación. Por ejemplo, *P. alcaligenes*, *P. putida* y *P. mendocina* son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Habe y Omori, 2003); *P. pseudoalcaligenes* es capaz de utilizar cianuro como fuente de carbono (Huertas y col., 2006); *P. resinovorans* es capaz de degradar carbazol (Salam y col., 2015).) y *P. veronii* tiene la capacidad de degradar compuestos aromáticos simples (Nam y col., 2003).

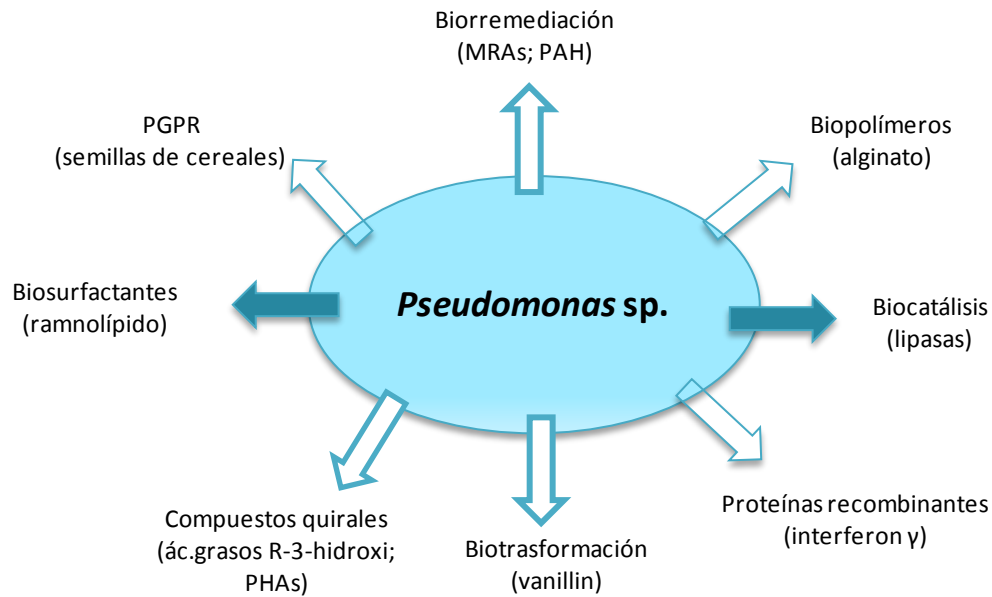


Fig. 2 Esquema de aplicaciones de *Pseudomonas sp.* Las flechas llenas indican aplicaciones comerciales; las flechas vacías indican potenciales aplicaciones.

Uno de los herbicidas más utilizados en agricultura es la atrazina. En la literatura se ha reportado que *Pseudomonas sp.* ADP fue capaz de metabolizar completamente más de $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de dicho compuesto (Nagy y col., 1995). También se ha reportado que este género fue capaz de degradar los plaguicidas hexaclorociclohexano (HCH- γ) y carbamatos (Doddamani y Ninnekar, 2001; Nawaz y col., 2011). Por lo tanto, los estudios sobre estas bacterias pueden contribuir al desarrollo de técnicas de biorremediación de suelos conteniendo altos niveles de plaguicidas.

En otros estudios reportados se observó que algunas cepas pertenecientes a este género también tenían la capacidad de remover metales. En la **Tabla 4** se dan algunos ejemplos de eliminación de metales por *Pseudomonas*.

Tabla 4 Ejemplos de *Pseudomonas* y su utilización en la biorremediación de diferentes metales.

<i>Pseudomonas</i>	Metal	Mecanismo	Referencia
<i>P. putida</i>	Hg(II)	Biotransformación	Wagner-Döbler y col., 2000
<i>P. fluorescens</i> <i>4F39</i>	Ni(II)	Biosorción	Lopez y col., 2000
	Pb(II), Cd(II), Cu(II), La(III), Ni(II), Eu(III), Yb(III)	Biosorción	Texier y col., 1999; Chang y Chen, 1999; Naz y col., 2015
<i>P. aeruginosa</i>	Cr(VI)	Biotransformación	Liu y col., 2004
	La(III)	Bioprecipitación	Teitzel y Parsek, 2003
	Ni(II)	Bioacumulación	Sar y col., 2001
<i>P. fluorescens</i> <i>ATCC 13525</i>	Pb(II)	Bioacumulación	Al-Aoukaty y col., 1991

Como puede observarse, el género *Pseudomonas* posee múltiples aplicaciones biotecnológicas (ya sea desarrolladas o potenciales), y su investigación permitirá mejorar el entendimiento de sus capacidades y mejorar la eficiencia en los procesos de recuperación de ambientes contaminados, la generación de estrategias de biocontrol en la agricultura, y la obtención de nuevos compuestos.

***Pseudomonas veronii* 2E: antecedentes**

El microorganismo utilizado en el presente trabajo de tesis fue *Pseudomonas veronii* 2E. Esta bacteria Gram-negativa fue aislada de sedimentos extraídos de la cuenca del Río Reconquista (provincia de Buenos Aires; 34° 25'S, 58°34'O), que recibe las descargas de efluentes de la mayoría de las actividades industriales y agropecuarias que se practican en las zonas aledañas (Vullo y col, 2005; Vullo y col, 2008). La bacteria fue secuenciada e identificada por 16S r-RNA (MIDI Labs, USA) como *P. veronii* 2E (99,9% alineamiento con GenBank).

La utilización de esta bacteria autóctona para el desarrollo de un biorreactor que permita el tratamiento de aguas contaminadas con metales está siendo estudiada en el laboratorio de microbiología de la “Universidad Nacional de General Sarmiento (UNGS)”. Para poder llevar a cabo este proceso, se requiere un estudio exhaustivo de diferentes parámetros de crecimiento, así como la posibilidad de retención e inmovilización metales; la formación de biopelículas sobre diferentes matrices de bajo costo, estudiar las interacciones metal-bacteria y bacteria-bacteria. *P. veronii* 2E presentó diferentes características que hacen posible su utilización en un reactor de lecho fijo:

- a) Posee una gran tolerancia a metales como Cd(II), Zn(II), Ni(II) y Cu(II) en solución acuosa (Vullo y col., 2005; Vullo y col., 2008; Garavaglia y col., 2010) (ver **Tabla 5**). Estos metales aparecen en los principales efluentes de la industria galvánica.

Tabla 5 Concentraciones Inhibitorias Mínimas (de sus siglas en inglés MIC) para Cu, Cd, Zn, Cr y Ni en medio rico PYG.

	MIC (mM)				
	Cu(II)	Cd(II)	Zn(II)	Cr(VI)	Ni(II)
<i>P. veronii</i> 2E	2	0,5	10	0,5	0,8

- b) Es capaz de formar biopelículas en diferentes superficies (Vullo y col., 2008).

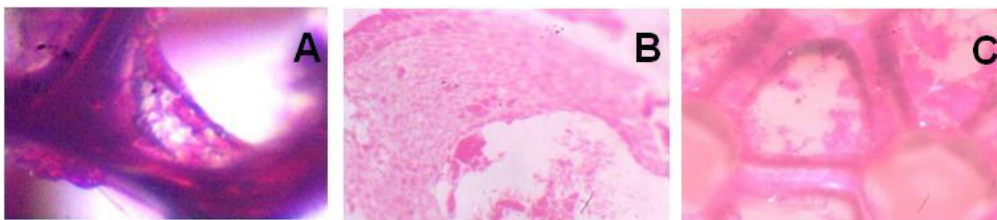


Fig. 3 Células de *Pseudomonas veronii* 2E inmovilizadas en diferentes polímeros, teñidas con safranina (aumento de 100x). **A.** espuma de poliuretano. **B.** de caucho de silicio. **C.** membrana de Teflón

- c) Se observó biosorción de Cd(II) y Zn(II), 70% y 50% respectivamente, en biopelículas desarrolladas en esponjas de poliuretano en reactores de lecho fijo (Daniel y col., 2007).



Fig. 4 Biorreactor de 50 mL y 200 mL con células inmovilizadas en esponjas de poliuretano.

- d) Se observó biosorción de metales en células planctónicas (sin inmovilizar). Los porcentajes de remoción se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6 Porcentaje de metal biosorbido por *Pseudomonas veronii* 2E para Cd, Zn y Cu a pH 7,5. * El porcentaje de biosorción de Cu fue medido a pH 5,5.

Metal	%Retención*	Referencia
Zn(II)	53	Vullo y col., 2008; Mendez y col., 2011
Cd(II)	50	Vullo y col., 2008
Cu(II)	43*	Vullo y col., 2008

- e) *Swimming*, *swarming* y quimiotaxis son funciones celulares directamente relacionadas con la formación y estabilidad de biopelículas. Éstas no se vieron afectadas en presencia de Cu(II), Cd(II), Zn(II) o Cr(VI), convirtiendo a *Pseudomonas veronii* 2E en una buena candidata para aplicar a procesos de biotratamiento de lecho fijo (Barrionuevo y Vullo, 2012).
- f) Demostró una biotransformación del 100% de Cr(VI) a Cr(III) en biorreactores de tipo *batch*, utilizando bacterias inmovilizadas en alginato (Garavaglia y col., 2010; Alessandrello y col., 2014).

A modo de resumen, se puede decir que *Pseudomonas veronii* 2E es una bacteria autóctona, no patógena, que ha mostrado gran capacidad de retener MRAs presentes en efluentes de sistemas productivos, de formar biopelículas y de biotransformar Cr(VI). Su gran versatilidad hace atractivo el estudio de la utilización de los productos extracelulares como una posible herramienta a futuro para tratar efluentes con contenido de metales.

Dado que la UNGS privilegia el desarrollo de proyectos que tengan un alto impacto sobre problemas relacionados con la industria, el ambiente, y la sociedad bonaerense, y en el marco del proyecto de desarrollo de métodos de biorremediación de efluentes con alto contenido de metales originados por la actividad industrial, se proponen los objetivos de esta tesis de doctorado.

OBJETIVOS GENERALES



El **objetivo general** del trabajo es el estudio de las interacciones entre componentes y productos celulares bacterianos y metales de relevancia ambiental para su potencial aplicación en sistemas de biotratamiento.

Los **objetivos específicos** del trabajo son los siguientes:

1. Desarrollar un método de extracción para cada uno de los posibles productos y componentes celulares capaces de interactuar con metales a partir de la bacteria *Pseudomonas veronii* 2E.
2. Determinar la capacidad de los productos extraídos de interactuar con metales como Cd(II), Zn(II), Cu(II), Cr(III) y Ni(II).
3. Caracterizar a los productos bacterianos obtenidos en cuanto a sus propiedades como ligando frente a Cd(II).
4. Efectuar una caracterización de los productos en cuanto a su estructura química.
5. Explorar la aplicación de los compuestos extracelulares para la remoción de Cd(II) en efluentes acuosos.

CAPÍTULO I

“PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CON Cd(II) DE SUSTANCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS) SOLUBLES PRODUCIDAS POR

Pseudomonas veronii 2E”

INTRODUCCIÓN

El conjunto de sustancias poliméricas extracelulares de origen microbiano (de aquí en más EPS, por sus siglas en inglés *Extracellular Polymeric Substances*) son una consecuencia de la acumulación de secreciones bacterianas, desprendimientos de la pared celular, compuestos de la lisis celular y algunos compuestos orgánicos sorbidos. Ésta mezcla compleja de biopolímeros es producida tanto por agregados microbianos, como las biopelículas, los bioflóculos y los biogránulos, como por una gran variedad de bacterias de vida libre. Independientemente de su origen, las sustancias poliméricas extracelulares se pueden encontrar unidas a la superficie de la célula o bien disueltas o suspendidas en el medio líquido circundante. La composición del biopolímero no es constante y depende de muchos factores, siendo los más destacados los constituyentes orgánicos e inorgánicos del medio de cultivo, o el tipo de cultivo celular (mixto o puro).

La función biológica del EPS es múltiple; merecen mencionarse ayudar al agregado celular, la formación de flóculos y la adhesión a superficies, la protección en ambientes secos y la resistencia en ambientes tóxicos. Adicionalmente, los exopolímeros servirían como acumuladores de nutrientes del medio ambiente y también tienen un papel importante en la retención de cationes metálicos.

Debido a la gran variedad de funciones encontradas en el EPS, estos biopolímeros han recibido una atención particular para su aplicación en diferentes procesos biotecnológicos, como por ejemplo el tratamiento de aguas residuales. La eliminación de metales utilizando EPS como biosorbente está siendo estudiada en los últimos años, debido a su relativa simpleza, bajo costo y biodegradabilidad.

Sustancias poliméricas extracelulares: definición

Una gran variedad de microorganismos, incluyendo procariotas y eucariotas, viven y crecen en agregados microbianos como biogránulos, biopelículas y bioflóculos. El EPS está formado por una mezcla compleja de polímeros que comprenden polisacáridos,

proteínas, ácidos nucleicos extracelulares, ácidos urónicos, lípidos, y, dependiendo del origen del EPS, también puede contener sustancias húmicas⁹.

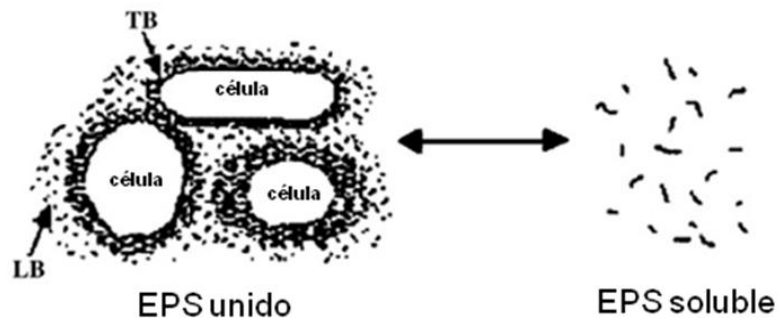
El término EPS se utilizaba originalmente para designar al conjunto de los polisacáridos extracelulares; sin embargo, en una publicación de *Wingerder y col.* (1999) se acuñó el término EPS en un sentido más amplio para abarcar las diferentes clases de macromoléculas presentes en el interior de los agregados microbianos. *Nielsen y Jahn* (1999) propusieron que todos los polímeros presentes fuera de la pared celular que no estén unidos covalentemente con la membrana externa o al peptidoglicano deberían llamarse EPS. En la actualidad se asigna la abreviatura EPS tanto al conjunto de las sustancias poliméricas de alto peso molecular secretadas por microorganismos como también a los productos de lisis celular e hidrólisis de macromoléculas. Adicionalmente, en el caso de aguas residuales la materia orgánica presente puede ser retenida por la matriz del EPS e incorporarse a su estructura.

Las variedades de EPS pueden clasificarse según dos criterios. El primero se define por la manera en que está asociado a la célula mientras que el segundo deriva del método utilizado para extraer y separar el EPS de la célula. Según la clasificación que se muestra en **Tabla 7** el EPS unido se encuentra en las cercanías de la pared celular, mientras que el EPS soluble abarca a los polímeros que se encuentran disueltos en el medio. Generalmente, estos dos tipos de EPS se pueden separar por centrifugación, quedando en el sobrenadante el EPS soluble y en el *pellet* las células junto con el EPS unido. La estructura del EPS unido puede a su vez ser clasificada en firmemente unido a las células (su siglas en inglés *TB-EPS*) y débilmente unido a las células (su siglas en inglés *LB-EPS*). El TB-EPS se encuentra estrechamente unido a la superficie de la célula mediante los grupos carboxilo dentro de la estructura polimérica y los hidroxilos presentes en los lipopolisacáridos. La capa unida débilmente a la pared celular (*LB-EPS*) forma una cápsula difusa alrededor de la célula y puede ser fácilmente perdida en el medio de cultivo (ver **Fig. 5**). Aunque las definiciones para el EPS que se encuentran en la **Tabla 7** están relacionadas entre sí, la clasificación de una u otra manera usada por los diferentes investigadores depende del EPS estudiado. En el presente trabajo se utilizará la clasificación según el estado fisicoquímico.

⁹ Son componentes de la materia orgánica natural presente en el suelo y ambientes acuáticos. Las sustancias húmicas son mezclas de compuestos que se forman por la degradación y descomposición de materia orgánica. Se pueden dividir en tres fracciones principales: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas.

Tabla 7 Clasificación de EPS

Clasificación	EPS	Definición	Referencia
Asociación con la célula	Mucosa	Son los polímeros presentes en los sobrenadantes luego de centrifugar la biomasa. Se encuentra en forma soluble.	
	Capsular	Son los polímeros unidos permanentemente a la membrana celular.	
Estado fisicoquímico	Soluble	Son secretados por la célula y se encuentran en el ambiente circundante. Los componentes mayoritarios son las macromoléculas, coloides y mucosas.	Wingerder J, 1999 Comte y col., 2008 Buthelezi y Olaniran, 2010 Guo-Ping Shenga, 2010
	Unido	Está firmemente unido a la célula. Los componentes mayoritarios son los polímeros de cápsula, geles condensados, polímeros débilmente unidos y materia orgánica agregada.	

**Fig. 5** Estructura del EPS (adaptado de Nielsen y Jahn, 1999)

A pesar de que la interacción entre el EPS soluble y las células es muy débil, algunos estudios han reportado que este tipo de EPS también posee efectos importantes en la actividad microbiana y las características de los lodos activados¹⁰ de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Sheng y Yu, 2007). Sin embargo los estudios para el EPS soluble son limitados y en su mayoría los trabajos encontrados en la literatura específica hacen referencia al EPS unido y al EPS que se encuentra en los lodos activados.

Composición

Los polisacáridos y proteínas son los componentes principales en el EPS (comprenden entre un 75 y un 90% de su masa), y en menor medida se encuentran los ácidos nucleicos, los lípidos, los ácidos urónicos, las glicoproteínas y algunos compuestos inorgánicos (Frolund y col., 1996; d'Abzac y col., 2010). En el EPS de los lodos de tratamiento de aguas residuales, casi el 20% en peso lo componen sustancias húmicas (Frolund y col., 1996), mientras que en cultivos celulares de *Pseudomonas* NCIMB 2021 la composición del EPS soluble y capsular es un copolímero de carbohidratos y proteínas (Arundhati y Paul, 2008). Para el exopolímero extraído de las biopelículas de *Pseudomonas putida* las proteínas fueron el componente principal (75%) seguido de los polisacáridos y ADN. Teniendo en cuenta los datos encontrados en la bibliografía especializada se puede observar que los componentes del EPS están determinados por el método de extracción utilizado, el origen del EPS, el tipo de lodo analizado, la fase de crecimiento, el microorganismo, etc. En la **Tabla 8** se muestra un resumen de algunos EPS, el método de extracción utilizado, la composición química y el microorganismo.

En relación a los métodos de extracción, en los últimos años se ha estudiado la influencia de diferentes técnicas de purificación tanto químicas como físicas en la composición del exopolímero, debido a que la composición del mismo varía dependiendo del proceso de extracción utilizado. Estos estudios se han realizado principalmente en lodos

¹⁰ Los lodos activados se utilizan en el proceso biológico de tratamiento de aguas residuales. Consiste en el desarrollo de un cultivo bacteriano disperso en forma de flóculo en un depósito agitado, aireado y alimentado con el agua residual, que es capaz de metabolizar como nutrientes los contaminantes biológicos presentes en esa agua.

activados y cultivos celulares de EPS unido (Klock y col., 2007; Comte y col., 2008; Chen Xu, 2009; More y col., 2014).

Las masas moleculares de EPS informadas en diferentes investigaciones se encuentran en un rango que varía desde 10^5 a $2,5 \times 10^6$ Da (More y col., 2014). Por ejemplo, el EPS producido por *Flavobacterium* sp. está compuesto principalmente por proteínas y la masa molecular es de $1,4 \times 10^5$ Da, mientras que la masa reportada para el EPS producido por *Hemimysis anomala* se estimó en un valor menor a $3,7 \times 10^4$ Da. El EPS producido por *Oscillatoria* sp. también se encontró en el mismo rango de masa molecular (More y col.,2014).

Tabla 8 Composición química, método de extracción, microorganismo utilizados y tipo de EPS

	Fuente	Composición EPS	mg·g ⁻¹ EPS	Método de extracción	Referencia	
Bacterias	<i>Methylobacterium organophilum</i> NCIB 11278 KC-1	Azúcares reductores	779	EPS del sobrenadante fue precipitado con 2,2 vol. de etanol, rediseuelto en agua destilada y dializado.	Kim y col., 1996	
		Proteínas	61			
		Ácido pirúvico	51			
		Ácidos urónicos	124			
			Ácido acético	6		
	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIMB 2021	EPS soluble			El cultivo celular se centrifugó (10000 g, 30min.), y el sobrenadante se dializó y se liofilizó.	Beech y col., 1999
		Azúcares neutros	13,35			
		Proteínas	9,31			
		EPS capsular				
		Azúcares neutros	13,32			
			Proteínas	14,4	El pellet bacteriano se trató con EDTA (10 mM), luego se centrifugó y se liofilizó.	
	<i>Pseudomonas putida</i>	EPS soluble			EPS del sobrenadante fue precipitado con 2 vol. de acetona, rediseuelto en agua destilada y dializado	Kachlan y col., 2011
		Carbohidratos	214			
		Proteínas	345			
		EPS capsular				
Azúcares neutros		154				
		Proteínas	483	El pellet bacteriano se mezcló (5 min.), luego se centrifugó (17000 g, 20 min.) y se precipitó el EPS con 2 vol. de acetona.		
Lodos	Lodo aeróbico granulado	Carbohidratos	40,5	El lodo fue tratado con formaldehído y NaOH, centrifugado, filtrado, dializado y liofilizado.	McSwain y col., 2005	
		ADN	0,35			
		Proteínas	54,6			
		Ácidos húmicos	50,4			
		Ácido urónicos	4,2			
Biopelículas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Polisacáridos	52,5	La biopelícula fue tratada con NaCl y EDTA y agitada vigorosamente y luego, centrifugada.	Steinberger y Holden, 2004	
		ADN	52,9			
		Proteínas	17,8			

Carbohidratos (exopolisacáridos)

Los carbohidratos son el componente mayoritario presente en el EPS. El término de exopolisacáridos ha sido ampliamente utilizado para aquellos polisacáridos localizados en la superficie externa de las células microbianas, entre los que se han encontrado polímeros de diversa composición química y propiedades físicas. El EPS está compuesto por carbohidratos neutros (mayoritariamente hexosas) y ácidos urónicos (ácido glucurónico, galacturónico y manurónico). La presencia de sustituyentes en los ácidos urónicos como acetatos, piruvatos, succinatos, formiatos o sustituyentes inorgánicos (fosfatos) son los que determinan principalmente la naturaleza iónica del EPS.

Existe una gran variedad de exopolisacáridos, siendo algunos de ellos muy estudiados y utilizados en la actualidad en diferentes áreas. Las causas de la enorme variedad de exopolisacáridos son la diversidad de las unidades básicas que los constituyen, la cantidad en que están presentes dichas unidades y los distintos tipos de enlace que determinan la configuración final. Se los puede clasificar en homopolisacáridos y heteropolisacáridos. En la **Fig. 6** se observan algunos ejemplos de exopolisacáridos.

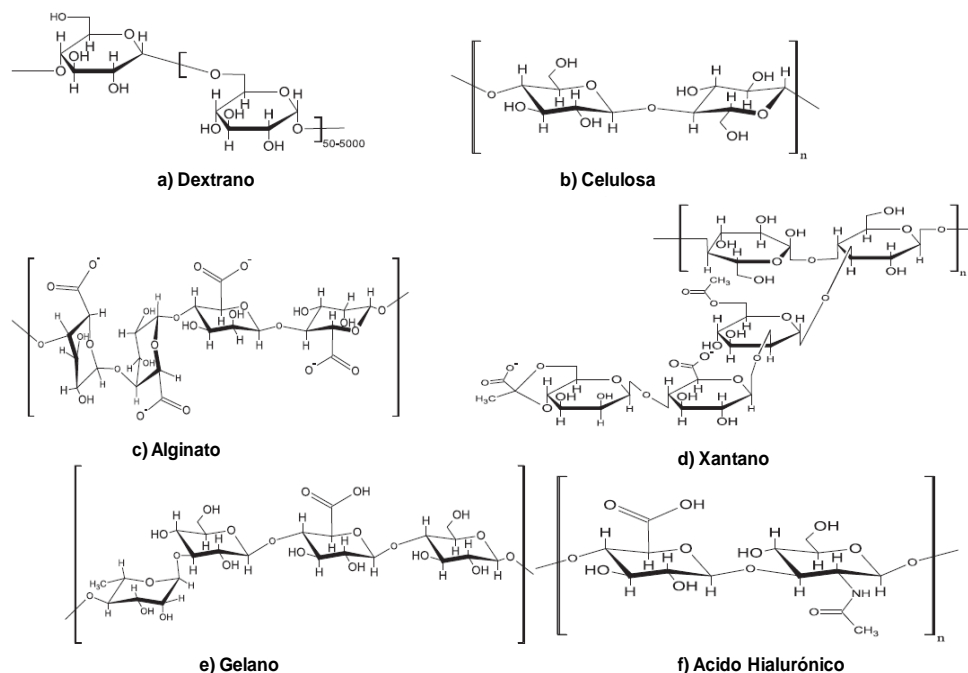


Fig. 6 Ejemplos de estructura química de los exopolisacáridos: a) Dextrano, b) Celulosa, c) Alginato, d) Xantano, e) Gelano, f) Ácido Hialurónico.

En términos generales, los **homopolisacáridos** son neutros y están compuestos por un único monosacárido que usualmente es glucosa o fructosa (Sutherland, 2001; Czaczyk y Myszk, 2007; Vu y col., 2009). Estos compuestos se pueden dividir en tres grupos distintos. El primer grupo está formado por α -D-glucanos. Estas macromoléculas contienen principalmente uniones α -(1,6) aunque hasta un 50% de las uniones pueden ser enlaces α -(1,3), α -(1,2) y α -(1,4). Dentro de este grupo se encuentran los dextranos, un exopolisacárido con un 95% de enlaces α -1,6 y un 5% de uniones α -1,3 y producidos industrialmente por *Leuconostoc* spp. y *Streptococcus* spp. (ver **Fig. 6 a**). El segundo grupo está formado por β -D-glucano. Estos compuestos son polímeros lineales formados por moléculas neutras, generalmente glucosa, unidas mediante un solo tipo de enlace (como ejemplo se puede citar celulosa y curdlano) y polímeros que presentan ramificaciones y dos tipos de enlaces (por ejemplo levano). El curdlano es un polisacárido lineal de baja masa molecular producido por *Alcaligenes faecalis* y *Agrobacterium* spp. que se encuentra formado por enlaces β -(1,3) entre residuos de glucosa. La celulosa es también un biopolímero de alto valor por sus propiedades y usos específicos. Este exopolímero está constituido por unidades repetitivas de D-glucosa unidas por enlaces β -(1,4) (ver **Fig. 6 b**). La celulosa se produce principalmente por α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* y bacterias Gram-positivas (Vu y col., 2009). Por último, el tercer grupo está formado por fructanos producidos por *Streptococcus salivarius*, y contienen uniones β -(2,6) (Czaczyk y Myszk, 2007).

Los **heteropolisacáridos** están constituidos por unidades que varían en cuanto a naturaleza y tamaño (disacáridos, tetrasacáridos, etc.). Las propiedades físicas de los heteropolisacáridos están determinadas por la naturaleza de las uniones entre los monosacáridos que lo conforman y las ramificaciones de las cadenas. En las unidades repetidas, cada hexosa puede presentar un enlace de tipo α o β , o los dos a la vez (por ejemplo heparina). Además, muchos de los polisacáridos presentes están sustituidos por piruvatos, succinatos y formiatos (Czaczyk y Myszk, 2007). Uno de los más estudiados es el alginato. Este es producido no sólo por algas, sino también por bacterias patógenas oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter* (Flemming y Wingender, 2010). Este exopolímero no es esencial para el desarrollo de las biopelículas por parte de *P. aeruginosa*; sin embargo, su presencia tiene un efecto notable sobre su arquitectura. Se caracteriza por presentar una estructura muy irregular, sin una unidad repetitiva

determinada. Es un heteropolímero formado por D-ácido manurónico y L-ácido gulurónico y en su estructura molecular no existen monosacáridos neutros (ver **Fig. 6 c**). Por otro lado es frecuente que los restos manosil se encuentren acetilados, y es precisamente el grado de acetilación, combinado con el contenido de D-ácido manurónico y de L-ácido gulurónico, lo que determina las diferencias estructurales y funcionales de los distintos alginatos bacterianos (Sutherland, 2001). El xantano, otro polisacárido utilizado como espesante en la industria alimenticia, es una goma producida por cepas de *Xanthomonas campestris*. Es un heteropolímero ramificado aniónico cuya estructura primaria se basa en una cadena lineal de unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -(1,4), mientras que la cadena lateral trisacáridica está constituida por D-manosa y ácido D- glucurónico en una proporción 1:2. Esta ramificación es del tipo β -D-manosa-(1,4)- β -D-glucurónico-(1,2)- α -D-manosa (ver **Fig. 6 d**). El gelano es un heteropolímero lineal producido por *Pseudomonas elodea*. Se lo utiliza en la formulación de helados y mermeladas, y está constituido por moléculas de D-glucosa, D-glucurónico y ácido L-rammosa en proporción 2:1:1 (ver **Fig. 6 e**). El ácido hialurónico es producido por *Streptococcus* sp. y *Pasteurella multocida*. Es un heteropolímero utilizado en la industria cósmica compuesto de unidades repetidas de disacárido de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina (ver **Fig. 6 f**) (Vu y col., 2009).

El interés de los polisacáridos de origen microbiano se debe principalmente a que constituyen una alternativa a los polímeros producidos por plantas (pectina, goma guar o goma garrofín) o algas (alginatos) utilizados tradicionalmente como agentes viscosantes en la industria y que presentan el inconveniente de no estar disponibles siempre con la calidad y propiedades adecuadas debido a la variabilidad estacional (Tombs y Harding, 1997).

Proteínas

El EPS contiene una cantidad importante de proteínas, algunas de ellas enzimas y otras proteínas estructurales. Algunas de las diversas **enzimas** detectadas en la matriz del EPS están involucradas en su degradación, mientras que otras actúan vinculando compuestos insolubles en agua (celulosa y lípidos) y compuestos solubles (polisacáridos, ADN extracelular y proteínas). La presencia de enzimas que degradan los componentes poliméricos en el EPS hace del mismo un sistema digestivo externo, debido a que estas enzimas rompen el biopolímero en productos de menor masa molecular que pueden ser

sorbidos y utilizados como fuentes de carbono y energía por parte de los microorganismos en períodos de escasez nutricional. Algunas enzimas pueden estar implicadas en la degradación de la estructura del EPS en biopelículas, promoviendo el desprendimiento de las células bacterianas para su movilización, mientras que otras están vinculadas al agregado microbiano. Otras enzimas presentes en el EPS actúan como factores de virulencia en las biopelículas durante procesos infecciosos (Flemming y Wingender, 2010).

Las **proteínas estructurales** o proteínas no enzimáticas en la matriz del EPS, tales como las asociadas a la pared celular o las que se encuentran unidas a los exopolisacáridos, están involucradas en la formación de la estructura de los biopolímeros como también en la formación de los agregados microbianos encontrados en los lodos activados (Flemming y Wingender, 2010).

ADN extracelular

En diversos estudios se ha reportado que el EPS producido por una variedad de microorganismos de diferentes orígenes (lodos activados, sedimentos marinos, cultivos sintéticos, etc.) contiene ADN extracelular (**ADNe**, ácidos desoxirribonucleicos extracelulares), y se ha reportado que su contenido y cantidad depende de la especie que produzca el biopolímero. Por ejemplo, el ADNe es un componente importante y mayoritario en la matriz del EPS de biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, mientras que es minoritario en el EPS formado por *Staphylococcus epidermidis* (Flemming y Wingender, 2010; Marvasi y col., 2010). Aunque inicialmente se creía que no tenía ninguna función particular dentro de la estructura de los EPS y que provenía de la lisis celular, recientemente se le ha asignado un rol importante en la agregación bacteriana, en la transferencia horizontal de genes y se ha informado que posee actividad antimicrobiana (Czaczyk y Myszk, 2007). Por ejemplo, se ha observado que el ADNe es un componente mayoritario en las biopelículas producidas por *P. aeruginosa* y que cumple la función de conector intercelular (Flemming y Wingender, 2010).

Los orígenes del ADNe aún no están bien establecidos y se ha observado que difiere entre las especies. Por ejemplo, el ADNe presente en las biopelículas producidas por *P. aeruginosa* y *P. putida* resultó ser idéntico al ADN genómico, mientras que el ADN en las biopelículas de bacterias pertenecientes a γ -*Proteobacteria* F8 resultó ser diferente al

genómico, demostrando que el ADNe no resulta sólo de la lisis celular (Böckelmann y col., 2006).

Lípidos

La naturaleza hidrofílica del EPS se debe principalmente a los polisacáridos, proteínas y moléculas de ADNe, pero algunos tipos de EPS también poseen propiedades hidrofóbicas (por ejemplo, el producido por *Rhodococcus* spp.). Estas características hidrofóbicas fueron atribuidas a polisacáridos unidos a grupos metilo y aceto, como también a lípidos y a sus correspondientes derivados, los lipopolisacáridos (LPS) (ver Fig. 7). Se ha reportado que los LPS participan en la adhesión de las células a superficies (por ejemplo, la adhesión de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a superficies de pirita) (Flemming y Wingender, 2010). Sin embargo no hay muchos estudios enfocados en la presencia y estructura de los LPS dentro del EPS.

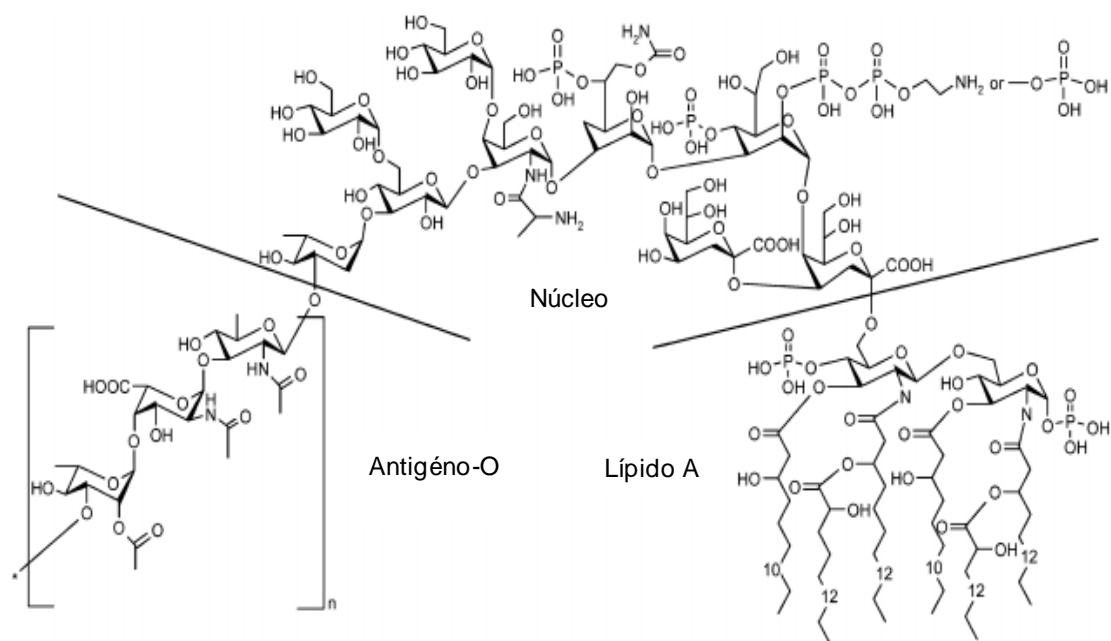


Fig. 7 Estructura de LPS producido por *P. aeruginosa*.

Funciones biológicas

Los EPSs producidos por microorganismos desempeñan múltiples funciones que generalmente se traducen en acciones beneficiosas para los mismos (Chen y col., 1995). Se

ha reportado que intervienen en la adhesión microbiana a superficies (Sutherland, 2001), y en medios acuosos se ha observado que los exopolímeros participan en la agregación microbiana de bacterias aisladas, provocando la unión de éstas a un determinado material y su posterior crecimiento sobre él, produciendo una película viscosa llamada biopelícula (Sutherland, 1980). Estas biopelículas componen un entorno microbiano complejo y dinámico (Sutherland, 2001). La formación de biopelículas sobre materiales médicos como catéteres, sondas o válvulas cardíacas son uno de los mayores problemas asociados al uso de estos dispositivos debido a que el exopolímero le confiere gran resistencia a los antibióticos (Wilson y col., 2002). Por ejemplo, el EPS producido por *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas cepacia* (dos bacterias de importancia clínica) disminuye la actividad antimicrobiana de la tobramicina y la ciprofloxacina de manera considerable (Manh y O'Tolle, 2001).

La adhesión de las biopelículas a diferentes materiales ha sido estudiada por muchos investigadores, por ejemplo *Pseudomonas fluorescens* se une a las superficies de acero inoxidable (Hood y Zottola, 1997), mientras que *Pseudomonas veronii* 2E forma biopelículas sobre membranas de Teflon y sobre esponjas de poliuretano (Vullo y col., 2008).

La formación de biopelículas es un tema de gran importancia también en la industria alimentaria ya que puede provocar grandes pérdidas económicas originadas a partir de problemas higiénicos. Por lo tanto, se han realizados numerosos estudios para prevenir y/o eliminar su formación (Brown y col., 2015).

En varias industrias, principalmente la industria del petróleo y la industria química, se ha estudiado el efecto de la formación de biopelículas sobre las superficies de tuberías metálicas en el fenómeno de corrosión (Frontini, 2005). Las biopelículas incrementan el fenómeno de corrosión debido a que modifican localmente la química del fluido en la interface biopelícula / metal. Los cambios en la química de interfase son influenciados principalmente por la cantidad y tipo de microorganismos presentes, la concentración de oxígeno disuelto, la velocidad y tipo de flujo dentro de la tubería, la capacidad amortiguadora del fluido que circula (Characklis, 1989), y esto vuelve compleja la dilucidación de un único mecanismo por el cual las biopelículas aumentan la corrosión. En la literatura se ha reportado aumentos de hasta 6 veces en la velocidad de corrosión por la

presencia de biopelículas (AlAbbas y col., 2013), y normalmente el tipo de corrosión fomentada por ellas es de tipo localizada.

No obstante, las biopelículas pueden ser aplicadas en el desarrollo de reactores para la obtención de productos de valor comercial. Por ejemplo, el ácido acético es producido industrialmente por el grupo de “bacterias del ácido acético”. Estas bacterias son inmovilizadas, en forma de biopelícula, sobre virutas de madera que son colocadas en un biorreactor de lecho percolador (*TRB* de sus siglas en inglés Trickle Bed Reactor). Los volúmenes utilizados son de 60000 litros teniendo una productividad máxima diaria de $1,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Halan y col., 2012).

En resumen, en la bibliografía específica se ha reportado un amplio número de funciones asociadas al EPS, entre las cuales se destacan los mecanismos de protección para el microorganismo:

- a) actuando como buffer frente a micro-cambios ambientales;
- b) protegiendo a las células frente a la desecación, ya que actúa como reservorio de agua (Robertson y Firestone, 1992);
- c) protegiendo frente a agentes antimicrobianos y sustancias tóxicas;
- d) actuando como barrera frente a las células del sistema inmune, por ejemplo los polisacáridos presentes en forma capsular de *Streptococcus pneumoniae* (De Vuyst y Degeest, 1999);
- e) facilidad para transferencia horizontal de información genética (Wingerder y col., 1999).
- f) influyendo en procesos de infección en plantas, por ejemplo *Xanthomonas campestris* secreta un exopolisacárido que altera la incorporación de nutrientes por parte de la planta (Sutherland, 2001a);
- g) aunque algunas bacterias no son capaces de catabolizar los EPS, en algunos casos se ha observado que puede actuar como suministro de energía y nutrientes, reteniéndolos para su uso en épocas de escasez (Cerning, 1990).
- h) está involucrado en la formación de biogránulos bacterianos. Éste es un proceso que involucra la inmovilización de microorganismos (de la misma especie o de diferentes especies) donde las células forman agregados compactos de forma esférica que resultan de la interacción de los biopolímeros y la pared celular (Arundhati y Paul, 2008).

EPS y sus aplicaciones en el medio ambiente

Muchas investigaciones describen la aplicación de EPS producido por diferentes bacterias en el tratamiento de aguas residuales. El EPS presenta una composición variada que le otorga un rol importante en la floculación y deshidratación de lodos activados, como también en la remoción de colorantes y sorción a metales en aguas residuales (Frolund y col., 1996). Estas características han sido estudiadas en los últimos años principalmente en el EPS que se encuentra en los lodos activados y en menor medida en otros sistemas de tratamiento de aguas.

Floculación

Las aguas residuales, contienen material suspendido que no sedimentan con facilidad. Una parte considerable de estos sólidos son coloides cargados en la superficie, la cual impide que se formen flóculos cuando chocan entre ellos. Por lo tanto, para conseguir la sedimentación y mejorar la calidad de las aguas, se agregan agentes químicos (coagulantes, comúnmente sales de Fe(III) o Al(III)) que producen la desestabilización del coloide eliminando la doble capa eléctrica, y luego se procede al agregado de floculantes que producen la aglomeración de las partículas que por el volumen y peso sedimentan. Los floculantes más utilizados son polímeros, como por ejemplo poliacrilamida (PAM). Sin embargo, se ha demostrado que la utilización de EPS como floculante influye en la formación de flóculos positivamente, produciendo la sedimentación de sólidos en suspensión (Liu y col., 2007; Liu y col., 2010b). Este mecanismo depende de la carga del EPS, la masa molecular, la naturaleza del mismo y el agregado de sales. Por ejemplo, la adición de coagulantes como Ca(II), Mg(II), Al(III) y Fe(III) produce un efecto positivo por su tendencia a unirse con el EPS y de esta forma aumentar la floculación. Por otro lado, la eficiencia de los mecanismos de floculación se encuentra influenciada por la masa molecular del EPS: altas masas moleculares dan como resultados un aumento en la floculación (More y col., 2014). Por otro lado, en los agregados microbianos se ha encontrado que el aumento de la actividad floculante va acompañado de un incremento del contenido de proteínas, y que el EPS levemente unido posee un efecto negativo en la floculación (Sheng y col., 2010).

En la literatura específica se encuentran diferentes estudios para la aplicación del EPS para tal fin, ya sea de cultivo en condiciones de laboratorio o en los lodos activados (Morgan y col., 1990). La principal ventaja de usar este tipo de biofloculantes radica en que no es necesario tratamientos posteriores a su aplicación (se podría usar los EPS en cualquiera de sus formas, solubles o unidas), y en el costo del mismo (More y col., 2012a). Por ejemplo, *Deng y col.*(2003), observaron la remoción de un 85% de los sólidos suspendidos en aguas residuales por parte del EPS producido por *Bacillus mucilaginosus*.

Deshidratación

El proceso de deshidratación consiste en remover agua de los lodos para tener un material que pueda ser utilizado o almacenado para su descarte. Este proceso tiene grandes costos de inversión inicial, de operación, y de mantenimiento, ya que generalmente es necesario añadir polímeros o algún material coagulante para lograr mejor aglutinación de las partículas y con ello incrementar la eficiencia del proceso. Los lodos contienen naturalmente EPS y su presencia ha sido identificada como el parámetro más relevante en la deshidratación de los mismos (More y col., 2010). Algunos investigadores mostraron que el aumento de la cantidad de EPS contenida naturalmente en los lodos es beneficioso para desarrollar esta actividad, ya que permite disminuir el grado de dispersión de los lodos y así mejorar la deshidratación (Mikkelsen y Keiding, 2002; Jin y col., 2004). Por ejemplo, el EPS producido por *Kebsiella* sp. ha mostrado una deshidratación de los lodos activados comparable a los floculantes comerciales agregados para tal fin (More y col., 2014). Por otro lado, se ha observado el efecto contrario con un aumento excesivo de EPS, originado por la retención de agua por los componentes hidrofílicos. Por este motivo, los resultados dependen de la concentración de EPS y sus efectos continúan siendo estudiados en la actualidad (More y col., 2014).

Remoción de compuestos orgánicos: colorantes e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

En las aguas residuales de las industrias textiles, la presencia de colorantes provoca cambios de color, incremento de la carga de materia orgánica y aumento de la toxicidad. Su descarga directa a cuerpos de aguas tiene por tanto efectos perjudiciales para la vida

acuática (Solis y col., 2012). En los últimos años se ha estudiado la biosorción de colorantes industriales por bacterias, y se ha relacionado este proceso a los EPSs (principalmente a los compuestos polisacáridicos y lipídicos). *Buthlezi S.P* (2008) ha estudiado la decoloración de distintos colorantes por el EPS producido por diferentes especies bacterianas como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella* y *Staphylococcus*, mostrando que el biopolímero posee una gran eficiencia en la decoloración, y que su efectividad depende del pH, el tipo de microorganismo, el tiempo de contacto, la concentración del EPS y colorante, la temperatura y la fuerza iónica.

Por otro lado, estudios realizados en aguas residuales, lodos o sólidos muestran que el EPS tiene la capacidad de remover y absorber compuestos orgánicos como PAHs¹¹ (Zhang y col., 2011). En los últimos años se ha estudiado la degradación y mineralización de los PAHs utilizando microorganismos, y se ha observado que el EPS juega un papel importante en la solubilización e interacción entre los PAHs y la bacteria degradadora. En el EPS, las zonas hidrofóbicas del biopolímero facilitan la transferencia de masa de los compuestos orgánicos insolubles aumentando su biodisponibilidad hacia las bacterias para luego ser biodegradados por las mismas. Se ha observado que *Zoogloea* sp. y *Aspergillus niger* degradan pireno y el porcentaje de degradación aumenta cuando se incrementa la concentración de EPS (Jia y col., 2011).

Remoción de metales de relevancia ambiental

La remoción de contaminantes metálicos del ambiente utilizando biosorbentes microbianos ha sido extensamente estudiada en los últimos años. Existen investigaciones en las cuales se reporta que el EPS posee un rol importante en la retención de metales (Guibaud y col., 2008; Comte y col., 2008; d'Abzac y col., 2010; Guibaud y col., 2012). La capacidad de biosorción del EPS se atribuye a los componentes presentes en su matriz (polisacáridos, proteínas, ADN y LPS) que contienen grupos funcionales capaces de interaccionar con cationes metálicos (como amino, hidroxilo, fosfato, carboxilo, etc.). La

¹¹ Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs o PAHs, por sus siglas en inglés) son compuestos orgánicos que se componen de anillos aromáticos simples que se han unido, y no contienen heteroátomos ni poseen sustituyentes. Los PAHs se encuentran en el petróleo, el carbón y en depósitos de alquitrán y también como productos de la utilización de combustibles (ya sean fósiles o biomasa). Como contaminantes han despertado preocupación debido a que algunos compuestos han sido identificados como carcinógenos, mutágenos y teratógenos. Algunos de los más conocidos son el fenantreno, el naftaleno, el pireno y el antraceno.

biosorción de los cationes por el EPS involucra interacciones físicas y químicas tales como mecanismos de adsorción, intercambio iónico, complejación y precipitación (Wingerder y col., 1999). Por este motivo, la efectividad de la biosorción va a depender de muchos factores como el pH, el tipo de metal, la temperatura, el tiempo de contacto, la fuerza iónica del medio, la concentración de biosorbente, y el número de sitios disponibles (Beech y Sunner, 2004; Arundhati y Paul, 2008). La complejación entre Zn(II) y cuatro grupos fosfato de ligandos orgánicos se muestra a modo de ejemplo en la **Fig. 8**.

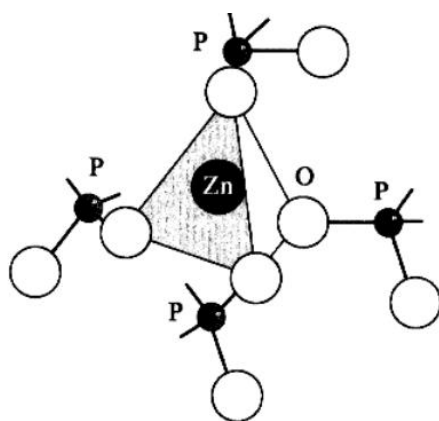


Fig. 8 Complejación entre el Zn(II) y cuatro grupos fosfato.

El uso de estos biopolímeros en el fenómeno de biosorción parece ser una alternativa más económica comparada con los métodos convencionales debido a los bajos costos que trae en relación al uso de agentes químicos utilizados en la precipitación, coagulación, intercambio iónico y métodos electroquímicos, usados actualmente. Además el uso de sorbentes sin células es preferible debido a que no se utilizan medios de cultivos, lo cual disminuye los costos del proceso.

Remoción de metales por EPS producido por células planctónicas

Una gran variedad de bacterias han demostrado producir EPS en medios de cultivo sintéticos, ya sea complejos o mínimos (Arundhati y Paul, 2008). En la **Tabla 9** se muestran algunos de los metales y cantidades biosorbidas por diferentes EPS.

Tabla 9 Estudio de biosorción de metales por parte de EPS producido por bacterias en estado planctónico.

Bacteria productora de EPS	Metal biosorbido	mg·g ⁻¹ EPS	Información de EPS	Referencia
Bacteria marina sulfato reductora	Mo(IV)	2,14	Estudio de metal biosorbido empleando rayos X de energía dispersa.	Beech y Cheung, 1995
	Ni(II)	0,43		
	Cr(VI)	0,2		
<i>Alteromonas macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i>	Pb(II)	316	Estudios de isoterma de biosorción en simple o bicomponente.	Loaëc y col., 1997
	Cd(II)	125		
	Zn(II)	75		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Cu resistente	Cu(II)	320	El EPS producido por <i>Pseudomonas</i> resistentes al Cu muestra mejor biosorción que el EPS producido por una <i>Pseudomonas</i> sensible al Cu	Kazy y col., 2002
<i>Enterobacter cloacae</i> AK-I-MB-71a	Cr(VI)	8,3	Biosorción estudiada por espectroscopia de fluorescencia de rayos X.	Arundhati y Paul, 2008
<i>Chryseomonas luteola</i> TEM05	Cd(II)	64,1	Estudio de isotermas de biosorción con EPS inmovilizado en perlas de alginato.	Arundhati y Paul, 2008
	Co(II)	55,2		

En los estudios de retención de metales por parte de EPSs se han utilizado sistemas en lote (*batch*) en los cuales el metal interacciona únicamente con el biopolímero, la biomasa junto con el EPS, o inmovilizándolo en pequeñas esferas de alginato. Por otro lado, como se muestra en la **Tabla 9**, es posible aplicar diferentes técnicas para el estudio de la retención de metales. Por ejemplo, estudios utilizando espectroscopia Infrarroja en el EPS producido por *Bacillus subtilis* ATCC 7003 y *P.aeruginosa* PA01 muestran que los grupos fosfato presentes en los enlaces fosfodiéster del ADN están implicados en la interacción con los centros de Fe en la goetita (Chen y col., 2000). La utilización de la técnica polarográfica ha demostrado que el EPS en el sobrenadante proveniente de un cultivo de *Desulfococcus multivorans* tenía la capacidad de complejar al ion Cu(II) (Bridge y col., 1999). Otro ejemplo es el uso de microscopía electrónica de barrido (*SEM* por sus siglas en inglés) en el estudio del EPS producido por *Desulfovibrio desulfuricans* mostrando interacción con los iones Zn(II) y Cu(II) (Arundhati y Paul, 2008).

Remoción de metales por EPS en biopelículas

Tal como fue explicado anteriormente, el componente principal en las biopelículas es el EPS junto con el agua. Este biopolímero envuelve e inmoviliza las células microbianas sobre una superficie sólida. En el medio ambiente las biopelículas son comunidades microbianas que se adhieren a partículas sólidas o sedimentos y se encuentran formadas principalmente por macromoléculas aniónicas (conteniendo principalmente grupos piruvato, ácidos urónicos o grupos fosfato) que interaccionan con otras moléculas, minerales y también con metales (Flemming, 1995). Muchos experimentos realizados en cultivos bacterianos puros han mostrado que el EPS juega un papel crucial en la sorción de sustancias inorgánicas, biomineralizando cationes metálicos y depositándolos en la matriz polimérica. En la **Fig. 9**, se muestra la estructura de las biopelículas y en la **Tabla 10** se resumen algunos ejemplos de biopelículas microbianas y diversos metales.

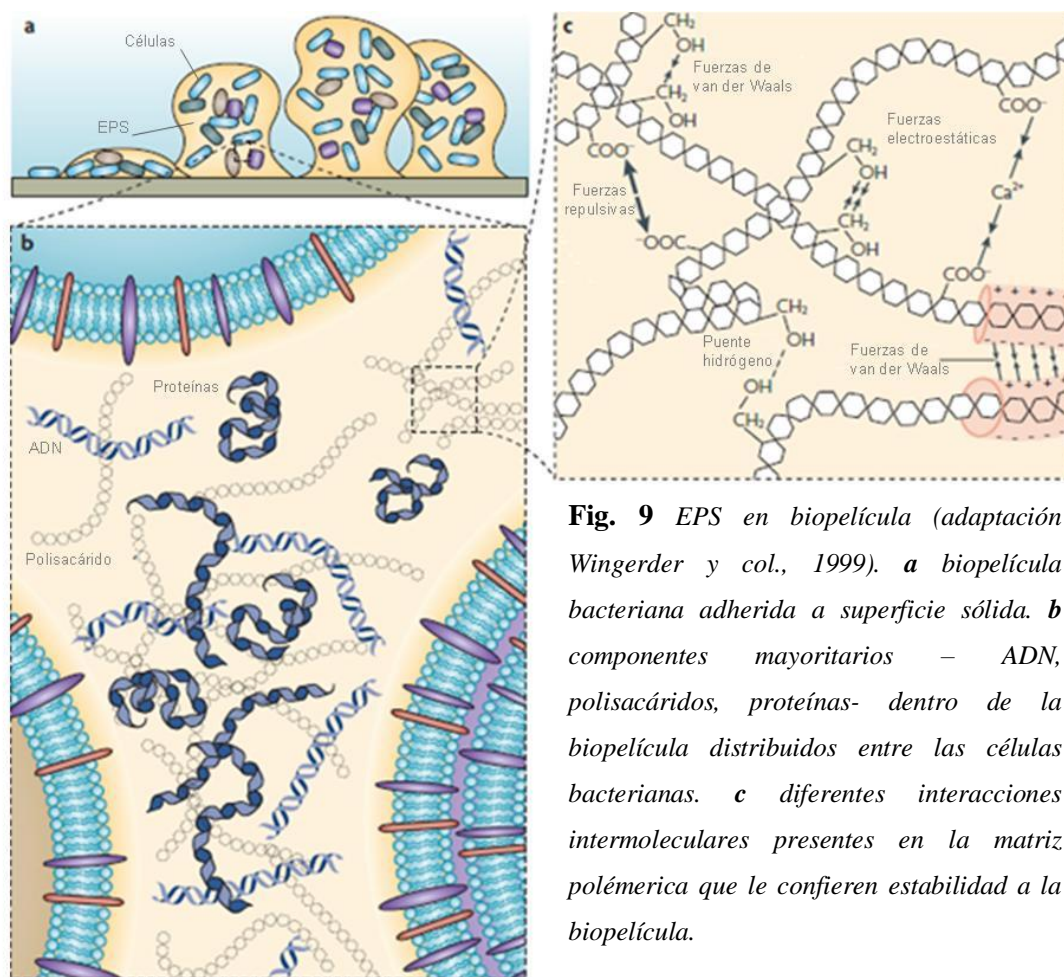


Fig. 9 EPS en biopelícula (adaptación Wingerder y col., 1999). **a** biopelícula bacteriana adherida a superficie sólida. **b** componentes mayoritarios – ADN, polisacáridos, proteínas- dentro de la biopelícula distribuidos entre las células bacterianas. **c** diferentes interacciones intermoleculares presentes en la matriz polimérica que le confieren estabilidad a la biopelícula.

La unión de los cationes metálicos a las biopelículas se encuentra fuertemente influenciada por la temperatura, el pH, la concentración de metal, la presencia de sustancias orgánicas y la biomasa. Adicionalmente, también se ha reportado que la relación carbono:proteína (C/P) influye en la remoción de los cationes en aguas residuales: por ejemplo, en sistemas de crecimiento *batch*, la sorción de Cu(II), Pb(II) y Ni(II) ocurre cuando la relación C/P es baja (Arundhati y Paul, 2008). Por otro lado, un método potencialmente aplicable para inmovilizar metales en aguas residuales es la utilización de bacterias sulfato reductoras (*SRB* de sus siglas en inglés), donde las biopelículas desarrolladas por estos microorganismos retienen los precipitados de metales como sulfuros dentro de la estructura polimérica. Para el cadmio, se observó que la acumulación de CdS en biopelículas va acompañada simultáneamente con un aumento del porcentaje de proteínas y polisacáridos en el EPS, indicando que la precipitación de sulfuros y la deposición en la matriz ocurre dentro de la biopelícula (White y Gadd, 2000; Pagnanelli F y col., 2010).

Tabla 10 Estudio de biosorción de metales por parte de diferentes biopelículas bacterianas.

Bacteria productora de la biopelícula	Metal biosorbido	Información de la biopelícula	Referencia
<i>Citrobacter</i> sp.	UO ₂	Biopelícula desarrollada en fermentador sin fuente de carbono usando anillos como soporte.	Finlay y col., 1999
	Ni(II)		
<i>Escherichia coli</i> PHL628	Zn(II)	Biopelícula crecida en sistema <i>batch</i> y sistema continuo en micropocillos, (<i>wells dishes</i>). La biosorción se estudió en microscopía de láser fotónico (LSM)	Hu y col., 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Co(II)	Biopelícula desarrollada en superficie de ZnSe. La biosorción fue estudiada por reflectancia atenuada de espectroscopía infraroja (ATR-IR)	Kangy col., 2006
	Cr(III)		
	Ni(II)		
<i>Pseudomonas veronii</i> 2E	Zn(II)	Biopelícula desarrollada en esponjas de poliuretano en sistema de crecimiento <i>batch</i> . Sorción de metal estudiada VPE, utilizando Voltamperometría de Preconcentración Electrolytica.	Vullo y col., 2008
	Cd(II)		
Cultivo mixto	Cu(II)	Biopelícula desarrollada en reactores de discos rotatorios.	Zhangy col., 2006
	Co(II)		

Remoción de metales por EPS en lodos activados

La utilización de lodos activados es el método más habitual en el tratamiento de aguas residuales y consiste en la degradación de contaminantes orgánicos por microorganismos en condiciones aeróbicas. Los lodos activados están compuestos principalmente por bacterias heterótrofas que pertenecen a los géneros de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Citrobacter* y *Zoogloea*, entre otras, las que secretan EPS que actúa formando un flóculo bacteriano jugando un rol fundamental en la retención de metales presentes en las aguas a tratar (Arundhati y Paul, 2008). Usando isotermas de adsorción se ha reportado que el EPS de los lodos activados es capaz de retener metales, con el siguiente orden de afinidad: $Zn(II) > Cu(II) > Cd(II) > Co(II) > Ni(II)$ (Arundhati y Paul, 2008), aunque otros estudios han reportado algunas diferencias relacionadas con la composición de los lodos. Algunos investigadores han reportado que los grupos funcionales carboxilo y fosfato son los más importantes en la complejación de los metales divalentes como $Pb(II)$, $Ni(II)$, $Cu(II)$ y $Cd(II)$ (Arundhati y Paul, 2008).

La cantidad de metal retenido por los lodos activados varía según el sistema estudiado. Por ejemplo, para el caso de $Cd(II)$, se observó una remoción de $2720 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de EPS en lodos activados de bacterias reductoras de sulfato (Zhang y col., 2006), mientras que utilizando lodos secos provenientes de otra planta de tratamiento se ha obtenido una sorción de $43 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de EPS (Choi y Yun, 2006).

Remoción de metales por biogránulos bacterianos

Al igual que otros agregados microbianos, como las biopelículas o los flóculos bacterianos, el EPS encontrado en biogránulos está compuesto por una variedad de polímeros (polisacáridos, proteínas, lípidos, ADN, sustancias húmicas, etc) que le confieren la posibilidad de ser utilizados para la remoción de metales. Se han estudiado principalmente dos tipos de biogránulos para esta finalidad: los gránulos aeróbicos producidos en reactores *batch* secuenciados (SBR de sus siglas en inglés), y los gránulos anaeróbicos producidos en reactores de lodos anaeróbicos de flujo ascendente (*UASB* de sus siglas en inglés), siendo éstos últimos los que dieron mejores resultados de biosorción de metales (Arundhati y Paul, 2008).

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer las condiciones óptimas para maximizar la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) por parte de *Pseudomonas veronii* 2E, obtener su composición química, estudiar su habilidad para interactuar con Cd(II) y explorar su potencial para la remoción de Cd(II) en efluentes acuosos.

Objetivos específicos

- ❖ Determinar las mejores condiciones en el medio de cultivo para la producción del EPS soluble por *Pseudomonas veronii* 2E;
- ❖ Optimizar las condiciones de producción de EPS soluble en el mejor medio de cultivo encontrado;
- ❖ Purificar el EPS soluble;
- ❖ Identificar los principales componentes dentro del EPS utilizando ensayos espectrofotométricos y FT-IR;
- ❖ Explorar las constantes de acidez de dicho producto;
- ❖ Estudiar la habilidad del EPS soluble para interactuar con Cd(II) utilizando la técnica de voltamperometría de preconcentración electrolítica (VPE);
- ❖ Separar las fracciones que componen al EPS soluble;
- ❖ Estimar la masa molecular de la fracción mayoritaria dentro del EPS;
- ❖ Estudiar la habilidad de las diferentes fracciones de interaccionar con Cd(II) utilizando VPE;
- ❖ Explorar sus aplicaciones biotecnológicas;
- ❖ Evaluar la utilización del EPS soluble para el tratamiento de efluentes acuosos con contenido de Cd(II);

RESUMEN

El conjunto de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son productos microbianos que son utilizados como por ejemplo como estrategia de supervivencia de los microorganismos en ambientes contaminados por metales. Estos compuestos de alta masa molecular pueden encontrarse unidos a las células o “solubles” en el medio líquido en el cual la bacteria se desarrolla. Están compuestos por una mezcla compleja de proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y otros compuestos poliméricos.

En este Capítulo se muestran los resultados obtenidos en la producción y caracterización estructural del EPS soluble (biopolímero no unido a la célula) producidos por *P. veronii* 2E. Se presenta la capacidad de interactuar con Cd(II) y su utilización para el tratamiento de aguas con contenido de Cd(II).

Palabras clave: EPS, *P.veronii* 2E, Cd(II), exopolisacáridos, LPS, FT-IR, HPAEC-PAD, Capacidad Complejante, biorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo experimental los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron analizados estadísticamente.

Producción de EPS soluble

Se determinó la producción de EPS y se expresó como $\text{g EPS} \cdot (\text{l} \cdot \text{DO})^{-1}$; donde g EPS corresponde a la masa de EPS seco, l corresponde al volumen de cultivo y DO a la biomasa como densidad óptica medida a 600 nm empleando un espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin-Elmer).

Efecto de la fuente de carbono y de nitrógeno en la producción de EPS soluble

Se probaron dos medios líquidos, uno rico (PY) y otro mínimo en nutrientes (M9).

En el medio PY se estudió la producción del biopolímero para diferentes concentraciones de glucosa (0,05%, 0,5%, 1%, 2% y 10% (m/v)) y tanto en M9 como en el medio PY se probaron diferentes fuentes de carbono en la producción del EPS soluble (citrato de sodio 0,5% (m/v), glutamato de sodio 0,5% (m/v), succinato de sodio 0,5% (m/v), glicerol 2% (v/v)) (*ver Anexo I: Composición Medios de Cultivo*). Para obtener el EPS, se inoculó en ambos medios la bacteria en un Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de medio en cultivo previo. Se lo incubó a 32 °C y 120 rpm hasta llegar a fase exponencial y posteriormente 10 ml de este cultivo se colocaron en un Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio fresco incubándolo hasta fase estacionaria. Se midió la densidad óptica final (DO). La obtención del EPS soluble se explica en la sección *Extracción y purificación de EPS soluble*.

Efecto de la temperatura en la producción de EPS soluble.

Para evaluar el efecto de la temperatura en la secreción del biopolímero, se incubó a *P. veronii* 2E en medio mínimo M9 a 25 °C y 30 °C, empleando diferentes fuentes de carbono (citrato de sodio 0,5% (m/v), glutamato de sodio 0,5% (m/v), succinato de sodio 0,5% (m/v), glicerol 2% y 5% (v/v), glucosa 2% (m/v)). Al igual que en el ítem anterior, se activó la bacteria en un pre-inóculo en un Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de M9 y se incubó hasta fase exponencial. Luego, 10 ml de cultivo se transfirieron a otro Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml de medio M9 fresco, y se incubó a la temperatura estudiada en las mismas condiciones que el preinóculo por 48 h (fase estacionaria). Se tomó el valor de la DO.

Adicionalmente, se exploró la utilización de glicerol proveniente de una planta de biodiesel (Malvinas Argentinas, Buenos Aires). El medio de cultivo fue M9 y la fuente de carbono utilizada fue crudo de glicerol en concentraciones 2% (v/v) y 4% (v/v). Se evaluó el efecto de la temperatura (25 °C y 32 °C), el pH (ajustando el valor de pH inicial = 7, o sin ajuste de pH), el tiempo de incubación (48 h y 72 h) y adición de extracto de levadura (0,01% (m/V)) en la producción de EPS.

Extracción y purificación parcial de EPS soluble

En la **Fig. 10** se esquematiza el tratamiento utilizado para la extracción y purificación parcial del EPS soluble. En esta etapa las células crecidas se separaron por centrifugación (7000 g, 15 min) y el EPS soluble presente en el sobrenadante se precipitó con el agregado de 2,2 volúmenes de etanol 96% (v/v), quedando en reposo *overnight* a -20 °C. Posteriormente, el EPS precipitado se separó por centrifugación (7000 g, 20 min, 4 °C), repitiendo los pasos de centrifugación y precipitación tres veces.

El medio de cultivo que registró una mayor producción de biopolímero fue seleccionado para producir EPS soluble y analizar su composición química y su capacidad complejante. Previamente a estos análisis, se agregó un paso más de purificación. A la fracción precipitada con etanol, se la resuspendió en el mínimo de agua destilada y se la dializó utilizando membrana de celulosa (Sigma Aldrich, MW>12400 Da) contra agua

MilliQ (Millipore Simplicity, 18,2 M Ω ·cm) por 48 h para remover especies de baja masa molecular (impurezas, sales, polímeros pequeños, etc.). Esta fracción se llamó **EPSpp**.

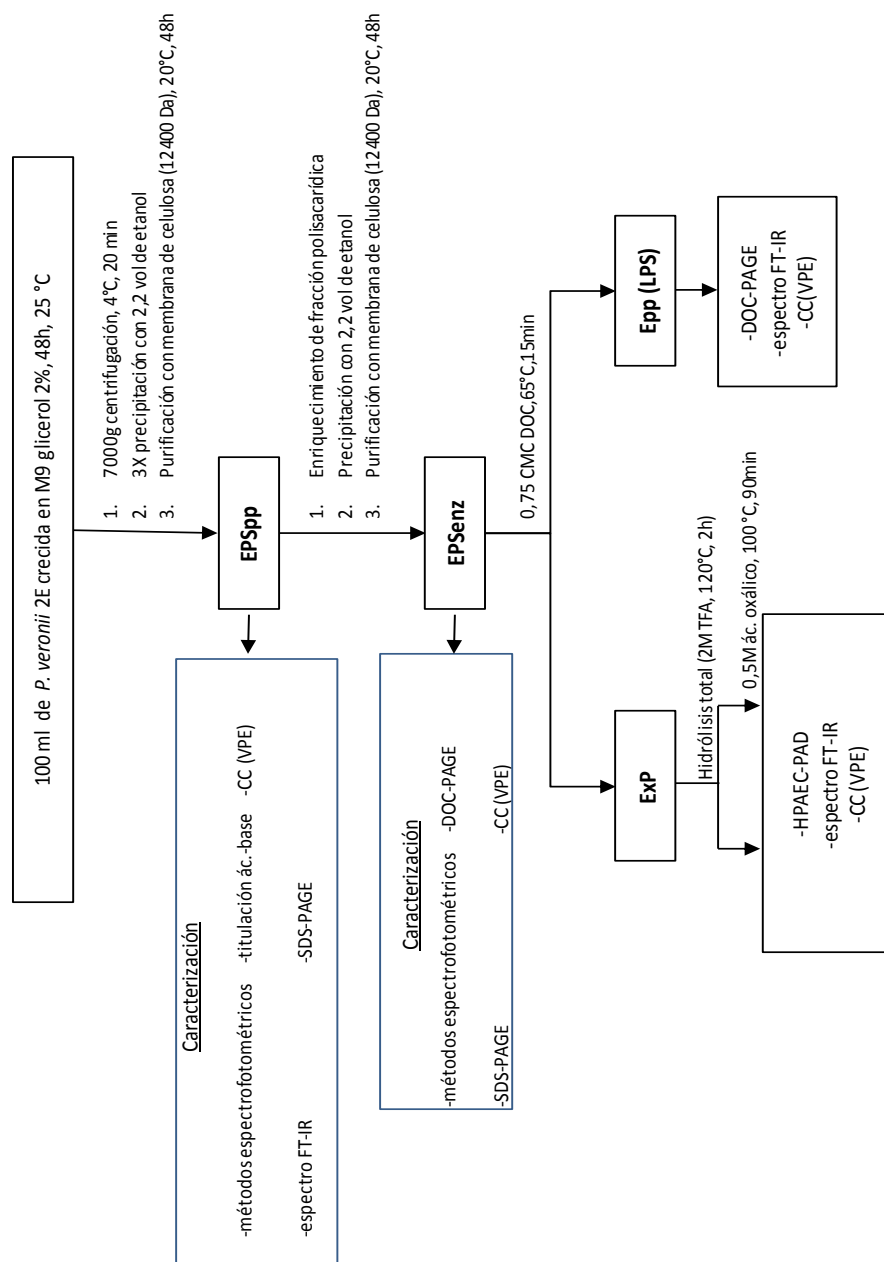


Fig. 10 Procedimiento de extracción y caracterización del EPS soluble producido por *P. veronii* 2E. EPSpp corresponde a EPS parcialmente purificado; EPSenz corresponde al EPS luego de tratamiento enzimático; Exp corresponde a exopolisacárido; Epp (LPS) corresponde a lipopolisacárido.

Purificación enzimática

Para obtener la fracción polisacáridica presente en el EPSpp, aproximadamente 2,2 g de EPSpp se resuspendieron en buffer TRIS 50 mM (pH 7,5) que contenía MgCl₂ 10 mM. A la solución anterior se le adicionó DNasa I (Sigma Aldrich) hasta llegar a una concentración final de 7 µg·ml⁻¹ y se incubó 4 h a una temperatura de 32 °C. Posteriormente se adicionó Proteinasa K (Embiotec) hasta una concentración final de 2,5 µg·ml⁻¹ y se incubó a la misma temperatura *overnight*. La mezcla anterior se calentó a 60 °C para desnaturalizar las proteínas y desactivar las enzimas adicionadas. Luego se centrifugó (7000 g, 20 min, 4 °C), se trató el sobrenadante con 2,2 vol. de etanol 96% (v/v) y se dializó nuevamente como se describió anteriormente. A esta fracción enriquecida en componente polisacáridico se la llamó **EPSenz**. Esta fracción obtenida se liofilizó obteniendo una masa total de 0,6 g, y luego se la almacenó a una temperatura de -20°C para análisis posteriores.

Obtención de exopolisacáridos: tratamiento con Desoxicolato (DOC)

Para obtener los exopolisacáridos del EPS y separarlos de los lipopolisacáridos (LPSs) presentes, al EPSenz se le realizó un tratamiento con Desoxicolato (DOC) (Kachlany y col., 2011). La muestra de EPSenz se redisolvió en una solución de buffer Tris 0,05 M que contenía NaCl 0,1 M. Se le adicionó DOC a una concentración final de 0,75 CMC (concentración micelar crítica) y se incubó la mezcla durante 15 min a 65 °C. Luego se enfrió en hielo y se le agregó ácido acético a una concentración final de 1% (v/v). Se centrifugó en microcentrífuga (20000 g, 5 min) para precipitar el LPS y el sobrenadante que contenía el exopolisacárido se liofilizó. A esta fracción se la denominó **ExP**. El pellet que contenía el LPS fue dializado empleando primero una membrana de celulosa (Sigma Aldrich, MW>14000) contra una solución que contenía Trizma base 4 mM en etanol 10%; luego se realizó una segunda diálisis contra agua MilliQ. Al producto de la diálisis se lo liofilizó y a esta fracción se la llamó **Epp** (contiene **LPS**).

Estimación de la masa molecular de ExP

Se utilizó una columna (82 cm x 1,5 cm) con fase estacionaria BioGel® P100 equilibrada con buffer Tris-HCl 0,02 M pH 6,8 y se eluyó con el mismo buffer.

Caracterización de la estructura química del EPS

Se realizaron diferentes caracterizaciones a las fracciones aisladas del EPS soluble (ver **Fig. 10**).

Métodos espectrofotométricos

Para la determinación de la presencia de azúcares neutros, ácidos urónicos (azúcares ácidos), proteínas y fósforo total en EPSpp y EPSenz se empleó un espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin-Elmer).

Proteínas

El método utilizado para la detección de proteínas fue el ensayo de Bradford (Sedmak y Grosserberg, 1977) y se basa en la interacción del colorante Coomassie Brilliant Blue G250 con las proteínas presentes en la muestra, resultando en una solución azul.

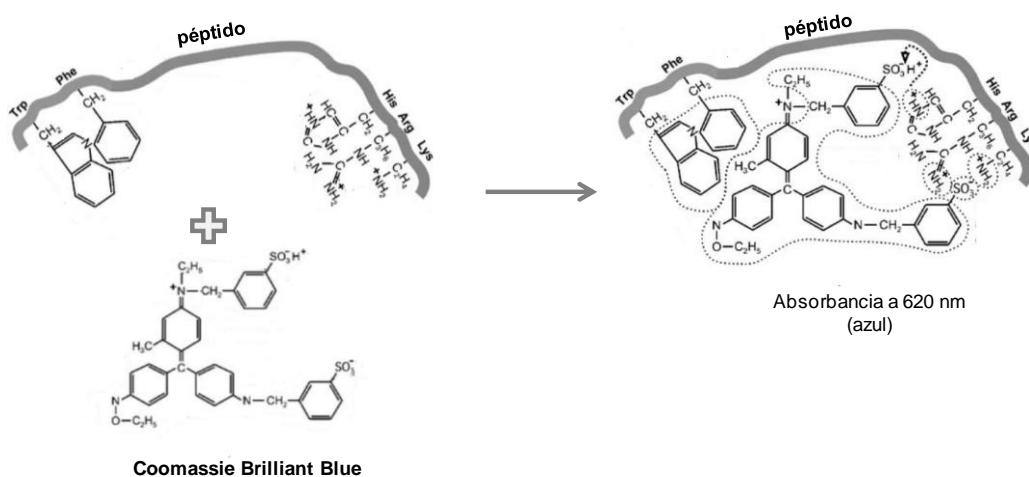


Fig. 11 El colorante Coomassie Brilliant Blue G250 se une a las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas, e interacciones electrostáticas con los aminoácidos básicos (adaptación Georgiou y col., 2008).

Reactivos: reactivo de Bradford, Coomassie brilliant blue G250 0,06% (m/v) en ácido perclórico 3% (m/v).

Se mezclaron 100 μ l de la muestra con 2 ml de reactivo de Bradford. El método empleado origina un complejo azul que tiende a agregarse pudiendo aparecer un precipitado que produce alteraciones en las medidas. Por tal motivo, la absorbancia a una

longitud de onda de 620 nm de las muestras se realizó dentro de los 20 min siguientes al agregado del reactivo.

Se realizó una curva de calibración utilizando como solución estándar albúmina bovina sérica 0,05% (m/v) (Sigma Aldrich). Los resultados fueron expresados como % (mg proteína total·(g EPSpp)⁻¹) o % (mg proteína total·(g EPSenz)⁻¹).

Azúcares Neutros

El contenido de azúcares neutros fue determinado utilizando el método de Antrona/ H₂SO₄ (Frolund y col., 1996). La antrona reacciona con los monosacáridos que por acción del H₂SO₄ fueron convertidos en furfural, para producir un compuesto aromático coloreado. La reacción es notablemente más sensible para hexosas que para pentosas.

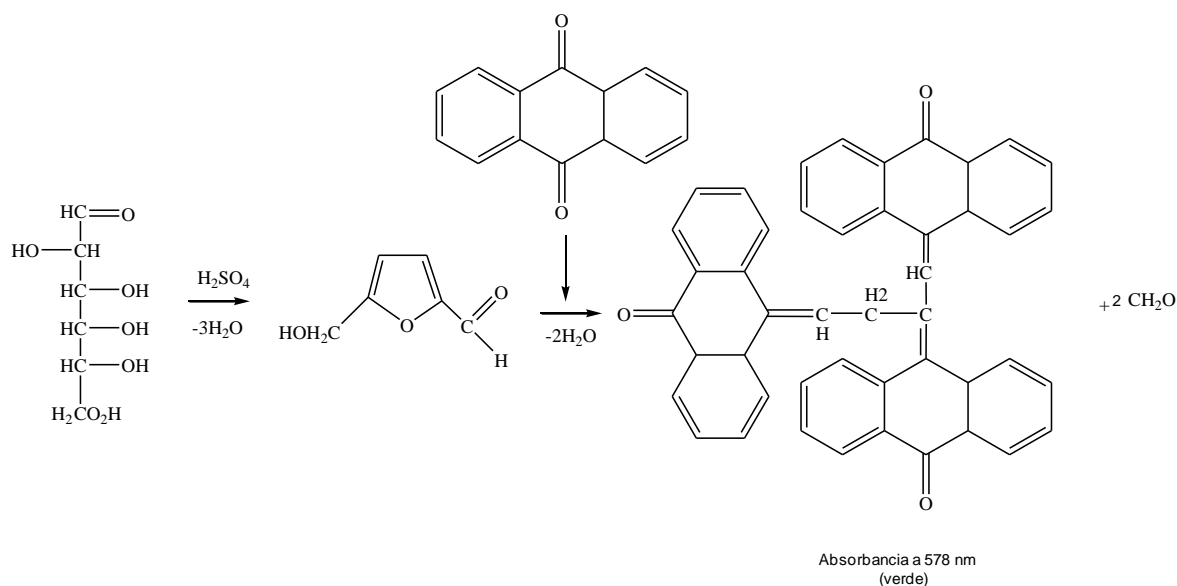


Fig. 12 Reacción de glucosa con antrona en medio ácido para obtener compuesto color verde (absorbancia 578 nm).

Reactivos: antrona 0,2% (m/v) en H₂SO₄ 75% (v/v).

Para la determinación, 1 ml de muestra se mezcló con 2 ml de solución de H₂SO₄ y 4 ml del reactivo de antrona. La mezcla fue calentada a 100 °C durante 15 min y luego colocada en un baño con hielo hasta llegar a una temperatura de 25 °C.

Se realizó una curva de calibración usando glucosa (100 mg·l⁻¹) como solución estándar y se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 578 nm. Se expresó el resultado como equivalente de glucosa, % (mg glucosa·(g EPSpp)⁻¹) o % (mg glucosa·(g EPSenz)⁻¹).

Ácidos Urónicos

Para la determinación de los ácidos urónicos se utilizó el método de Blumenkrantz con modificaciones de Filisetti-Cozzi (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973; Filisetti-Cozzi y Carpita, 1991). Los ácidos urónicos presentes en la muestra son hidrolizados por acción del H_2SO_4 que luego en presencia de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) reaccionan con 3-fenilfenol para dar un cromógeno rosa. La introducción de ácido sulfámico a la reacción realizada por *Filisetti y Cozzi* permite disminuir las interferencias causada por la presencia de hexosas (Hasta donde sabemos, el mecanismo no se ha publicado aún).

Reactivos: ácido sulfámico 4 M (pH 1,6), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 75 mM en H_2SO_4 97%, 3-fenilfenol 0,15% (m/v) en NaOH 0,5% (m/v).

Se mezclaron 700 μl de muestra con 40 μl de la solución de ácido sulfámico y 2,5 ml de la solución de tetraborato de sodio manteniendo la muestra refrigerada en hielo. Luego de una agitación vigorosa, la mezcla se calentó a 100 °C durante 20 min y luego se enfrió en baño de hielo. Cuando la muestra llegó a temperatura ambiente, se adicionaron 80 μl del reactivo 3-fenilfenol. Luego de transcurridos 5 min se midió la absorbancia a 525 nm.

La curva de calibración se realizó utilizando una solución de ácido galacturónico 0,1% (m/v) (Fluka). Se expresó el resultado como equivalente de ácido galacturónico % ($\text{mg á. galacturónico} \cdot (\text{g EPSpp})^{-1}$) o % ($\text{mg á. galacturónico} \cdot (\text{g EPSenz})^{-1}$).

Fósforo Total

El contenido total de fósforo fue determinado utilizando el método de azul de Molibdeno. El método se basa en la reacción de los fosfatos con el molibdeno produciendo un complejo coloreado (Bray y Kurtz, 1945).

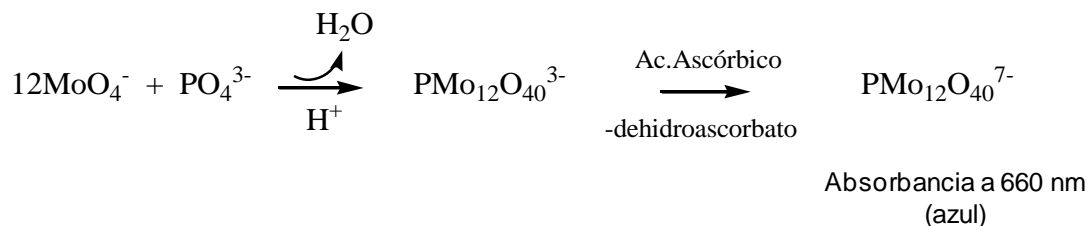


Fig. 13 Reacción de molibdato de amonio con fosfato para producir fosfomolibdato de amonio en medio ácido, luego es reducido por el ácido ascórbico a azul de molibdato.

Reactivos: $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 1,66% (m/v) en H_2SO_4 6% (v/v), ácido ascórbico 1% (m/v).

Se mezcló 1 ml de la muestra con 1 ml de la solución de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ y con 0,6 ml de la solución de ácido ascórbico y se llevó a un volumen final de 10 ml con agua MilliQ. Transcurridos 15 min se midió la absorbancia a 660 nm y se expresó el resultado como fósforo total. Se utilizó una solución de KH_2PO_4 $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para la curva de calibración. Se expresó el resultado como fósforo total, % ($\text{mg fósforo}\cdot(\text{g EPSpp})^{-1}$) o % ($\text{mg fósforo}\cdot(\text{g EPSenz})^{-1}$).

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) del material

El biopolímero parcialmente purificado (EPSpp) fue analizado utilizando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Esta técnica permite identificar de manera rápida grupos funcionales como carboxilos, fosfatos, hidroxilos, aminas y amidas que puedan estar presentes en el EPS (Schmitt y Flemming, 1998; Noghabi y col., 2007; d'Abzac y col., 2010). Para el registro de los espectros se colocaron aproximadamente 0,03 mg de muestra sobre una ventana de CaF_2 y se secó bajo corriente de aire a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min hasta obtener un film transparente, eliminando de esta manera el agua que interfiere en las mediciones. Los espectros fueron registrados de $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$, realizando 128 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} . Se purgó continuamente el sistema con N_2 para eliminar la interferencia de CO_2 y vapor de agua. El espectro fue registrado a temperatura ambiente en un espectrómetro Thermo Nicolet IS10 spectrometer (Thermo Scientific, MA, USA).

Las fracciones ExP y LPS también fueron analizadas utilizando FT-IR. Las condiciones utilizadas fueron idénticas a las descriptas para EPSpp.

El análisis del espectro IR fue realizado mediante el programa OMNIC (Nicolet Instrument Co., Madison, WI, USA). La asignación de los grupos funcionales se realizó de acuerdo a lo descrito previamente en literatura para el EPS (Lartiges y col., 2001; Comte, y col., 2006; Braissat y col., 2007; Parkin y Chorover, 2007; d'Abzac y col., 2010; Vijayabaskar y col., 2011)

Las mediciones fueron realizadas por el Dr. Gerbino, en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CONICET.

Determinación de pKa de grupos funcionales con características ácido-base

La determinación de los pKa (-log constante de acidez) se realizó por titulación potenciométrica. En una primera titulación se trabajó entre $11 > \text{pH} > 7$, utilizando como titulante una solución de NaOH 0,038 M, mientras que en la segunda titulación se exploró el intervalo $7 > \text{pH} > 3$, y se utilizó como titulante HCl 0,036 M. En cada titulación, se colocó en una celda una muestra de 25,0 ml de solución de EPSpp ($0,6 \text{ mg EPSpp} \cdot \text{ml}^{-1}$) y se realizaron incrementos de 50 μl . El pH fue medido luego de que el sistema se estabilizara usando un equipo 827 Metrohm pHlab. La temperatura en la celda se mantuvo a $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Se realizó un blanco de titulación contra agua (solvente de re-disolución del EPSpp).

Análisis por SDS-PAGE y DOC-PAGE

El método de separación electroforética, denominada **SDS-PAGE**, se basa en la migración diferencial de las moléculas en solución en un campo eléctrico. Este método de amplia aplicación se utiliza en la purificación y en la caracterización de proteínas, como también en el estudio de ácidos nucleicos. El soporte para realizar la migración diferenciada de las moléculas es el gel de poliacrilamida que contiene SDS como agente tensioactivo. Las proteínas se desnaturalizan y se unen al detergente quedando cargadas negativamente. Dependiendo del tamaño y de la cantidad de SDS unido, se puede estimar la masa molecular aparente de las proteínas utilizando marcadores de masa comercial.

Los análisis electroforéticos, se realizaron usando un Bio-Rad Mini-Protean II cell. Las muestras (EPSpp y EPSenz) se prepararon en el siguiente buffer (pH 6,8): Tris-base (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) 0,125 M, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, de azul de bromofenol $0,02 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Posteriormente se sembraron en el gel concentrador de poliacrilamida 4% 0,125 M Tris-base (pH 6,8), resuelto en un gel separador de poliacrilamida 12% 0,75 M Tris-base (pH 8,8). Los geles se corrieron en un buffer pH 8,3, que contenía Tris-base 0,02 M, glicerol 0,192 M y SDS 0,1% (gel concentrador: 17 mA, gel separador: 24 mA). Se utilizó un marcador de masa molecular (Bio Rad), corrido junto con las muestras. Luego de terminada la corrida electroforética, se tiñeron los geles con una solución de Coomassie Blue (0,125% (m/v) en metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) y posteriormente se decoloraron en una solución 50% (v/v) metanol y 10% (v/v) de ácido acético.

Por otro lado, se analizó la presencia de ExP y LPS utilizando separación electroforética con Desoxicolato de sodio (**DOC-PAGE**). El método es similar al SDS-PAGE, pero el soporte para realizar la migración electroforética contiene el detergente DOC en lugar del SDS. Nuevamente, dependiendo del tamaño de las moléculas y de la cantidad de DOC unido, pueden migrar de forma diferenciada. Este método permite diferenciar entre *smooth* LPS y *rough* LPS, la diferencia entre ambos es que el rough LPS no contiene en su estructura el antígeno-O) (Komuro y Galanos, 1988; Kachlany y col., 2011). Para los análisis del biopolímero por DOC-PAGE, la muestra (EPSenz, ExP y Epp) se disolvió en un buffer que contenía Tris-base 7% (m/v) (pH 6,8), azul de bromotimol 5% (m/v), DOC 0,25% y glicerol 2% (v/v). Las muestras se resolvieron en un gel concentrador 4%, DOC 0,5% y Tris-base 0,125 M (pH 6,8), resuelto en un gel separador de poliacrilamida 12% o 18%, DOC 0,5% y Tris-base 0,75 M (pH 8,8). Los geles se corrieron usando 100 V (Kachlany y col., 2011) y las bandas fueron detectadas con una solución de AgNO₃ (Krauss y col., 1988) o teñidos con Alcian Blue 0,05% (m/v) -solución AgNO₃ (Reuhs y col., 1998).

Análisis de la composición de exopolisacáridos

La determinación de los monosacáridos presentes en la muestra se realizó mediante Cromatografía Líquida de Intercambio Iónico con Detección Amperométrica de Pulsos (HPAEC-PAD, por sus siglas en inglés, *High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*). Esta técnica cromatográfica permite la cuantificación directa de carbohidratos a niveles de picomoles. Se basa en aprovechar el carácter poco ácido de los carbohidratos para proporcionar separaciones selectivas a pH elevado, usando como fase estacionaria un intercambiador de aniones. En cuanto al sistema de detección, la amperometría de pulsos permite la detección directa de carbohidratos sin necesidad de derivatizados, además de proporcionar una elevada sensibilidad y selectividad frente a la naturaleza compleja de las muestras reales de carbohidratos (Gey y col., 1996).

La muestra que contiene los azúcares se hidrolizó utilizando ácido trifluoroacético 2 M durante 2 h a 120 °C. Luego la muestra se liofilizó y analizó en un sistema DX-3000 Dionex BioLC con detección de pulso amperométrica (HPAEC-PAD; Dionex Corp., Sunnyvale, CA). La separación de los azúcares se realizó por medio de una columna PA-20

(25 x 0,4 cm) conectada previamente a una precolumna PA-20 column (volumen inyectado 20 μ l, 100 ng).

Para el estudio de los azúcares neutros las condiciones que se emplearon fueron las siguientes: se utilizó una elución isocrática con una solución acuosa de NaOH 16 mM y un flujo de 0,4 ml \cdot min⁻¹. 2-deoxiglucosa fue usado como estándar interno. Para el estudio de los azúcares ácidos, se utilizó una elución isocrática con NaOH 50 mM y acetato de sodio 100 mM a un flujo de 0,4 ml \cdot min⁻¹. El ácido galacturónico se utilizó como estándar interno en este análisis.

Para todos los casos, se realizaron tres corridas independientes y se usaron patrones externos. Por otro lado, se compararon los cromatogramas obtenidos con estándares comerciales y con monosacáridos de ácidos D- manurónico y D- galacturónico obtenidos luego de una hidrólisis total de alginato comercial producido por *Algas Pardas 516 MA* (Sigma).

Un tratamiento adicional fue introducido con el fin de reconocer azúcares con sustituyentes piruvilados. Luego de una hidrólisis ácida del biopolímero Exp (ver **Fig. 10**) se adicionó una solución de ácido oxálico 0,5 M, y se calentó la mezcla durante 90 min a 100 °C (Cescutti y col., 1999).

Los estudios de los exopolisacáridos, SDS-PAGE y DOC-PAGE fueron realizados por la Dra. Alicia Couto en el departamento de Química Orgánica, CIHIDECAR, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Caracterización del material como ligando de Cd(II)

Reactivos utilizados

Las soluciones buffer utilizadas y sus características (rango de aplicación, pH de trabajo, etc.) están detalladas en la **Tabla 11**. Las soluciones buffer 0,01 M se prepararon en KNO₃ 0,05 M (electrolito soporte, Merck) y se llevaron al pH de trabajo con HCl o NaOH (Merck). Debido a que es importante que el entorno no interaccione con el Cd(II), las soluciones buffer seleccionados no interfieren formando complejos, por lo que son aptos para el estudio de la Capacidad Complejante (Ceretti y col., 2006).

La solución estándar de 10 mg \cdot l⁻¹ y 100 mg \cdot l⁻¹ de Cd(II) se prepararon por dilución de una solución patrón certificada de 1000 mg \cdot l⁻¹ (Merck Certipur).

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizó agua provista por un equipo Millipore Simplicity ,18MΩ·cm (agua MilliQ).

Tabla 11 Soluciones reguladoras utilizadas y sus características

Buffer	pKa (25°C)	Rango de pH de aplicación	pH de trabajo
MES Ácido 2-(N-morfolietansulfónico)	6,1	5,5 - 6,7	5,5; 6,2
HEPES Ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etansulfónico)	7,6	6,8 - 8,2	7,5; 8,1
BORAX Tetraborato de Sodio	9,14	8,0-9,5	9,2

El diagrama de especiación de Cd(II), **Fig. 14**, sirvió como herramienta para verificar que a valores de pH 9,2 (buffer Borax) la contribución de la especie $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$ es de apenas 17% en relación a la concentración de Cd(II) total máxima utilizada.

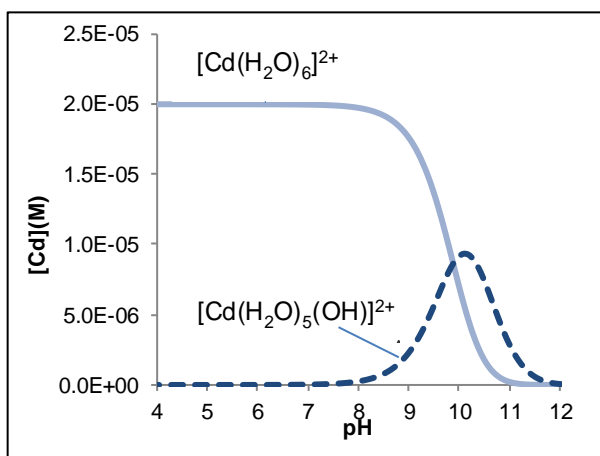


Fig. 14 Distribución de especies mayoritarias de Cd(II) en solución acuosa.

Instrumental

Se utilizó un potenciostato AutoLab PGStat10 (EcoChemie) y un polarógrafo Metrohm 663VA compuesto por un electrodo de gota de mercurio (HMDE). Los potenciales se midieron empleando un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl) y las medidas fueron realizadas a $(25 \pm 1)^\circ \text{C}$ bajo atmósfera de N_2 . El experimento fue monitoreado utilizando el software GPES (General Purpose Electrochemical System).

Titulación de EPSpp, EPSenz, ExP y LPS

La capacidad de EPSpp de interaccionar con Cd(II) en un rango de valores de pH de 5,5 - 9,2 se estudió utilizando voltamperometría de preconcentración electrolítica (VPE, ASV de sus siglas en inglés). El método consiste en medir el metal lábil luego de sucesivas adiciones de solución estándar de Cd(II). Para ello, se disolvieron 0,65 mg de EPSpp en 15,0 ml de la solución buffer que contenía el electrolito soporte. Luego de cada agregado de Cd(II), la solución se agitó durante 5 min (tiempo necesario para que el sistema llegue al equilibrio) y luego se burbujeó durante 2 min con N_2 . Todas las titulaciones se monitorearon por voltamperometría de onda cuadrada (VOC) y se utilizaron las siguientes condiciones: -0,75 V; tiempo de equilibrio: 5 min.; barrido de potencial: -0,8 a -0,25 V; escalón de potencial: 0,0051 V, amplitud del pulso: 0,01995 V, velocidad de barrido: $0,05 \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ y el tiempo de deposición fue de 30 s y 60 s.

Las titulaciones para estudiar la interacción entre EPSenz, ExP y LPS con Cd(II) se realizaron a valor de pH 7,5. Las condiciones utilizadas fueron idénticas a las descriptas para EPSpp.

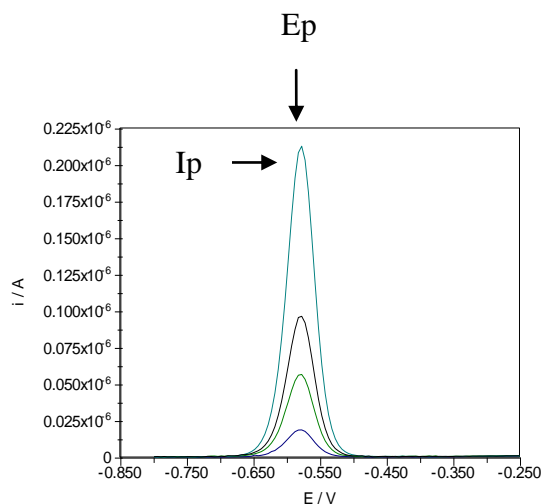


Fig. 15 Curvas de corriente vs potencial para sucesivos agregados de solución estándar de Cd(II).

La **Fig. 15** muestra una curva de respuesta típica de corriente vs potencial para la técnica de VPE aplicada a este sistema. Los parámetros que se obtienen utilizando el software GPES son: el potencial de pico (E_p) y la corriente de pico (I_p). Los valores I_p se emplean para obtener la curva de titulación y los demás parámetros de interés mediante las linealizaciones de Ruzic y Scatchard (*ver Anexo II: VPE- Fundamentos Electroquímicos*).

Tratamiento de residuos

Las soluciones acuosas que contenían metales fueron dispuestas en recipientes rotulados de plástico para su posterior tratamiento. El Hg usado en el electrodo de trabajo, fue almacenado en un recipiente de vidrio para una posterior limpieza y reutilización.

Lavado de material

Todo el material empleado para los estudios electroquímicos fue lavado con $KMnO_4$ (0,5 M), seguido de H_2O_2 (1 M), luego HNO_3 (1 M) y finalmente enjuagado con agua MilliQ. Este procedimiento permite eliminar materia orgánica y metales.

Estudio de aplicaciones biotecnológicas del EPSpp

Se estudiaron las siguientes aplicaciones para el EPSpp.

Floculación

La floculación por EPSpp se estudió utilizando el método propuesto por *Nakata y Kurane* (1999). Éste consiste en medir la disminución de la turbidez de una suspensión de caolín (arcilla blanca) como consecuencia de la presencia de un floculante. Para ello, se colocaron en cuatro tubos de ensayo 9 ml de una suspensión de caolín ($5,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) junto con 1 ml de CaCl_2 0,5 M y 100 μl de buffer HEPES 1 M. A uno de los tubos se agregó 1 mg de EPSpp, a otro 2 mg de EPSpp, a un tercero 1 mg de EPSpp y 1 ml de CaCl_2 0,5 M, y el cuarto tubo se utilizó como testigo. Luego de cada agregado, los tubos fueron agitados vigorosamente por 20 s y se los dejó reposar 5 min. Se midió la turbidez del sobrenadante en un espectrofotómetro a 550 nm y se observó la disminución respecto al tubo control (*Salehizadeh y Shojaosadati*, 2002).

Remoción de colorantes: verde de malaquita

Se estudió la capacidad del EPSpp de decolorar una solución de verde de malaquita (Cloruro de 4-{[4-(dimetilamino)fenil](fenil)metiliden}-N,N-dimetilciclohexa-2,5-dien-1-iminio; pka 6,90; Abs. Máx. 620 nm). Para ello, se prepararon 30 ml de una solución de verde de malaquita $8,0 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se ajustó el valor de pH a 7,0. Posteriormente, a 5 ml de la solución anterior se adicionó 1 mg de EPSpp y se incubó por una hora a 25 °C. Luego se centrifugó la solución (7000 g, 15 min, 25 °C) y se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro. Se utilizó un tubo control al cual se realizó el mismo procedimiento pero sin adición de EPSpp.

Remoción de Cd(II) en biorreactor de flujo continuo

Se estudió la remoción de Cd(II) en un efluente modelo utilizando EPSpp. Para ello, el EPSpp se empaquetó en bolsas de diálisis (membrana de celulosa, Sigma Aldrich, MW>12400 Da) a las cuales se les realizó un tratamiento previo para remover cualquier

metal que pudieran contener. Este tratamiento consistió en hervir las bolsas de diálisis (tamaño 9 cm x 2 cm) en una solución de NaHCO_3 2% (m/v), luego se hirvió en solución EDTA 1 mM y finalmente se lavaron con agua MilliQ. Posteriormente, a una de las bolsas tratadas se agregaron 12 ml de una solución de EPSpp de concentración $3,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, y se la selló con el contenido. Se colocó la bolsa dentro de una jeringa de capacidad máxima de 65 ml, y se agregó un volumen total de 50 ml de una solución de CdCl_2 0,13 mM y de HEPES 10 mM, pH final de 7,5.

Con una bomba peristáltica de dos cabezales (Drive Watson Marlow 505S) se circuló desde la parte inferior de la jeringa la solución que contenía el metal (flujo constante $9 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$), y por la parte superior del dispositivo se conectó una manguera, conectada a otro cabezal de la bomba, que funcionaba manteniendo el volumen del “reactor” en 50 ml (ver **Fig. 16**).

Se tomaron muestras desde la salida superior del biorreactor (manguera conectada a receptor de solución tratada) a diferentes tiempos y el muestreo finalizó cuando la concentración de Cd(II) de la solución entrante fue igual a la concentración de la solución de salida.

Para disminuir el error por difusión del ion dentro de la bolsa, se realizó el mismo experimento descrito anteriormente pero utilizando agua MilliQ en lugar de la solución de EPSpp (experimento control). La capacidad de remoción de Cd(II) por parte del EPSpp se comparó con una resina de intercambio iónico comercial, Chelex ® 100, BioRad. Se pesó una masa igual a la utilizada para el EPSpp y se trabajó de la misma forma que la experiencia del biopolímero.

La concentración de Cd(II) se determinó utilizando la técnica VPE, utilizando el método agregado patrón.

Las mangueras (diámetro interno de 0,8 mm, de silicona curada al platino, Sanitech) y el material utilizado fueron previamente lavados y tratados como se describe en la sección *Caracterización del material como ligando de Cd(II)*.

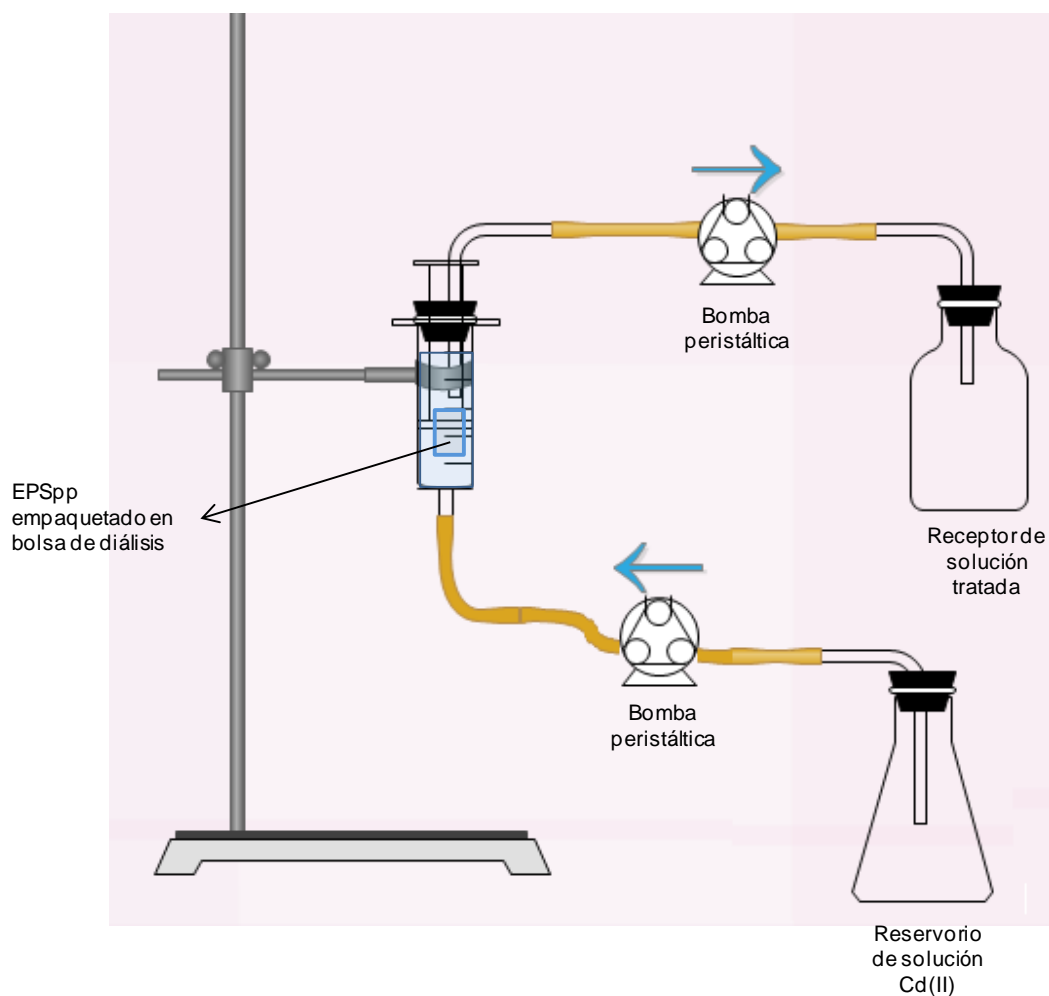


Fig. 16 Esquema del biorreactor utilizado en la sorción de Cd(II).

Cuantificación de Cd(II) por agregado patrón

Para cuantificar la cantidad de Cd(II) se utilizó VPE con detección por barrido de onda cuadrada. Las condiciones instrumentales para la determinación del metal fueron: $-0,75$ V; barrido de potencial: $-0,8$ a $-0,25$ V; escalón de potencial: $0,0051$ V, amplitud del pulso: $0,01995$ V, velocidad de barrido: $0,05$ V \cdot s $^{-1}$ y el tiempo de deposición fue de 30 s y 60 s. Se burbujeó la celda con N₂ durante 120 s, luego de cada agregado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de EPS soluble

Efecto de la fuente de carbono, nitrógeno y temperatura

La producción de EPS es sensible a muchos factores como la temperatura, la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y períodos de incubación (Sutherland, 2001; Arundhati y Paul, 2008; More y col., 2014). Por tal motivo, el primer paso fue obtener un medio de cultivo en el cual *P.veronii* 2E libere EPS soluble. Se decidió aislar, purificar y caracterizar este EPS en primer lugar por la simpleza de separarlo de las células bacterianas, en segundo lugar, por presentar la ventaja de ser parcialmente soluble en medios acuosos, lo cual facilitaría el análisis estructural y en tercer lugar, por ser los EPS solubles poco estudiados hasta el momento.

Para obtener el EPS soluble, se probaron dos medios líquidos en diferentes condiciones. La producción se estudió en primer lugar en un medio rico (PY) y a una temperatura de crecimiento celular de 32 °C, condiciones en las cuales se habían obtenido los mejores resultados en la formación de biopelículas en el laboratorio de Microbiología del la UNGS (Daniel y col., 2016). Se utilizó glucosa como fuente de carbono en diferentes concentraciones (0,05%, 0,5%, 1%, 2% y 10% (m/v)). Luego de separar el EPS producido y purificarlo parcialmente, se determinó su peso seco en cada caso y se expresó el resultado $\text{g EPS} \cdot (\text{l} \cdot \text{DO})^{-1}$. El resultado de dividir los gramos obtenidos de EPS por la DO lo hace independiente del crecimiento bacteriano, haciendo posible comparar la producción en los diferentes medios de cultivo evaluados.

Como muestra la **Fig. 17** el aumento de la concentración de glucosa en el medio de cultivo fue acompañado de un incremento de la producción de EPS. Por lo tanto en líneas generales y teniendo en cuenta que la fracción predominante en el EPS son los polisacáridos, se puede señalar que un aumento en la concentración de glucosa es un factor

importante para el crecimiento y producción del biopolímero. No obstante, cuando la concentración fue de 10% (m/v), se observó una inhibición en el crecimiento de la bacteria y como consecuencia no hubo secreción del biopolímero. Esto puede deberse a la disminución observada del pH del medio (pH final = 4) ya que un medio ácido podría afectar el metabolismo normal de la bacteria y la producción del exopolímero.

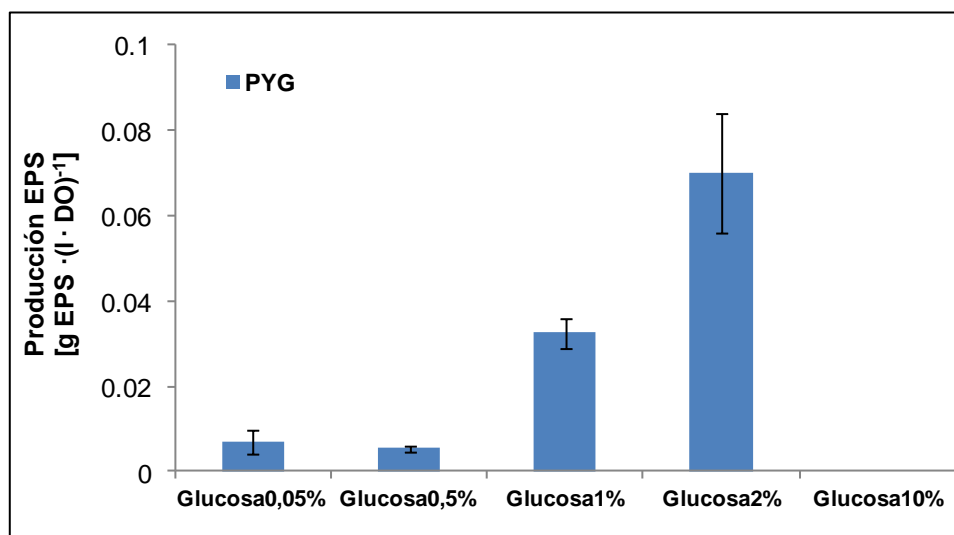


Fig. 17 Efecto del porcentaje de glucosa en la producción de EPS soluble en medio PY a una temperatura de 32° C.

Si bien la bacteria es capaz de utilizar eficientemente a la glucosa, se evaluó si *P.veronii* 2E posee la capacidad de producir EPS a partir de otras fuentes de carbono. Por otro lado, también se estudió la influencia en la producción del biopolímero de fuentes de nitrógeno inorgánicas (NH_4Cl en medio mínimo M9) en lugar de fuentes de nitrógeno complejas como son el extracto de levadura o la peptona de caseína presente en el medio de cultivo PY.

Como muestra la **Fig. 18**, la producción de EPS fue mayor en el medio M9, demostrando que la fuente de nitrógeno inorgánica incide positivamente en la producción del biopolímero. Se puede observar además que la producción depende de la fuente de carbono utilizada; los mejores valores se obtienen para citrato y glicerol en M9; $2,15 \pm 0,07$ g EPS · (l · DO)⁻¹ y $1,8 \pm 0,3$ g EPS · (l · DO)⁻¹ respectivamente.

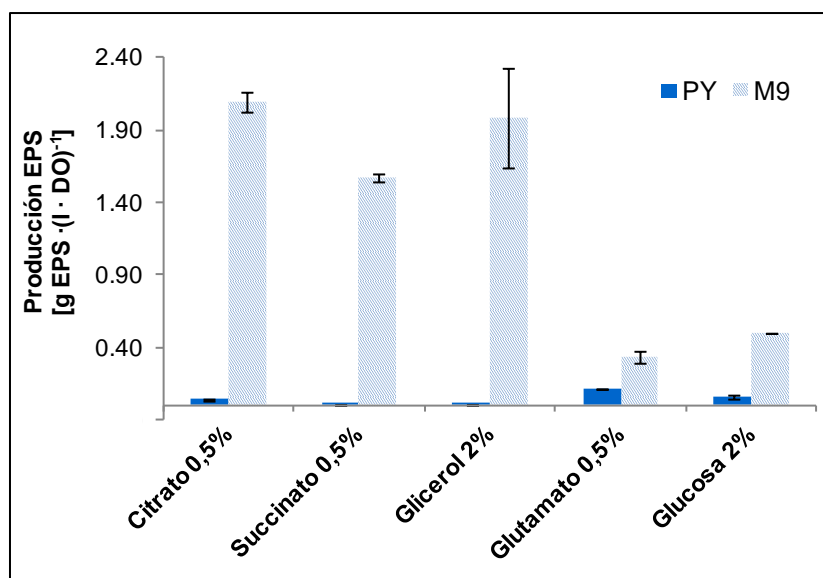


Fig. 18 Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de EPS soluble a una temperatura de 32° C.

En relación a los resultados obtenidos anteriormente, se evaluó el efecto de la temperatura en la producción de EPS por *P.veronii* 2E. De acuerdo a *Wingerder y col.* (1999), la temperatura es un parámetro importante en la producción de EPS. Por tal motivo, se trabajó a dos temperaturas (25 °C y 32 °C), en medio M9 y en iguales condiciones de fuente de carbono que en los ensayos anteriores.

Como se muestra en la **Fig. 19** la producción del biopolímero fue afectada por la temperatura. A 25 °C el porcentaje de EPS obtenido fue mayor en M9 glicerol 2% y M9 glutamato 0,5% ($(2,80 \pm 0,04)$ g EPS·(l·DO)⁻¹ en glicerol y $(1,0 \pm 0,1)$ g EPS·(l·DO)⁻¹ en glutamato). Sin embargo, las cantidades secretadas en las otras fuentes de carbono estudiadas fueron menores cuando se disminuyó la temperatura. Por otro lado, se probó si se obtenía una mayor cantidad de EPS cuando la concentración de glicerol en el medio se aumentaba a 5% (m/v), pero se obtuvo una menor cantidad que para glicerol 2% siendo $(1,88 \pm 0,02)$ g EPS·(l·DO)⁻¹.

Otros investigadores informaron que la gran mayoría de los biopolímeros presentan condiciones óptimas de producción cuando la temperatura es superior a 30 °C. Estos resultados están bien descriptos para exopolímeros como gelano, xantano o alginatos (Clementi, 1997; Leela y Sharma, 2000; Zhang y col., 2011). Contrario a lo anterior, en el caso de la bacteria psicotolerante *Pseudomonas fluorescens* BM07 se observó una

producción de exopolímeros óptima a 10 °C y una inhibición a 30 °C (Noghabi y col., 2007). Mancuso y col. (2005) reportaron que temperaturas subóptimas para el crecimiento de la bacteria *Pseudoalteromonas CAM*, se obtenía un rendimiento 30 veces superior en la producción del exopolímero. Otros autores coinciden en afirmar que la producción de exopolímeros se induce a temperaturas bajas debido a que el crecimiento bacteriano se hace más lento, disminuyendo la síntesis de constituyentes de la pared celular y por consiguiente, una mayor disponibilidad de precursores de EPS (Whitfield, 1988; Petry y col., 2000; Sutherland, 2001a).

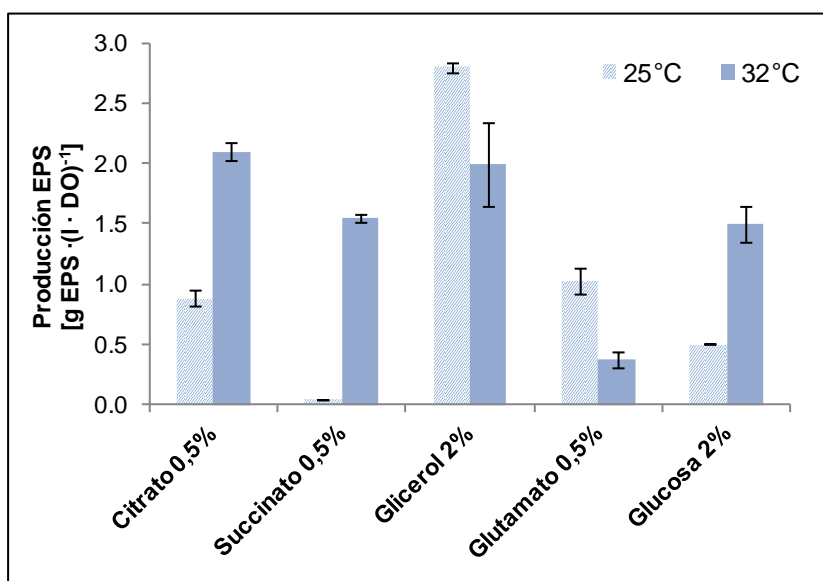


Fig. 19 Efecto de la temperatura sobre la producción de EPS.

Pseudomonas plecoglossicida A14, produce EPS con máximos rendimientos usando como fuente de carbono glicerol y etanol, (28 °C, 48 h) (Buthelezi, 2008); *Klebsiella sp.* utiliza como fuente de carbono glucosa (30 °C, 120 h) (More y col., 2014); con *Pseudomonas fluorescens* BM07 se obtienen los mejores resultados con sucrosa y ácido casamino, (10 °C, 140 h) (Noghabi y col., 2007). En conclusión, las mejores condiciones de producción de EPS dependen del microorganismo estudiado y del tipo de EPS, y tienen que ser exploradas en cada caso. Para *P.veronii* 2E las condiciones óptimas de obtención de EPS soluble fueron en M9 glicerol 2% (v/v) a 25 °C.

Por mucho tiempo, los carbohidratos han sido la fuente de carbono más utilizada para la obtención de los biopolímeros. En los últimos años se han comenzado a utilizar otras fuentes de menor costo, como son los subproductos industriales o aguas de desecho de la industria alimenticia (crudo de biodiesel, suero de queso o melaza de remolacha) (Olivera y col., 2007; Freitas y col., 2011). El glicerol es un subproducto mayoritario de la producción de biodiesel (10% de la producción de biodiesel corresponde a glicerol) y posee un costo de reventa considerablemente bajo. Recientemente se ha reportado que *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 utiliza como fuente de carbono el crudo de biodiesel para producir EPS (Freitas y col., 2009). Teniendo en cuenta lo anterior, se estudió la posibilidad de que *P. veronii* 2E secrete EPS soluble utilizando este tipo de sustratos. Para ello, se utilizó glicerol proveniente de una planta de biodiesel localizada en el partido de Malvinas Argentinas (Provincia de Buenos Aires). Se realizaron varios ensayos utilizando el medio de cultivo M9 y se varió la concentración del crudo (2%, 4% (v/v)), la procedencia del glicerol (crudo obtenido como subproducto de biodiesel a partir de aceites de cocina o de jabones de coco), el tiempo de incubación (48 h y 72 h), la temperatura (25 °C y 32 °C), el pH (ajustando el valor de pH inicial= 7, o sin ajuste de pH) y adición de extracto de levadura (0,01% (m/V)). Sin embargo, la producción de EPS soluble no se observó. Los cultivos presentaban grumos (posiblemente por la secreción de EPS unido). No obstante, hay que tener en cuenta que diferentes pasos metabólicos pueden aparecer al utilizar un sub-producto que contiene una determinada fuente de carbono. Esto se debe a que puede contener sustancias (como inhibidores) que afectan el crecimiento celular y también al biopolímero, conduciendo a menores porcentajes o composiciones diferentes de EPS. En la **Fig. 20** se muestra el medio de cultivo M9 con 2% de crudo de glicerol y 0,01% (m/v) de extracto de levadura (48 h, 32 °C).



Fig. 20 *P.veronii* 2E en medio M9 crudo de biodiesel 2% (v/v), extr.lev 0,01% (v/v), 48 h, 32 °C.

Extracción y purificación parcial de EPS soluble

Entre todas las condiciones evaluadas, la mejor para producir EPS por *Pseudomonas veronii* 2E fue en medio mínimo M9 glicerol 2% (v/v) a 25 °C. Para conseguir un producto más puro para las posteriores caracterizaciones químicas, se realizaron sucesivas precipitaciones con etanol y luego se dializó el polímero utilizando una membrana de celulosa con un corte de 12400 Da para eliminar impurezas remanentes como sales y polímeros de menor masa molecular (ver **Fig. 10**). Tal como se adelantó en Materiales y Métodos, a este producto parcialmente purificado se lo llamó **EPSpp**.

Una gran variedad de métodos de extracción y purificación se encuentran en bibliografía (Wingerder y col., 1999; Comte y col., 2007, Comte y col., 2008; Poul y col., 2010). Dentro de los métodos químicos más utilizados se hallan el uso de reactivos como EDTA (ácido etildiaminotetraacético), etanol, formaldehído, glutaraldehído o NaOH. Por otro lado, se han utilizado también técnicas físicas que implican sonicar, calentar, utilizar una resina de intercambio catiónico o combinar dos o más de estas técnicas. Los mejores porcentajes de extracción fueron encontrados utilizando métodos químicos. Sin embargo, un análisis posterior utilizando espectrometría IR mostró que existía una contaminación cuando se utilizaba EDTA, formaldehído o glutaraldehído (Klock y col., 2007; Chen Xu 2009; Rondel y col., 2013; More y col., 2014). Por tal motivo, el método de extracción seleccionado fue simple. Éste consistía en centrifugaciones combinadas con precipitación con etanol. La simpleza radica en los pocos pasos involucrados y el bajo costo de los elementos y reactivos usados. Además, no introdujo contaminantes que pudieran interferir con los análisis estructurales futuros.

Por otro lado, el método de extracción condiciona la composición del extracto en el que se encuentra el EPS. Por ejemplo, la utilización de resinas catiónicas conduce a la obtención principalmente de proteínas, la utilización de EDTA interfiere en los ensayos colorimétricos de caracterización (Comte y col., 2008) y utilizar calor o NaOH produce la hidrólisis de proteínas y polisacáridos presentes en las muestras (Karapanagiotis y col., 1989).

La técnica utilizada en este trabajo se basa en la solubilidad de los componentes presentes en el EPS en una solución de etanol/agua. Las moléculas de alta masa molecular precipitan mientras que las de menor masa molecular (menor a 100 Da) permanecen disueltas en la fase líquida. Esta técnica no solo permitió obtener la fracción polimérica, sino que también se utilizó como etapa de purificación, ya que las sales presentes en el medio de cultivo líquido quedan mayoritariamente en solución (Klock y col., 2007). La utilización de precipitaciones sucesivas (en el caso del presente trabajo de investigación se realizaron tres precipitaciones con etanol) combinadas con la diálisis de tamaño de corte de 12400 Da permitieron obtener y purificar los compuesto poliméricos de alta masa molecular presentes en el EPS soluble.

Caracterización de la estructura química del EPSpp

Métodos espectrofotométricos

El contenido de azúcares neutros, proteínas, ácido urónicos (azúcares ácidos) y fósforo total se observa en la **Tabla 12**. Los resultados están expresados en % mg componente·(g EPSpp)⁻¹.

Tabla 12 Porcentaje de los diferentes componentes presentes en EPSpp junto con el método utilizado

Componente	Método Colorimétrico	%
Polisacáridos neutros	Antrona	48
Ácidos Urónicos	m-hidroxidifenil / H ₂ SO ₄ / ácido sulfámico	1
Proteínas Totales	Bradford	37
Fósforo Total	Azul de Molibdeno	14

Los resultados obtenidos por espectrofotometría indican que el EPS está formado por una matriz compleja. Los componentes mayoritarios son los carbohidratos (48%),

mientras que en menor proporción se encuentra las proteínas y los compuestos que contienen fósforo (posiblemente LPS y/o ADNe).

Los **ácidos urónicos** se encuentran en menor proporción con respecto a los demás componentes presentes en el EPS. Estos le confieren un carácter aniónico a los polímeros, lo que es una propiedad interesante desde el punto de vista biotecnológico al ser potencialmente aplicables en tratamiento de efluentes conteniendo MRAs (como Cd, Zn, Cr, Hg, Pb). Además, el aumento del carácter aniónico dentro del polímero también hace posible su utilización como floculante.

Las **proteínas** atrapadas en el EPS no necesariamente se encuentran relacionadas a actividad enzimática. Algunas son estabilizadoras, actuando de nexo entre la superficie de las células y los polisacáridos presentes en la matriz polimérica. A su vez, *Navon Venezia y col.* (1998) mencionan que las propiedades emulgentes encontradas en los EPS producidos por algunos microorganismos son producto de la presencia de las proteínas disueltas.

Por otro lado, muchas de las exoenzimas pueden estar relacionadas con la degradación del biopolímero. El sustrato para estas enzimas extracelulares son polímeros solubles como los polisacáridos o proteínas o ADN (Flemming y Wingender, 2010).

Respecto de la determinación de fósforo, el método utilizado cuantifica el fósforo total, sin dar información de su origen, y podría estar asociado a ADN extracelular (ADNe) y/o a lipoproteínas, o lipopolisacáridos (LPS) atrapados en el polímero.

Inicialmente se creía que el **ADNe** era producto de la lisis celular causada por el método de extracción; cada vez más investigaciones están comprobando que estos compuestos son liberados a la matriz del polímero para cumplir con funciones específicas. Como se mencionó en la Introducción, el ADNe tienen un rol importante en la formación y estabilidad de las biopelículas.

A su vez, los lipopolisacáridos (**LPSs**) además de polisacáridos también contienen fósforo en su estructura y podrían formar parte del EPS. Estos compuestos podrían aportar al carácter hidrofóbico en la matriz del biopolímero. Sin embargo, no hay muchos estudios enfocados en la presencia y estructura de LPSs dentro de los EPSs.

En relación al contenido de los **polisacáridos**, éstos representan el componente mayoritario. Otros autores informaron resultados similares, confirmando que los polisacáridos son la fracción principal en el EPS (Frolund y col., 1996, Rondel y col., 2013; More y col., 2014). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el método de purificación emplea etanol, y que en esas condiciones se precipita principalmente este tipo de compuestos (Flemming y Wingender, 2010). A su vez, el método de detección utilizado en este trabajo sólo cuantifica los azúcares neutros, principalmente hexosas (Kamma Raunkjaer, 1994), mientras que la cuantificación de ácidos urónicos corresponde a los azúcares cargados.

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

La caracterización química del EPS también fue realizada utilizando espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), en un rango de frecuencia de 400 - 4000 cm^{-1} . Los perfiles del FT-IR obtenidos para el EPSpp muestran señales típicas para grupos carboxilos, amidas, fosfatos e hidroxilos correspondientes a diferentes moléculas (ver **Fig. 21**). Utilizando bibliografía y tablas de IR, se asignaron a las bandas más importantes los grupos funcionales y posibles compuestos asociados (ver **Tabla 13**). El espectro FT-IR muestra una intensa banda alrededor de 3200 - 3400 cm^{-1} , característicos de grupos hidroxilos (presentes en azúcares, ácidos urónicos, proteínas, ADNe y LPS), y también del enlace N-H presente en proteínas. La absorción a $\approx 2900 \text{ cm}^{-1}$ corresponde a estiramientos simétricos (ν C-H) del grupo $-\text{CH}_2$ característico de polímeros y el hombro a $\approx 1720 \text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento asimétrico de grupos C=O en $-\text{COOH}$ sugiriendo la presencia de grupos carboxilos en el EPS. Se observan bandas características de amida I a 1655 cm^{-1} (ν C=O y C-N) y amida II 1546 cm^{-1} (ν C-N y δ N-H) que corresponden a modos vibracionales relacionados con el enlace peptídico presente en proteínas. La banda que aparece en el rango de 1470-1430 cm^{-1} es debida a las flexiones C-H (δ C-H) de la cadena peptídica. El modo vibracional suave entre 1430-1390 cm^{-1} corresponde a estiramiento simétricos de los grupos iones carboxílicos (ν COO^- s) y el pico a 1251 cm^{-1} podría relacionarse con el estiramiento de los grupos fosfatos presentes en los ácidos nucleídos y LPSs (ν P=O). La absorbancia a 1155 cm^{-1} corresponde al estiramiento del grupo C-O-C, el pico a 1043 cm^{-1} a los estiramientos C-O-C y $-\text{OH}$, grupos funcionales presentes en

polisacáridos. En la zona de la huella digital se pueden observar picos suaves característicos de C-O-P presentes en compuestos con grupos fosfatos y de los grupos C-O-C presentes en los polisacáridos.

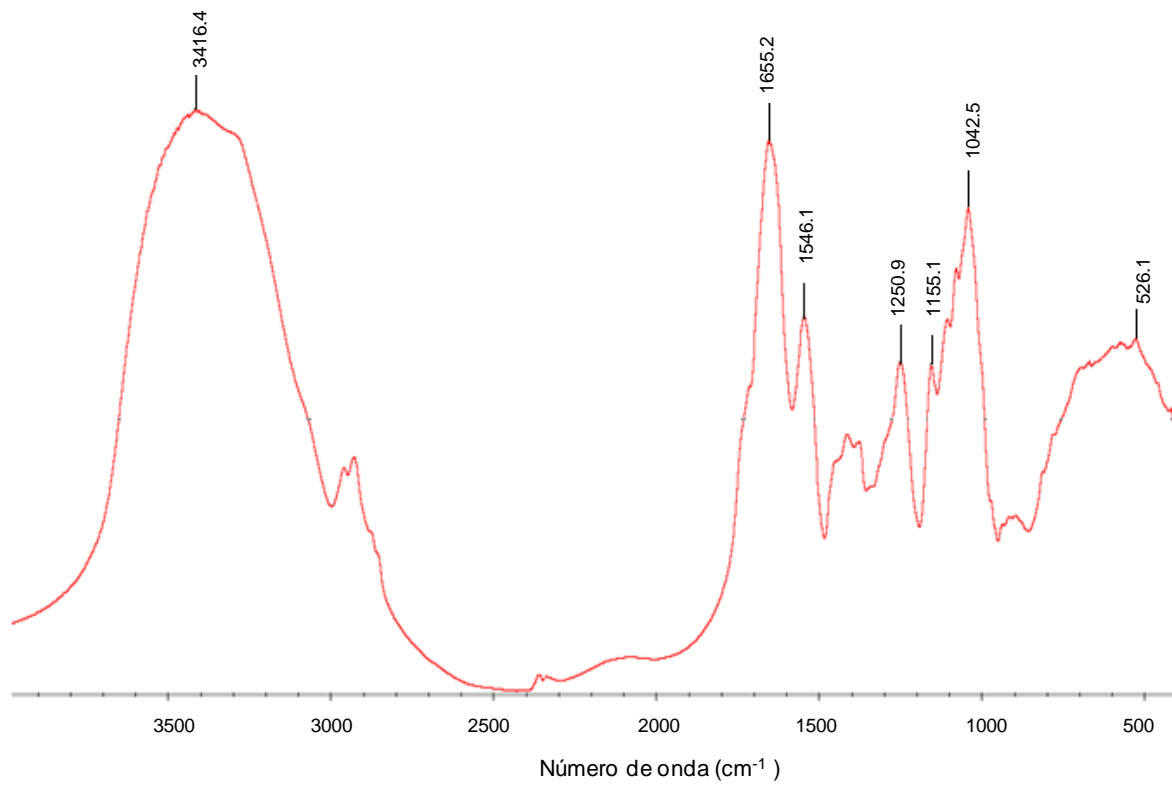


Fig. 21 Espectro FT-IR para el EPSpp

Tabla 13 Grupos funcionales presentes en el espectro FT-IR. ν corresponde al estiramiento; δ corresponde a flexiones; *s* corresponde a simétrico; *as* corresponde a asimétrico.

Número de Onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibración	Compuesto	Referencia
3416	ν O-H; ν N-H	Polisacáridos, peptidos	Braissat, y col., 2007; Comte, y col., 2006; Poul, y col., 2010
≈ 2900	ν C-H <i>s</i>	Compuestos orgánicos	d'Abzac, y col., 2010
≈ 2890	ν C-H <i>as</i>	Compuestos orgánicos	d'Abzac, y col., 2010
≈ 1720	ν C=O <i>s</i>	Polisacáridos,	Lartigesa, y col., 2001
1655	ν C=O y ν C-N(Amida I)	Uniones peptídicas	d'Abzac, y col., 2010
1546	ν C-N y δ N-H(Amida II)	Uniones peptídicas	Noghabia, 2007
≈ 1430-1470	δ C-H	Péptidos, compuestos orgánicos	Ramesh, y col., 2006
≈ 1430-1390	ν COO ⁻ <i>s</i> , ν C=O,	Polisacáridos	Noghabia, 2007; Tapia y col., 2011
1251	ν P=O <i>as</i>	Ácidos nucleicos, LPS	Eboigbodín y Biggs, 2008; Weia, y col., 2011
1155	ν C-O-Cs	Polisacáridos	Guibaud y col., 2003
≈ 1080	ν P=O <i>s</i>	Ácidos nucleicos, LPS	d'Abzac, y col., 2010; Parikh y Chorover, 2007
1043	ν -OH; ν C-O-C	Polisacáridos	Guibaud y col., 2003
<1000	Huella digital	Polisacáridos, grupo fosfato en ácidos nucleicos y LPS	Vijayabaskar, y col., 2011; Weia y col., 2011

Los grupos funcionales evidenciados en el espectro de FT-IR para EPSpp son consistentes con los resultados obtenidos en los ensayos espectrofotométricos.

Determinación de pKa de grupos funcionales con características ácido-base

Se determinó mediante titulación ácido-base el pKa de los grupos funcionales presentes en el biopolímero. En la **Fig. 22** se pueden observar los gráficos obtenidos para las dos titulaciones realizadas y sus primeras derivadas ($\Delta\text{pH}/\Delta\text{vol}$) donde los máximos corresponden a los puntos de equivalencia (máxima variación de pH) y los mínimos a los pKas (zona amortiguadora). A su vez, se utilizaron las segundas derivadas ($\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta\text{vol})/\Delta\text{vol}$) para obtener los valores de pKa's (estos datos no se muestran).

Los valores obtenidos para los pKa's fueron asignados utilizando valores de constantes de acidez obtenidas para biopolímeros informadas en bibliografía (**Tabla 14**). Cuatro pKa's fueron obtenidos: $\text{pKa}_1=3,6$ correspondiente a grupos carboxilo posiblemente presentes en ácidos urónicos (d'Abzac y col., 2010) o grupos fosfato (fosfodiéster) presente en ADNe o LPSs (Comte y col., 2006; Barkleit y col., 2008); $\text{pKa}_2=6,2$ y $\text{pKa}_3=7,0$ correspondientes a grupos fosfato (fosfatomonoéster) de LPSs (Barkleit y col., 2008), aunque el pKa_2 algunos autores lo asignan a grupos carboxilo presentes en los polisacáridos (Comte y col., 2006; Guibaud y col., 2006); y un $\text{pKa}_3=8,1$ característico de grupos aminos presentes en proteínas (Comte y col., 2006; Braissat y col., 2007). Los pKa's obtenidos pueden asociarse a los grupos funcionales observados en el FT-IR y los resultados de los métodos espectrofotométricos realizados.

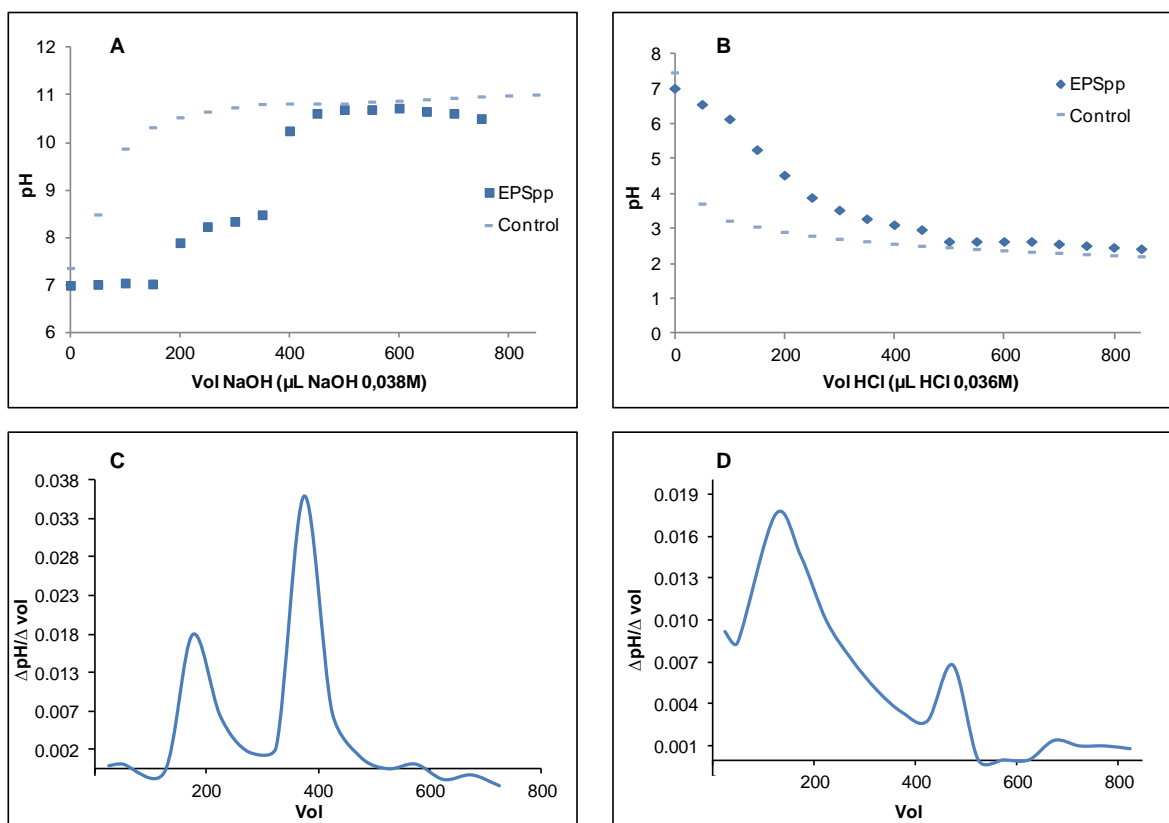


Fig. 22 Titulación ácido-base para el EPSpp producido por *P. veronii* 2E. **A** Curva de titulación con NaOH; **B** Curva de titulación con HCl; **C** primera derivada de la curva A $\Delta\text{pH}/\Delta\text{vol}$; **D** primera derivada de la curva B $\Delta\text{pH}/\Delta\text{vol}$.

Tabla 14 Constantes de acidez de grupos funcionales reportados en bibliografía para biopolímeros.

Grupo funcional	Rango pKa	Compuesto	Referencia
Carboxilo	2 - 6	Polisacáridos ácidos	Texier y col., 2000; Yee y Fein, 2001; Comte y col., 2006; Barkleit y col., 2008; Poul y col., 2010
Fosfatomonoéster	0,2 - 2,9 5,6 - 7,2	ADN; LPS	Texier y col., 2000; Martínez, y col., 2002; Guibaud y col., 2003; Guibaud y col., 2006; Barkleit y col., 2008
Fosfatodíéster	3,2 - 3,5	ADNA; LPS	Martínez y col., 2002
Amino	8 - 11	Proteínas	Guibaud y col., 2003

Caracterización del EPSpp como ligando de Cd(II)

En esta etapa del estudio se evaluó la capacidad que posee el EPS de complejar Cd(II) utilizando la técnica de VPE (*ver Anexo II: VPE- Fundamentos Electroquímicos*).

Como se explicó en la Introducción General, la sorción del metal involucra la interacción entre éste y los grupos funcionales presentes en el sorbente (EPS), mediante intercambio iónico, adsorción física y complejación. Los resultados obtenidos para los estudios espectrofotométricos, de FT-IR y de titulación ácido-base mostraron que el EPS contiene polisacáridos, proteínas, ácidos urónicos y compuestos que contiene fósforo (como ADNe y LPSs). Por lo tanto, el EPS es una matriz compleja que contiene grupos ionizables (como carboxilo, amina, hidroxilo y grupos fosfato) que podrían interactuar con Cd(II) de diferentes formas dependiendo del pH del medio.

Para evaluar la capacidad de interactuar con metales, y como los equilibrios se modifican por el pH, es necesario que éste se mantenga constante en la experiencia. Como se mencionó en Materiales y Métodos, los buffers empleados no solo deben amortiguar el pH sino que tampoco deben complejar el metal en estudio. Por lo tanto, de manera de garantizar la disponibilidad del Cd(II) se utilizaron MES, HEPES y BORAX (*ver Tabla 11*). Los dos primeros son conocidos como buffers de Good (Good y col., 1966) y son utilizados en estudios de sistemas biológicos por su baja capacidad complejante. La concentración a emplear se seleccionó teniendo en cuenta la utilizada por otros autores (Ceretti y col., 2006) y la capacidad amortiguadora del mismo para los diferentes agregados de solución patrón que se realizaron durante las titulaciones. Al finalizar el experimento se midió el pH final y para todos los estudios no se observaron cambios.

Los buffers cubrían el rango de valores de pH 5,5 - 9,2 en los cuales los diferentes grupos funcionales presentes en el polímero podrían estar protonados o no. Adicionalmente, a valores de pH mayores que 4 los grupos carboxilo y fosfatodiestéer se encuentran totalmente desprotonados y disponibles para interactuar con el metal; a valores de pH mayores que 6,2 además de los grupos carboxílico y fosfatodiestéer, los grupos fosfatomonoeéster se encuentran libres y disponibles para interactuar con el ion metálico (Barkleit y col., 2008). Por último, a valores de pH mayores a 9, además de los grupos funcionales anteriormente mencionados, los grupos amino tendrían que estar disponibles.

Además del cuidado en la selección del buffer, se debe emplear un tiempo de equilibramiento adecuado para alcanzar el equilibrio luego de cada agregado de metal. Se estableció un tiempo de 5 minutos para permitir que se forme el complejo debido a que este equilibrio se alcanza inmediatamente.

El tiempo de preconcentración (o tiempo de deposición) también es un factor importante cuando se realizan las titulaciones. Éste condiciona la sensibilidad de la detección: a tiempos de concentración largos se obtienen señales más intensas, lo que se traduce como un incremento de la pendiente en la curva de titulación. En la **Fig. 23** se muestra a modo de ejemplo la curva de titulación para el buffer MES a distintos tiempos de preconcentración; para todos ellos la respuesta fue lineal y no se observaron interacciones con el Cd(II).

Sin embargo, el tiempo total del ensayo se incrementa al aumentar el tiempo de preconcentración, como también la posibilidad de descomponer el complejo formado. Por lo tanto, es necesario llegar a una situación de compromiso. En la **Fig. 24** se muestra la evolución de E_p (potencial de pico) vs Cd_t (concentración de Cd(II) total, luego de cada agregado, a lo largo de la titulación de EPSpp). Este gráfico pone de manifiesto la labilidad electroquímica del complejo, debido a que el valor de E_p se modifica a lo largo de la titulación. Por lo tanto, para minimizar la descomposición del complejo y no incrementar la fracción de Cd lábil, el tiempo de preconcentración seleccionado fue de 30s y 60s.

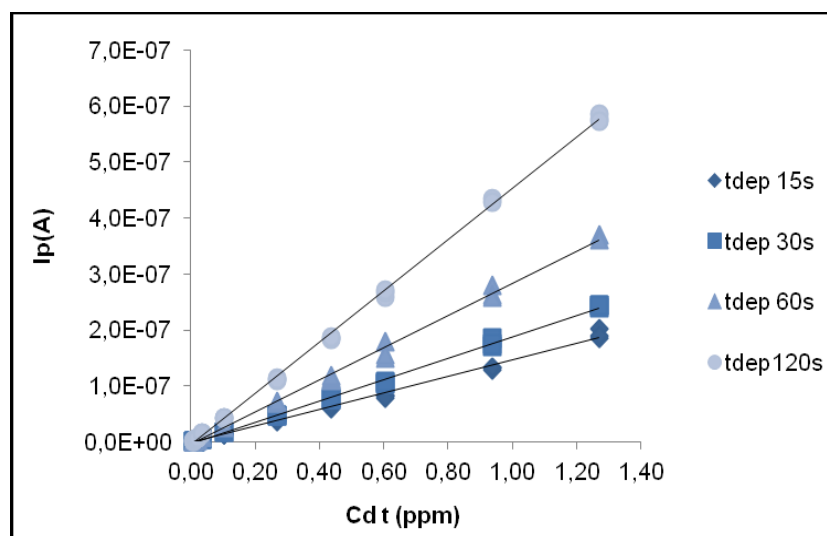


Fig. 23 Curva de titulación para diferentes tiempos de deposición. Buffer MES, pH 5,5.

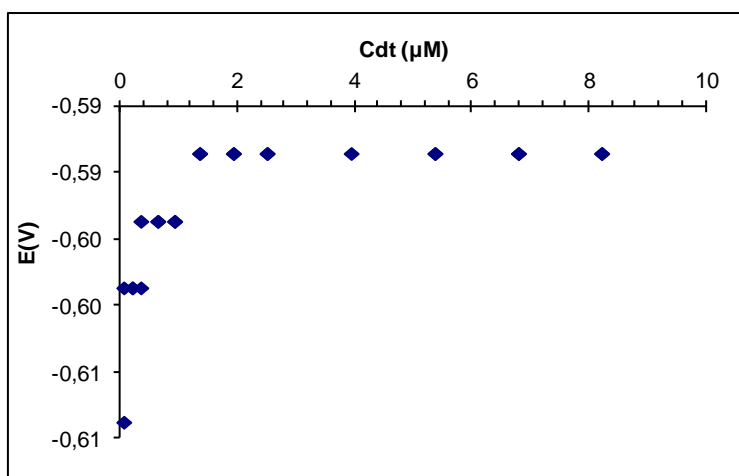


Fig. 24 Gráfico E_p vs C_{dt} , titulación de EPSpp en HEPES 0,01M pH 7,5, t dep 60s.

Las curvas de titulación realizadas a los diferentes valores de pHs se muestran en la **Fig. 25** y la **Fig. 26**. En cada una de las curvas se muestra la corriente de pico (I_p) obtenida luego de cada agregado de Cd(II) en función de la concentración total del metal (expresada como C_{dt}). También se muestra la curva de titulación en ausencia del EPS. Como se observa en las figuras, a los valores de pH 6,2, 7,5, 8,1 y 9,2 hay interacción EPS-Cd(II), y en todas las curvas se presentan dos zonas: la primera zona, donde se observa la curvatura, es la zona de complejación y guarda la información relevante para evaluar la interacción entre el ligando y el metal. La zona lineal refleja el exceso de titulante una vez que ha ocurrido la ocupación total de los sitios de unión al ligando.

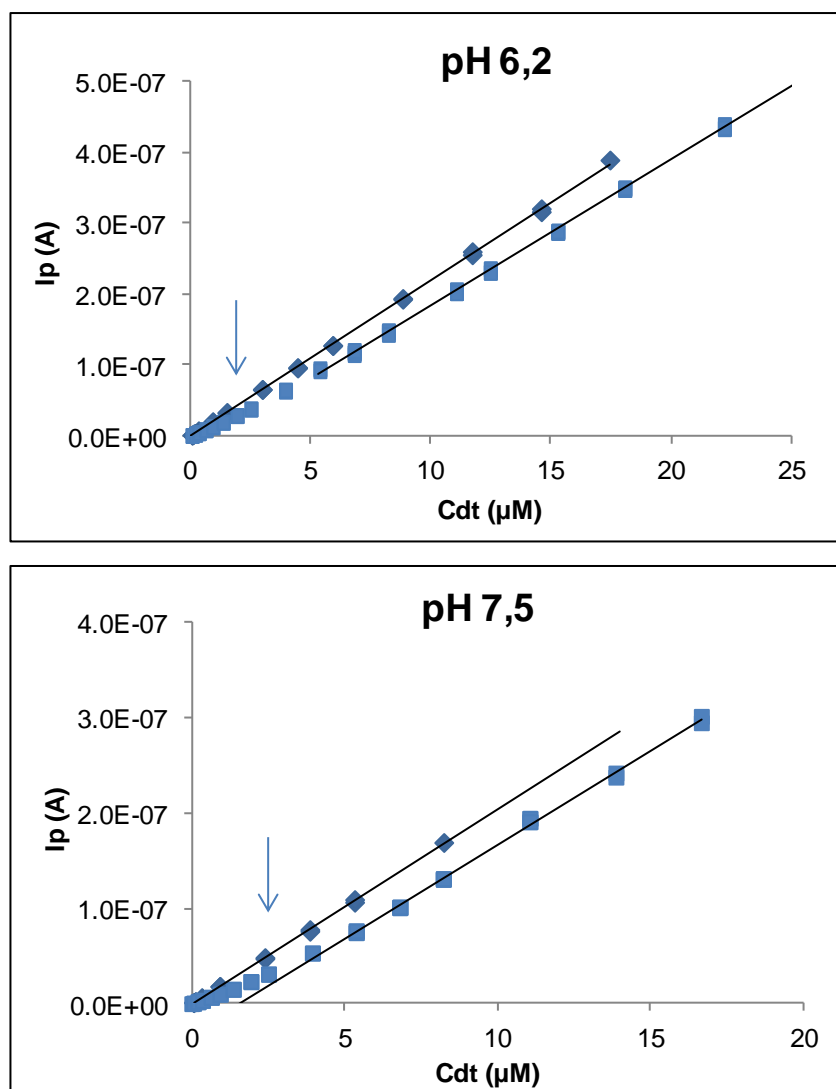


Fig. 25 Curvas de titulación de EPSpp con Cd(II) a pH 6,2 y 7,5 ; t_{dep} 30 s. (♦)buffer , (■)curva de titulación EPSpp con Cd(II), la flecha indica el comienzo de la zona lineal.

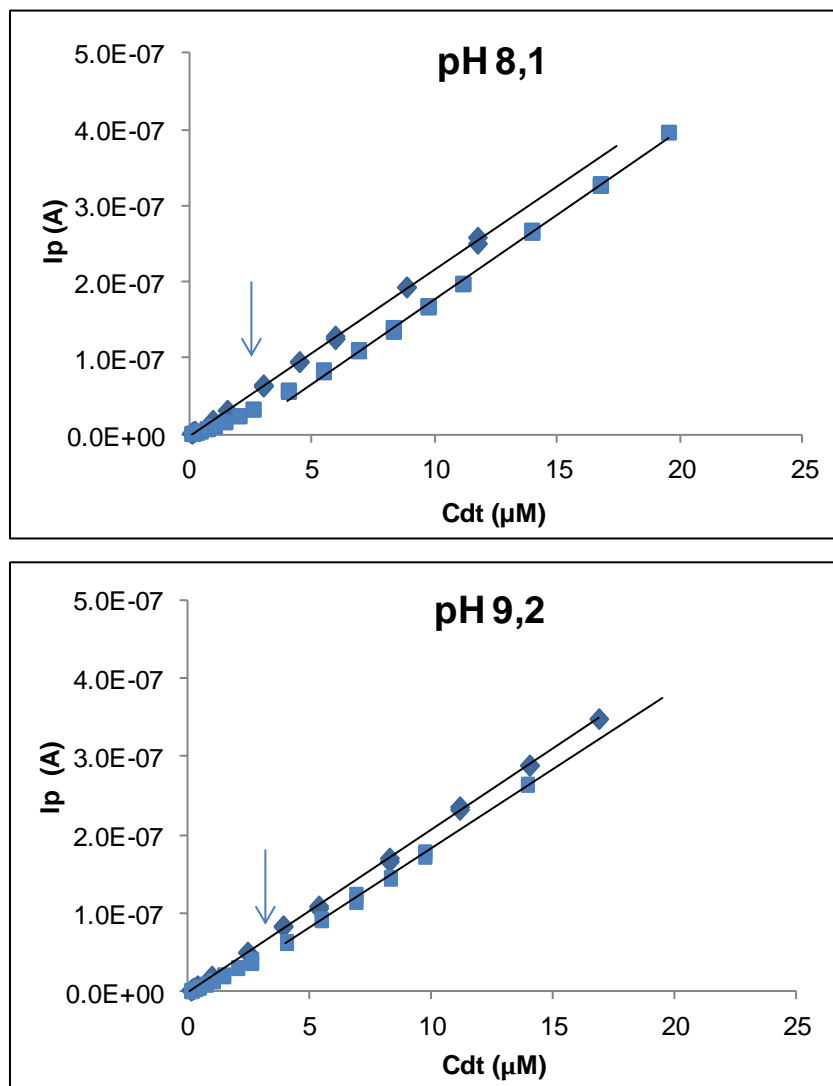


Fig. 26 Curvas de titulación de EPSpp con Cd^{2+} a pH 8,1 y 9,2; t_{dep} 30 s. (♦)buffer, (■)curva de titulación EPSpp con Cd(II), la flecha indica el comienzo de la zona lineal.

El análisis de los datos aplicando las linealizaciones de Ruzic y Scatchard permitió determinar la constante condicional K' y la concentración de sitios de unión. La **Fig. 27** muestra la linealizaciones realizadas para la curva de titulación a pH 7,5, en los otros valores de pH evaluados se obtuvieron curvas similares. Los gráficos concuerdan con la descripción para la formación de complejo 1 metal: 1 ligando. De la pendiente de linealización del modelo de Scatchard se obtiene la constante condicional y de la pendiente de la linealización de Ruzic se obtiene el valor de la concentración de sitios de unión expresado como μM de Cd(II) (Scarponi y col., 1996; Ruzic, 1996).

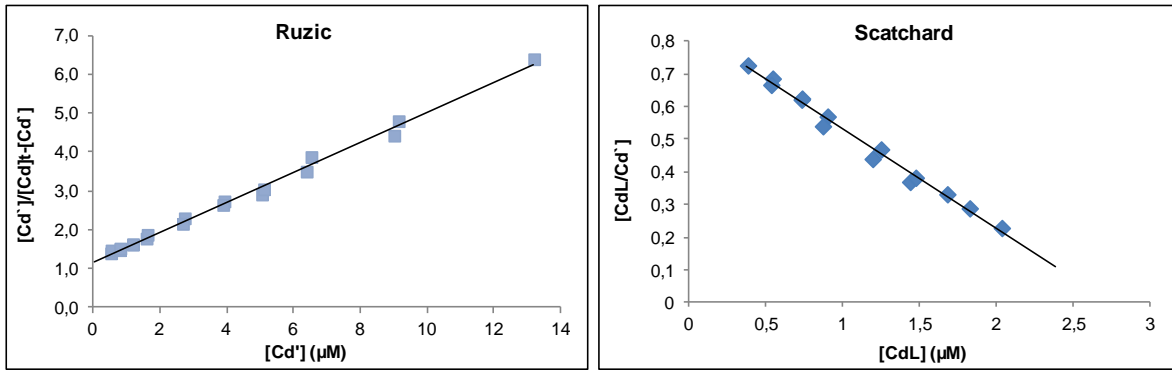


Fig. 27 Linealizaciones utilizando el modelo de Ruzic y Scatchard a valor de pH 7,5. $[Cd']$ es la concentración de metal libre; $[CdL]$ es la concentración del complejo y $[Cd]t$ es la concentración total del metal.

La **Tabla 15** muestra los valores de la constante de formación condicional (expresada como $\text{Log } K'$) y la concentración de sitios de unión (expresados como μmol de sitios de interacción de $\text{Cd(II)} \cdot (\text{g EPSpp})^{-1}$) para todos los valores de pHs evaluados. En todas las situaciones el resultado del producto de $[Lt] \cdot K'$ está comprendido entre $0,01 < [Lt] \cdot K' < 100$, dentro de la ventana analítica¹².

Como se puede observar, la constante de formación condicional no mostró cambios significativos con el incremento del pH. La misma observación se hizo para el número de sitios de interacción. Asimismo, al valor de pH 5,5 no se observó interacción EPSpp frente a Cd(II).

Tabla 15 Constante de formación condicional ($\text{Log } K'$) y la concentración de sitios de interacción ($[L_t]$) expresado como μmol de sitios de interacción de $\text{Cd(II)} \cdot (\text{gEPSpp})^{-1}$ a los diferentes pHs estudiados para Cd(II), * no detectado

	pH 5,5	pH 6,2	pH 7,5	pH 8,1	pH 9,2
Log K'	*	$5,48 \pm 0,05$	$5,47 \pm 0,01$	$5,48 \pm 0,08$	$5,61 \pm 0,01$
$[L_t]$	*	61 ± 2	65 ± 3	66 ± 6	48 ± 3

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la determinación de las constantes de acidez, se esperaba que el valor del pH afectara la concentración de los sitios de unión, sin embargo, las concentraciones se mantienen prácticamente constantes.

¹² La concentración de Lt expresada en M.

Se sabe que el pH del medio afecta el estado de ionización de los diferentes grupos funcionales presentes en el EPS (Lopez y col., 2000; Comte y col., 2006; Guibaud y col., 2012). Los grupos carboxilo, fosfato (fosfatodiéster, fosfatomonoéster), hidroxilo y amino en su forma desprotonada son candidatos a estar implicados en la unión con los iones metálicos. Por lo tanto, se esperaba que a valor de pH 5,5 los grupos asociados al pK_1 se encontraran ionizados para poder interaccionar con Cd(II). Al analizar la curva de titulación no se observaron cambios cuando se la comparó con la curva de titulación en ausencia de ligandos. Este resultado fue confirmado evaluando tiempos de equilibrios más largos (se probó hasta 24 h) y aumentando la masa de EPSpp en la celda electroquímica, sin embargo el resultado fue negativo. Una posible explicación, es que los grupos funcionales se encontraban fuera de la ventana analítica de trabajo, por lo tanto la interacción con Cd(II) no pudo ser detectada por la técnica de VPE.

Por otro lado, se esperaba hallar una mayor concentración de sitios de unión ($[Lt]$) a valores de pH 9,5 que a pH 7,5, debido a que a mayor valor de pH además de los grupos funcionales caracterizados por pKa_2 y pKa_3 los grupos amino se encontrarían desprotonados. No obstante, como muestra la **Tabla 15** no se observó un aumento de la concentración de los $[Lt]$ con el incremento del pH. Se plantean dos hipótesis para explicar el fenómeno observado: o bien la técnica de VPE no permitió discernir entre los diferentes grupos funcionales en función del pH, o los sitios de unión pueden haber estado ocupados por otro catión de mayor afinidad que el Cd. Este fenómeno fue reportado en la literatura para el caso de algas (Wang y Chen, 2009). Una tercera hipótesis puede ser planteada: la estructura tridimensional también afecta la unión de los iones al biopolímero. Según *Morlay y col.* (1998), la unión del catión a los sitios poliácidos no puede depender puramente de un proceso de intercambio iónico, este grupo de investigadores sugiere que esta interacción depende del tipo de contracción y de los cambios conformacionales que puedan ocurrir en el polímero. El EPS no es una molécula aislada, son polímeros que están interaccionando entre sí y con iones y otras moléculas del medio en el cual se encuentran. Por lo tanto, los sitios de unión a Cd(II) pueden no estar totalmente disponibles debido a la estructura tridimensional que adoptan.

Como se mencionó en la introducción, la mayoría de los trabajos estudian la sorción de iones metálicos en el EPS unido a células microbianas o en lodos activados. Por

lo tanto, de acuerdo a la información que se ha encontrado en bibliografía publicada hasta la fecha, los resultados del presente trabajo son originales.

En la **Tabla 16** se comparan las concentraciones de sitios de unión a Cd(II) y las constantes de formación reportadas para otros biopolímeros a un valor de pH = 7. Como se observa, las constantes de formación en el EPS de lodos activados y la obtenida para EPS de *P. veronii* 2E corresponden a ligandos moderados. Sin embargo, el número de sitios de unión (expresado como $[L_t]\mu\text{mol de Cd(II)}\cdot(\text{gEPS})^{-1}$) es mayor en el EPS estudiado en este trabajo, mostrando una ventaja en la utilización de este compuesto sobre otros informados.

Tabla 16 Constante de formación condicional ($\text{Log } K'$) y número de sitios de interacción ($[L_t]$ expresado como $\mu\text{moles de sitios de interacción de Cd(II)}\cdot(\text{gEPS})^{-1}$) para diferentes EPS ^a(Comte y col., 2008); ^b(d'Abzac y col., 2010); ^c(Guibaud y col., 2008); ^d PEC=capacidad de intercambio de protones.

Cd(II)	Log K'	$[L_t]\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ EPS
EPS de lodos activados ^a	$4,5 \pm 1$	21 ± 2
EPS de lodos activados ^b	-	$1,7 \pm 0,2$
EPS-2 de <i>Bacillus</i> ^c	$1,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1^d$
EPS de <i>P.veronii</i> 2E	$5,47 \pm 0,01$	65 ± 3

Enriquecimiento de la fracción polisacáridica

Análisis por SDS-PAGE y DOC-PAGE

Teniendo en cuenta que el componente mayoritario del EPS soluble secretado por *P. veronii* 2E en M9 glicerol 2% son los azúcares, se purificó de manera de enriquecer en esta fracción polisacáridica para un posterior análisis de los monosacáridos que la constituyen. Para ello, al EPSpp se le realizó un tratamiento enzimático (ver **Fig. 10**) que se basaba en el uso de DNasa y Proteinasa K para eliminar la fracción proteica y de ADNe. Para evaluar el éxito de este procedimiento, se realizaron los ensayos espectrofotométricos de cuantificación de proteínas, fósforo total, azúcares ácidos y azúcares neutros, y se los comparó con los obtenidos para EPSpp. Los resultados que se observan en la **Fig. 28**, muestran un enriquecimiento en la fracción polisacáridica, tanto de azúcares neutros como de azúcares cargados o ácidos. Se obtuvo un aumento del 32% de polisacáridos y una

disminución del 65% y de 50% en la fracción de proteínas y compuestos con fósforo, respectivamente.

El porcentaje de recuperación luego del tratamiento enzimático fue de de 30% mostrando que en el proceso de purificación no solo se eliminan proteínas y ADNe, si no también parte de la fracción correspondiente a polisacáridos. A la fracción tratada enzimáticamente se la llamó EPSenz (ver **Fig. 10**).

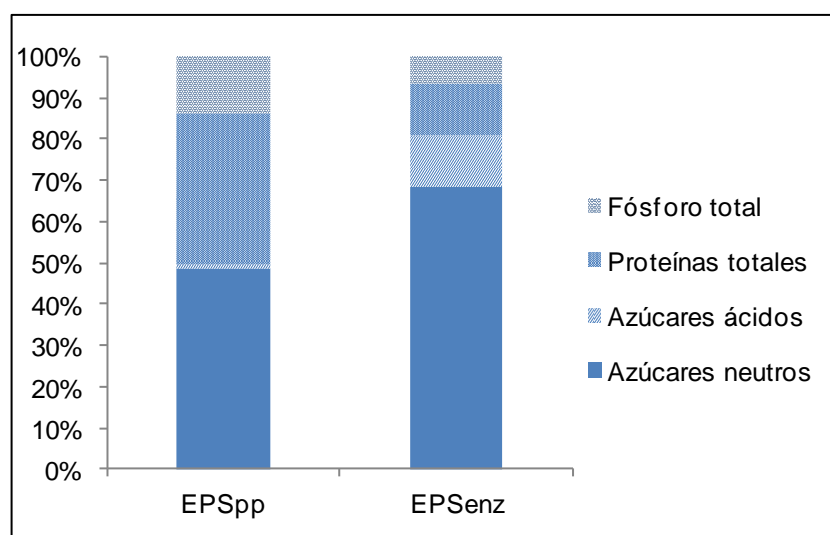


Fig. 28 Porcentaje de los diferentes componentes del EPSpp y EPSenz calculados $\text{mg componente} \cdot (\text{g EPSpp})^{-1}$ o $\text{mg componente} \cdot (\text{g EPSenz})^{-1}$.

La disminución de los componentes proteicos fue analizada también por SDS-PAGE. La tinción del gel con el colorante Coomassie Blue permitió visualizar los péptidos. En la **Fig. 29 A**, la calle 1 corresponde al EPS parcialmente purificado (EPSpp), la calle 2 al EPSpp luego del tratamiento enzimático (EPSenz) y la calle 3 a los marcadores de peso molecular. En la calle 1 se observa un banda correspondiente a proteínas de masa molecular comprendida entre 45 – 66 kDa, según bibliografía podría tratarse de flagelina (Kachlany y col., 2011). Luego del tratamiento enzimático esa banda desaparece, hecho que se observa en la calle 2. Por lo tanto, la proteína inicialmente presente en el EPSpp fue casi eliminada en su totalidad luego del uso de Proteinasa K. Estos resultados son consistentes con los analizados en el párrafo anterior para los ensayos espectrofotométricos.

Posteriormente a la fracción EPSenz se le realizó un tratamiento con desoxicolato (DOC) debido a la posibilidad de que exista LPS. Se decidió implementar este tratamiento previo al análisis de los azúcares, ya que el LPS contiene en su estructura polisacáridos (ver

Fig. 7), los cuales serían una interferencia cuando se estudie la composición de los monosacáridos presentes en la fracción de exopolisacáridos. El uso de esta técnica se basa en la diferente solubilidad que presenta el LPS y el ExP frente a este detergente. Consiste en utilizar el detergente DOC para precipitar el LPS, separándolo de la fracción polisacáridica que permanece en solución. Posterior al uso de DOC y luego del tratamiento de purificación, se obtuvieron dos fracciones: ExP 45% (m/m) y Epp 55% (m/m). La fracción ExP corresponde al purificado de exopolisacáridos y la fracción Epp corresponde a LPS (ver **Fig. 10**). Como confirma la **Fig. 29 B**, efectivamente el LPS estaba presente en EPSenz. En las calles 1 y 4 se sembró EPSenz, en la calle 2 y 5 Epp y en la calle 3 y 6 ExP. La tinción al posterior desarrollo del gel se realizó con AgNO_3 en el caso del gel DOC-PAGE 12% y con Alcian Blue y AgNO_3 en el caso del gel DOC-PAGE 18%. La tinción con AgNO_3 permite visualizar el LPS, mientras que la tinción de AgNO_3 junto con el colorante Alcian Blue permite visualizar tanto el LPS como el ExP. La ausencia de la banda de LPS en la calle 6 confirma que este tratamiento es adecuado para separar LPS de exopolisacáridos.

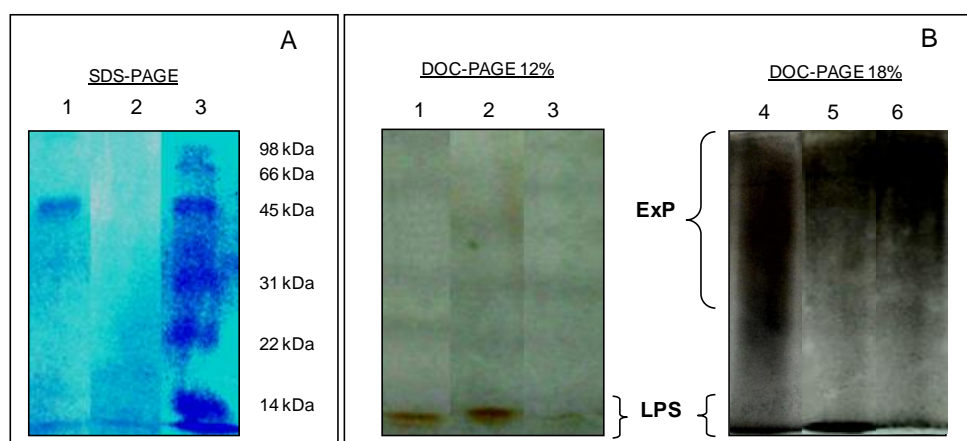


Fig. 29 A. Calle 1 EPSpp, calle 2 EPSenz y calle 3 marcadores resuelto en SDS-PAGE con tinción Coomassie Blue. B. Calle 1,2 y 3, EPSenz, Epp y ExP respectivamente resuelto en DOC-PAGE con tinción de AgNO_3 . Calle 4,5 y 6, corresponde a EPSenz, Epp y ExP resueltos en DOC-PAGE con tinción de Alcian Blue y AgNO_3 .

Por otro lado, el LPS puede encontrarse en dos formas diferentes: *rough* LPS o *smooth* LPS. El *smooth* LPS exhibe un patrón de bandas en los geles DOC-PAGE cuando son revelados con solución de AgNO_3 debido a la variedad del largo de la cadena de

polisacáridos en el motivo antígeno-O. El *rough* LPS, debido a la ausencia de esta parte de la estructura, exhibe una única banda (Knirel y col., 2006). Como se puede observar en la **Fig. 29 B**, las calles 1 y 2 solo muestran una banda. Esto podría deberse a la eliminación del antígeno-O por el tratamiento realizado o bien a la ausencia del mismo, sugiriendo en este último caso que el LPS presente en el EPSpp podría tratarse del tipo *rough*. No obstante, la degradación parcial del LPS no altera su interacción con el Cd(II), debido a que en el núcleo de su estructura se encuentra una gran densidad de grupos fosfato y carboxilo capaces de unirse a este metal.

Por otro lado la purificación y eliminación del ADNe presente en el EPSpp fue confirmada por HPAEC-PAD. Como se muestra en la próxima sección Análisis de la composición de exopolisacáridos, los cromatogramas no muestran presencia de estos compuestos.

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

La identificación de las diferentes fracciones ExP y LPS también fue analizada utilizando Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR). Las asignaciones de las bandas más características se realizaron utilizando lo reportado en la bibliografía específica para cada polímero y la **Tabla 13**. Los perfiles de FT-IR obtenidos para la fracción ExP y LPS se muestran en la **Fig. 30**. El ExP muestra señales típicas para grupos carboxilato (νCOO^-), carbonilo ($\nu\text{C=O}$) e hidroxilo ($\nu\text{O-H}$), como también se observa la señal correspondiente al grupo C-O-C presentes en las uniones glicosídicas del polisacárido. En relación al espectro obtenido para la fracción LPS, las bandas características y más importantes resultan ser $\nu\text{O-H}$ (en grupos fosfato y azúcares presentes en el núcleo), $\nu\text{C-H}$ (zona característica de ácidos grasos presente en la cadena A del LPS), $\nu\text{P=O}$ de grupos fosfato y $\nu\text{C-O-C}$ correspondientes a los azúcares presentes en el núcleo del polímero.

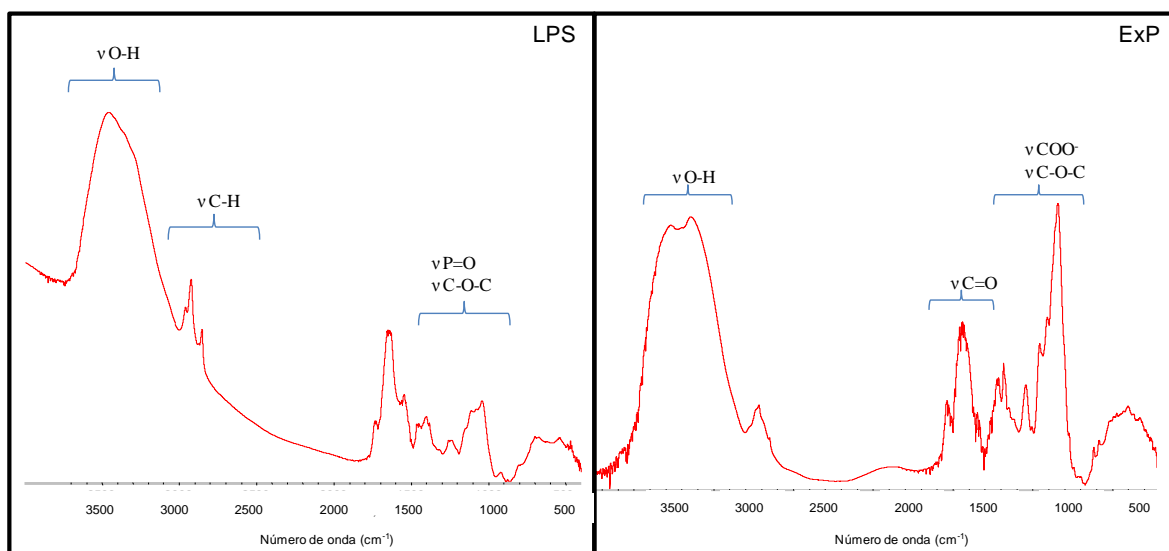


Fig. 30 Espectro FT-IR para el LPS y Exp.

Análisis de la composición de exopolisacáridos

Luego de obtener mediante el tratamiento con DOC la fracción de azúcares, se procedió al análisis de los monosacáridos presentes mediante cromatografía líquida de intercambio iónico con detección amperométrica (HPAEC-PAD). Como se discutió en la sección Materiales y Métodos, esta técnica es muy sensible y selectiva para azúcares.

Análisis de azúcares neutros y azúcares ácidos

El análisis por HPAEC-PAD de los exopolisacáridos reveló la presencia de cuatro azúcares neutros: fucosa ($t_R = 3,8$), galactosa ($t_R = 9,6$), glucosa ($t_R = 10,4$) y manosa ($t_R = 11,7$). Alguno de ellos también se encuentran como amino azúcares, galactosamina ($t_R = 6,6$) y la glucosamina ($t_R = 7,9$). Estos resultados se muestran en la **Fig. 31**.

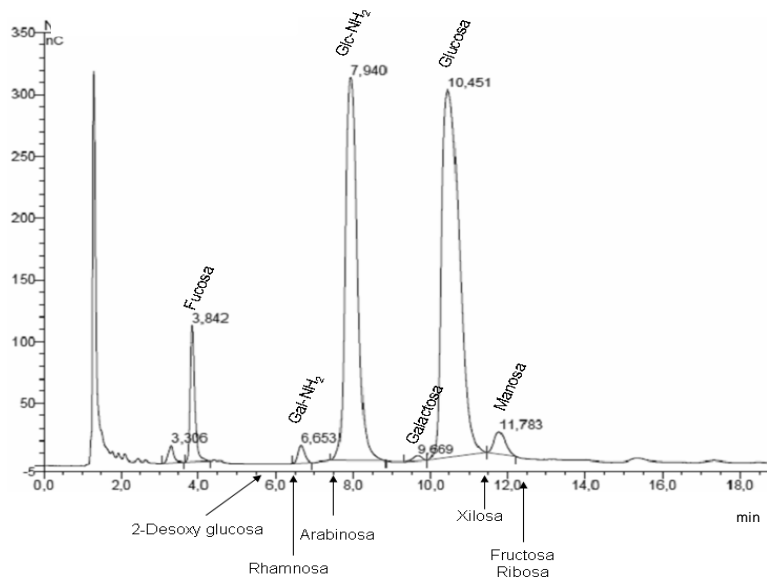


Fig. 31 Análisis de *Exp* por HPAEC-PAD. Azúcares neutros presentes en EPSpp producido por *P. veronii* 2E en medio M9 glicerol. Los monosacáridos presentes fueron obtenidos por comparación con patrones (fucosa, 2-desoxiglucosa, galactosamina, ramnosa, arabinosa, glucosamina, galactosa, glucosa, manosa, xilosa, fructosa, ribosa).

Por otro lado, el cromatograma correspondiente a azúcares ácidos permite identificar la presencia de dos picos importantes (**Fig. 32**). Uno de ellos fue reconocido como el ácido glucurónico ($t_R = 12,9$). Para identificar el otro pico ($t_R = 6,3$), se requirió el tratamiento con ácido oxálico, el cual reveló la presencia de un azúcar piruvilado ($t_R = 4,6$), (**Fig. 32.A y B**).

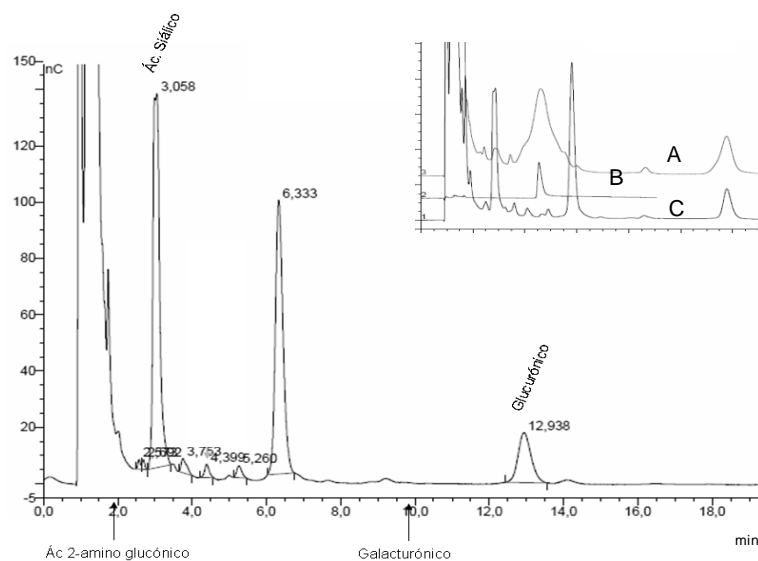


Fig. 32 Análisis de ExP por HPAEC-PAD. Azúcares ácidos presentes en el EPS soluble producido por *P.veronii* 2E en medio M9 glicerol. **A** Tratamiento con ácido oxálico. **B** estándar de ácido pirúvico. **C** hidrólisis ácida. Los monosacáridos presentes fueron obtenidos por comparación con patrones (ác. galacturónico, glucurónico, ác. 2-amino glucónico). El ácido siálico fue agregado como patrón interno.

Los resultados reportados aquí demuestran que el EPS producido por *P.veronii* 2E en medio M9 con glicerol como fuente de carbono está compuesto por heteropolisacáridos, y los monosacáridos hallados son similares a los encontrados en otras especies de *Pseudomonas* reportadas. Freitas y col. (2009) estudiaron la composición del exopolisacárido secretado por *P. oleovorans*, y observaron que estaba formado por glucosa, manosa, ramnosa, galactosa y azúcares piruvilados. Resultados similares fueron informados para *P. aeruginosa* G1 y *P. putida* G12 (Celik y col., 2008). Adicionalmente, se ha reportado que las condiciones de cultivo no afectan el tipo de azúcar de los exopolisacáridos microbianos, aunque influyen de forma importante en su conformación final, masa molecular, grado de sustitución y proporción de los distintos monosacáridos. Por lo general, el ácido glucurónico es relativamente frecuente en los exopolisacáridos microbianos, mientras que el ácido galacturónico se detecta con menor frecuencia (Conti y col., 1994).

Por otro lado, dado que la fucosa es un azúcar cuya ocurrencia es poco habitual, y cuya obtención es costosa y difícil, la posibilidad de sintetizarla a partir de *P. veronii* es de interés biotecnológico.

La masa molecular del ExP estimado mediante cromatografía de permeación resultó ser mayor a 80 kDa. En adición a lo anterior, existe una gran variabilidad en los valores informados en bibliografía para los exopolisacáridos. A modo de ejemplo el exopolisacárido producido por *Pseudomonas pseudomallei* posee una masa de 150 kDa (Steinmetz y col., 1995) y *Pseudomonas aeruginosa* produce alginato con una masa comprendida entre 300-1300 kDa (Freitas y col., 2011).

Caracterización de EPS enz, ExP y LPS como ligandos de Cd(II)

Se estudió la capacidad de las distintas fracciones contenidas en EPSpp de interactuar con Cd(II) utilizando la técnica de VPE. Teniendo en cuenta que el pH no afectaba la capacidad complejante frente a Cd(II) de los ligandos presentes en el biopolímero, se eligió trabajar a un valor de pH 7,5. Las concentraciones de ligandos y la constante de formación se obtuvieron utilizando los métodos de Ruzic y Scatchard.

EPSenz como ligando de Cd(II)

A partir de las curvas de titulación y de la linealización de Ruzic se pudo obtener la concentración de ligando total, siendo de $[L_t] = (496 \pm 14) \mu\text{mol de Cd(II)} \cdot (\text{g EPSenz})^{-1}$ (ver **Fig. 33** y **Fig. 34**). Se puede observar que la concentración de los sitios de unión aumentó de forma considerable luego del tratamiento con enzimas. Una posible explicación, es el enriquecimiento de los grupos funcionales que interaccionan con el Cd(II), producto de la purificación del EPSpp. El tratamiento con DNAsa permitió eliminar el ADNe, hecho que se verificó con los análisis de HPAEC-PAD. Asimismo, el tratamiento con Proteinasa K, eliminó las proteínas presentes, hecho confirmado al analizar por SDS-PAGE la fracción EPSenz.

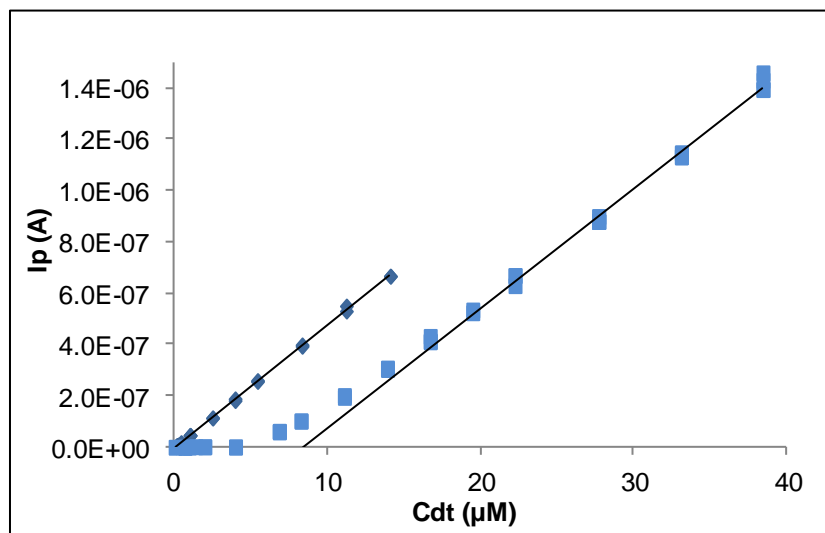


Fig. 33 Curva de titulación EPSenz con Cd(II) (t_{dep} 30 s, E_{dep} -0,75 V, t_{equil} 5 min, buffer HEPES pH 7,5). (♦)buffer HEPES, (■)curva de titulación EPSenz con Cd(II).

Con respecto al valor de K' , usando el modelo de Scatchard se obtiene $\log K' = 5,7 \pm 0,1$, consistente con la presencia de ligandos moderados (ver **Fig. 34**).

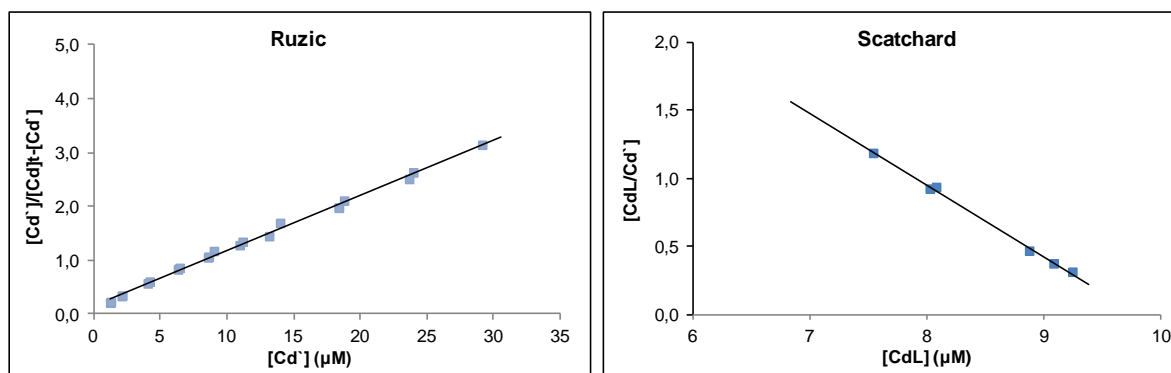


Fig. 34 Linealización método Ruzic y Scatchard para EPSenz.

ExP como ligando de Cd(II)

La **Fig. 35** y **Fig. 36** muestran la curva de titulación y la linealización de Ruzic y Scatchard obtenidas al analizar la muestra de ExP. La concentración de ligando obtenida utilizando el método Ruzic expresada como $[L_t]$ $\mu\text{mol de Cd(II)} \cdot (\text{g ExP})^{-1}$ fue de 16 ± 1 . De la pendiente de la linealización de Scatchard, se obtuvo la constante de formación, sugiriendo que se trata de ligandos moderados ($\log K' = 5,7 \pm 0,2$), y al analizar la ventana analítica los valores de $[L_t] \cdot K'$ se encuentra dentro del rango permitido.

Los resultados obtenidos sugieren que la aproximación de 1 metal- 1 ligando es adecuada para describir este sistema, y que la fuerza de los ligandos presentes en el ExP es similar a los encontrados en EPSpp.

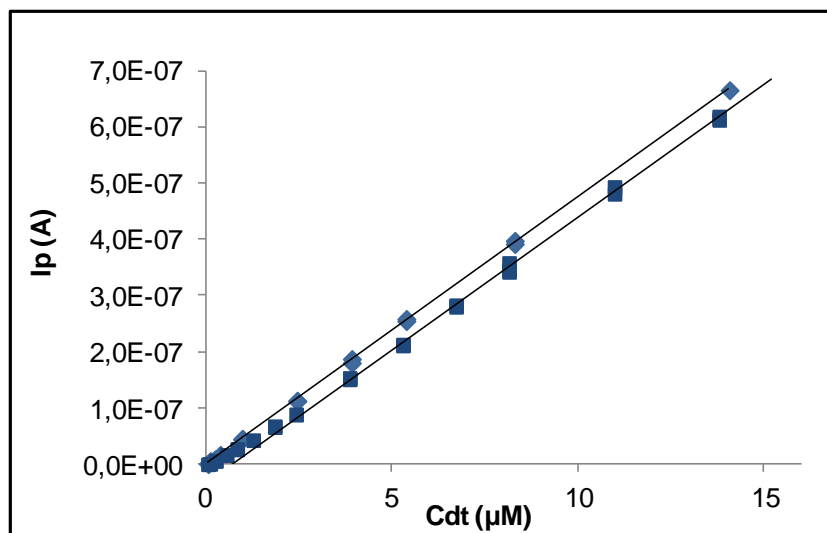


Fig. 35 Curva de titulación ExP con Cd(II) (t_{dep} 30 s, E_{dep} -0,75 V, t_{equil} 5min, buffer HEPES pH 7,5). (♦)buffer HEPES, (■)curva de titulación ExP con Cd(II).

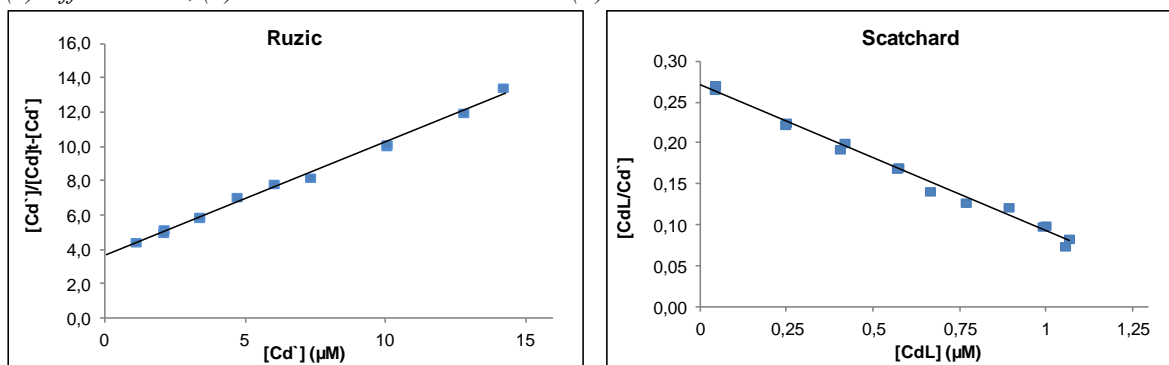


Fig. 36 Linealización de Ruzic y Scatchard para ExP

LPS como ligando de Cd(II)

La concentración de ligando total obtenida por el método de Ruzic fue de $[L_t] = (279 \pm 10) \mu\text{mol de Cd(II)} \cdot (\text{g LPS})^{-1}$, mientras que el valor para la constante de formación obtenida por la linealización de Scatchard fue $\log K' = 5,3 \pm 0,1$ (ver **Fig. 37** y **Fig. 38**). A su vez, la leve curvatura observada al comienzo de la titulación en el gráfico de Ruzic (aproximación 1 metal - 1 ligando) (ver inserto **Fig. 38**), podría estar sugiriendo la presencia de 2 grupos de ligandos (Ruzic, 1996). Este aspecto fue explorado evaluando el ajuste de la curva experimental a la curva que describe la titulación de dos familias de

ligando (Scarponi y col., 1996; Sosa y col., 2015). Para ambas familias se obtuvieron dos valores similares de K' , lo que indica que las desviaciones observadas no se deben a la presencia de dos familias sino que son parte de la variabilidad experimental. Por este motivo se descartó la suposición 1 metal - 2 ligando.

Por otro lado, el valor para la constante de formación obtenido se encuentran en el mismo orden que para la muestra de EPSpp y EPS enz. Sin embargo la concentración de ligandos es mucho mayor en esta fracción que la encontrada en ExP, mostrando que los sitios de unión al metal se encuentran principalmente en el LPS. Esto puede deberse a que el LPS contiene grupos fosfato (fosfatodiéster y fosfatomonoéster), hidroxilo, carboxilo y amino que pueden estar implicados en la interacción con Cd(II) (ver **Fig. 7**), mientras que en la fracción ExP solo los tres últimos grupos funcionales se encuentran presentes.

En concordancia con los resultados obtenidos, *Strain y col.* (1983), utilizando ^{31}P RMN concluyeron que los grupos fosfato que conforman el LPS de *Escherichia coli* K12 eran los principales sitios de interacción con Cd(II). Posteriormente *Guibaud y col.* (2005), observaron que el número de sitios de unión para Pb(II) aumentaba proporcionalmente al aumento de la cantidad de grupos fosfato presentes en los EPS de lodos activados.

Adicionalmente, el EPS secretado por *P. veronii* 2E contiene *rough* LPS según lo observado en (sección DOC-PAGE). *Langley y Beveridge* (1999), reportaron que la estructura antígeno-O en el LPS no estaba implicada en la unión a metales en *P. aeruginosa*; en paralelo, *Lins y Straatsma* (2001), basandose en modelos computacionales, reportaron que el *rough* LPS producido por *P. aeruginosa* interaccionaba con Ca(II) por medio de un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo y tres grupos fosfato, formando un complejo octaédrico. Adicionalmente, el Ca(II) posee una relación carga / radio iónico similar a la de Cd(II)¹³, y se podría suponer que este catión interacciona con el *rough* LPS de la misma forma que lo hace el ion Ca(II). Por lo tanto, se puede concluir que los grupos fosfato, y en menor medida los grupos carboxilo e hidroxilo, son los responsables de interaccionar con Cd(II).

¹³ (Carga)² Ca(II)/radio iónico (A)=4,0; (Carga)² Cd(II)/radio iónico (A)=4,1.

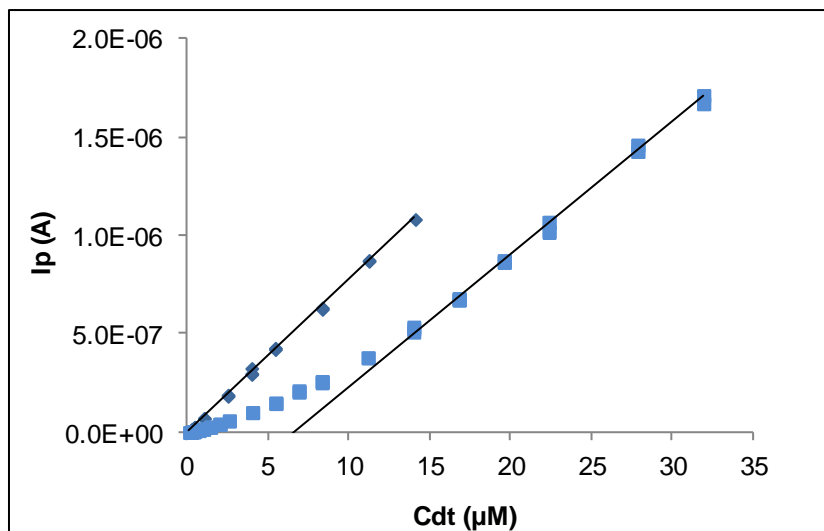


Fig. 37 Curva de titulación LPS con Cd(II) (tdep 30 s, Edep -0,75 V, tequil 5min, buffer HEPES pH 7,5). (♦)buffer HEPES, (■)curva de titulación LPS con Cd(II).

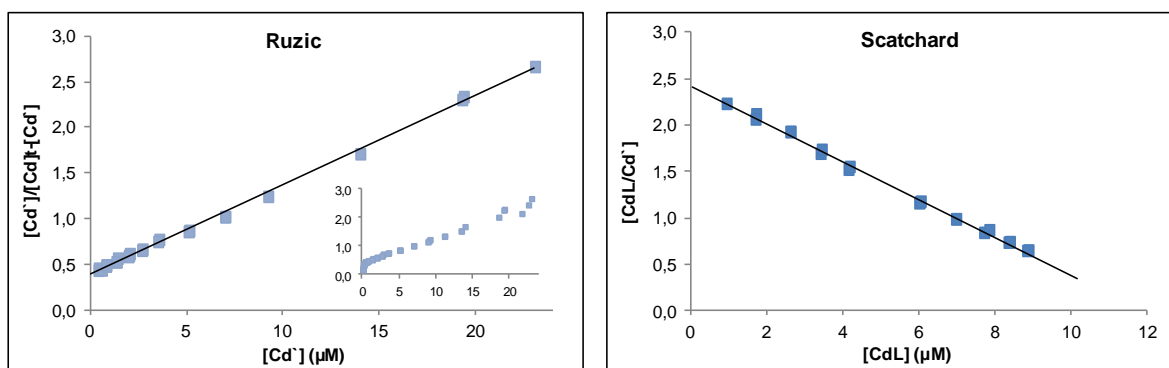


Fig. 38 Linealización método Ruzic y Scatchard para LPS.

Estudio de aplicaciones biotecnológicas del EPSpp

A continuación se describen los resultados obtenidos para los ensayos realizados sobre el EPSpp explorando sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Floculación y remoción de colorantes

Se observó que el EPSpp no posee la capacidad para ser utilizado como floculante en las condiciones estudiadas. Aunque algunos investigadores han reportado que el EPS soluble puede causar la agregación de las partículas coloidales (Dermlim y col., 1999; Subramaniana y col., 2010), en este trabajo y en otros publicados en la literatura se ha observado que este tipo de exopolímero no poseen actividad de flocular (Yu y col., 2009). Estudios a futuro podrían involucrar un cambio en el catión utilizado para formar el flóculo, se sabe que además de Ca(II) se adicionan sales de Fe(III) y Al(III) para producir el efecto buscado.

Por otro lado se estudió la posibilidad de utilizar el EPSpp como decolorante. Para ello se probó la capacidad de remover el colorante verde de malaquita. Este colorante pertenece a la familia de los trifenilmetano y se produce en grandes cantidades junto a otros colorantes de uso industrial (7×10^7 t·año⁻¹). Se utiliza principalmente en la industria textil y entre un 10-15% se descarta en las aguas residuales sin un previo tratamiento, causando serios problemas ambientales, debido a que la coloración interfiere con la penetración de la luz en los cuerpos de agua retardando la fotosíntesis o inhibiendo el crecimiento de las especies presentes en el ecosistema, pero también debido a que posee propiedades carcinogénicas y se acumula en la cadena alimentaria (Zabłocka-Godlewska y col., 2014).

Las industrias que requieren del uso de estos compuestos utilizan tratamientos para los efluentes que no resultan económicamente viables (Garg y col., 2004). Por tal motivo, se necesita el desarrollo de nuevos métodos que sean en lo posible simples, económicos y más amigables con el medio ambiente. Un posible tratamiento es utilizar EPSpp para sorber los colorantes.

El verde de malaquita se encuentra cargado positivamente (pKa de 6,9; pH 7,0 utilizado en la experiencia), por lo que puede interaccionar con las cargas negativas presentes en los grupos del EPSpp y de esa forma quedar adsorbido en el polímero.

Como se muestra en la **Fig. 39**, se observó una disminución de la coloración del verde malaquita en la solución que contenía el EPSpp. El porcentaje de remoción fue cuantificado a valores de 30%. Con el objetivo de aumentar el porcentaje de remoción, futuros estudios podrían evaluar elevar la concentración de EPSpp, o el efecto que posee la temperatura y el cambio del pH.

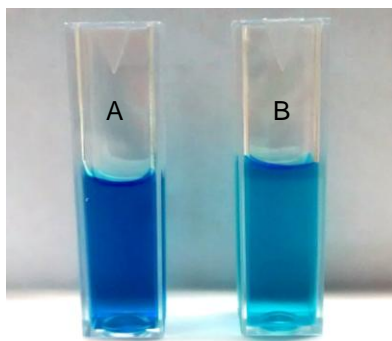


Fig. 39 **A.** Solución verde de malaquita control. **B.** Solución verde de malaquita luego de interaccionar 1 h con *EPSpp*.

Remoción de Cd(II) en biorreactor de flujo continuo

El Cd es uno de los metales más tóxicos y nocivos para el medio ambiente y para los seres humanos. Las aguas residuales provenientes de industrias galvánicas, industrias metalúrgicas, químicas y de pigmentos entre otras, presentan concentraciones en un rango comprendido entre $0,1-100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Vullo y col., 2008; Ruchita y col., 2015). Estos valores de concentración son órdenes de magnitud superiores al valor de concentración de Cd máximo permitido por las legislaciones actuales para su descarga en cuerpos de agua o en plantas de tratamiento cloacal (ver **Tabla 2**). Por lo tanto, estas industrias deberían tratar los efluentes que producen previo a su descarga, pero como se discutió en la Introducción General, los tratamientos de tipo químico muchas veces resultan ineficientes y costosos. Es por ello que la utilización de biosorbentes para inmovilizar el Cd(II) podría ser una alternativa a los tratamientos convencionales. Existen dos métodos muy estudiados para la eliminación de metales en sistemas acuosos mediada por microorganismos. El primero consiste en tratar el metal en un medio de cultivo en el cual se encuentran las células libres y el metal en estudio, por lo general en un sistema de tipo *batch*. El segundo método consiste en estudiar la sorción utilizando las células inmovilizadas (activas o inactivas). Las estrategias más utilizadas son la encapsulación en un polímero (alginato o agarosa los más comunes) o la formación de la biopelícula microbiana. La ventaja de inmovilizar a las células reside principalmente en el hecho de que soportan concentraciones más altas de metal, no es necesario medio de cultivo, la separación de las células de la solución luego

del tratamiento resulta más sencilla y se obtienen porcentajes de remoción elevados (Asthana y col., 1995; Wasi y col., 2011; Wasi y col., 2013). Por estas razones se seleccionó el segundo método de retención del catión. Dentro de las alternativas de inmovilización, se descartó utilizar alginato para retener al Cd(II) debido a que estudios previos en nuestro laboratorio habían mostrado que las esferas de alginato por sí mismas alcanzaban una remoción del 90% (Vullo y col., 2003), y si bien la oclusión del EPSpp podría mejorar la eficiencia del sistema de remediación, los altos niveles de captación por parte de la matriz hacen que la inmovilización pueda llegar a no ser rentable y que las mejoras en el porcentaje de remoción sean no significativas. La opción de formación de biopelículas se descartó debido a que ya está siendo estudiada por otros investigadores dentro del laboratorio, y además se trata de EPS unido, distinto al estudiado en este trabajo. Por estos motivos se estudió la posibilidad de utilizar EPSpp empaquetado en bolsas de diálisis. Éste material contiene al biopolímero y a su vez permite la difusión del metal a través de la membrana semipermeable que conforma la bolsa de diálisis. Una de las ventajas de utilizar este tipo de sistemas es que solo se utiliza un producto extracelular y no es necesario utilizar las células, disminuyendo considerablemente el riesgo de contaminación o la utilización de medios de cultivo, simplificando el proceso. Por otro lado, las células no se tendrían que descartar: estas podrían ser utilizadas para un tratamiento de biotransformación de Cr(VI) a Cr(III), hecho que ya fue estudiado y aplicado exitosamente a efluentes provenientes de una empresa productora de piezas metálicas de grifería en el laboratorio de microbiología de la UNGS.

Para los ensayos se utilizó un efluente modelo que contenía una concentración del catión que se encuentra dentro del rango de las aguas residuales ($14 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), y se diseñó y armó un biorreactor de flujo continuo que contenía 40 mg de EPSpp dentro de una bolsa de diálisis que permitía el paso de iones. Para tener en cuenta los efectos de difusión del catión se realizó un control en el cual se reemplazó el EPSpp por agua MilliQ.

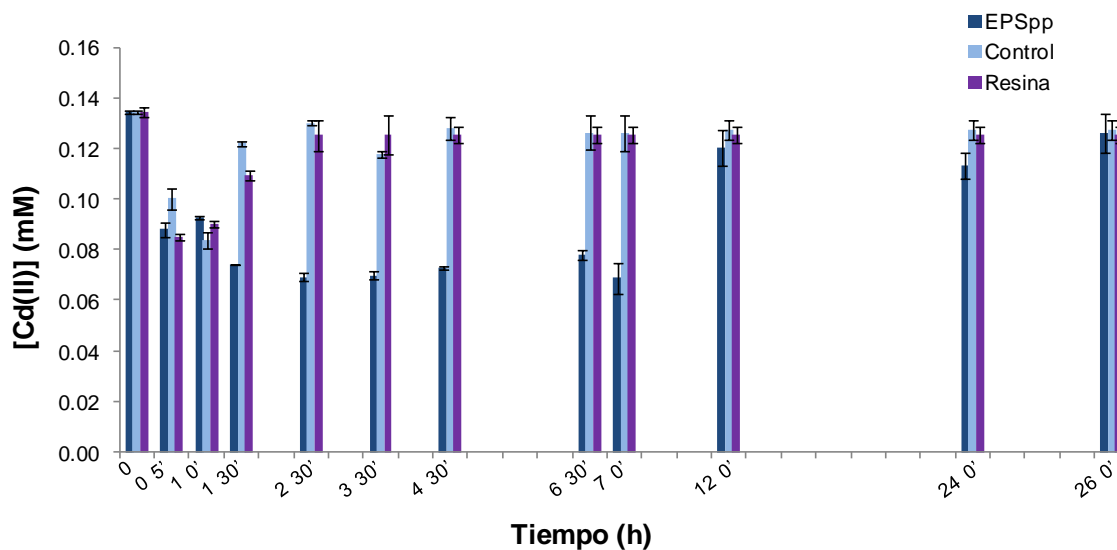


Fig. 40 Evolución en el tiempo de la concentración de Cd(II) a la salida del biorreactor de flujo continuo.

En la **Fig. 40** se muestran los resultados obtenidos para la remoción de Cd(II) en el tiempo (expresado en horas) en el biorreactor de flujo continuo. Como se puede observar en el control existe una difusión producto de una diferencia de concentraciones para el ion metálico, pero aproximadamente poco después de las 4 horas de experiencia, la concentración es comparable a la inicial. Para el sistema que contenía el EPSpp como biosorbente, se observa que a partir de la primera media hora existe una disminución de la concentración de Cd(II) en el efluente de salida, pero esto puede ser debido al proceso de difusión. Trascorrida 1h 30 min se observa la disminución de la concentración del catión en solución llegando a una sorción de aproximadamente 54% transcurridas 7 h de experiencia, producto de la presencia del biopolímero. La saturación de los sitios de unión se alcanza luego de 12 h. Por otro lado, a fin de comparar la capacidad del EPS soluble de remover Cd(II) en un flujo continuo, se realizó la misma experiencia utilizando una resina de intercambio iónico comercial. En las condiciones ensayadas, los resultados muestran que la capacidad de remoción es mejor en el biopolímero que en la resina sintética. La remoción máxima de la resina fue de 40%.

Si bien la concentración de Cd(II) en la solución cuando se llega a la capacidad de remoción máxima se encuentra por encima del rango de permitido para su descarga, este experimento fue una primera aproximación a la utilización de EPSpp en la eliminación de metales utilizando un sistema de flujo continuo. Sería esperable un aumento de la sorción

empleando mayor masa del compuesto. Experimentos a futuro permitirán explorar ajustes en las condiciones experimentales para aumentar la retención del metal, disminuir los tiempos del proceso, como también se explorará otras matrices para inmovilizar o empaquetar el EPS.

CONCLUSIONES

- ❖ La obtención de EPS soluble por parte de *P.veronii* 2E fue máxima en medio de cultivo mínimo M9 glicerol 2% (v/v) a 25° C.
- ❖ El biopolímero está compuesto principalmente por azúcares, seguidos en una menor proporción por proteínas y compuestos con contenido de fósforo.
- ❖ Los polímeros mayoritarios presentes en el EPS soluble son los exopolisacáridos y lipopolisacáridos.
- ❖ La composición polisacáridica del EPS es heterogénea, siendo los constituyentes fucosa, galactosa, manosa, galactosamina, glucosamina y ácido glucurónico, y azúcares piruvilados.
- ❖ El estudio de la interacción EPSpp-Cd (II) mostró una sola familia de ligandos moderados y una K' similar para los valores de pH más altos estudiados.
- ❖ Los sitios de unión implicados en la interacción con Cd(II) se encuentran principalmente en el LPS.
- ❖ EPSpp posee actividad de remoción para colorantes de la familia triarilmetano.
- ❖ EPSpp fue capaz de remover 54% de Cd(II) en un biorreactor de flujo continuo.

CAPÍTULO II

“EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN ESTRUCTURAL Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE SIDERÓFOROS PRODUCIDOS POR *Pseudomonas veronii* 2E”

INTRODUCCIÓN

Los sideróforos (de aquí en más SPs, por su nombre en inglés *SideroPhores*) son moléculas orgánicas pequeñas producidas por microorganismos bajo condiciones de escasez de hierro¹⁴. Estos compuestos tienen una gran afinidad por el Fe(III) con los que forma complejos solubles que luego pueden ser incorporados por los microorganismos para satisfacer su demanda de hierro.

En los últimos años se ha estudiado la posible utilización de sideróforos en diferentes áreas, siendo las más destacadas la agricultura, donde podrían ser utilizados como promotores del crecimiento de plantas y como bioplaguicidas; en tecnología, donde los sideróforos podrían ser utilizados para detectar el contenido de hierro en diferentes entornos posibilitando así el desarrollo de biosensores de hierro; y en medio ambiente, donde estas moléculas pueden complejar otros metales distintos al hierro, posibilitando así su aplicación en biorremediación de MRAs.

Importancia del hierro en microorganismos

El hierro es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre, y el segundo metal, precedido por el aluminio. Este elemento se caracteriza químicamente como un metal de transición que se encuentra mayoritariamente en los estados de oxidación Fe(II) (hierro ferroso) y Fe(III) (hierro férrico) (Cox, 1995). La versatilidad para pasar de un estado de oxidación a otro le permite estar involucrado en una variedad de reacciones biológicas de óxido-reducción en procesos metabólicos (por ejemplo en el ciclo de Krebs, en la cadena de transporte de electrones, en la fosforilación oxidativa y en la fotosíntesis).

¹⁴ No todos los microorganismos liberan sideróforos. Algunas bacterias, como la bacterias lácticas, no necesitan hierro para su desarrollo y crecimiento (Duhutrel y col., 2010).

También regula la biosíntesis de porfirinas, vitaminas, antibióticos, toxinas, citocromos, pigmentos, compuestos aromáticos, ácidos nucleicos y de los propios SPs; y recientemente se ha observado que juega un rol importante en la formación de biopelículas, en la regulación de la movilidad microbiana en superficies, en la producción de biosurfactantes e interviene en la comunicación intracelular¹⁵ (Glick y col., 2010; Cai y col., 2010; Daniel y col., 2016).

A valores de pH neutros (pH fisiológico), el Fe(II) se encuentra disuelto, es decir, se encuentra disponible para ser incorporado por bacterias, hongos y plantas mediante transportadores de metales divalentes. Sin embargo, en presencia de oxígeno o de ciertas enzimas, el ion ferroso se oxida fácilmente a férrico, siendo este último insoluble en condiciones de funcionamiento biológico normal. Por otro lado, la disponibilidad de Fe(III) no sólo está limitada por su baja solubilidad a valores de pH neutros, sino también por la baja cinética de disolución de los minerales que lo contienen, como suelos carbonatados y óxidos e hidróxidos (Kraemer, 2004; Saha y col., 2012). Como consecuencia, la concentración del ion ferroso se encuentra en valores en el orden de 10^{-10} M, mientras que la concentración necesaria para el desarrollo de microorganismos es de 10^{-6} M (Johnstone y Nolan, 2015), es decir, 4 órdenes de magnitud mayor (ver **Tabla 17**). Por lo tanto, con el fin de sobrevivir en un entorno con una baja disponibilidad de hierro soluble, los microorganismos poseen un mecanismo indirecto de obtención de hierro: producen ciertos compuestos orgánicos de baja masa molecular llamados *sideróforos* que se unen y complejan al Fe(III) insoluble de diferentes ambientes (Meyer y Abdallah, 1978; Neilands, 1995; Saha y col., 2012).

¹⁵ Es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular. Las células involucradas producen y secretan sustancias, que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva.

Tabla 17 Concentración de Fe(III) libre en el medio ambiente

Localización	Concentración de Fe(III) libre (M)	Referencia
Sangre	10^{-9}	Masalha y col., 2000
Océanos		
Superficie	10^{-10} - 10^{-9}	Cox, 1995
Profundo	10^{-9}	
Suelos	10^{-18} - 10^{-9}	Kraemer, 2004; Masalha y col., 2000

Propiedades fisicoquímicas de los sideróforos

Tal como fue mencionado en la introducción, los SPs son moléculas orgánicas (cuyo tamaño es generalmente menor a 1,5 kDa) que están diseñadas para formar complejos estables con el Fe(III) (Neilands, 1995; Miethke y Marahiel, 2007; Saha y col., 2012). El Fe(III) es un ácido fuerte de Lewis que en medio acuoso se encuentra solvatado por seis moléculas de agua formando el complejo $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (Dertz & Raymond, 2004). Cuando éste acuocomplejo se pone en contacto con los átomos donores de electrones presentes en los SPs (bases fuertes de Lewis), éstos rodean al ion y reemplazan las moléculas de agua, coordinando así al Fe(III). Este proceso está favorecido termodinámicamente, y debido a que el SP contiene seis átomos donores, el complejo que se forma posee una relación 1:1, FeL, donde L es el ligando. Sin embargo, pioquelina (producida por el género bacteriano *Pseudomonas*) puede formar complejos que poseen una relación FeL_2 , aunque este tipo es menos común (Tseng y col., 2006). Debido a la extraordinaria estabilidad termodinámica de los complejos de SP-Fe(III) solubles (Cezard y col., 2015), los SPs también tienen un efecto marcado sobre la solubilidad de los óxidos de hierro en un amplio rango de valores de pH. Concentraciones muy pequeñas de SPs libres en solución tienen un gran efecto en la disolución de óxidos de hierro (Kraemer, 2004).

La geometría que adopta el complejo SP-Fe(III) es usualmente de tipo octaédrica (ver **Fig. 41**).

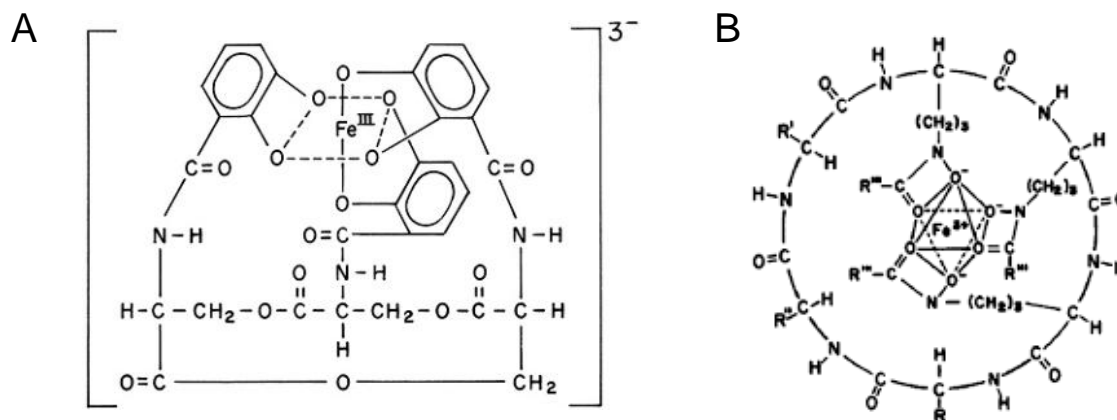


Fig. 41 Estructura octaédrica de complejo SP-Fe(III) (adaptación Neilands, 1995). **A.** geometría octaédrica adaptada por enterobactina, SP perteneciente a la familia de catecol. **B.** geometría octaédrica adoptada por ferricromo, SP pertenecientes a la familia de hidroxamato.

Tipos de sideróforos

En función de la naturaleza de ligandos de oxígeno que coordinan al ion Fe(III), los SPs pueden clasificarse en cuatro categorías: catecolato y fenolato, hidroxamato, carboxilato y compuestos de tipo mixtos. En la **Fig. 42** se muestran algunos ejemplos de este tipo de compuestos.

Hidroxamato

Los SPs pertenecientes a este grupo son los más comunes, secretados principalmente por bacterias Gram positivas y hongos. Los hongos producen una amplia gama de este tipo de SPs como ácido rodaturlico, ferricromo, coprogenes y fusarininas (Varma y Chincholkar, 2007). El grupo hidroxamato corresponde a C=O unido a (-NOH)R (ver en la **Fig. 42** coloreado en amarillo), donde R es un aminoácido (por lo general ornitina), o un derivado de aminoácido. Los dos oxígenos presentes en el grupo hidroxamato son los ligandos (bidentados) que forman el complejo con el Fe(III) por la pérdida de un protón de la hidroxilamina (-NOH). De esta manera los SPs con tres grupos hidroxamatos pueden formar complejos de geometría octaédrica (ver **Fig. 42 A**). Los valores de pKa de este grupo funcional se encuentran entre 8 – 9.

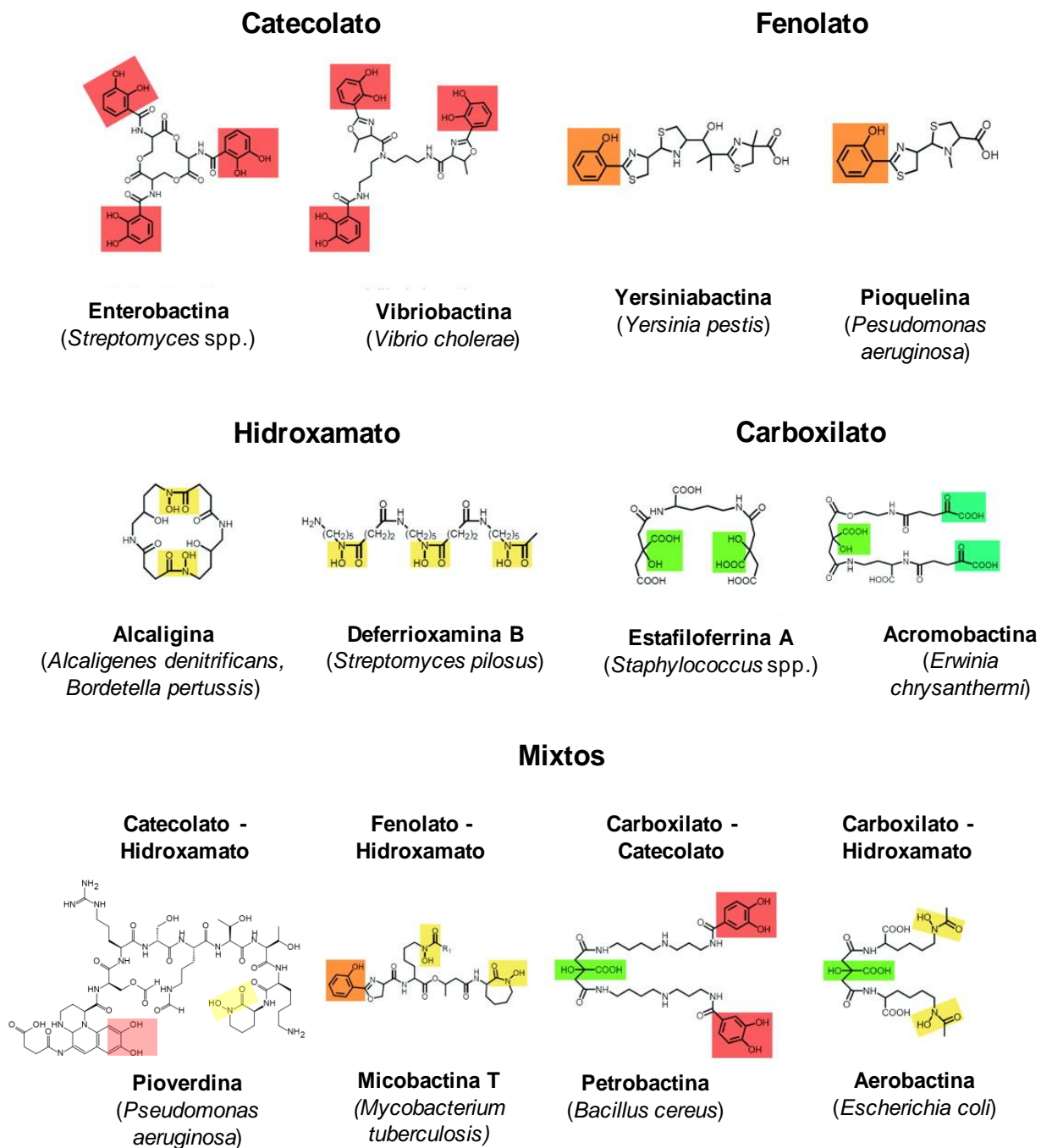


Fig. 42 Ejemplos de diferentes SPs y sus productores. Los motivos envueltos en la coordinación de Fe(III) se encuentran coloreados: catecolatos en rojo; fenolatos en naranja; hidroxamatos en amarillo; α -hidroxicarboxilatos en verde.

Catecolato y fenolato

Este tipo de SPs son principalmente producidos por bacterias. Por ejemplo, ciertas bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptomyces* spp. producen enterobactina que se une al Fe(III) cuando las concentraciones de este ion son bajas en el ambiente.

Cada grupo catecolato (1,2-dihidroxibenzeno) aporta dos átomos de oxígeno para complejar al Fe(III) con el fin de formar un complejo octaédrico hexadentado (ver **Fig. 42 B**). Este grupo posee un primer pKa con valores de alrededor de 6-7 y un segundo pKa con valores cercanos a 12.

Carboxilato

Este tipo de SPs son producidos principalmente por bacterias del género *Rhizobium* y *Staphylococcus*, y hongos del género *Mucor*. Uno de los más estudiados es la estafiloferrina A, que transporta el hierro no sólo a la cepa productora sino también a otros 37 diferentes *Staphylococcus* (Saha y col., 2012).

Este tipo de sideróforo se une al hierro a través de grupos carboxilo e hidroxilo (Dave y Dune 2000). El pKa del grupo carboxilato se encuentra en valores de entre 3,5 y 5, convirtiendo a estos SPs eficientes bajo condiciones ácidas donde los grupos catecolato e hidroxamato no se encuentran totalmente desprotonados. De esta forma, los microorganismos que habitan en ambientes ácidos, como algunos hongos, producen preferencialmente este tipo de SPs.

Mixtos

La mayoría de los SPs secretados por el género *Pseudomonas* corresponde a esta familia, donde estos compuestos poseen dos grupos funcionales distintos capaces de interactuar con el Fe(III). A modo de ejemplo se puede mencionar las pioverdinas secretadas por especies del género *Pseudomonas*, que poseen grupos hidroxamato y catecol. Otro ejemplo es la aerobactina, SP producido por *Echerichia coli*, la cual presenta en su estructura dos grupos carboxilato y un grupo hidroxamato (ver **Fig. 42**).

Rol de los sideróforos en la naturaleza

En el estudio de los SPs se les ha asignado diferentes roles en la naturaleza debido a su fuerte interacción con el ion Fe(III).

Solubilización de minerales sólidos

Las comunidades microbianas que viven sobre la superficie de los sólidos son distintas de las comunidades presentes en el suelo que las rodea (Certini y col., 2004). En estas comunidades microbianas, algunos nutrientes minerales son obtenidos directamente del sólido en el cual están desarrollados estos microambientes. Según *Kalinowski y col.* (2000), la secreción de SPs promueve la solubilización del mineral para obtener Fe(III), y el complejo formado es transferido al medio sólido circundante para hacerlo biodisponible a los microorganismos e incluso a plantas del suelo (Shirvani y Nurbakhsh, 2010). Debido a la gran afinidad que poseen los SPs con el Fe(III) en los últimos años se ha investigado el rol de estos metabolitos en la solubilización y en la formación de sólidos que contienen este metal (Watteau y Berthelin, 1994). Por ejemplo, el SP desferrioxamina B secretado por *Streptomyces* y *Arthrobacter* disuelve Fe(III) presente en piedras de hornblenda o carbonilla (Kalinowski y col., 2000).

Ciclo Biogeoquímico del hierro en el océano

El ciclo biogeoquímico de trazas de minerales en el océano ha tenido un interés particular en los últimos años. De todos los minerales que se encuentran presentes en los océanos, el hierro ha recibido una atención particular debido a que es un micronutriente esencial para los organismos marinos y se encuentra en bajas concentraciones, afectando una de las comunidades marinas más importantes: el fitoplancton (Gledhil y Buck, 2012). Se ha encontrado que bacterias marinas secretan SPs (por ejemplo desferrioxamina G y E) que se unen al ion Fe(III) provocando que el metal aumente su disponibilidad para ser utilizado por el fitoplancton, sustentando así la hipótesis de que los SPs juegan un rol importante en el ciclo biogeoquímico del hierro (ver **Fig. 43**)(Mawji y col., 2008).

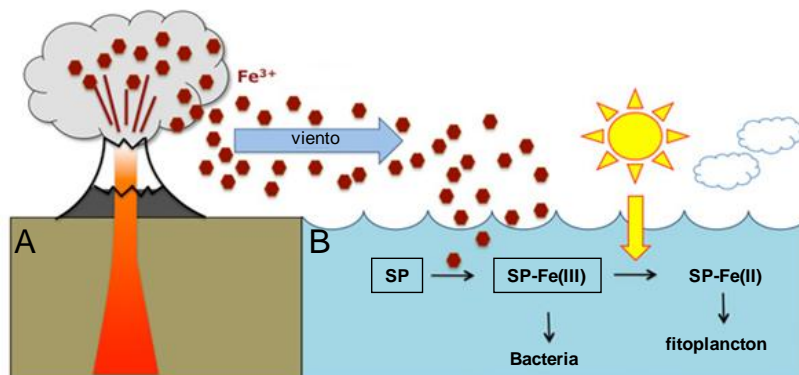


Fig. 43 Esquema biogeoquímico del hierro en el océano. **A.** El viento transporta el Fe(III) a los océanos producto del polvo o ceniza volcánica. **B.** Las partículas en la superficie son complejadas por los SP que luego es incorporado por la bacteria o puede ser reducido a Fe(II) por acción de la luz y quedar biodisponible para el fitoplancton (adaptado Nature Education).

Funciones biológicas de los sideróforos bacterianos

La principal función biológica que poseen los SPs es la de quelar al ion Fe(III) y transportar este metal esencial al interior de la célula para satisfacer la demanda nutricional de hierro. Dependiendo de la concentración del metal en el ambiente y de la demanda de éste nutriente, un mismo microorganismo es capaz de producir uno o varios SPs. Por ejemplo, *E. coli* puede secretar aerobactina y enterobactina, teniendo esta última una constante de afinidad por el hierro mayor que la primera.

En la **Fig. 44** se muestra un diagrama esquemático de la captación del ion Fe(III) mediada por SPs. Los SPs se unen primero al ion Fe(III) formando el complejo SP-Fe(III) que luego es incorporado por las células bacterianas a través de receptores específicos. En el caso de bacterias Gram-positivas, los SPs-Fe(III) se unen a proteínas, permeasas y ATPasas, que están implicados en el transporte del complejo (Ahmed y Holmstrom, 2014). En las bacterias Gram-negativas, un receptor de membrana externa, una proteína de unión periplasmática y el transportador ABC ATP dependiente ubicado en la membrana citoplasmática son los encargados de transportar el complejo al interior de la célula. Una vez que el SP-Fe(III) se encuentra en el citosol, el Fe(III) es reducido a Fe(II), por un mecanismo que todavía no ha sido establecido completamente (Cezard y col., 2015), y debido a que el SP posee una afinidad mucho menor por el ion ferroso que por el ion

férrico, se produce la liberación del ion Fe(II) al interior celular. El Fe(II) es utilizado por la bacteria para el crecimiento celular y el SP libre es reciclado por bombas de flujo específicas que lo liberan al medio ambiente, o eventualmente es degradado por la bacteria.

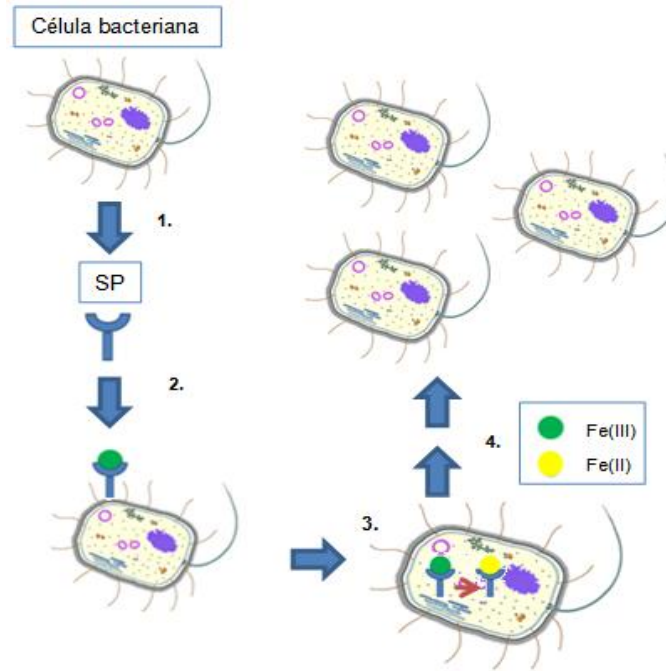


Fig. 44 1. En ambientes con escasez de hierro, las células bacterianas liberan SP. 2. Los SPs se unen al Fe(III) insoluble formando complejos solubles que se unen a la superficie bacteriana. 3. El complejo es introducido al interior de la célula, donde el Fe(III) se reduce a Fe(II) soluble. 4. El SP es degradado o reciclado para su uso, mientras que el Fe(II) es utilizado para el crecimiento celular.

A pesar de que la función primaria de los SPs es suministrar el hierro soluble a los microorganismos para su crecimiento, en los últimos años se han descrito otras funciones importantes (Johnstone y Nolan, 2015):

a) Unión a otros metales esenciales como Zn(II) , Mn(II) , V(IV) y Mo(VI) para ser incorporados y utilizados por las bacterias. Se ha demostrado que *E. coli*, *Streptomyces coelicolor*, *Yersinia pestis* y *Pseudomonas stutzeri* y *putida* secretan SPs que complejan y transportan Zn al interior de la célula (Cortese y col., 2002; Bobrov y col., 2014). En relación al Mn(II) , este metal también es un nutriente esencial en microorganismos procariotas y en la naturaleza se encuentra poco disponible (generalmente en forma de óxidos de Mn(III, IV)). Parker y col. (2007) han reportado que *P. putida* secreta pioverdina_{MnB1} que se une con gran afinidad a este metal y por transportadores específicos para luego poder ser incorporado por la bacteria. Por otro lado, algunas bacterias fijadoras de nitrógeno (como *Azotobacter vinelandii*) necesitan Mo y V como cofactores de las

enzimas nitrogenasas. Estas bacterias secretan aminoquelina, proteoquelina y azotobactina (SPs del tipo catecol) que se unen fuertemente a estos metales y los trasportan al interior de la célula donde son utilizados por la enzima (Liermann y col., 2005).

b) Protección frente a stress oxidativo. El SP enterobactina ha mostrado tener un rol en la mitigación de los efectos dañinos del stress oxidativo en *E. coli* y *Salmonella enterica*. Como ya se mencionó, este SP posee grupo funcional catecol, que participa en la disminución de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*).

c) Señalización molecular y virulencia. Se ha reportado que la pioverdina secretada por *P. aeruginosa* cumple la función de regular la expresión de factores de virulencia como la exotoxina A, una endoproteasa y la propia pioverdina, que son los principales contribuyentes a la capacidad de esta bacteria para causar fibrosis quística (Lamont y col., 2002). El funcionamiento de la pioverdina como factor virulento en mamíferos estaría relacionado a la gran afinidad que poseen los SPs por el Fe(III). El proceso involucra una competencia por el Fe(III) entre la pioverdina y la transferrina (proteína que transporta el hierro en el huésped) convirtiendo al SP en un factor de virulencia (Saha y col., 2012). En efecto, esta competencia es posible pues la constante de formación del complejo Fe-pioverdina es mucho mayor que la correspondiente a Fe-transferrina ($\log K = 31$ y $\log K = 22,7$ respectivamente). Los SPs como factores virulentos se han registrado en otras bacterias. *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 (deficiente en la producción de SPs) exhibe una disminución en la virulencia a las plantas de tabaco y un incremento de la respuesta *swarming* y la secreción de biosurfactantes (Taguchi y col., 2010).

Por otro lado, en las bacterias marinas la señalización molecular emplea SP-exógenos para la estimulación de la producción de SP-endógenos. Guan y col. (2001) sugirieron que los SPs son compuestos de señalización necesarios para el crecimiento bacteriano y para la captación de hierro por algunas bacterias marinas no productoras de SPs.

d) Maduración de biopelículas. Muchos estudios han demostrado que la concentración de hierro intracelular juega un rol importante en la formación y desarrollo de biopelículas (Banin y col., 2005; Saha y col., 2012; Oglesby-Sherrouse y col., 2014; Daniel y col., 2016). Por ejemplo, en mutantes de *P.aeruginosa* incapaces de producir SPs (pioverdina y pioquelina) se observó la formación de biopelículas poco robustas y muy delgadas (Banin y col., 2005).

e) Protección contra efectos tóxicos por presencia de metales. Se ha estudiado que los SPs no solo se unen al hierro, si no también a otros metales que resultan tóxicos para el microorganismo evitando de esta manera el transporte y la entrada de estos iones metálicos al interior de la célula bacteriana (Braud y col., 2009b). Se ha reportado que los SPs secretados por *P. aeruginosa* se unen a diferentes metales no esenciales (como por ejemplo Cu(II), Ga(III), Al(III)) y son incorporados al interior de la célula por medio de transportadores de membrana, para luego ser eliminados por un sistema de bombas de flujo ATP-dependientes mitigando los efectos originados por la presencia de los metales mencionados (Braud y col., 2010). Por otro lado, los SPs tales como desferrioximina B se unen a Ga(III), Al(III) e In(III) con una gran afinidad, similar a la encontrada para Fe(III). Estas últimas interacciones están siendo estudiadas para la utilización de este SP en el tratamiento de intoxicación por sobreexposición al aluminio (Crisponi y col., 2013).

Aplicaciones biotecnológicas de los sideróforos microbianos en el medio ambiente

Los SPs han recibido mucha atención en los últimos años debido a su potencial aplicación en varias áreas de la biotecnología ambiental como biocontrol de patógenos, biosensores, bioblanqueamiento de pulpa de papel, caracterización taxonómica y biorremediación (Ahmed y Holmstrom, 2014).

Aumento del crecimiento vegetal y biocontrol de patógenos en plantas

El hierro es un micronutriente esencial y necesario para las actividades fisiológicas de las plantas. Muchas plantas son capaces de producir fitosideróforos (fitoSPs) para aumentar la solubilidad del hierro y su incorporación por las raíces (Masalha y col., 2000). Sin embargo, algunos investigadores han reportado y estudiado que son los SPs de origen microbiano los responsables de proporcionarle a ciertas plantas el hierro necesario para el crecimiento, convirtiendo así a los SPs en promotores del crecimiento vegetal (*plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR*) (Masalha y col., 2000; Crowley, 2006). Aunque el

mecanismo mediante el cual la planta incorpora el hierro complejo por los SPs microbianos no se encuentra totalmente establecido, se han propuesto dos alternativas:

a) la planta reduciría el hierro del complejo SP-Fe(III) en las raíces, liberando el hierro en estado Fe(II) que luego se incorporaría a la planta por el apoplasto;

b) podría ocurrir un intercambio de ligandos, donde el complejo SP-Fe(III) microbiano pasaría en las cercanías de las raíces de la planta a un complejo de fitoSP-Fe(III) que sería reconocido e incorporado por la planta.

En relación a la utilización de los SPs como biocontrol de patógenos en plantas, se ha sugerido que estos pueden reemplazar en algunos casos a los plaguicidas (Schenk y col., 2012). *Klopper y col.* (1980) reportaron que las pioverdinas secretadas por el género *Pseudomonas* podían actuar protegiendo a las plantas de patógenos, reduciendo la cantidad de hierro disponible para éstos e inhibiendo así su desarrollo. Por ejemplo, se ha estudiado que la pioverdina disminuye los efectos dañinos causados por *Fusarium oxysporum* en las plantas de papa (Schippers y col., 1987; Ahmed y Holmstrom, 2014).

Biocontrol de patógenos en peces

Además de actuar en el control de patógenos en plantas, se ha estudiado la utilización de los SPs en el control de patógenos en peces. Nuevamente, la posibilidad de utilizar estas moléculas radica en la gran afinidad que presentan con el Fe(III) y la baja disponibilidad del metal en los ambientes marinos. La utilización de los SPs producidos por los microorganismos de biocontrol tendrá éxito siempre y cuando la constante de afinidad de los mismos sea mayor que la constante de afinidad de la transferrina (SP producido por los patógenos). Por ejemplo, se ha informado que los SPs producidos por *Pseudomonas fluorescens* pueden inhibir el crecimiento de una variedad de patógenos tales como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae* y *Flavobacterium psychrophilum* entre otras (Gram y col., 1999; Dimitroglou y col., 2011).

Taxonomía microbiana

La creciente necesidad de obtener una rápida identificación de bacterias con fines médicos ha fomentado el uso de los SPs como herramienta en taxonomía. *Meyer y col.*

(2002) propusieron la posibilidad de identificar y caracterizar especies microbianas de acuerdo a los SPs, llamada *siderotyping* y se basa en la caracterización de especies de acuerdo al tipo de SP que producen. Existen dos métodos de identificación: un método **analítico**, que involucra la purificación y caracterización del SP utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría masa (HPLC/MS); y una variedad de métodos **biológicos**, donde el más común utiliza la técnica de isoelectroenfoque (IEF), que compara la cadena peptídica de los SPs con patrones de SPs conocidos (Kilz y col., 1999; Fuchs y col., 2001; Meyer, 2007). Estos estudios se realizaron principalmente en el género *Pseudomonas*, aunque también fueron aplicados a otras bacterias como *Burkholderia* spp. y *Mycobacterium* spp. (Ahmed y Holmstrom, 2014).

Biosensores

Un biosensor es un instrumento analítico basado en la respuesta de un material biológico en estrecho contacto con un transductor físico/químico, que convierte la respuesta biológica en una señal cuantificable. En la **Fig. 45** se muestra un esquema del funcionamiento de un biosensor para detección de Fe(III) utilizando como material biológico a los SPs.

Como se mencionó en las secciones anteriores, los SPs poseen una gran afinidad por el Fe(III) y muy poca afinidad por el Fe(II). Teniendo en cuenta esta característica, *Chung Chun Lam* y col. (2006) y posteriormente *Yoder y Kisaalita* (2011), estudiaron la posibilidad de utilizar el SP parabactina (producido por *Paracoccus denitrificans*) y pioverdina (producido por *Pseudomonas* spp.) como biosensores ópticos para la determinación de hierro disponible en medios acuosos. En el caso de las pioverdinas, se encapsularon estos SPs en una matriz de sol-gel y se cuantificó la concentración de hierro en agua a partir de la medición de la señal de fluorescencia. Si bien las moléculas de los SPs son sensibles a la oxidación y degradación, su gran afinidad al Fe(III) y la introducción en una matriz protectora hacen posible su utilización en biosensores.

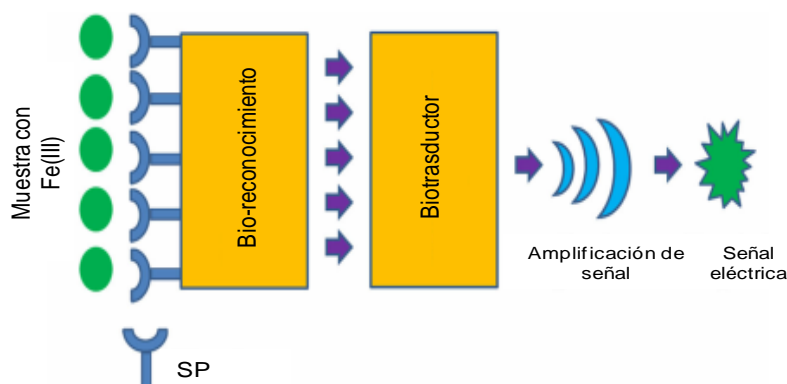


Fig. 45 Diagrama esquemático de un biosensor basado en SPs. Los SPs son los componentes biosensibles que interactúan con el analito (Fe(III)); luego el biotransductor (por ejemplo óptico de fluorescencia) transforma la señal resultante de la interacción entre el hierro y SPs en otra señal que puede ser fácilmente medida y cuantificada a través de un amplificador y detector.

Reprocesamiento de combustible nuclear

En el reciclado de combustibles nucleares¹⁶ uno de los métodos utilizados es el proceso Purex. En él se realiza una extracción líquido-líquido para separar U y Pu de otros productos del combustible nuclear, tales como el Np, y reutilizarlos en la fisión. Durante una de las etapas de extracción, la fracción que contiene U se contamina con Np, algo indeseado en este proceso. *Taylor y col.* (1998) han estudiado que los hidroxamatos pueden remover selectivamente el Np de la fracción que contiene U, y de esta forma su empleo en el proceso Purex permite obtener U de mayor pureza. Teniendo en cuenta este resultado y que los SPs contienen grupos funcionales aniónicos (hidroxamato y/o catecoles) con gran afinidad por ácidos de Lewis fuertes, como los actínidos, *Muller y col.* (2007) propusieron el uso de desferrioxamina B (SP del tipo hidroxamato) para el reprocesamiento de combustibles nucleares.

Basado en estos resultados, los SPs podrían ser utilizados en la remediación de desechos radioactivos y en los procesos del ciclo de combustible nuclear.

Blanqueamiento de pulpa de papel

El principal problema ambiental asociado a la industria del papel es el proceso de blanqueamiento de la celulosa debido a la emisión de contaminantes al aire y descarga de

¹⁶ El reprocesamiento nuclear separa cualquier elemento reutilizable (por ejemplo el uranio y el plutonio) de los productos de fisión y otros materiales existentes en el residuo del combustible nuclear utilizado en reactores de potencia.

residuos peligrosos a las cuencas acuáticas. Algunos estudios han reportado que los SPs del tipo hidroxamato podrían actuar en el proceso de blanqueamiento de la pulpa del papel disminuyendo la cantidad de productos químicos utilizados en la actualidad (Ahmed y Holmstrom, 2014). El mecanismo por el que actuarían involucraría un aumento de la reacción Fenton¹⁷ para la degradación de α -celulosa. Los SPs complejan Fe(III) y luego el ion en cercanías de la celulosa se reduce Fe(II) por acción microbiana, esta especie reducida luego reacciona con H₂O₂ para producir especies radicalarias que son las responsables de la depolimerización de celulosa, la hemicelulosa y la lignocelulosa (Xu y Goodell, 2001; Milagres y col., 2002). Este proceso de degradación se considera la función principal de los SPs en el bio-blanqueamiento de pastas de papel y se ha estudiado principalmente en SPs provenientes de hongos (Ahmed y Holmstrom, 2014).

Biorremediación de derrames de hidrocarburos derivados del petróleo

Uno de los principales problemas ambientales en la actualidad es la contaminación por hidrocarburos producto de las actividades relacionadas con la industria del petróleo. Actualmente los métodos utilizados para su eliminación consisten en la incineración cuando las cantidades de contaminante son grandes (siendo éste uno de los procesos más caros), y la remoción física y química. La biorremediación es la tecnología más prometedora para el tratamiento de sitios contaminados por hidrocarburos, debido a su bajo costo y alta eficiencia (Nilanjana y Preethy, 2011). Los SPs producidos por microorganismos marinos juegan un rol fundamental en la remediación de los compuestos derivados del petróleo, ya que facilitarían la incorporación del hierro que necesitan las bacterias degradadoras (Das y Chandran, 2011). Gauglitz y col. (2012), demostraron que la bacteria marina *Vibrio* spp., aislada en el Golfo de México (luego del derrame de petróleo de Deepwater Horizon en 2010), produce SPs anfipáticos que contribuyen a la degradación de hidrocarburos de petróleo. Todo esto apoyaría la hipótesis de que los SPs podrían favorecer la eficiencia de la remediación de derrames de petróleo.

¹⁷ Es un proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales altamente reactivos del hidroxilo. La reacción involucra Fe(II) y H₂O₂.

Biorremediación de metales

La afinidad que poseen los SPs por otros iones metálicos distintos que el hierro hace posible su utilización en la bioremediación de metales presentes en ambientes contaminados. Debido a que son moléculas solubles, los estudios a la fecha se han realizado principalmente en suelos.

Movilización de metales tóxicos en suelos contaminados

Los SPs juegan un papel crucial en la movilización de metales en suelos contaminados (Ahmed y Holmstrom, 2014). Son extremadamente eficaces en la solubilización y el aumento de la movilidad de una amplia gama de metales tales como Cd(II), Cu(II), Ni(II), Pb(II), Zn(II), y los actínidos Th (IV), U (IV) y Pu (IV) (Braud y col., 2009b; Schalk y col., 2011). Esta capacidad depende principalmente de sus funcionalidades de ligando, y como se informó anteriormente, los SPs pueden tener una afinidad selectiva para otros metales distintos del hierro. De este modo, los SPs se convierten en una herramienta útil y amigable con el medio ambiente en la biorremediación de metales (Rajkumar y col., 2010).

En los últimos años, algunos investigadores han estudiado la eliminación de metales / metaloides en suelos utilizando SPs. En un estudio realizado por Wang y col. (2011) se informó que los SPs sintetizados por *Agrobacterium radiobacter* eliminaron aproximadamente el 54% del arsénico de suelos contaminados. También se observó una remoción del 92% de arsénico en suelos utilizando SPs producidos por *P. Azotoformans* (Nair y col., 2007). En relación a otros metales, se ha reportado que la bacteria *Kluyvera ascorbata* SUD 165 (mutante sobreproductora de SPs), puede reducir la toxicidad de Ni(II), Pb(II) y Zn(II) en plantas de tomate y en humedales (Burd y col., 2000).

Los SPs también juegan un papel vital en la movilización de metales a partir de desechos de minas. Los SPs producidos por *Pseudomonas fluorescens* en diferentes condiciones de cultivo fueron capaces de movilizar metales como Fe, Ni, y Co presentes en lixiviados de minas de uranio (Edberg y col., 2010).

Aunque los SP tienen el potencial de movilizar metales, la eficiencia de estos metabolitos microbianos depende de varios factores, tales como el metal en cuestión y su

estado de oxidación, la carga de los SPs, el pH del suelo, su composición mineral, y el contenido de materia orgánica del mismo.

Fitorremediación

Las bacterias productoras de SPs han sido utilizadas para ayudar en la fitoextracción de metales en ambientes contaminados. Los SPs producidos por bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas se unen a iones metálicos y los ponen a disposición de las raíces, aumentando así la capacidad de las plantas en la fitoextracción (Rajkumar y col., 2010) (ver **Fig. 46**). Por ejemplo, los SPs de la familia de hidroxamatos, tales como la desferrioxamina B, desferrioxamina E y coeliquelina producidos por *Streptomyces acidiscabies* E13 y *Streptomyces tendae* F4 asociados con poroto tape y girasol respectivamente, producen un aumento en la captación de Al(III), Cu(II), Mn(II), Ni(II), U(VI) y Cd(II) (Dimkpa y col., 2008 y 2009).

Braud y col. (2009b) informaron que la inoculación de suelos con *P. aeruginosa* dio como resultado un aumento de las concentraciones de Cr y Pb biodisponible en comparación con los respectivos controles de suelos no inoculados. Por otro lado, también observaron que la bacteria *P. aeruginosa* mejora de forma significativa la acumulación de Cr y Pb en los brotes de maíz.

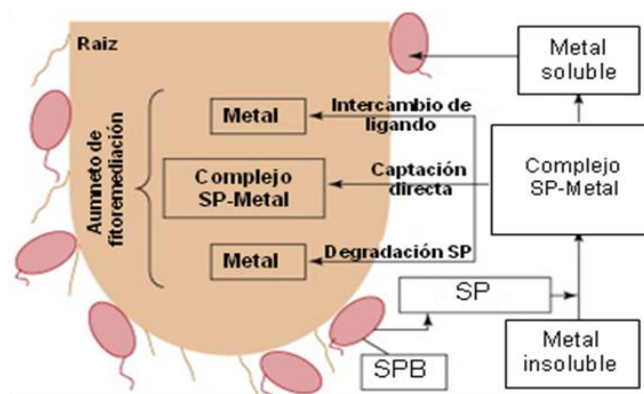


Fig. 46 Papel de las bacterias productoras de SPs (SPB) en fitorremediación de suelos contaminados por MRAs (adaptación Rajkumar y col., 2010). Los SPs producidos por bacterias de la rizósfera solubilizan los metales no biodisponibles por complejación. Las plantas pueden absorberlos por su raíz a partir de complejos SP-metal directamente, degradando el SP o intercambiando ligandos.

Pioverdinas, principal grupo de sideróforos producidos por Pseudomonas

En relación a los objetivos de este trabajo, a continuación se amplía la descripción de los SPs producidos por la especie *Pseudomonas*.

Pioverdinas (Pvds) es el nombre genérico dado a una amplia familia de pigmentos verde-amarillentos fluorescentes producidos por especies de *Pseudomonas* del grupo fluorescente. A valores de pH neutros y en condiciones fisiológicas, las Pvds se unen al ion Fe(III) con una gran afinidad ($\text{Log } K' = 21 - 31$, Cezard y col., 2015). No son los únicos SPs secretados por las *Pseudomonas*; éstas también liberan pioquelina, quinolobactina y ácido salicílico, aunque en una proporción diez veces menor que la cantidad de Pvds secretadas, y con una afinidad por el ion Fe(III) también menor (Boukhalfa y Crumbliss, 2002; Cezard y col., 2015).

La estructura química de estos SPs presenta tres sitios de unión al Fe(III), uno de tipo catecol y dos de tipo hidroxamatos, complejando al ión con una estequiometría 1:1 y así adoptando una geometría octaédrica.

En la **Fig. 47** se observan las tres partes que conforman la estructura de las Pvds:

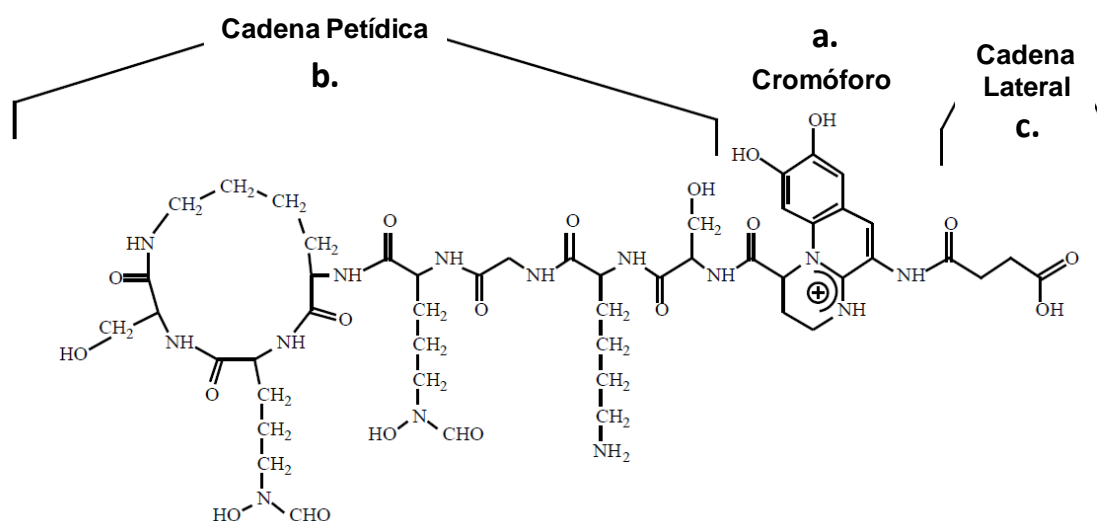


Fig. 47 Estructura de Pioverdina producida por *P. fluorescens* ATCC13525.

a) Cromóforo fluorescente, derivado de 2,3-diamino-6,7-dihidroquinolina. Ésta zona se mantiene conservada en la mayoría de los derivados de cepas de *Pseudomonas* y

puede unir al ion Fe(III) a través del grupo catecol. El cromóforo es la única parte de las Pvds que posee propiedades espectroscópicas. En el espectro UV-Visible posee bandas de absorción debido a la presencia del grupo catecol. A valores de pH de 5, las Pvds poseen una banda característica de emisión de fluorescencia de 450 nm de longitud de onda, y dos bandas de absorción a 360 y 380 nm de longitud de onda, respectivamente. A valores de pH de 8, sólo una banda de absorción se mantiene a una longitud de onda de 400 nm. Estas características se modifican cuando se forman los complejos Pvd-Fe(III), donde se observa el *quenching* de la fluorescencia y se manifiesta una nueva banda a una longitud de onda aproximadamente de 500 nm en el espectro de absorción (Meyer y Abdallah, 1978) .

b) Cadena peptídica: Es un péptido específico compuesto por 6 a 14 aminoácidos. La mayoría de los aminoácidos que constituyen la parte peptídica son polares (Ser, Lys, Thr, Asp, ...) de manera de garantizar al compuesto solubilidad en medio acuoso y la capacidad de interactuar con el receptor. Algunas Pvds pueden presentar aminoácidos poco comunes como ornitina y derivados o ácido diaminobutírico, entre otros.

Esta cadena puede ser cíclica o lineal e interactúa con el ion Fe(III) por medio de los grupos hidroxamato y/o α -hidroxicarboxilatos. Este resto peptídico difiere entre cepas y especies en la cantidad, longitud, composición y configuración de los aminoácidos de la porción que se utiliza para el reconocimiento de la cepa (Fuchs y col., 2001).

c) Cadena lateral: correspondiente a un derivado de ácido carboxílico. Dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo, este residuo puede corresponder a ácido succínico, ácido málico y sus derivados amidos, o ácido glutárico y su derivado ácido α -cetoglutárico. Debido a que esta cadena lateral no interacciona con Fe(III) y no afecta su transporte e incorporación intracelular, la bacteria puede secretar una o varias Pvds que solo difieren en esta parte de la estructura, llamadas isoformas (Meyer y col.,2002).

A continuación se describen los objetivos específicos planteados en este trabajo para el estudio de los SPs producidos por *P veronii* 2E.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la producción de sideróforos por parte de *Pseudomonas veronii* 2E, obtener la estructura química, estudiar su interacción con diferentes metales y explorar su utilización para la remoción de Cd(II) retenido en diatomitas.

Objetivos específicos

- ❖ Determinar las condiciones de cultivo para la producción de sideróforos por *Pseudomonas veronii* 2E;
- ❖ Identificar los principales grupos funcionales de los sideróforos utilizando ensayos espectrofotométricos;
- ❖ Evaluar el efecto de diferentes metales (Ni(II), Zn(II), Cu(II), Cr(III) y Cd(II)) en la producción de sideróforos;
- ❖ Evaluar la interacción de Ni(II), Zn(II), Cu(II), Cr(III) y Cd(II) con los sideróforos;
- ❖ Extraer y purificar el/los sideróforos;
- ❖ Explorar por HPLC la naturaleza de los sideróforos extraídos;
- ❖ Obtener la masa molecular de los sideróforos utilizando la técnica LC-MS;
- ❖ Obtener la estructura del principal sideróforo secretado mediante LC-MS/MS;
- ❖ Estudiar la interacción de los sideróforos con respecto a Cd(II) utilizando la técnica de VPE;
- ❖ Explorar la utilización de sideróforos en la remoción de Cd(II) retenido en diatomitas;

RESUMEN

Los sideróforos son moléculas orgánicas de baja masa molecular que son secretados por microorganismos bajo condiciones de escasez de hierro, para complejarlo y solubilizarlo, haciéndolo biodisponible para su incorporación. A pesar de su especificidad con hierro, hay evidencia de que estos metabolitos pueden unirse a otros metales de relevancia ambiental como Zn(II), Cu(II), Co(II), Mn(II), Al(III) y radionucleidos, como UO_2^{2+} , afectando la solubilidad y destino de estos contaminantes en el medio ambiente. Esta estrategia puede ser utilizada para la remoción de metales de sólidos contaminados.

Este Capítulo II se focaliza en la producción y caracterización de los sideróforos producidos por *P. veronii* 2E. En presencia de Cd(II), Zn(II), Ni(II), Cu(II) y Cr(III) se evalúa la producción de sideróforos, como estos interactúan con dichos metales y se explora la posibilidad de utilizarlos en la remoción de Cd(II) en suelos contaminados.

Palabras clave: sideróforos, *Pseudomonas veronii* 2E, Cd(II), Zn(II), Ni(II), Cu(II), Cr(III), capacidad complejante, pioverdina, HPLC, LC-MS, LC-MS/MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo experimental los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron analizados estadísticamente.

Estudio de la producción de sideróforos

Para estudiar la producción de sideróforos (SPs) por parte de *P. veronii* 2E, se testaron diferentes medios de cultivo líquidos. Los cultivos se desarrollaron en Erlenmeyers que contenían 10 ml del medio líquido a evaluar. Las condiciones de crecimiento fueron: 40 h (tiempo en el cual se observó producción de sideróforos), 32 °C, 120 rpm, pH inicial 7,0. El pre-inóculo se realizó en el mismo medio por 24 h (fase exponencial).

Los medio testeados fueron: PYG_{0,5%}; M9 succinato de sodio 0,5% (m/v) (M9S) y M9 glicerol 2% (v/v) (M9G) (*ver Anexo I: Composición Medios de Cultivo*).

Teniendo en cuenta que la secreción de los SPs se ve afectada por trazas de Fe(III) en el medio de cultivo, el material utilizado fue lavado con HCl 6 M (Anedra 37% (p/p)) y agua provista por equipo Millipore Simplicity (18 MΩcm) (MilliQ). Los medios de cultivo fueron preparados con agua MilliQ.

Optimización en la producción de sideróforos

Se estudiaron diferentes factores que pueden afectar la secreción de SPs por parte de la bacteria, a saber: la temperatura, el pH y el tiempo de crecimiento bacteriano. Estos se estudiaron en el mejor medio de producción de SPs hallado (M9S).

Efecto de la temperatura

Se evaluaron cuatro temperaturas de crecimiento: 20 °C, 25 °C, 32 °C y 38 °C. Nuevamente, se activó la bacteria en un pre-inóculo en un Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml del medio de cultivo y se incubó hasta fase exponencial. Luego, se transfirieron 10 ml de cultivo a otro Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio fresco y se incubó a la temperatura estudiada en las mismas condiciones que el pre-inóculo hasta fase estacionaria.

Efecto del pH

Para estudiar si el pH del medio de cultivo afectaba la producción de los SPs, *P.veronii 2E* creció en un medio M9S en el cual se ajustó el valor de pH previamente a la inoculación. Las soluciones reguladoras utilizadas fueron: MES (ácido 2-(N-morfollietansulfónico); pH= 5,8); PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis(2-etansulfónico); pH= 6,2); Fosfato ($\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$; pH=6,9) y HEPES (ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazin-N'-(2-etansulfónico); pH=7,8). La concentración de las soluciones buffer fue de 0,01 M. Todos los reactivos son de calidad analítica (Sigma).

Efecto del tiempo de crecimiento bacteriano

Una vez determinadas las mejores condiciones de temperatura y valor de pH, se evaluó la producción de SPs en el tiempo por parte de *P. veronii 2E*. Se tomaron alícuotas del medio de cultivo a diferentes tiempos y se determinó el crecimiento bacteriano y la producción de SPs. El crecimiento (DO) fue evaluado a 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Lambda 25, PerkinElmer). Para estudiar la secreción de SPs se removió las células bacterianas por centrifugación a 7000 g durante 15 min y luego se midió la absorbancia a 404 nm correspondiente al pico de absorción presente en su estructura química (J.M.Meyer, 1978; Kumar y Dube, 1991; Merja y Tiina, 1994). El resultado fue expresado como producción de sideróforos, (Absorbancia de sobrenadante a $\lambda=404$ nm *f.d); donde f.d corresponde a factor de dilución. Las diluciones se realizaron con agua MilliQ con el fin de que las absorbancias no superen el valor de 1,5.

Detección y caracterización de sideróforos

Se utilizaron distintos métodos de detección. Para evaluar la producción de SPs en los sobrenadantes de cultivo se utilizó el método universal agar-CAS; el ensayo CAS-líquido (por ser un ensayo más sensible que el correspondiente en agar); o la absorbancia del metabolito a 404 nm por ser un método rápido.

Agar-CAS

La producción de sideróforos en diferentes medios fue evaluada por el ensayo universal Chrome Azurol S (CAS) (Schwyn y Neilands, 1987). El experimento se basa en la competición por el Fe(III) que se establece entre los SPs y el colorante formado por CAS-CTAB, (CTAB, bromuro de cetiltrimetilamonio). Los SPs poseen una afinidad por el Fe(III) mayor que la que posee este metal por el colorante, en consecuencia cuando el SP está presente éste puede remover el ion del complejo $Fe(CAS-CTAB)^{3-\alpha}$; y la liberación del colorante está acompañada por un cambio de color (de azul a amarillo-naranja) (ver **Fig. 48**). En el ensayo original, la bacteria a testear se hace crecer en un agar que contiene CTAB. Debido a que el CTAB resultó tóxico para la bacteria *P. veronii* 2E, se realizaron algunos cambios al ensayo universal Agar-CAS los cuales consistían en utilizar el sobrenadante del medio de cultivo a estudiar, utilizar una menor cantidad de buffer PIPES y no agregar fuente de carbono ni nitrógeno (permitiendo trabajar sin esterilidad).

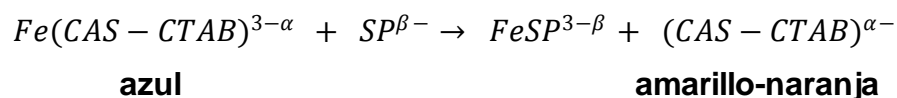


Fig. 48 *Reacción para reconocimiento de SP, ensayo universal CAS.*

Obtención de sobrenadantes: La bacteria se hizo crecer en los diferentes medios a testear para la producción de SPs, luego se separó el sobrenadante por centrifugación (7000 g, 15 min) y se filtró a través de una membrana de nitrato de celulosa 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore) para eliminar células. El filtrado fue utilizado para el ensayo.

Preparación de Agar-CAS: volumen final 100 ml

Solución 1: CAS-CTAB

Se preparó la solución a partir de 7,5 ml de Chrome Azurol S 2 mM y se le agregó 1,5 ml de una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (en HCl 10 mM). Posteriormente, se agregó lentamente y con agitación continua 6 ml de una solución de CTAB 10 mM. La solución azul resultante se llevó a 50 °C.

Solución 2: buffer –agar.

Se disolvieron 0,6 g de PIPES en 85 ml de agua MilliQ y se llevó a pH 6,8 utilizando una solución de KOH 6 M. A la solución anterior se le agregó 1,5 g de agar-agar y se calentó hasta disolución total. Se llevó a una temperatura final de 50 °C.

Procedimiento: Las soluciones 1 y 2 que se encontraban a 50 °C se mezclaron y se realizaron las correspondientes placas de agar-CAS. Cuando se encontraron gelificadas, se realizaron orificios de 5 mm con un sacabocado. Luego las placas fueron secadas en estufa por una hora a 32 °C y en cada orificio se adicionó 75 μl de sobrenadante libre de células. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin inocular y como control positivo se utilizó sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* PA01¹⁸. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 h. Un halo de color naranja o amarillo es indicio de presencia de SPs en la muestra testada.

La producción de SPs en *P. veronii* 2E se estimó midiendo el diámetro del halo formado en el ensayo agar-CAS, comparándolo con el producido por la *P. aeruginosa* PA01 y se expresó el resultado como

$$\text{Diámetro relativo} = \frac{(\text{diámetro}/\text{DO})_{2E}}{(\text{diámetro}/\text{DO})_{PA01}} \quad (\text{Ec.1})$$

Ensayo CAS Líquido

El ensayo de CAS Líquido posee mayor sensibilidad que el agar-CAS. Por esta razón fue utilizado para evaluar la producción de SPs a diferentes temperaturas y pH en el medio productor de SPs encontrado en la sección anterior. Las muestras a testear se obtuvieron de la misma forma que para el ensayo Agar-CAS (sobrenadantes de medio de cultivo sin células).

Solución CAS-Líquido: volumen final 100 ml

¹⁸ *Pseudomonas aeruginosa* produce diferentes SPs, principalmente pioverdina (Pvd) (Cox CD, 1979; Visca, 1992).

Se preparó la solución a partir de 7,5 ml de Chrome Azurol S 2 mM y se agregó 1,5 ml de una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mM (en HCl 10 mM). Posteriormente, se agregó lentamente y con agitación continua 6 ml de una solución de CTAB 10 mM. A la solución anterior se le adicionó 0,6 g de PIPES cada 85 ml (pH= 6,8). La solución resultante se trasladó a un matraz de 100 ml y se llevó a volumen con agua MilliQ.

Procedimiento: Se mezclaron 1,5 ml de la solución de CAS con 1,5 ml del sobrenadante filtrado. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin inocular y como control positivo se utilizó sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Luego de 30 min se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 630 nm. El resultado se expresó como porcentaje de disminución de SP frecuentemente denominado en bibliografía como % sideróforo:

$$\% SP = \left[\frac{(Ar - As)}{(Ar \cdot DO)} \right] \cdot 100 \quad (\text{Ec.2})$$

Ar es la absorbancia de referencia del medio M9S medida a 630 nm (solución CAS + medio s/inocular) y As es la absorbancia a 630 nm de la muestra (solución CAS + sobrenadante) (Sayyed y col., 2005).

Ensayo rápido en FeCl_3

Debido a la gran afinidad que presentan los SPs por el Fe(III), un ensayo rápido y simple para evaluar su presencia es el test con FeCl_3 . Un mililitro de sobrenadante que contiene los SPs se mezcló con 20 μl de una solución de FeCl_3 1% (m/v). Una coloración naranja-marrón indica la presencia del SP (Perez-Miranda y col., 2007).

Espectro de absorción

El sobrenadante obtenido en medio M9S libre de células fue ajustado a pH 3, 7 y 8 con una solución de HCl 6 M. La absorbancia de las muestras fue medida entre 230-500 nm en un espectrofotómetro utilizando cubetas de cuarzo. Posteriormente, se adicionaron 20 μl de una solución de FeCl_3 0,1% (m/v), se agitó y se midió nuevamente la absorbancia.

Determinación de grupos funcionales en los sideróforos producidos

Detección de grupo catecol

La detección del grupo catecol presente en la estructura de los SPs se realizó con dos ensayos colorimétricos: el ensayo de Arnow (1973) y el ensayo de Rioux (1983). El ensayo de Arnow es ampliamente utilizado para detectar grupos catecol en SPs, pero posee dos limitaciones: el límite de detección (10-20 μM) y la reacción depende del tipo de catecol. La reacción de Rioux detecta catecoles con una sensibilidad mucho mayor al ensayo de Arnow y es independiente del tipo de catecol estudiado, pero requiere preparar los reactivos en el momento de realizar el experimento.

Aunque los dos métodos son usados para detectar catecoles, algunos SPs que contienen este grupo no dan una reacción positiva para el ensayo de Arnow y sí para el ensayo de Rioux (Leong y Neilands, 1982). Por tal motivo se realizaron ambos ensayos.

Obtención de solución a testear: La bacteria se inoculó en M9S (40 h, 25 °C, pH 7) luego se separó el sobrenadante por centrifugación (7000 g, 15 min) y se filtró a través de una membrana de nitrato de celulosa (Millipore, 0,45 μm) para eliminar cualquier célula. El filtrado se utilizó para el ensayo.

Ensayo de Arnow

El ensayo se basa en la reacción del grupo catecol con el HNO_2 para formar un nitrocompuesto de color amarillo, que luego en presencia del NaOH produce un color rojo intenso (estable en presencia de Na_2MoO_4). Compuestos cis diol como 2,3-dihidroxinaftaleno inhiben el paso de nitración u ocurre en otra posición y un color amarillo es aceptado como positivo.

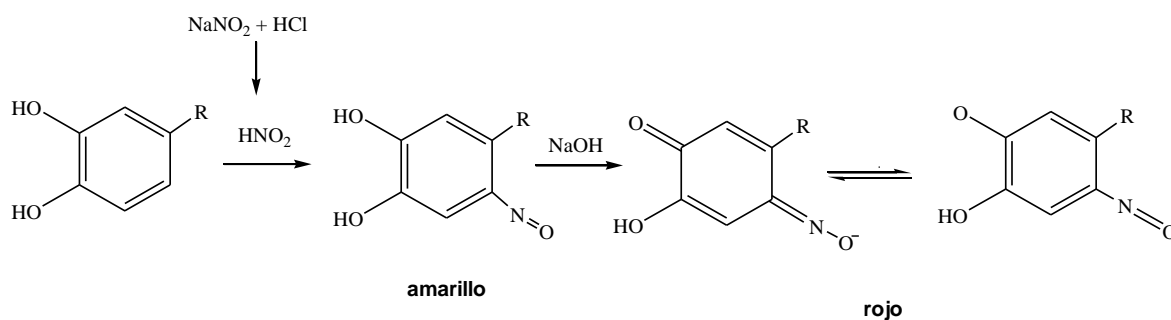


Fig. 49 Reacción sugerida para el ensayo de Arnow (da Silva Ribeiro y Morais Duarte, 2014).

Los reactivos pueden ser preparados y guardados por varias semanas.

Reactivos: solución de HCl 0,5 M; 100 ml de una solución que contiene 10 g de NaNO_2 y 10 g Na_2MoO_4 ; solución de NaOH 1 M.

Procedimiento: 0,5 ml de la muestra se mezclaron con 0,5 ml de HCl y 0,5 ml de la solución de NaNO_2 , luego se adicionó 0,5 ml de la solución de NaOH.

Como control positivo se utilizó una solución que contenía ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) y sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Como control negativo fue utilizado el medio de cultivo sin inocular.

Ensayo de Rioux

Este ensayo detecta catecoles en posición orto y para. La reacción consiste en reducir Fe(III) a Fe(II) por acción de los grupos hidroxilos vecinos presentes en el grupo catecol, el ion ferroso luego forma un complejo color naranja-rojo con la fenantrolina presente en el medio. Los reactivos deben ser preparados en el momento de su utilización.

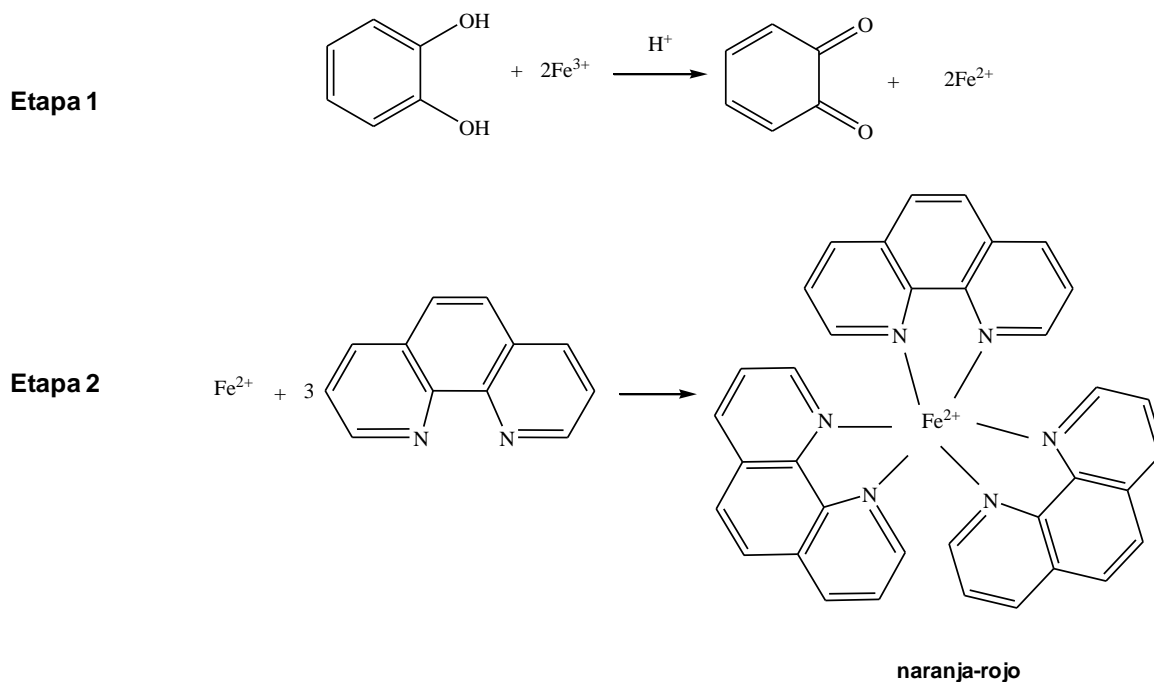


Fig. 50 Reacción de Rioux. Etapa 1: oxidación de grupos hidroxilo y reducción de Fe(III) a Fe(II) . Etapa 2: el Fe(II) forma complejo naranja-rojo con 1,10-fenantrolina.

Reactivos: solución de H₂SO₄ 20% (v/v); solución de 1,10-fenantrolina 1% (m/v); solución citrato de hierro 1% (m/v) en H₂SO₄ 0,2 M; solución de hidroxiquinolina en CHCl₃ 3% (m/v).

Procedimiento: Se realizó una pequeña modificación del ensayo de Rioux. En el ensayo original se utiliza una solución de NH₄F para eliminar el Fe(III) que puede interferir posteriormente en la detección del complejo coloreado de Fe(II)-fenantrolina; en su lugar se realizó una extracción previa del Fe(III) con la solución de hidroxiquinolina.

Los reactivos fueron adicionados en el siguiente orden y mezclados luego de cada adición: 2,3 ml de agua MilliQ, 0,2 ml de la solución de H₂SO₄, 1 ml del sobrenadante filtrado, 0,1 ml de la solución de citrato férrico. La mezcla se extrajo luego con 2 volúmenes de la solución de hidroxiquinolina y posteriormente se agregaron 0,4 ml de la solución de fenantrolina. Por último se incubaron por una hora a 60 °C.

Como control positivo se utilizó una solución de ácido 2,3-dihidroxibezoico (2,3-DHBA) y sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Como control negativo fue utilizado el medio de cultivo sin inocular.

Detección de grupo hidroxamato

Ensayo de Csáky

Para la detección de los grupos hidroxamatos presentes en los sideróforos, se utilizó el ensayo desarrollado por Csaky (1948) y modificado posteriormente por Gillamm(1981). En el ensayo, la muestra es calentada en H₂SO₄ para obtener hidroxilamina libre que luego es oxidada hasta HNO₂ por acción del I₂. Luego la sulfanilamida en presencia de HNO₂ y de N-(1-naftil)etilendiamina forma una sal de diazonio color roja.

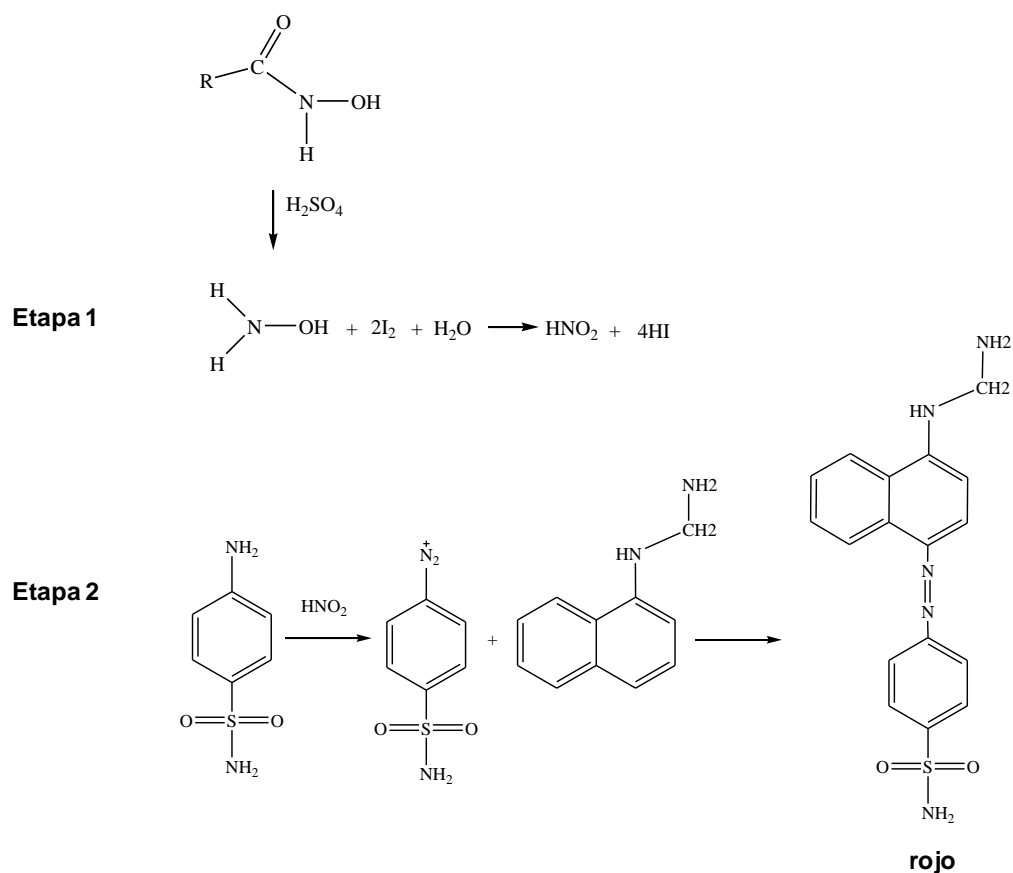


Fig. 51 Reacción propuesta para la detección de grupos hidroxámicos. La hidrólisis con ácido sulfúrico produce hidroxilamina que luego (Etapa 1) es oxidada en presencia de iodo a HNO_2 ; en la Etapa 2 en la sulfanilamida en presencia de HNO_2 y de $N-(1-naftil)etilendiamina$ forma una sal de diazonio color roja.

Obtención de solución a testear: La bacteria se inoculó en M9S (40 h, 25 °C, pH 7) luego se separó el sobrenadante por centrifugación (7000 g, 15 min) y se filtró a través de una membrana de nitrato de celulosa (Millipore, 0,45 μm) para eliminar cualquier célula. El filtrado se utilizó para el ensayo.

Reactivos: H_2SO_4 3 M, acetato de sodio 2 M, solución de sulfanilamida 1% (m/v) en ácido acético 30% (v/v); $N-(1-naftil)etilendiamina$ 0,05% (m/v), I_2 0,65% (m/v) en solución de KI 1% (m/v), $Na_2S_2O_3$ 1,5% (m/v).

Procedimiento: 1 ml de la muestra se mezcló con 1 ml de la solución de H_2SO_4 y se hizo reaccionar por 4 h a 120 °C. Posteriormente a la muestra digerida, se le adicionó 3 ml de solución de acetato de sodio junto con 1 ml de solución de sulfanilamida y 1 ml de la solución de I_2 . Se mezcló durante 5 min y luego se agregó 1 ml de la solución de $Na_2S_2O_3$ y 1 ml de la solución de $N-(1-naftil)etilendiamina$. El color rojo se desarrolló luego de los 30 min.

Estimulación o represión de la síntesis de sideróforos

Para evaluar el efecto de metales sobre la biosíntesis de SPs, se realizaron agregados al medio líquido M9S hasta alcanzar concentraciones finales de 0,01 mM, 0,1 mM y 0,5 mM de Zn(II), Cd(II), Ni(II), Cu(II) y Cr(III). Se inoculó con 1 ml de pre-inóculo (crecido en el mismo medio pero sin agregado de metales) 10 ml de medio de cultivo adicionado con metales. El crecimiento bacteriano y la producción de SPs se midió a 600 nm y 404 nm, respectivamente.

Las sales que se emplearon para preparar soluciones estándar de metales fueron las siguientes: CdCl₂.H₂O (contenido máximo de Fe(III) 0,001%), ZnSO₄.7 H₂O (contenido máximo de Fe(III) de 0,001%), Cu (NO₃)₂.3H₂O (contenido máximo de Fe(III) de 0,002%), NiSO₄.6 H₂O (contenido máximo de Fe(III) de 0,001%) y CrCl₃.6H₂O (contenido máximo de Fe(III) de 0,001%) . Las soluciones madre 10 mM se esterilizaron por filtración a través de una membrana de nitrato de celulosa (Millipore, 0,45 µm).

Todas las concentraciones de metales utilizadas se encuentran por debajo de la concentración mínima inhibitoria (CIM) (Vullo y col., 2008; Garavaglia y col., 2010). El valor del pH inicial fue 6, para evitar precipitaciones de los cationes estudiados.

Estudio de la interacción del sideróforo con Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ni(II) y Cr(III)

Para evaluar la interacción entre SPs y metales, se incubó el sobrenadante libre de células proveniente de un cultivo de *P. veronii* 2E en M9S con Zn(II), Cd(II), Ni(II), Cu(II) o Cr(III) en un rango de concentración final entre 1 a 100 µM. La experiencia se realizó durante 3 h con agitación a 120 rpm y temperatura ambiente. La interacción se determinó midiendo un espectro de las diferentes soluciones entre las longitudes de onda 320-480 nm. Como control negativo se utilizaron medios M9S con metales y sin inocular.

Caracterización del sideróforo como ligando de Cd(II)

Se evaluó la interacción de los SPs producidos por *P. veronii* 2E en medio M9S, utilizando voltamperometría de preconcentración electrolítica (VPE), (*ver Anexo II: VPE-Fundamentos Electroquímicos*).

Obtención de solución a testear: La bacteria se inoculó en 100 ml en M9S (40 h, 25 °C, pH 7) luego se separó el sobrenadante por centrifugación (7000 g, 15 min) y se filtró con vacío a través de un pre-filtro (Millipore, 1,2 µm) y una membrana de nitrato de celulosa (Millipore, 0,45 µm) para eliminar cualquier célula. Posteriormente, se adicionaron 2,2 volúmenes de etanol y la mezcla se incubó 24 h a 4 °C. Luego, se descartó el precipitado y se concentró el sobrenadante utilizando evaporador al vacío hasta sequedad. El sólido resultante se resuspendió en 30 ml de agua MilliQ, se llevó a pH 4 con HCl 6 M y se incubó por 6 h con 15 g de resina XAD-2 (Arbelite, XAD-2, Rohm and Haas), estabilizada previamente con una solución de agua-metanol 1:1. Luego de la incubación se colocó en una columna la resina que tenía sorbido los SPs y se lavó con 3 volúmenes de agua (pH=4-5). Se eluyó los SPs con agua: metanol 1:1 y se llevó a sequedad en un concentrador utilizando bomba de vacío.

El sólido se resuspendió en 10 ml de agua MilliQ y se lo incubó 1 h con 0,5 g de resina de intercambio iónico (Chelex®100, BioRAD) para eliminar trazas de metales que puedan estar interaccionando y bloqueando los sitios de unión en los SPs. Seguido a lo anterior, se filtró y se conservó el filtrado que se utilizó para estudiar la interacción de los SPs frente a Cd(II).

Titulación: Las titulaciones por VPE fueron medidas en las condiciones detalladas en la sección Materiales y Métodos, Capítulo I. Se utilizó una solución buffer MES 0,01M (pH =6,2) en KNO₃ 0,05 M (electrolito soporte) al cual se le adicionaron 400 µl de la solución a testear. El valor de pH utilizado fue seleccionado para minimizar la descomposición del metabolito. La concentración del SP fue estimada utilizando la ley Lambert Beer y el coeficiente de extinción para la pioverdina a 400 nm ($\epsilon=1,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Barelmann y col., 2003).

Purificación de sideróforos

La purificación de los SPs producidos en M9S por *P. veronii* 2E consistió en tres partes: purificación parcial, extracción y utilización de resinas.

Purificación parcial

Se esterilizaron 500 ml de sobrenadante de cultivo con SPs a través de un pre-filtro de membrana de nitrato de celulosa (Millipore, 1,2 μm y 0,45 μm) para eliminar cualquier célula, utilizando bomba de vacío. Posteriormente, se le adicionaron 2,2 volúmenes de etanol y la mezcla se almacenó 24 h a 4 °C. Luego, se concentró el sobrenadante utilizando evaporador al vacío hasta sequedad.

El sólido se resuspendió en 50 ml de agua MilliQ y se llevó a un valor de pH entre 4 - 5 con una solución de HCl 6 M. Se agregaron 0,5 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se incubó nuevamente por 24 h. Posterior a este paso, se centrifugó (7000 g, 15 min) y se conservó el sobrenadante con una coloración parda característica de la interacción SP-Fe(III).

Extracción complejo sideróforo-Fe(III)

Se realizaron tres extracciones sucesivas con 25 ml de Fenol: CHCl_3 (1:1) a 50 ml de la solución que contenía SP-Fe (III).

La fase orgánica, que contenía el complejo, se extrajo posteriormente con 1 volumen de dietil éter y 15 ml de agua destilada. Se repitió el agregado de 15 ml de agua y la extracción con dietileter hasta que en la fase orgánica no se observó color pardo y pasó todo a la fase acuosa. Luego a ésta fase se lavó tres veces con 20 ml de dietil éter para eliminar restos de fenol. A continuación, la fase acuosa se evaporó al vacío hasta sequedad y el sólido se resuspendió en 4 ml de agua MilliQ. La concentración final fue de 1,7% (m/v).

Utilización de resinas

Resina Sephadex G-25

Se armó una columna con 3 ml de resina G25 (estabilizada previamente con agua-metanol 1:1). Se sembraron 250 µl de la solución de SP-Fe(III) 1,7% (m/v) y se lavó la columna con tres volúmenes de agua (pH=4-5). Luego se eluyó el extracto con una solución de agua: metanol 1:1. Las fracciones que contenían al complejo coloreado se juntaron y llevaron a sequedad en un concentrador. El sólido se resuspendió en 500 µl de agua MilliQ.

Resina de fase reversa C18

Se armó una columna con 3 ml de resina RP-18 (fase estacionaria de octadecil (C18), Lichroprep, 25-40 µm, Merck) estabilizada previamente con agua-metanol 1:1. Se sembraron 250 µL del extracto pasado previamente por G25, se lavó la columna con tres volúmenes de agua (pH=4-5) y luego se eluyó el complejo con agua: metanol 1:1. Las fracciones con el complejo coloreado se juntaron y llevaron a sequedad en un concentrador.

Análisis de sideróforos por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Para obtener información sobre la composición del/los SPs se utilizó la técnica de HPLC. La muestra eluida por la resina RP-18 fue analizada en un Liquid Chromatograph (Hewlett Packard, series 1090) con detección UV-Visible. La fase móvil utilizada consistió en A= ácido acético 50 mM y B= metanol. Los SPs fueron eluidos usando un gradiente 5% B hasta 10% en 15 min, seguido por 10% B hasta 30% B por 3 min, luego 30% B hasta 5% B por 2 min. El flujo fue mantenido a 0,7 ml/min y la composición del eluido fue monitoreada a 400 nm. La separación de los sideróforos se realizó por medio de una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 150 mm, 5 µm) conectada a una precolumna, (volumen inyectado 10 µl).

Todos los solventes utilizados son de calidad HPLC (Tedia).

Caracterización de sideróforos por LC-MS (Liquid chromatography - Mass Spectrometry)

La identificación de péptidos y proteínas en mezclas complejas se lleva a cabo actualmente mediante una serie de procedimientos que, si bien pueden utilizar una instrumentación muy variada, se asienta en dos estrategias básicas: el denominado mapeo de masas peptídicas mediante espectrometría de masas (usado en proteómica) y la secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem (se obtiene información estructural).

Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas o péptidos pueden ser divididos básicamente en:

1) Fuente de iones que generan e introducen los iones analitos en el instrumento: habitualmente se utilizan dos tipos de técnicas de ionización: MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y ESI (*Electrospray Ionization*), siendo esta última un ionizador suave que permite la ionización de moléculas termolábiles de gran tamaño, como los péptidos y las proteínas, sin producir extensiva degradación.

2) Detector para medir las masas de los iones generados. Las trampas de iones han sido uno de los sistemas más utilizados para la identificación de proteínas tanto en formato de acoplamiento LC/MS como mediante nanospray. Este es el caso del Orbitrap, un analizador que permite una separación de los componentes de la muestra y una posterior identificación de la masa molecular intacta de los mismos. Este tipo de analizadores confinan los iones dentro de una cámara de pequeño tamaño utilizando campos eléctricos. Los iones pueden mantenerse en el interior de la trampa durante tiempos prolongados con el objeto de favorecer la observación de descomposiciones metaestables o de fragmentos producidos por colisión con moléculas de gas. Los iones fragmentos generados en estos procesos pueden ser a su vez seleccionados y fragmentados de nuevo en la misma trampa de forma que el sistema equivale a un sistema de espectrometría de masas en tándem múltiple.

La obtención de la masa molecular fue realizada en CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa, Facultad de Ciencias Exactas

y Naturales, UBA). El análisis de la estructura química fue realizado a partir de los datos de MS/MS.

La muestra utilizada fue la obtenida en la purificación por resinas.

Tratamiento de la muestra

Se disolvió la muestra en ácido fórmico 0,1% en agua hasta una concentración de 1 µg/µl. Se analizó por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap.

La fase móvil utilizada consistió en una solución A (0,1% de ácido fórmico) y una solución B (0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo). El SP-Fe(III) fue eluído usando un gradiente 5% B hasta 40% en 35 min, seguido por 40% B hasta 95%B en 1 min, luego 95% B por 4 min. El flujo fue mantenido a 300 nl·min⁻¹.

La separación se realizó por medio de una columna EASY-Spray C18 apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa (2 µm, 100^a, 50 µm x 150 mm) a una temperatura de 35 °C. El volumen de inyección fue de 2 µl.

Todos los solventes y reactivos utilizados son de calidad LC-MS.

Ionizador

La ionización de la muestra se realiza por electrospray (Electro Spray Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY).

Voltaje del Spray: 3,5 kV.

Espectrómetro de masa

Se utilizó un espectrómetro marca Thermo Scientific, modelo QExactive. El equipo cuenta con una celda de HCD (High Collision Dissociation) y un analizador Orbitrap.

Los parámetros utilizados fueron Resolución: 70000, AGC: 3X106.

El análisis de los datos obtenidos se realizó manualmente con el programa Xcalibur.

Estudio de aplicaciones biotecnológicas de los sideróforos

Sorción de Cd(II) en diatomitas

Para estudiar la sorción de Cd(II) en las diatomitas, se mezclaron 55 mg de diatomitas molidas en mortero con 100 ml de diferentes concentraciones de solución de CdCl₂ (rango estudiado 1,2 – 88 μM, pH 6,2). Se incubó la mezcla por 24 h a 120 rpm y temperatura ambiente. Se separaron las tierras de diatomeas por centrifugación (7000 g, 15 min) y se determinó la concentración de Cd(II) en el sobrenadante utilizando el método de agregado patrón utilizando la técnica de VPE. Luego se determinó la constante de formación ($K'_{\text{diatomitas}}$) utilizando el modelo de Ruzic (*ver Anexo II: VPE- Fundamentos Electroquímicos*).

Las condiciones instrumentales fueron las mismas utilizadas en *Materiales y Métodos, Capítulo I*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación a los objetivos planteados, se determinaron las condiciones de cultivo para la producción máxima de SPs por *Pseudomonas veronii* 2E, se caracterizó y estudió su estructura y se evaluó el efecto de diferentes metales (Ni(II), Zn(II), Cu(II), Cd(II) y Cr(III)) en su producción. Este aspecto junto con las propiedades de ligando son particularmente relevantes en el tratamiento de las aguas residuales o de suelos contaminados, pues los SPs pueden aplicarse en la retención de metales.

Estudio de la producción de sideróforos

Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno

La producción de SPs se evaluó para los diferentes medios a testear en placas de Agar-CAS. En la **Fig. 52** se muestra el cambio de color que indica la presencia de SPs. En la placa se observa ausencia de halo para el control negativo (Sideróforo -), mientras que los medios de cultivo que contienen SPs producen halos de diferentes intensidades (Sideróforo +). El diámetro del halo varía dependiendo del medio estudiado.

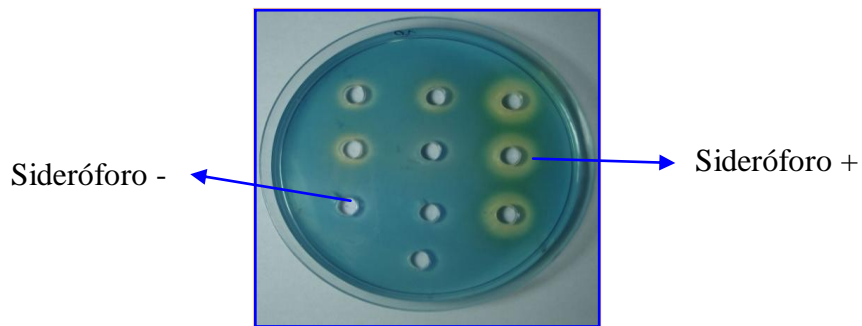


Fig. 52 Placa Agar-CAS para detección de sideróforos por *P. veronii* 2E.

Como se observa en la **Fig. 53** los SPs secretados por *P. veronii* 2E se detectaron en el medio M9S y M9G, pero no en el medio rico PYG_{0,5%}. Estos resultados son consistentes con los informados para otras *Pseudomonas* (J.M.Meyer, 1978; Boruah y Kumar, 2002;

Sharma y Johri, 2003). Se menciona en literatura que la presencia de succinato influye en la síntesis de este metabolito, por ejemplo, la cadena lateral de los SPs de grupo pioverdina (Pvd) puede ser ácido succínico o succinamida, (Demange y col., 1987; Budzikiewicz 1993; Fuchs y col., 2001; Mehri y col., 2012). *Barbhaiya y Rao* (1985), evaluaron cómo afectaban diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno a la producción de Pvd por parte de *P. aeruginosa* PA01 y observaron que los mejores resultados se obtenían cuando empleaban succinato como fuente de carbono en medio M9. Otros investigadores utilizaron diferentes medios de cultivo para la producción de SPs y sugieren que medios mínimos son mejores que medios ricos (Sharma y Johri, 2003). Esto puede deberse a la mayor concentración de hierro contenido en los medios complejos, siendo este elemento el factor principal en la biosíntesis de SPs.

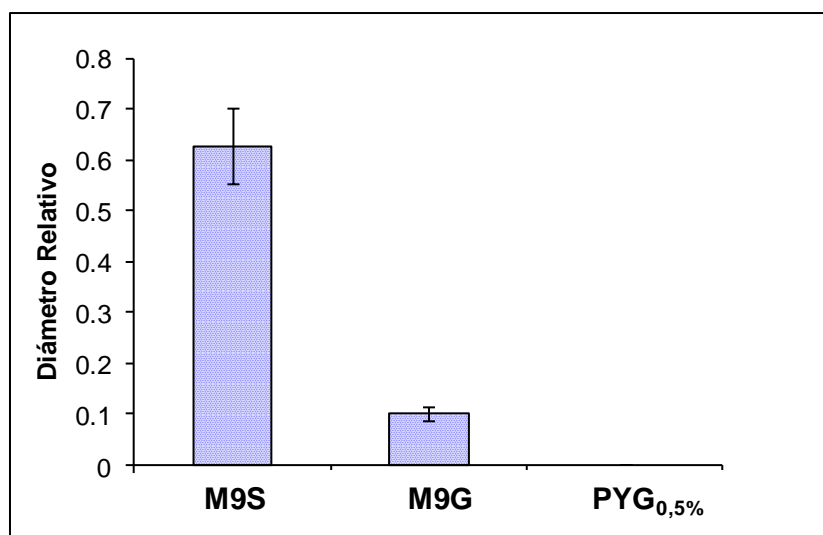


Fig. 53 Producción de sideróforos por *P. veronii* 2E en diferentes medio se cultivo: $PYG_{0,5\%}$, M9S y M9G a 25 °C. El Diámetro Relativo esta expresado como $(\text{diámetro}/DO)_{2E} \cdot (\text{diámetro}/DO)_{PA01}^{-1}$.

Optimización en la producción de sideróforos

Efecto de la temperatura y el pH

Para profundizar el estudio de producción de SPs en el medio de cultivo M9S, se evaluó si esta se veía afectada por la temperatura. Se estudiaron cuatro temperaturas diferentes: 20 °C, 25 °C, 32 °C y 38 °C. La detección de SP se realizó utilizando el ensayo

CAS-líquido que posee mayor sensibilidad que su correspondiente ensayo en agar, los resultados son más rápidos de obtener y poseen menor error, debido a que no se utiliza el sobrenadante de la cepa control positivo *P. aeruginosa* PA01 y se eliminan los problemas de difusión en agar. El porcentaje de SP fue expresado como % SP (Ec.2, ver *Materiales y Métodos*).

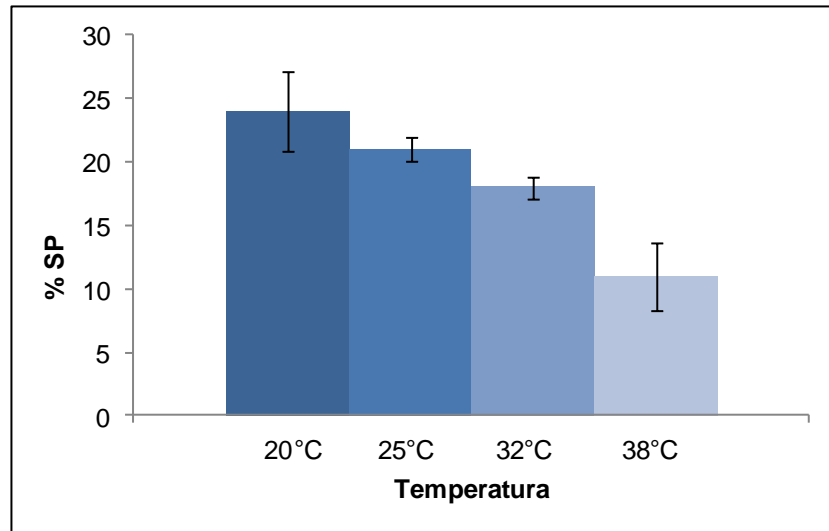


Fig. 54 Efecto de la temperatura en la producción de SPs en medio M9S. % SP expresado como $[(Ar-As):(Ar*DO)^{-1}]*100$.

Por lo general, la temperatura de crecimiento bacteriano influye en la producción de SPs por parte del género *Pseudomonas* (Loper y Schroth, 1986; Villegas, 2007). En el presente trabajo, se observó que la temperatura óptima de crecimiento para *P. veronii* 2E es de 32 °C en M9S, sin embargo, la secreción del o los SPs no fue máxima para esta temperatura. Como se puede observar en la **Fig. 54** los mejores resultados fueron obtenidos a las temperaturas más bajas ensayadas, y se eligió trabajar a 25 °C debido a que es más sencillo mantener la temperatura constante a este valor.

Otro parámetro que se evaluó, fue el pH. Para mejorar las condiciones de producción, se estudió la secreción del metabolito de interés a diferentes valores de pH, 5,8; 6,2; 6,9 y 7,8.

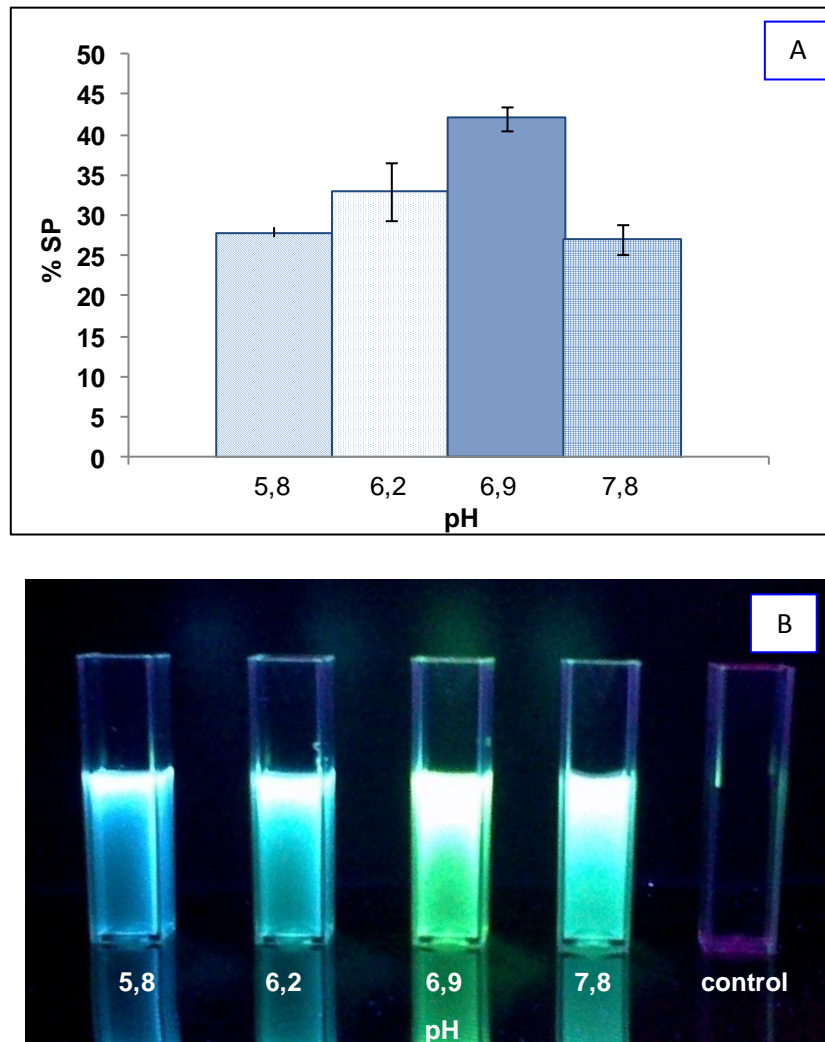


Fig. 55 A. Efecto del pH en la producción de SPs en sobrenadantes de *P. veronii* 2E. **B.** Fluorescencia de SP bajo luz UV 365 nm

Según la **Fig. 55 A** se puede observar un aumento de la siderogénesis cuando los valores de pH aumentan de 5,8 a 6,9.

Como se mencionó en la introducción, las bacterias necesitan concentraciones de Fe(III) en el orden de 1 μM ; si son menores, secretan SPs como estrategia para su captación e incorporación. Por lo tanto, se analizó si la diferencia de concentraciones de Fe(III) a diferentes valores de pH afectaba la secreción de SPs. Se estimaron las concentraciones de Fe(III)¹⁹ presentes en el medio M9S sabiendo que este ion se encuentra formando complejos con diferentes ligandos presentes en el medio ($\text{FeCl}_2^+(\text{ac})$; $\text{FeCl}_3(\text{ac})$; $\text{FeCl}_2^+(\text{ac})$; $\text{FeHPO}_4^+(\text{ac})$; $\text{FeH}_2\text{PO}_4^{2+}(\text{ac})$; $\text{Fe}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3^{-3}(\text{ac})$; $\text{Fe}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2)^+(\text{ac})$; $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}(\text{ac})$; $\text{Fe}(\text{OH})_2^+(\text{ac})$, $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{ac})$; $\text{Fe}(\text{OH})_4^-(\text{ac})$), siendo los más importantes los complejos solubles

¹⁹ Fe(III)_(ac) corresponde al ion férrico hexahidratado.

con hidroxilos. Por lo tanto, se calcularon las concentraciones de Fe(III) para los diferentes pH estudiados (ver **Tabla 18**). Los valores se obtuvieron a partir de la concentración de Fe(III) inicial en el medio M9S (aproximadamente $8 \mu\text{M}^{20}$), utilizando la constante de solubilidad y las constantes de formación que se encuentran en bibliografía (Martell y Smith, 2010).

Tabla 18 Concentraciones de Fe(III) (M) en medio M9S para valores de pH 5,8; 6,2; 6,9 y 7,8. Obtenidas a partir de constantes de estabilidad.

pH	[Fe(III)] (M)
5,8	$5,7 \times 10^{-11}$
6,2	$3,54 \times 10^{-12}$
6,9	$8,39 \times 10^{-14}$
7,8	$1,94 \times 10^{-16}$

Como se puede observar, a medida que aumenta el valor de pH disminuye la concentración de Fe(III) en la solución, junto con ello *P. veronii* aumenta la producción de SPs que son utilizados para obtener hierro. Como la menor concentración de Fe(III) se observa a pH 7,8 también se esperaban los máximos porcentajes de estimulación de siderogénesis, sin embargo el %SP fue comparable al observado a pH 5,8. Meyer y Abdallah (1978), observaron una degradación del 30% de SPs del grupo de Pvd cuando el pH era mayor a 8. La oxidación y degradación del grupo catecol también fue informada en otros estudios en soluciones básicas para la Pvd (Albrecht-Gary y col.; 1994). Por lo anterior, la disminución en la cantidad detectada de SPs en medio M9S a pH 7,8 podría deberse no a menor producción sino a la degradación del mismo.

En la **Fig. 55 B**, se observa máxima fluorescencia de los SPs secretados en el medio a pH 6,8. Es sabido que las *Pseudomonas* de la especie *fluorescens* secretan SPs del grupo Pvd que fluorescen con luz ultravioleta comprendida entre 254-365 nm, debido a la presencia del cromóforo en su estructura (ver **Fig. 47**) (Budzikiewicz, 1993; Villegas,

²⁰ La concentración máxima presente en el medio de cultivo M9S fue estimada a partir de la información de porcentaje de Fe(III) presente en los reactivos utilizados.

2007). Por lo tanto, esta característica que presentan también los SPs secretados por *P. veronii* confirman que podría pertenecer al grupo Pvd.

Efecto del tiempo de crecimiento bacteriano

Para poder detectar el momento en que la secreción del SP era máxima durante el crecimiento de la bacteria, se siguió su producción en el tiempo en paralelo con la producción de biomasa (medida como DO) en un cultivo en lote (*batch*) en las mejores condiciones de producción evaluadas (M9S, 25 °C, pH=6,9). Aunque no se conoce la estructura molecular del compuesto de interés en esta etapa, se pudo observar que en estas condiciones de cultivo produce un cromóforo verde-amarillo que absorbe aproximadamente a una longitud de onda en la cual lo hace la Pvd, un SP bien caracterizado para la *P. aeruginosa* (ver **Fig. 56 B**). Por ello, la producción de SP fue seguida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 404 nm. Esto fue observado por otros investigadores, como *Kumar y Dube* (1991) que reportaron los espectros UV-visible de sobrenadantes libres de células para una variedad de *Pseudomonas fluorescens* y notaron que había un máximo de absorbancia alrededor de 400 nm, característica de los SPs del grupo Pvd producidos por esta especie.

Por otro lado, al analizar la producción del metabolito en el tiempo, se observó que ésta es máxima en la fase estacionaria de crecimiento en lote (ver **Fig. 56 A**). El estancamiento del crecimiento bacteriano cuando llega a la fase estacionaria inhibe los procesos metabólicos, entre ellos la siderogénesis.

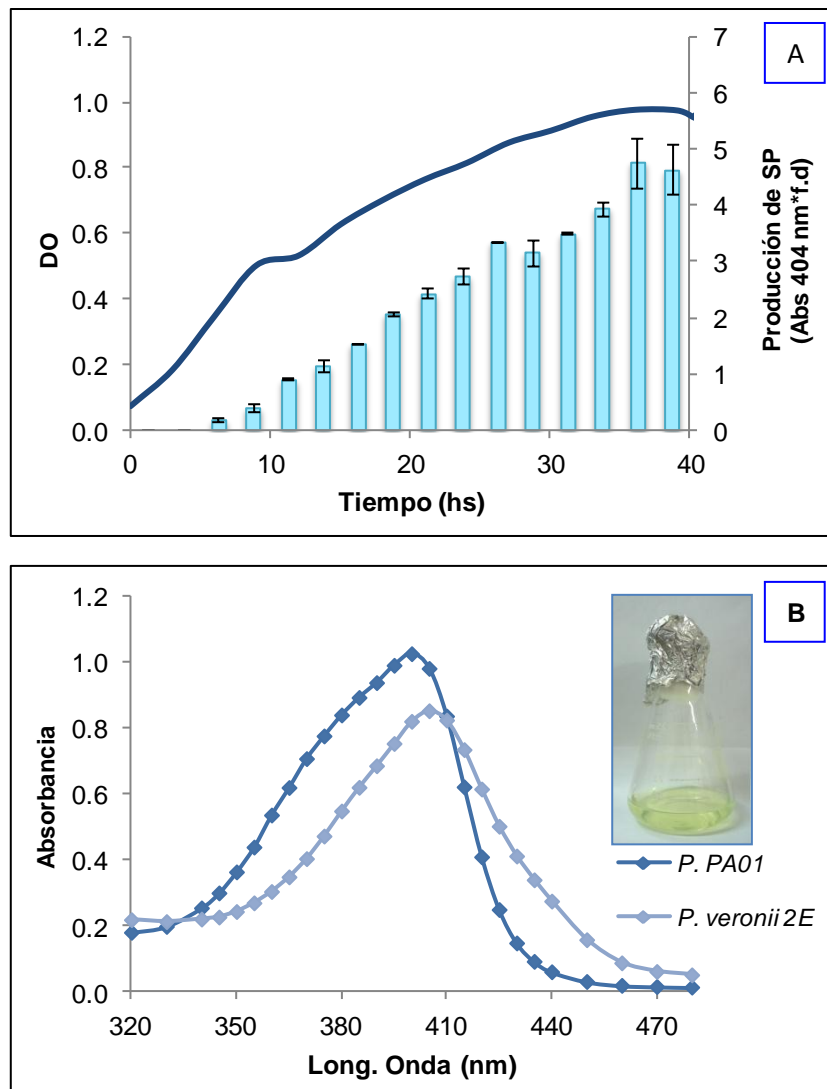


Fig. 56 A. (gráfico barras) Producción de SPs en medio M9S en el tiempo, expresado como producción de SP (Absorbancia de sobrenadante a $\lambda=404$ nm *f.d; donde f.d corresponde a factor de dilución); (línea continua) curva de crecimiento *P. veronii* 2E en M9S. **B.** Espectro de absorbancia del sobrenadante de *P. veronii* 2E y *P. aeruginosa* PA01; en la esquina superior derecha cultivo de *P. veronii* 2E en M9S.

Detección y caracterización de sideróforos

Estudio del espectro de absorción

La producción de SPs en el medio M9S fue investigada a diferentes valores de pH utilizando espectrofotometría. El espectro de absorción mostrado en la Fig. 57 A fue obtenido para el sobrenadante a pH 7 producido por *P. veronii* 2E. Se puede observar que

existen dos máximos de absorbancia importantes: uno aproximadamente a 230 nm con un hombro a 260 nm, y otro cercano a 400 nm. Por otro lado, el espectro del complejo SP-Fe(III) muestra un hombro ancho que absorbe alrededor de 500 nm, característica de la interacción de grupos hidroxamato-Fe(III) (Paine, 1994). A su vez, el complejo muestra un máximo cercano a 400 nm y otro a 280 nm, relacionados al grupo quinolina presente en los SPs de la familia Pvd, y una absorbancia máxima a 230 nm que corresponde al grupo amida relacionada a los aminoácidos de la cadena peptídica (Meyer y Abdallah, 1978). Por otro lado, se observó un cambio de color, amarillo-verde a pardo, cuando se agregó Fe(III) al sobrenadante que contenía los SPs (ver **Fig. 57 B**), hecho que también fue observado para sobrenadante de *P. putida* que produce Pvd (Scher y Baker, 1982).

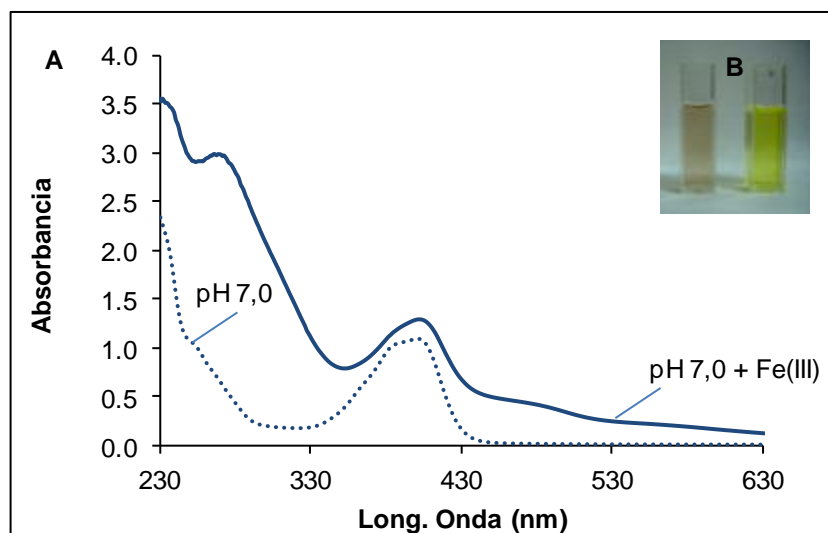


Fig. 57 A. Espectro de absorción para sobrenadante de *P.veronii* 2E y su complejo con Fe(III) a pH 7,0. **B.** Solución del complejo SP-Fe(III), cubeta izquierda; Solución $FeCl_3$, cubeta derecha.

Al analizar los espectros de absorbancia a diferentes valores de pH (ver **Fig. 58**) se observa que a pH 3,0 existen dos picos con máximos a 366 nm y 380 nm en la región del visible; mientras que a pH mayor/igual a 7,0, solo se distingue un pico en esta región que posee un corrimiento a 404 nm (pH 7), siendo más marcado este cambio a pH 8,0 donde el pico se hace más agudo y se desplaza a 410 nm. Estos corrimientos pueden ser atribuidos al grado de desprotonación de los grupos funcionales presentes en la estructura de los SPs. *Albrecht-Gary y col.* (1994), estudiaron las constantes de acidez de la PvdI, y reportaron que uno de los grupos hidroxilo presentes en el cromóforo de la Pvd posee un valor de pKa

de 6. Por lo tanto, los corrimientos hipsocrómicos observados podrían deberse a este equilibrio químico.

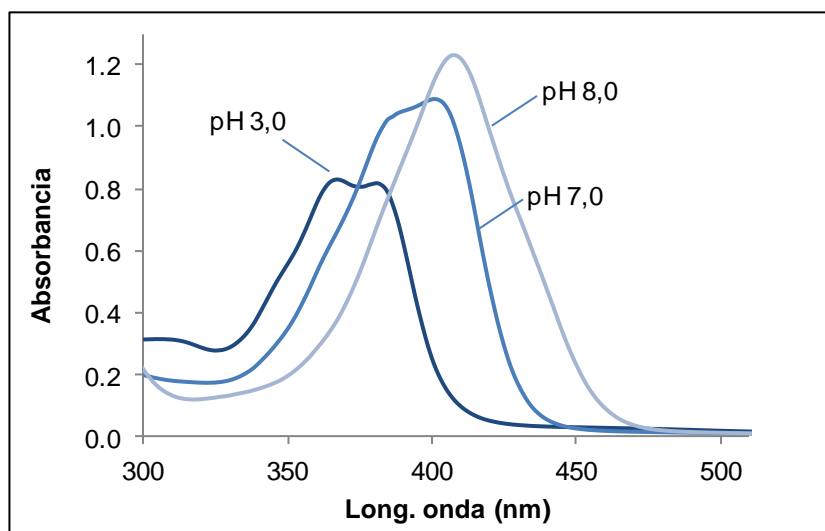


Fig. 58 Espectro de absorción en la zona del visible en función del pH para sobrenadante de *P. veronii* 2E en medio M9S. Los valores de pH están indicados en el espectro.

Todos estos resultados indicarían que el SP es de familia de Pvds y contiene en su estructura grupos catecol y posiblemente grupos hidroxamato. Los siguientes ensayos colorimétricos ayudaron a confirmar la presencia de dichos grupos funcionales.

Grupos funcionales

A pesar de que los SPs son secretados por una variedad de bacterias, los grupos que interaccionan y coordinan al Fe(III) se encuentran conservados evolutivamente. La mayoría de estas moléculas poseen grupos catecol ó/y hidroxamato que se encuentran involucrados en la interacción con el hierro.

El ensayo de CAS Líquido y el ensayo colorimétrico con FeCl₃ indican sólo la presencia de SPs, pero no dan información estructural de las moléculas. Por lo tanto, además de estos ensayos se realizaron pruebas adicionales para detectar la presencia de grupos catecol e hidroxamato. Ambos grupos funcionales son químicamente detectables utilizando reacciones colorimétricas como el ensayo Csáky (1948) para hidroxamato y el ensayo de Arnow (1973) y Rioux (1983) para catecoles.

Como se observa en la **Tabla 19** *P. veronii* 2E secretó SPs que contenían tanto grupos hidroxamato como grupos catecol capaces de coordinar hierro. Los simbolos + hacen referencia a la intensidad de color positivo desarrollado durante el ensayo colorimétrico.

Ambos sobrenadates bacterianos dieron positivo a los ensayos de CAS Líquido y FeCl₃, así como también el control de la solución que contenía 2,3-DHBA (ácido 2,3-dihidroxibenzoico). En relación al estudio de grupos hidroxamato presentes en el SP producido por *P. veronii* 2E, el sobrenadante mostró ser positivo. La solución de 2,3-DHBA no presentó reacción frente a dicho ensayo debido a que no presenta grupos hidroxamato, mientras que el SP del grupo de Pvd producida por *P. aeruginosa* PA01 sí los contiene resultando en una reacción positiva.

Tabla 19 Caracterización química de SPs producidos por *P. veronii* 2E, *P. aeruginosa* PA01 Reacción fuerte (+++), reacción moderada (++) , reacción leve (+), reacción negativa (-).^a color rojo para reacción con 2,3-DHBA y amarillo para sobrenadante de *P.veronii* 2E y *P. aeruginosa* PA0.1

Bacteria / control positivo	FeCl ₃	CAS	Hidroxamato Csáky	Catecol Arnow ^a	Catecol Rioux
<i>P.veronii</i> 2E	++	++	++	+	++
<i>P. aeruginosa</i> PA01	++	+++	+++	+	++
2,3-DHBA	+	+	-	++	+++

El ensayo de Arnow, es muy utilizado cuando se analiza la presencia de grupos catecol en SPs (Paine, 1994; Varma y Chincholkar, 2007; Tortora y Diaz-Ricci, 2011). Sin embargo, sólo desarrolla el color rojo característico de grupos catecol cuando los dioles vecinales presentes en este grupo no poseen sustituyentes en las posiciones 3 y 4, en esa situación el intermediario de la reacción se estabiliza con el agregado de NaOH resultando en un compuesto de color rojo (ver **Fig. 49**) (Barnum, 1977; Rioux y col., 1983; Paine, 1994; Srideri y col., 2008). Por tal motivo, la reacción concluye exitosamente para SPs como por ejemplo enterobactina (producido por *Escherichia coli*) o vibriobactina (producido por *Vibrio cholerae*) que corresponden a derivados de 2,3-DHBA. Para SPs que poseen sustituidas las posiciones 3 y 4, como es el caso de los SPs del grupo de Pvds, el producto final es un compuesto inestable de color amarillo. Para este tipo de compuestos la reacción no es completa y no finaliza en el compuesto color rojo (Rioux y col., 1983;

Daveu, y col., 1997). No obstante, el color amarillo fue aceptado como positivo, y se concluyó que el grupo catecol presente en los SPs producidos por *P. veronii* 2E presentaba sustituyentes en posiciones 3 y 4, consistente con los grupos dioles en cromóforos de PvdS. Posterior a este ensayo, se realizó el ensayo de Rioux, siendo este más concluyente en la detección de grupos catecol (Rioux y col., 1983; Velasquez y col., 2011). Éste mostró ser positivo para los SPs producidos por *P. veronii* 2E y también para los SPs de los controles positivo *P. aeruginosa* PA01 y 2,3-DHBA.

Los resultados sugieren que los SPs producidos por *P. veronii* 2E poseen grupos hidroxamato y catecol en su estructura, involucrados en la complejación con Fe(III). La presencia de hidroxamato en la cadena peptídica de las PvdS se debe a derivados de la ornitina, como la hidroxiornitina o la ciclohidroxiornitina. No obstante, no todas las PvdS poseen en su estructura dicha molécula, por lo tanto, la detección en el SP estudiado, es un avance en el conocimiento de su estructura.

Estimulación o represión de la síntesis de sideróforos

Los SPs son complejantes que poseen una gran selectividad por el Fe(III), no obstante en los últimos años se ha estudiado si estos metabolitos microbianos pueden interaccionar con otros metales además del hierro (Visca, 1992; Neubauer, 2000; Cortese y col., 2002; Anupa y col., 2007; Bobrov y col., 2014).

Por lo anterior, se estudió si *P. veronii* 2E en el medio M9S aumentaba o disminuía la síntesis de SPs en presencia de diferentes metales: Ni(II), Zn(II), Cu(II), Cd(II) y Cr(III). Las concentraciones de los metales evaluados siempre se encontraron por debajo de la CIM (concentración inhibitoria mínima) (Vullo y col, 2008; Garavaglia y col, 2010). Los resultados de estimación de SPs son expresados como absorbancia máxima·(DO)⁻¹, de esta manera se hace independiente la producción de SPs del crecimiento bacteriano.

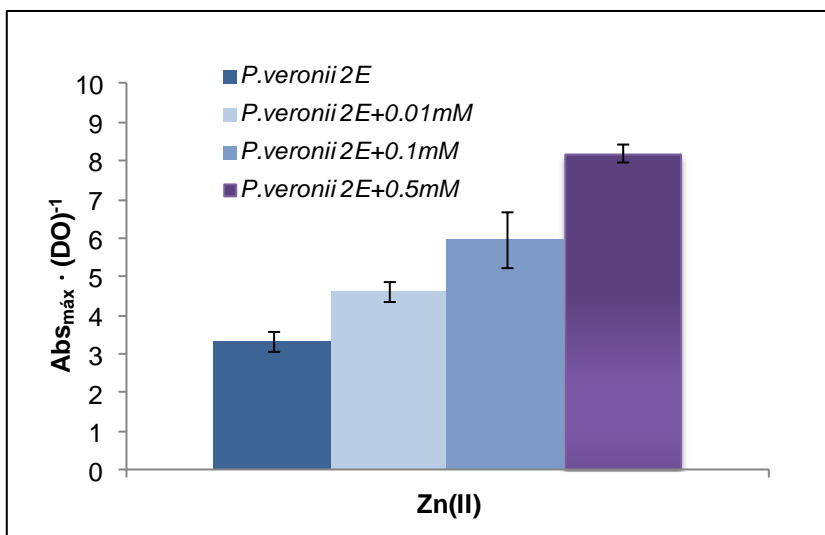


Fig. 59 Efecto dosis respuesta sobre la producción de SPs por *P.veronii* 2E crecida en M9S suplementado con 0,01mM, 0,1 mM y 0,5 mM de Zn(II).

En las **Fig. 59** y **Fig. 60** se muestra el aumento o disminución de la producción de SPs en presencia de los diferentes metales. Como se puede observar, para el caso del Zn(II) hay estimulación en la producción del metabolito en todas las concentraciones evaluadas, siendo el metal que más estimuló la siderogénesis. Para los otros metales estudiados se observa: a) A concentraciones finales de metal de 0,01 mM y 0,1 mM Cd(II), Cr(III) y Cu(II) muestran una activación en la producción de SP;

b) Cuando la concentración fue de 0,5 mM Cr(III) disminuye la siderogénesis, Cd(II) y Cu(II) no mostraron inducción a la concentración de 0,1 mM.

c) Para el caso del Ni(II), no se observó estimulación de siderogénesis cuando se aumentó la concentración del metal en el medio de cultivo. Adicionalmente, no se detectó presencia de SPs cuando la concentración de Ni(II) fue de 0,5mM, probablemente vinculado a bajo crecimiento bacteriano ($DO = 0,025 \pm 0,02$).

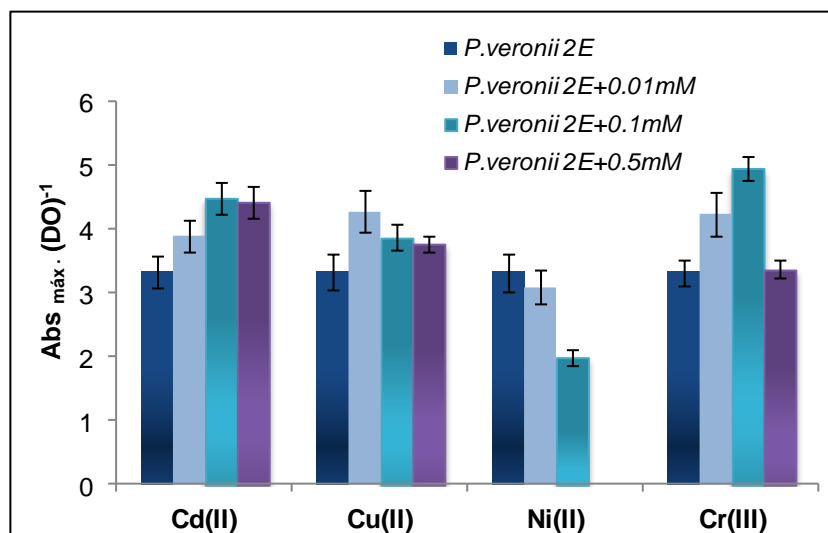


Fig. 60 Efecto dosis respuesta sobre la producción de SPs producidos por *P.veronii* 2E crecida en M9S suplementado con 0,01mM, 0,1 mM y 0,5 mM de Cd(II), Cu(II), Ni(II) y Cr(III).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, este microorganismo en presencia de metales podría secretar SPs como estrategia para disminuir sus efectos tóxicos. En el caso de las bacterias Gram negativas, se sabe que los iones metálicos entran a la célula principalmente por difusión a través de los poros de la membrana celular (Lutkenhaus, 1977). La interacción SP-Metal podría afectar las concentraciones de los metales provocando una disminución de su difusión intracelular. Este mecanismo fue también propuesto por otros investigadores (Visca y col., 2002; Braud y col., 2010). Teniendo en cuenta lo anterior, el Cd(II), siendo el elemento más nocivo dentro de los metales evaluados, no presentó la mayor estimulación de siderogénesis cuando se encontraba en el medio de crecimiento de *P. veronii* 2E. Sin embargo, esta bacteria no posee una única maquinaria de defensa en ambientes tóxicos; es capaz de biosorber metales como Cu(II), Zn(II), Cd(II) y Ni(II); y además como se discutió en el Capítulo I, también produce EPSs solubles que podrían ser utilizados para complejar y disminuir la toxicidad de los metales. En adición a lo anterior, para los ensayos realizados en presencia de Ni(II) y Cu(II) se observaron grumos bacterianos y formación de biopelícula, lo que confirma que *P. veronii* 2E no utiliza solamente como estrategia bacteriana la producción de SPs. En el caso del Cd(II), la sorción o la interacción con los EPSs solubles podría resultar más efectiva que la secreción de SPs para disminuir los efectos nocivos de este metal.

Estudio de la interacción del sideróforo con Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ni(II) y Cr(III)

P. veronii 2E posee grupos funcionales como catecol e hidroxamato que podrían interactuar con MRAs. Por ello, se estudió en sobrenadantes de M9S la interacción SP-Metal con concentraciones finales de 1 μ M, 10 μ M 100 μ M de Ni(II), Zn(II), Cu(II), Cd(II) y Cr(III). De esta manera, sólo se evaluó la complejación y no los efectos tóxicos o de estimulación en la producción de SPs. En la **Fig. 61** se pueden observar los resultados obtenidos.

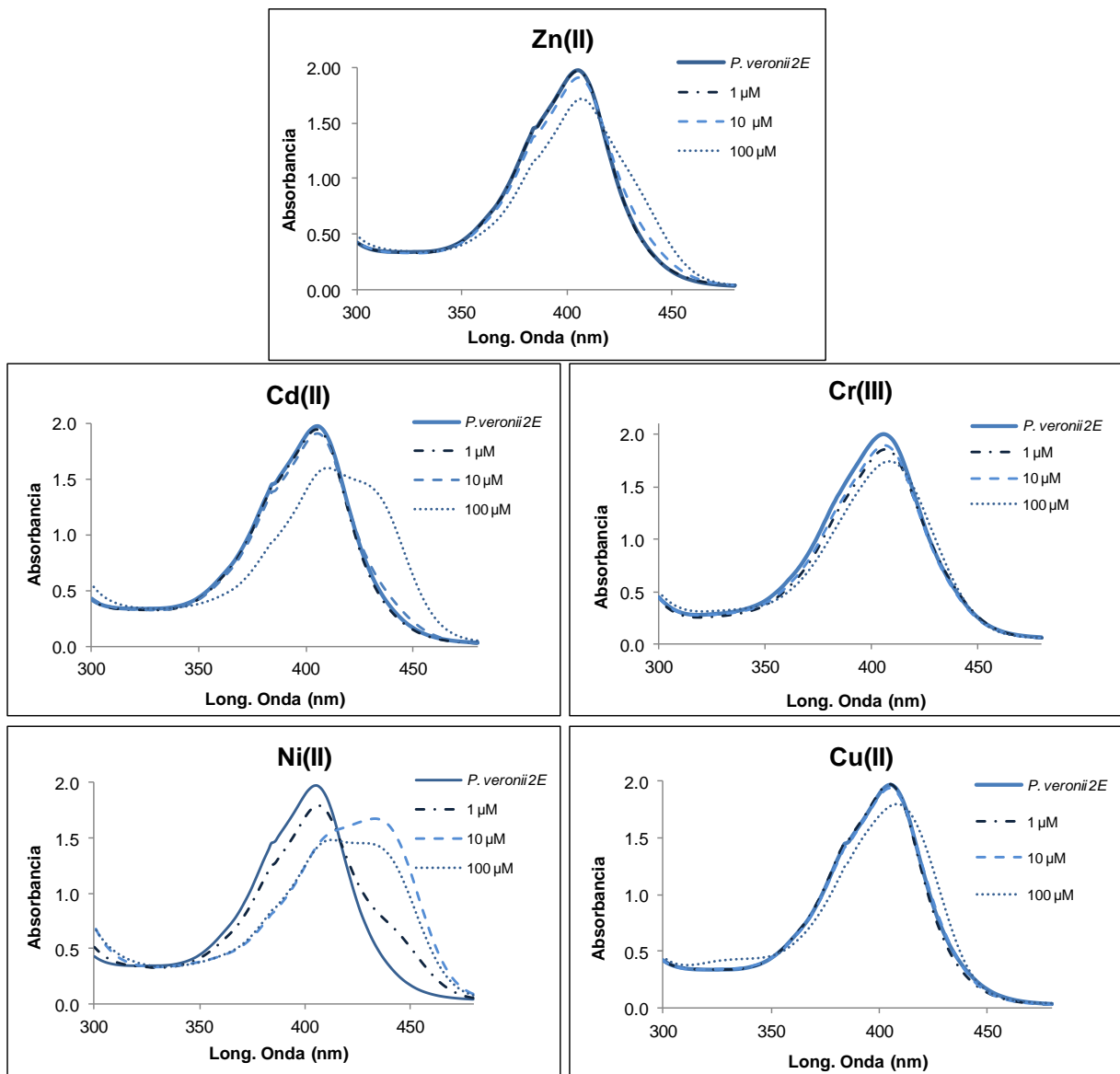


Fig. 61 Espectro UV-visible de sobrenadantes de *P. veronii* 2E crecida en medio M9S con concentraciones finales 1 μ M, 10 μ M o 100 μ M de Cd(II), Cr(III), Ni(II), Cu(II) y Zn(II).

La **Fig. 61** muestra que para Cr(III) no se observaron cambios importantes en el espectro respecto al SP sin agregado de metal. En relación a los espectros de Cd(II), Cu(II) y Zn(II), sólo cuando la concentración final fue de 100 μM las curvas mostraron corrimiento a longitudes de onda mayores; siendo más marcado para el caso del Cd(II), donde además se observó cambios en la forma de la curva. Para Ni(II) estos cambios se observaron a partir de una concentración de 10 μM . Los corrimientos del máximo de absorbancia y los cambios en la forma de las curvas, pueden indicar interacciones entre el SP y el metal.

Según los resultados obtenidos en la sección anterior, se esperaba observar diferencias más marcadas en los espectros de absorción cuando se hizo interaccionar Zn(II) y Cr(III) con el sobrenadante que contenía SPs, dado el aumento de secreción cuando estos metales se encontraban presentes en el medio de cultivo. No obstante, la falta de cambios en los espectros UV no son prueba suficiente para descartar la complejación con estos metales. *Braud y col.* (2009b), no obtuvieron cambios significativos cuando analizaron los espectros UV entre PvdI con Cd(II), Mn(II), Ni(II) y Zn(II), pero sí observaron indicios de interacción cuando analizaron la fluorescencia de PvdI junto con los metales. En el presente trabajo se exploró la posibilidad de usar espectrofluorimetría debido a que es una técnica más sensible y aprovechando que los SPs producidos por *P.veronii* 2E producen fluorescencia. Sin embargo la presencia de sales en el medio de cultivo impidió el estudio de la interacción SP-Metal por ésta técnica.

Caracterización del sideróforo como ligando de Cd(II)

Teniendo en cuenta que los SPs secretados por *P. veronii* 2E muestran indicios de interacción con Cd(II) se evaluó la capacidad complejante frente a este metal utilizando la técnica de VPE. La **Fig. 62** y **Fig. 63** muestran la curva de titulación y las linealizaciones de Ruzic y Scatchard obtenidas al analizar la muestra de SP purificado. En el gráfico de Ruzic, se obtiene una buena correlación lineal con una sola pendiente, mostrando que la aproximación 1 metal: 1 ligando es correcta. El valor de concentración de $[L_1]$ fue de $0,93 \pm 0,09 \mu\text{M}$, mientras que la concentración de SP estimada utilizando la ley de

Lambert Beer y coeficiente de extinción para Pvd producida por *P. fluorescens* fue de $2 \mu\text{M}$, encontrándose ambos valores en el mismo orden de concentraciones.

Con respecto al valor de K' , a partir de los resultados obtenidos de la linealización de Scatchard se obtiene $\text{Log } K' = 6,1 \pm 0,1$, coherente con una familia de ligandos moderados. A su vez, los primeros puntos del gráfico $[\text{CdL}/\text{Cd}']$ vs $[\text{CdL}]$ muestran una desviación de la linealidad. De acuerdo con bibliografía, esta curvatura cóncava a bajas concentraciones se debería a una inestabilidad de los grupos ligandos y a su posible descomposición (Fu, 2004). Como se muestra más adelante, los SPs son moléculas poco estables y susceptibles a ruptura química.

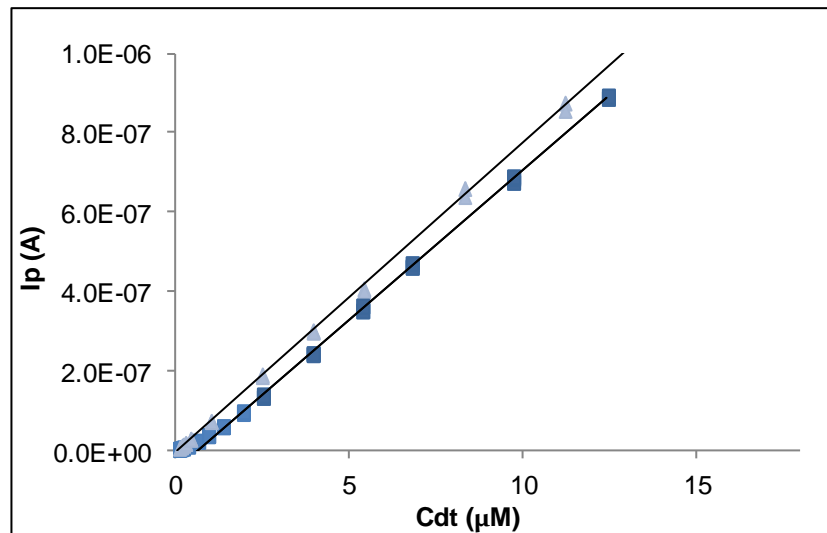


Fig. 62 Curva de titulación SP con Cd(II) (t_{dep} 30 s, E_{dep} -0,75 V, t_{equil} 5min, buffer MES pH 6,2). (▲) buffer MES, (■) curva de titulación SP con Cd(II).

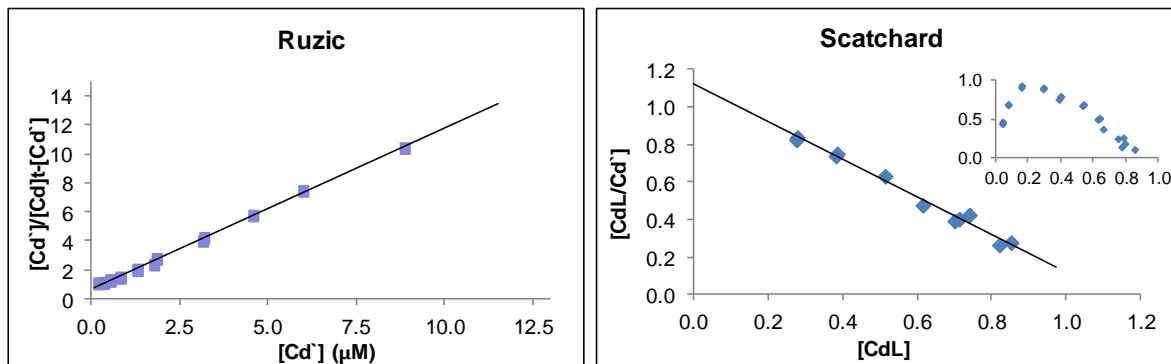


Fig. 63 Linealización de Ruzic y Scatchard para SP producido por *P.veronii* 2E.

No obstante, los resultados obtenidos indican que los SPs producidos por *P. veronii* 2E pueden interaccionar Cd(II), formando complejos de fuerza moderada al pH evaluado.

La capacidad complejante entre las PvdS y otros cationes metálicos también fue estudiada por otros investigadores. Si se compara la K' con las informadas para PvdI y otros metales (ver **Tabla 20**) se puede observar que la interacción entre Cd(II) y SP es más débil comparada con la informada para Pvd- Fe(III). Esto se debe a que el Fe(III) es un ácido “duro” de Lewis e interacciona fuertemente con ligandos “duros”, como el oxígeno, presente en los grupos catecol e hidroxamato. El Cd(II), como también es el caso de Fe(II), son ácidos intermedios que interaccionan más débilmente con estos ligandos.

Tabla 20 Constantes de formación para complejos Ploverdina varios cationes metálicos.

	Log K'	Ref
Zn(II)	19,8	Albrecht-Gary y col., 1994
Cu(II)	22,3	Chen y col., 1994
Fe(II)	9	Albrecht-Gary y col., 1994
	8,3	Chen y col., 1994
Fe(III)	30,8	Albrecht-Gary y col., 1994
	29,6	Chen y col., 1994

Análisis de sideróforos por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Los ensayos de grupos funcionales sugieren la presencia de grupos hidroxamato y catecol, y los análisis espectrofotométricos del medio de cultivo junto con el ensayo de CAS confirman la producción de SPs por *P. veronii*. No obstante, se ha reportado en diferentes publicaciones científicas la posibilidad de secretar diferentes isoformas de SPs en un mismo medio de cultivo (Meyer y col., 2002; Meyer, 2007; Cezard y col., 2015). Por lo tanto, se estudió si el producto de secreción corresponde a un solo tipo o una mezcla de estos compuestos. Para ello, se extrajo el o los posibles SPs producidos en medio M9S, se formó el complejo SP-Fe(III) y se realizaron purificaciones del extracto utilizando diferentes resinas (Sphadex G-25; reversa C-18) con el fin de obtener el metabolito puro.

Se evaluó la pureza y variedad de compuestos utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En la **Fig. 64** se muestra el cromatograma utilizando detección espectrofotométrica. Los picos que se observan son los compuestos que absorben a longitud de onda de 400 nm, que corresponderían a la absorción de SPs. Como puede verse, el extracto contiene varios componentes que absorben a la longitud característica de los analitos estudiados. La **Fig. 65** muestra el espectro de absorción del pico con t_R 5,45 min y 4,35 min, similares espectros se obtiene para los demás picos.

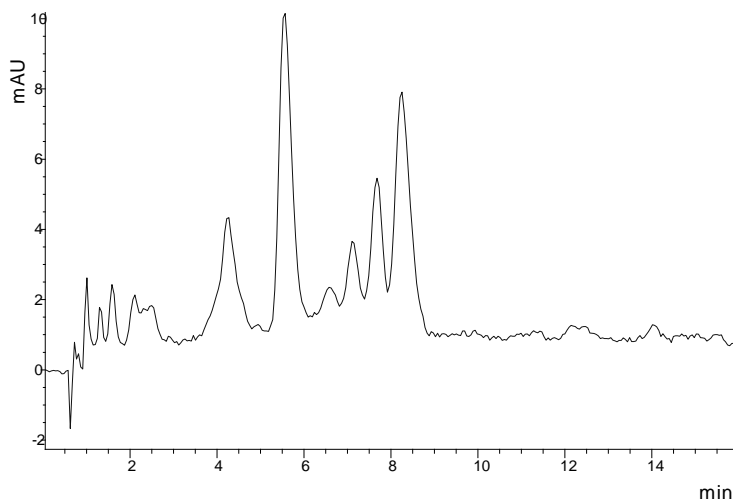


Fig. 64 Cromatograma correspondiente al complejo sideróforo-Fe(III) (detección a 400 nm).

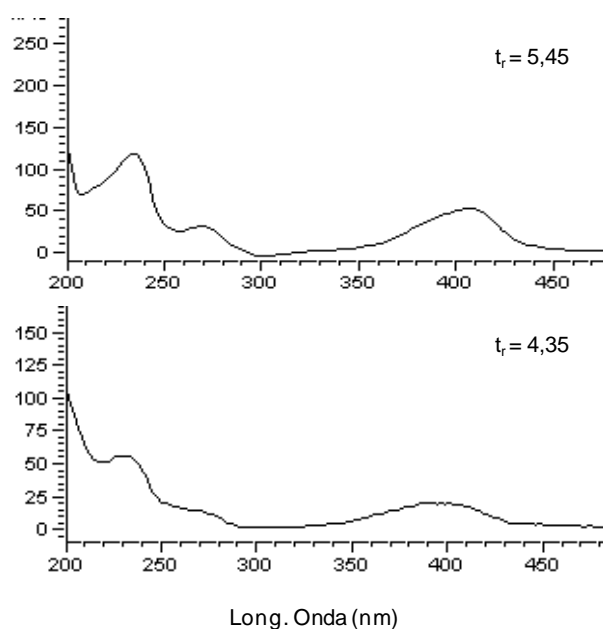


Fig. 65 Espectro de absorbancia (U.A) para el pico con t_R 5,45 y 4,35 min del cromatograma de la Fig. 64.

Como se discutió anteriormente, a λ aproximadamente de 400 nm absorbe el cromóforo que se encuentra presente en los SPs de grupo Pvd. La variedad de picos observados en el cromatograma puede deberse a dos razones. El primer motivo podría ser una degradación del SP, mientras que una segunda explicación podría ser la presencia de diferentes “cadenas laterales” unidas al cromoforo (Varma y Chincholkar, 2007). En el presente estudio, para disminuir la degradación del SP durante las etapas extracción y purificación, se hizo interaccionar el mismo con Fe(III), haciendo más estable y compatible al metabolito para su estudio por HPLC. Adicionalmente, utilizando el complejo SP-Fe(III) se disminuyen problemas relacionados con la gran afinidad de SP por el hierro presente en los solventes de la fase móvil, evitando falsas interpretaciones (Nowak-Thompson y Gould, 1994). Por lo anterior, se concluye que la variedad de picos podría deberse a diferentes cadenas laterales en la estructura de la pioverdina.

Caracterización de sideróforos por LC-MS

El uso de nano HPLC-MS permitió obtener una caracterización estructural de los SPs secretados por *P. veronii* 2E. En la **Fig. 66** se muestra el cromatograma obtenido para el extracto SP-Fe(III) luego de utilizar nanoHPLC.

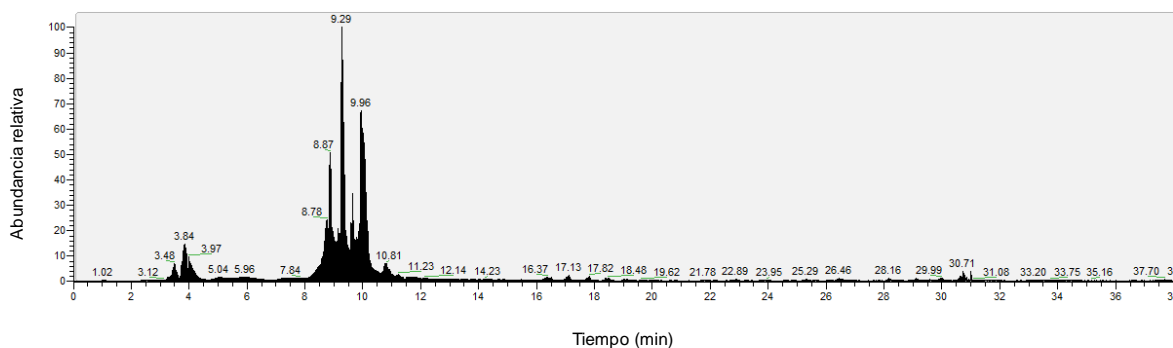


Fig. 66 cromatograma correspondiente al complejo SP-Fe(III) obtenido en nanoHPLC.

Los espectros ESI-MS de los picos más intensos obtenidos en el cromatograma mostrado en la **Fig. 66** se muestran en la **Fig. 67**, **Fig. 68**, **Fig. 69**, **Fig. 70**, **Fig. 71** y **Fig. 72**.

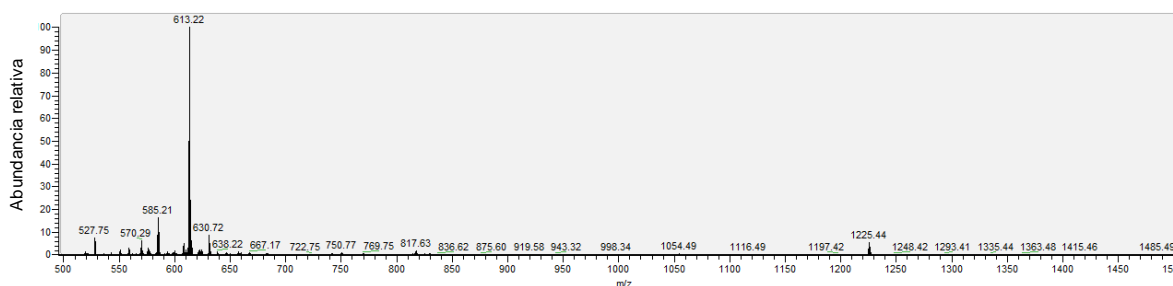


Fig. 67 Espectro ESI-MS del compuesto con $t_R=3,48$ minutos.

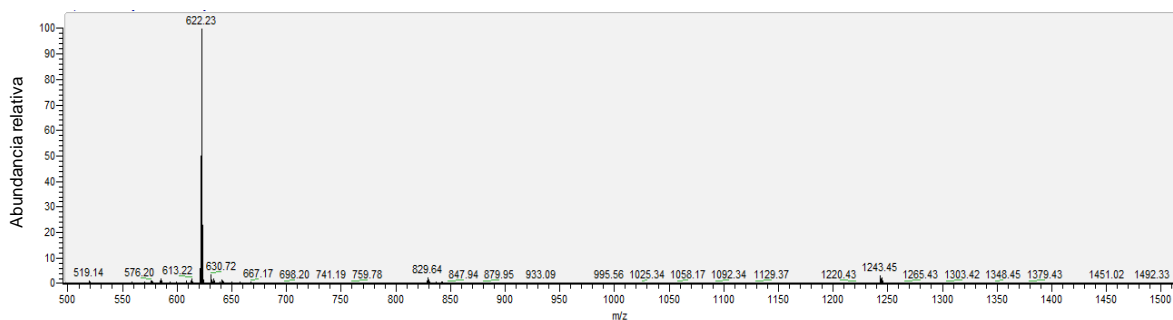


Fig. 68 Espectro ESI-MS del compuesto con $t_R=3,84$ minutos.

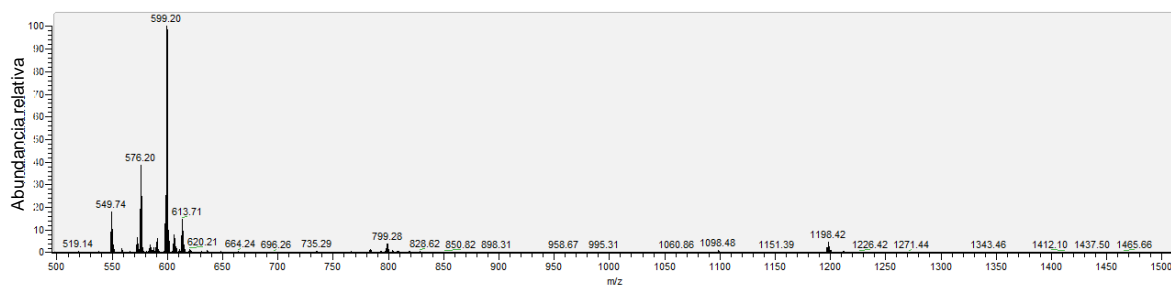


Fig. 69 Espectro ESI-MS del compuesto con $t_R=8,78$ minutos.

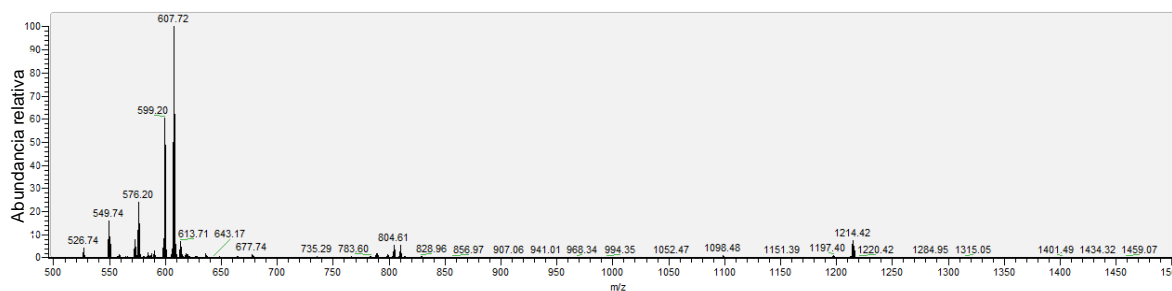


Fig. 70 Espectro ESI-MS del compuesto con $t_R=8,87$ minutos.

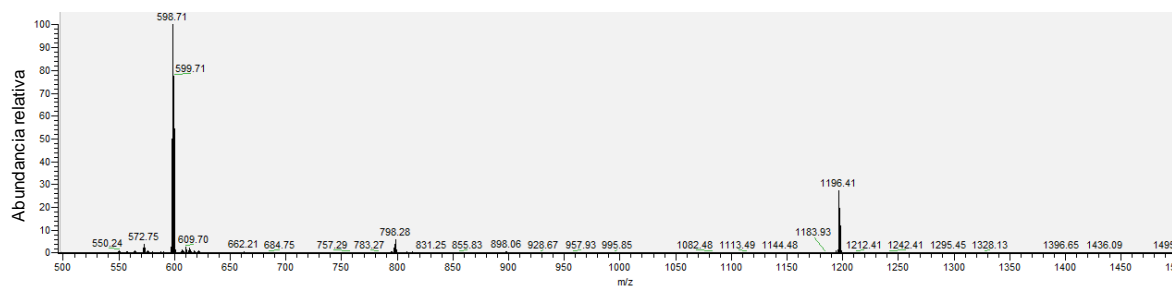


Fig. 71 Espectro ESI-MS del compuesto con $t_R=9,29$ minutos.

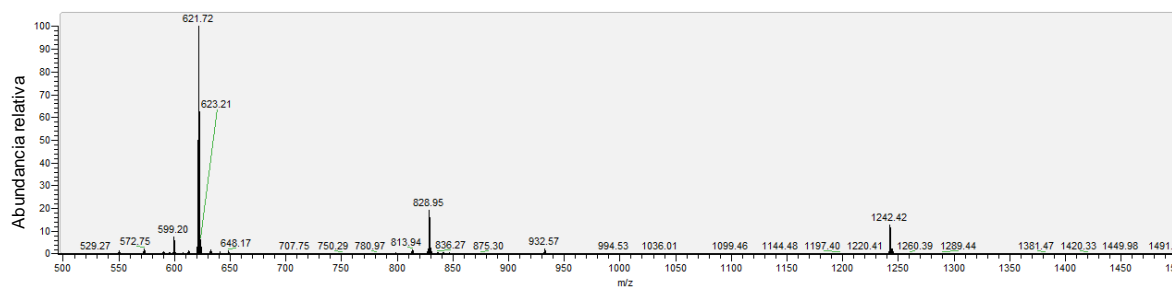


Fig. 72 Espectro ESI-MS del compuesto con $t_R=9,96$ minutos.

Las masas moleculares de los diferentes SPs fueron obtenidas de los iones doblemente protonados $[M + 2H]^{2+}$. La **Tabla 21** muestra la masa molecular de los compuestos asociados a los espectros de masa previamente mostrados.

Tabla 21 Masas moleculares del extracto SP-Fe(III)

m/z Z=2	m/z Z=1	Masa molecular	t _R (min)
613,22	1225,44	1224,4	3,48
622,23	1243,45	1242,5	3,84
599,2	1198,42	1197,4	8,78
607,72	1214,42	1213,4	8,87
598,71	1196,41	1195,4	9,29
621,72	1242,42	1241,4	9,96

La variedad de picos registrados en el cromatograma muestra la capacidad que posee un microorganismo de producir diferentes isoformas de SPs en un mismo medio de cultivo. Resultados similares fueron registrados por otros investigadores (Kilz, y col., 1999; Fuchs, y col., 2001; Ye, y col., 2013). Meyer y col. (2002) y Kilz y col. (1999), han estudiado los SPs producidos por las *Pseudomonas* de la especie *fluorescens*, las Pvds. Estos investigadores y sus colaboradores encontraron un método de clasificación taxonómica para las *Pseudomonas* basado en la estructura de las Pvds producidas por cada especie. Al estudiar dichos SPs, observaron que la cadena peptídica se conserva en una misma cepa. Sin embargo, la naturaleza del cromóforo y de la cadena lateral puede variar, mostrando que una misma bacteria puede secretar una variedad de estos compuestos (isoformas) bajo una misma condición de crecimiento. Por lo anterior, al analizar los diferentes picos observados en el cromatograma (ver **Fig. 66**) y sus masas moleculares correspondientes (ver **Tabla 21**) se asume que las diferencias de peso molecular sólo se pueden deber a diferencia en el cromoforo, en la cadena lateral o pérdidas de moléculas pequeñas (agua, dióxido de carbono). Por otro lado, la masa molecular de los compuestos mayoritarios presentes en la muestra se encuentran dentro del rango esperado para los compuestos de interés buscados.

Elucidación estructural utilizando MS/MS

Se analizaron manualmente los resultados del MS/MS para obtener la cadena peptídica para la masa molecular de 1241,4. Los algoritmos que utilizan bases de datos computacionales que se encuentran para la secuenciación de proteínas no representan la

situación para Pvd debido a la presencia de la cadena lateral, el grupo cromóforo y el Fe(III) unido. Para la elucidación de la estructura de la Pvd, se utilizó como referencia la fragmentación de péptidos informada en bibliografía por la técnica ESI en trampa de iones (Lignet y col, 1992; Kilz y col., 1999; Zane y Butler, 2013; Wei y Aristilde, 2015). Se propone la siguiente estructura:



Fig. 73 *succa*: ácido succínico amida; *chr*: cromóforo 5-amino-2,3-dihidro-8,9-dihidroxi-1H-pirimido-[1,2-a]-quinolina-1-ácido carbóxico; *OHOrn*=: hidroxiornitina; *Thr*: treonina; *Asn*: asparagina; *Ser*: serina; *FoOHOrn*: formil-hidroxi-ornitina; *cOHOrn*: ciclo-hidroxi-ornitina.

Los resultados obtenidos son consistentes con los observados en los ensayos de determinación de grupos funcionales y los espectros UV:

- a) Posee grupos hidroxamato. Estos se encuentran presentes en la cOHOrn y FoOHOrn ;
- b) Posee grupos catecol en el grupo cromóforo;
- c) El grupo catecol posee sustituciones en las posiciones 3 y 4.
- d) Posee absorbancia a una longitud de 400 nm, típica para el cromóforo presente en Pvd.

La confirmación de la cadena peptídica requiere análisis en RMN 2D (Resonancia Magnética Nuclear en 2 dimensiones). No obstante, en el presente trabajo se ha caracterizado una nueva Pvd producida por la especie *P. veronii*.

Estudio de aplicaciones biotecnológicas de los sideróforos

Sorción de Cd(II) en diatomitas

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que los SPs secretados por *P. veronii* 2E contienen grupos que interaccionan con Cd(II) y que la capacidad de complejar

este metal posee una constante de formación correspondiente a ligando moderado. Los SPs juegan un papel crucial en la movilización de metales en suelos (Ahmed y Holmstrom, 2014) y ésta depende de su capacidad de actuar como ligandos. Por tal motivo, se estudió la posibilidad de usar los SPs producidos por *P. veronii* 2E para solubilizar y movilizar Cd(II) de suelos contaminados.

Para evitar trabajar con una matriz complicada como lo es el suelo, se eligió explorar la remoción utilizando un sistema modelo: diatomitas o tierras de diatomeas. La utilización de estas tierras permitió disminuir la interferencia de posibles ligandos orgánicos que se encuentran en los suelos. Por lo tanto, se hizo interaccionar las diatomitas con una solución que contenía Cd(II). Las diatomitas fueron caracterizadas por su constante condicional de complejamiento utilizando la técnica de VPE, $K'_{\text{diatomitas}}$, siendo el valor de $(5,0 \pm 0,9) \times 10^3$. Al comparar este valor con el obtenido para K'_{SP} , $(1,2 \pm 0,3) \times 10^6$, se observa que la fuerza con que interaccionan los SPs con Cd(II) es mayor a la interacción con diatomitas, mostrando una posible aplicación en la remoción de Cd(II) de suelos. Por otro lado, diferentes factores deben ser estudiados para la utilización de los SPs para movilizar Cd(II), algunos de ellos son el pH del suelo, la materia orgánica, la retención del SP en suelo, el tiempo de contacto, la estabilidad del SP y la presencia de otros metales.

Además, las tierras de diatomeas son utilizadas en la industria alimenticia para filtrar y clarificar bebidas. Pero en los últimos años, se está estudiando su utilización en la sorción de metales, como por ejemplo Cd(II), Ni(II), Zn(II) y Pb(II) (Safa y col., 2012). Por lo tanto, en un primer paso se podrían utilizar las tierras de diatomeas para la retención de Cd(II) y en un segundo paso se propone usar los SPs para desorber el metal retenido en las diatomitas para su correcta disposición final o reutilización. La solución con SP-Cd(II) podría concentrarse y luego degradar a estos metabolitos para recuperar el metal. Un factor importante que debe ser analizado en futuras experiencias, es la retención del SP en las arcillas, debido a que este tipo de sólidos no solo se une a metales si no también a compuestos orgánicos (Agdi y col., 2000).

CONCLUSIONES

- ❖ La obtención de los sideróforos por parte de *P.veronii* 2E fue máxima en medio de cultivo mínimo M9S (25 °C, pH=6,9, 40 h).
- ❖ Los ensayos colorimétricos mostraron que los grupos funcionales presentes son catecol e hidroxamato;
- ❖ La producción de sideróforos se ve estimulada en presencia de Zn(II) en todas las concentraciones estudiadas. Cd(II), Cu(II) y Cr(III) inducen la secreción de sideróforos en concentraciones finales de 0,01 mM y 0,1 mM;
- ❖ Los resultados obtenidos en los estudios de espectrofotometría indican interacción entre los sideróforos y Zn(II), Cd(II), Cu(II), Cr(III) y Ni(II);
- ❖ La masa molecular del metabolito obtenida por ESI-MS es aproximadamente de 1200 Da;
- ❖ El sideróforo pertenece a la familia de pioverdinas;
- ❖ La pioverdina producida por *P. veronii* no ha sido informada anteriormente para esta especie.
- ❖ El estudio de la interacción sideróforo-Cd (II) mostró una sola familia de ligandos moderados;
- ❖ Puede explorarse el uso de sideróforos producidos por *P. veronii* 2E en la remoción de Cd(II) de suelos contaminados.

DISCUSIÓN FINAL



La contaminación del aire, del suelo y particularmente del agua por MRAs es uno de los problemas ambientales más severos. Por otro lado, es muy difícil de resolver, ya que los metales no son biodegradables y se acumulan en los organismos vivos causando serios problemas. Por estos motivos es necesario buscar la manera de desarrollar métodos eficientes para reducir su emisión. Las tecnologías tradicionales como la precipitación química, el intercambio iónico, la adsorción en carbón activado y los procesos de separación por membranas han sido extensamente aplicados para eliminar los metales en aguas residuales. Sin embargo, estos procesos pueden ser ineficaces o costosos, especialmente cuando las concentraciones de metal disuelto son del orden de 1 a 100 mg·l⁻¹. Resulta evidente la necesidad de desarrollar tecnologías más eficaces y económicamente más rentables para el tratamiento de aguas residuales.

El estudio de las estrategias de supervivencia que los microorganismos desarrollan en los ecosistemas en presencia de metales son las herramientas con las que se cuenta para diseñar un biotratamiento adecuado. *Pseudomonas veronii* 2E es una bacteria autóctona del río Reconquista (Buenos Aires, Área Metropolitana) que produce sustancias poliméricas extracelulares (EPSs) y sideróforos (SPs) con potencial capacidad de interactuar con MRAs. Por este motivo, como primer paso se estudió la producción, aislamiento, purificación y caracterización de los EPSs solubles y de los SPs secretados por *P.veronii* 2E.

Con respecto a los EPSs, las mejores condiciones para su producción fueron en medio M9 con glicerol como fuente de carbono. Utilizando espectrofotometría y HPLC se pudo observar que los EPSs estaban compuestos mayoritariamente por polisacáridos, además de polímeros fosforados (como ADNe y LPS) y proteínas. Por otro lado, los resultados obtenidos utilizando VPE muestran que los EPSs solubles poseen ligandos moderados frente a Cd(II), y la mayor concentración de ligandos se encuentra presente en los LPSs. De acuerdo a la bibliografía específica consultada, es la primera vez que se estudió la interacción frente a un metal de los diferentes polímeros que conforman los EPSs. Más aún, en lo que respecta a nuestro conocimiento, es la primera vez que se realizan estudios de interacción y composición de exopolímeros extracelulares solubles. Por estos motivos los resultados presentados son originales y ayudan a comprender cuales son los grupos funcionales involucrados en la interacción de metales dentro de los EPSs.

Por otro lado también se estudió la producción y secreción de SPs por parte de *P. veronii* 2E. Las mejores condiciones de producción de SPs se obtuvieron en medio M9 con succinato como fuente de carbono. Luego mediante análisis de grupos funcionales se observó que los SPs producidos por *P. veronii* 2E pertenecen al grupo de las PvdS, y por la técnica de HPLC se determinó la presencia de varias isoformas del metabolito. La utilización de espectrometría de masa acoplada al HPLC ayudó a dilucidar la estructura y su masa molecular, obteniendo como resultado una Pvd no descripta anteriormente en bibliografía, hasta donde sabemos, para esta especie bacteriana. Por otro lado, se estudió si el SP podía interaccionar con otros metales distintos que el Fe(III) mediante análisis por espectroscopía UV-visible, y se pudo observar una marcada interacción con Ni(II), Zn(II) y Cd(II). Además, se aplicó la técnica de VPE para caracterizar al SP obtenido como ligando frente a Cd(II), obteniéndose como resultado que la interacción ocurre por medio de una familia de ligandos moderados.

Por último, se exploró la potencial utilización de los EPSs y SPs en la remoción de Cd(II) de aguas residuales. En el caso de los EPSs, se utilizó un biorreactor de flujo continuo (9 ml h^{-1}), y se observó una retención de 54% del metal en un efluente modelo que contenía $14 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cd(II). Estos resultados abren una perspectiva para estudios a futuro, lo cuales deben tener en cuenta la utilización de una mayor concentración de masa de EPS para aumentar el porcentaje de remoción, y el ajuste de los parámetros de flujo para disminuir los tiempos de proceso. Es importante destacar que en este sistema se utiliza un componente extracelular de la bacteria y no las células bacterianas *per sé*. Ésto representa una ventaja frente a los biosorbentes microbianos utilizados, debido a que la remoción de metales ocurre en ausencia de medio de cultivo y la obtención de los EPSs se logra vía precipitación con etanol 96%, siendo posible la recuperación y reutilización de éste solvente. Por todo lo anterior se afirma que ésta técnica permitiría reducir los costos e incrementar la eficiencia en potenciales aplicaciones industriales futuras para el tratamiento de aguas residuales. Además, se podrían explorar otras formas de empaquetamiento del biopolímero como la inmovilización en Biofiltros. Hoy día ya existe comercialmente un producto de la empresa *Floating Wetland Solutions* (filtros BioFilm FilterTM) que contiene materiales con EPSs inmovilizados que pueden ser aplicados en aguas naturales contaminadas con MRAs con el fin de removerlos, y se podría analizar la posibilidad de desarrollar un producto alternativo basándose en los resultados obtenidos en este trabajo.

En la potencial utilización de los SPs para la remoción de metales, se propusieron dos posibles aplicaciones para estos metabolitos. Una primera aplicación consiste en su utilización en la remoción de Cd(II) de suelos contaminados. Esta opción tiene que ser estudiada en suelos reales, debido a que los SPs pueden quedar retenidos en los sólidos presentes en el suelo y no cumplir con la movilización y detoxificación de los MRAs. Otra posible aplicación es utilizarlos en un sistema en el cual en un primer paso se usen las tierras de diatomeas para retener el Cd(II) para luego remover el catión utilizando los SPs. Según los resultados obtenidos, esta aplicación es posible debido a que la K' para los SPs resultó mayor que la determinada para las tierras de diatomeas, mostrando que la fuerza con la que se unen los metabolitos al Cd(II) es mayor.

Por otro lado, en la última década la fitorremediación asistida por SPs ha recibido un interés particular. Una posibilidad es utilizar los SPs producidos por la bacteria no patógena *P. veronii* 2E para aumentar la fitoextracción de Cd(II) mediada por plantas.

Finalmente, la **Fig. 74** muestra un resumen esquemático de las posibles aplicaciones de los compuestos extracelulares producidos por *P. veronii* 2E. Es importante resaltar, que las células bacterianas pueden ser utilizadas en la biotransformación de Cr(VI) a Cr(III), hecho que fue investigado en efluentes provenientes de una empresa productora de piezas de grifería en el laboratorio de microbiología de la UNGS.

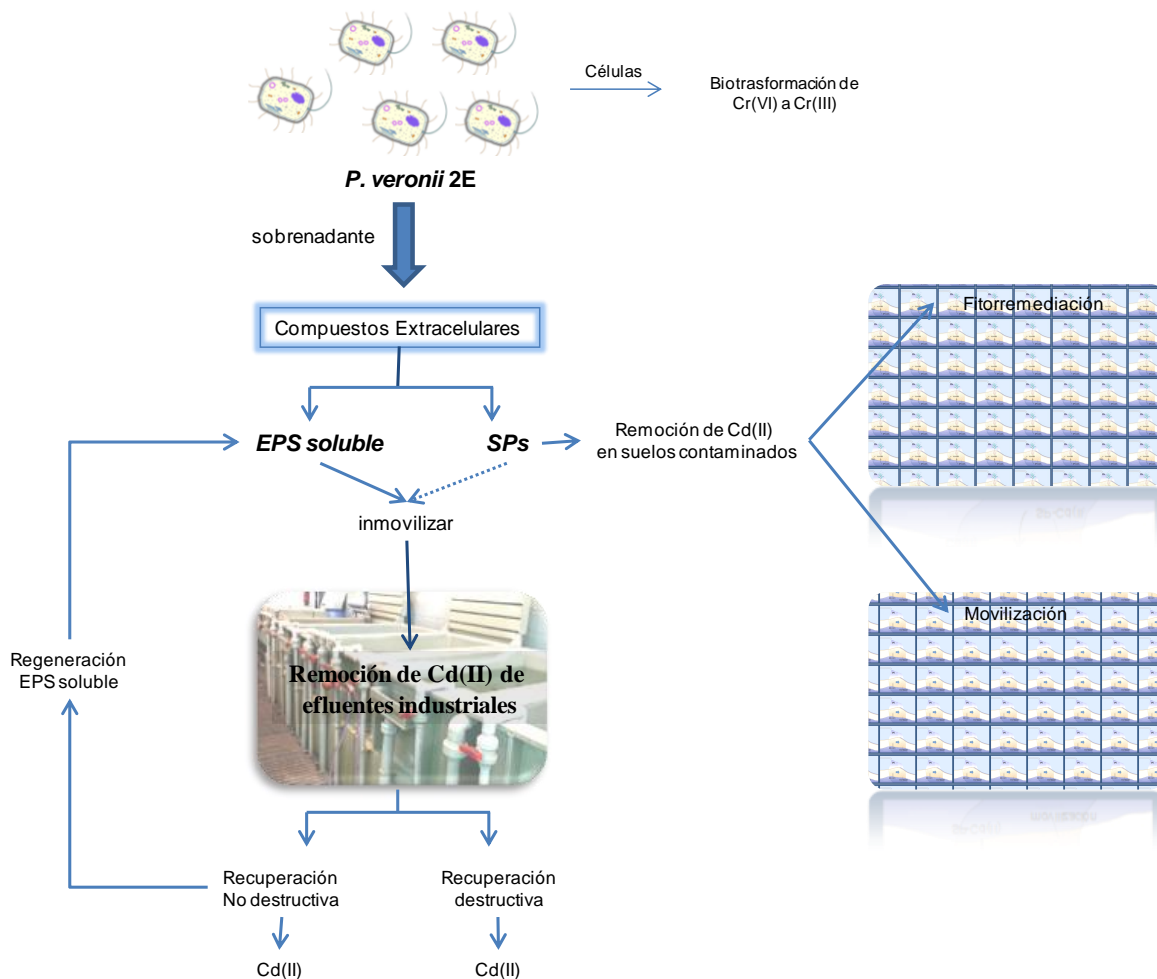


Fig. 74 Esquema de las posibles aplicaciones de los compuestos extracelulares: EPSs solubles y SPs.

En conclusión, en este trabajo de tesis se logró obtener las mejores condiciones para la secreción de compuestos extracelulares como son los EPSs solubles y SPs por parte de *P. veronii* 2E. Los resultados obtenidos de caracterización de sus estructuras muestran que estos compuestos poseen grupos funcionales capaces de interactuar con metales. Se determinó la capacidad de estos compuestos para actuar como ligandos de Cd(II), y se pudo explorar su utilización en la remoción del mismo en ambientes contaminados utilizando sistemas modelos.

PROYECCIONES



PROYECCIONES

- Caracterizar a los EPSs solubles y a las Pvds producidas por *P. veronii* 2E como ligandos frente a otros metales de relevancia ambiental;
- Profundizar el estudio de los grupos funcionales implicados en la interacción con Cd(II), así como también con otros metales de relevancia ambiental;
- Obtener la estructura química de los LPSs y estudiar los grupos funcionales implicados en la interacción con Cd(II);
- Estudiar la inmovilización de los EPSs solubles en otras matrices y estudiar la capacidad de remover Cd(II) de efluentes contaminados;
- Confirmar mediante RMN 2D la estructura química de las Pvds secretadas por *P. veronii* 2E;
- Investigar la utilización de las Pvds en la biorremediación de suelos contaminados con metales.

TESISTA

Lic. Maria Laura Ferreira

DIRECTORA

Dra. Diana Lía Vullo

DIRECTORA

Dra. Silvana Ramírez

ANEXOS



ANEXO I: *Composición Medios de Cultivo*

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 ° C durante 15 min. Las soluciones de sales (CaCl₂ y MgSO₄) y fuentes de carbono fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana de nitrato de celulosa (Millipore, 0,45 µm) y adicionadas a los medios luego de ser autoclavados.

Medio Rico PY (volumen final 1 l)

Peptona de caseína	6 g
Extracto de levadura	3 g

Se adicionó al medio estéril alguna de las siguientes fuentes de carbono: PY_{citrato 0,5%} 25 ml de citrato de sodio 25% (m/v); PY_{succinato 0,5%} 12,5 ml de succinato de sodio 40% (m/v); PY_{glutamato 0,5%} 25 ml de glutamato de sodio 25% (m/v); PY_{glicerol 2%} 23 ml de glicerol 87% (v/v). En el caso del medio PYG se agregó glucosa al medio antes de esterilizar por autoclave: PYG_{0,05%} 0,5 g; PYG_{0,5%} 5 g; PYG_{1%} 10 g; PYG_{2%} 20 g; PYG_{10%} 100 g.

Medio Mínimo M9 (volumen final 1 l)

K ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NH ₄ Cl	1 g
NaCl	0,5 g
Extracto de levadura 2% (m/v)	2,5 ml
CaCl ₂ 1 M	100 µl
MgSO ₄ 1 M	220 µl

Se adicionó al medio estéril alguna de las siguientes fuentes de carbono: M9_{citrato 0,5%} 25 ml de citrato de sodio 25% (m/v); M9_{succinato 0,5%} 12,5 ml de succinato de sodio 40% (m/v); M9_{glutamato 0,5%} 25 ml de glutamato de sodio 25% (m/v); M9_{glucosa 2%} 44 ml de glucosa 45% (m/v); M9_{glicerol 2%} 23 ml de glicerol 87% (v/v); M9_{glicerol 5%} 57 ml de glicerol 87% (v/v).

ANEXO II: *VPE-Fundamentos Electroquímicos*

En este anexo se mostrarán los fundamentos de la técnica electroquímica utilizada. Se describe la metodología analítica que se aplicó para estudiar la interacción de las diferentes fracciones de EPS y SP con respecto a cadmio empleando la voltamperometría de preconcentración electrolítica como técnica instrumental.

Capacidad complejante y especiación

La *capacidad complejante* (CC) es un parámetro importante pues permite caracterizar interacciones metal-ligando en diferentes sistemas acuosos: efluentes líquidos, medios de cultivo microbiológico, aguas naturales, etc. El término CC puede definirse como la concentración total de ligandos presentes en la muestra capaces de formar complejos con un metal (Davey y col., 1973; Ceretti, 2007). La evaluación de la CC con respecto a un metal implica la determinación de la constante condicional de estabilidad o formación (K') y la concentración de ligando total (L_t) presente en el medio.

El término *especiación* se encuentra en la literatura científica asociado a diferentes contextos. En el ámbito de la Química, se define como la *especie* a las diferentes formas físicoquímicas que puede tomar un elemento. La IUPAC recomienda que el término *especiación* se emplee para indicar la distribución de especies (forma físicoquímica y su concentración) en una muestra o matriz (Templeton y col., 2000). En este sentido los términos *distribución de especies* y *especiación* resultan equivalentes. Por lo tanto, cada una de las formas en que puede presentarse un elemento debe ser considerada especie (compuestos inorgánicos, complejos con ligandos inorgánicos, complejos con ligandos orgánicos, compuestos organometálicos, estados de oxidación, etc.).

Sin embargo, en la práctica la discriminación entre las distintas especies presentes en un sistema depende de diversos factores como por ejemplo: la estabilidad termodinámica y el tiempo de vida media en relación con la técnica analítica empleada; la posibilidad de diferenciar analíticamente las especies; la presencia de otras especies que pueden ser parte

de un sistema (por ejemplo complejos metálicos en un fluido biológico o complejos metal-ácidos húmicos en un sistema ambiental) (Ceretti, 2007).

En muchas situaciones se recurre a la estrategia operacional de agrupar las especies en diferentes *clases* o *fracciones* en función de su comportamiento analítico y se determina la suma de las concentraciones de todas las especies en una clase o grupo. Por ejemplo, las especies $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, CdSO_4 (ac), CdCl_4^{2-} (ac) y CdCO_3 (ac) no pueden distinguirse cuando se analizan por voltamperometría de preconcentración electrolítica (VPE) (Bott, 1995). Todas ellas conjuntamente contribuyen a la fracción que suele definirse como $\text{Cd}_{\text{inorgánico}}$. Por otro lado, el agrupamiento de las especies detectadas experimentalmente puede diferir de la situación en la muestra original puesto que el procesamiento y análisis pueden modificar el equilibrio entre especies.

Voltamperometría de preconcentración electrolítica (VPE)

La voltamperometría de preconcentración electrolítica (VPE, o ASV por su siglas en inglés) fue la técnica analítica elegida para determinar la interacción de las diferentes fracciones de EPS y de SP con respecto a Cd(II). A continuación se dará una breve descripción de las ventajas de esta técnica sobre otras para la determinación de cadmio; se describirá brevemente el material y los electrodos que se utilizan para la medición; los principios de la técnica y el tratamiento de datos para la formación de complejos con estequiometría 1:1.

La determinación de especies químicamente lábiles²¹ presentes en sistemas naturales requiere el uso de técnicas de análisis no invasivas para no perturbar la muestra. La voltamperometría ha sido una de los métodos electroquímicos tradicionalmente más utilizados en la determinación de metales. Para la determinación de concentraciones a nivel de trazas es muy habitual el empleo de espectrofotometría de absorción atómica (AAS) o espectrometría de masa con plasma inductivamente acoplado (ICP). La técnica de VPE presenta ventajas sobre las técnicas mencionadas anteriormente, entre las cuales se puede mencionar:

²¹ Se define como especies químicas lábiles a las fracciones del metal que se encuentran formando acuocomplejos y complejos con ligandos inorgánicos.

-
- a) Utiliza gases de bajo costo;
 - b) No requiere sistema de extracción de vapores;
 - c) La estabilización del equipo es rápida;
 - d) No necesita agua de abastecimiento para enfriamiento, como en el caso de ICP;
 - e) No requiere el uso de lámparas o sistemas ópticos;
 - f) El costo de los instrumentos es menor;

Además de las ventajas anteriormente mencionadas, es una técnica que posee una elevada sensibilidad, permite alcanzar bajos límites de detección (ppb) y permite el estudio y la determinación de varios metales simultáneamente (Wang, 1985).

Principios del método

La voltamperometría se refiere a un conjunto de métodos electroquímicos en los cuales la información analítica se obtiene de medidas de intensidad de corriente en función de un potencial aplicado variable en el tiempo, en condiciones que favorezcan la polarización del electrodo de trabajo.

Las medidas se llevan a cabo en una celda electroquímica, que contiene tres electrodos sumergidos en la solución junto al analito a medir: el electrodo de trabajo donde ocurre la reacción redox de interés, un electrodo de referencia que mantiene el potencial eléctrico aplicado estable, y un electrodo auxiliar que cierra el circuito con el electrodo de trabajo. En este trabajo se utilizaron un electrodo de gota de mercurio (HMDE) como electrodo de trabajo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3M KCl) y un electrodo auxiliar de grafito. La presencia de oxígeno disuelto interfiere en las mediciones ya que aumenta el *background*, puede oxidar metales, etc. Para minimizar la cantidad de oxígeno disuelto en la solución se burbujea gas inerte (en este trabajo se utilizó nitrógeno) (Wang, 1985).

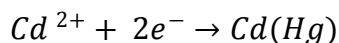
Por otro lado, se requiere que la conductividad de la solución sea adecuada. Para ello se añade, en caso de ser necesario, un electrolito tal como NaCl, KCl o NaNO₃, al que se lo denomina soporte. Éste debe tener alta conductividad eléctrica y no debe reaccionar

con la muestra ni interferir con la reacción que ocurre sobre la superficie del electrodo. En este trabajo se utilizó KNO_3 0,01M.

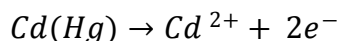
Etapas de deposición y medición electroquímica

Para realizar determinaciones por VPE, deben llevarse a cabo dos etapas sucesivas previo al procedimiento de medición; en primer lugar debe realizarse la **preconcentración** electroquímica del analito, para lo cual se aplica un potencial constante y negativo por un tiempo determinado para reducir al Cd^0 (Cd lábil), el cual se deposita en la superficie del electrodo formando una amalgama ($\text{Cd}(\text{Hg})$). Luego se realiza la estabilización del depósito obtenido, continuando la electrólisis del paso anterior por un tiempo corto; y finalmente en una segunda etapa, se hace un barrido de potencial (en el presente trabajo se utilizó VOC, voltamperometría de onda cuadrada) en sentido positivo para promover la oxidación del cadmio preconcentrado en la amalgama o **redisolución** (*stripping* en inglés). La corriente i generada en este proceso se relaciona con la concentración de Cd^0 en la solución. Si se aumenta el tiempo de preconcentración durante la primera etapa, se depositará mayor cantidad de analito y como resultado la señal se intensificará (mayor i).

Etapas de preconcentración:



Etapas de redisolución:



La corriente medida durante el barrido de potencial puede tener dos contribuciones en relación con el metal a detectar: a) la fracción de metal lábil que está en equilibrio con acuocomplejos y complejos con ligandos inorgánicos ($\text{Cd}(\text{II})$ químicamente lábil), b) las especies cinéticamente lábiles, es decir aquellas que pueden disociarse en la capa difusional ($\text{Cd}(\text{II})$ electroquímicamente lábil). Si esta segunda contribución tiene lugar, se obtendrá una corriente de pico mayor, sobreestimando así la fracción de metal lábil. En consecuencia se estará subestimando la capacidad complejante del sistema (Ceretti, 2007).

El potencial de preconcentración es un parámetro crítico cuando se emplea VPE. Para la cupla $\text{Cd}(\text{II})/\text{Cd}(\text{Hg})$ en solución acuosa el potencial del pico de reducción (E_p) medido es de -0,75 V (vs Ag/AgCl (3M)). Si se aplica un potencial mucho más negativo

que este valor, además de reducirse el Cd' pueden reducirse especies que forman complejos con ligandos orgánicos.

Sistema 1 metal - 1 ligando

Muchos autores han contribuido en las últimas décadas al desarrollo de teorías para estudiar complejación de metales en aguas naturales basándose en los resultados obtenidos utilizando VPE. El uso de modelos de linealización (Ruzic y Scatchard, descritos más adelante) para la obtención de parámetros, como la constante de formación y la concentración de ligandos, es extrapolable a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Esta sección se va a centrar en el análisis de la formación de complejo con estequiometría 1:1.

Para el caso de un ligando (o un grupo de ligandos) (L) orgánico que forma complejos con cadmio de estequiometría 1:1 (1 metal - 1 ligando), junto con la reacción de formación del complejo CdL pueden ocurrir reacciones secundarias con otras especies presentes en el sistema: equilibrios ácido-base que involucran al ligando; interacción del ligando L con cationes metálicos presentes en solución (M_j : Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.); interacción entre Cd(II) y ligandos inorgánicos o ligandos débiles (X_i : Cl^- , OH^- , CO_3^{2-} , etc.) (Scarponi y col., 1996; Ceretti, 2007). Estas interacciones se muestran en la **Figura 1**

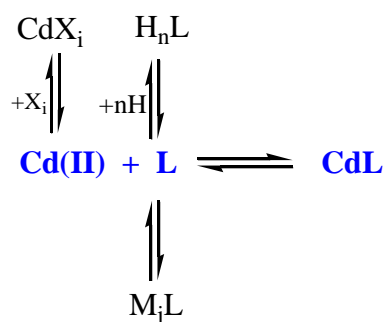


Figura 1 Equilibrio en solución acuosa para el sistema CdL.

La reacción de complejación del equilibrio de formación del complejo CdL tiene la siguiente expresión:

$$K = \frac{[CdL]}{[Cd][L]} \quad (\text{Ec.A.1})$$

La concentración de Cd lábil $[Cd']$, se expresa como:

$$[Cd'] = [Cd] + \sum [CdXi] \quad (\text{Ec.A.2})$$

y la concentración de ligando $[L']$ resulta:

$$[L'] = [L] + \sum_j [MjL] + \sum_n [HnL] \quad (\text{Ec.A.3})$$

Los coeficientes que representan las reacciones secundarias para Cd(II) y L, α_{Cd} y α_L respectivamente se expresan como:

$$\alpha_M = \frac{[Cd']}{[Cd]} \quad (\text{Ec.A.4})$$

$$\alpha_L = \frac{[L']}{[L]} \quad (\text{Ec.A.5})$$

La constante de equilibrio condicional K' para el sistema Cd-L tiene la forma:

$$K' = \frac{[CdL]}{[Cd'][L']} \quad (\text{Ec.A.6})$$

La relación entre ambas constantes K y K' puede obtenerse a partir de las (Ec.A.4), (Ec.A.5) y (Ec.A.6):

$$K' = \frac{[CdL]}{[\alpha_M][\alpha_L]} \quad (\text{Ec.A.7})$$

Curva de titulación

La curva de titulación puede obtenerse experimentalmente a partir del agregado de sucesivas alícuotas de titulante (Cd(II)) a la solución cuya CC se desea determinar, teniendo la precaución de mantener el pH constante durante la titulación para no perturbar los equilibrios en solución (van Leeuwen y col., 1989). El Cd(II) reaccionará con los ligandos (L) de la solución de acuerdo a la reacción indicada que se mostró en la **Figura 1**. Las condiciones de trabajo (tiempo de preconcentración, tiempo de equilibramiento, potencial de preconcentración) deben seleccionarse previamente en función de las características fisicoquímicas del sistema a estudiar (Ceretti, 2007).

En la curva de titulación se representa la corriente de pico (I_p) obtenida luego de cada agregado de Cd(II) en función de la concentración total del metal $[Cd]_t$, la cual resulta de la suma de la concentración de metal inicialmente presente en la muestra $[Cd]_i$ más la concentración del metal agregado durante la titulación $[Cd]_{ag}$ (concentración conocida). Utilizando una curva de calibración se puede determinar la concentración de Cd'. Luego de cada agregado se registra la curva voltamperométrica (voltaje vs corriente) (ver **Figura 2(a)**), y se determina el valor de la corriente de pico obtenida. Así, la altura de pico (corriente máxima) o el área de pico (carga desarrollada) es proporcional a la concentración de Cd' en solución. Cuando se grafica, en ausencia de ligandos o en presencia de ligandos débiles, se observa una relación lineal tal como se muestra en la recta punteada de la **Figura 2(b)**.

Cuando la muestra contiene ligandos moderados o fuertes la forma de la curva de titulación presenta 3 zonas (**Figura 2(b)**). En la zona 1, la respuesta de corriente se aparta de la relación lineal. Se observa una curvatura derivada de la disminución o supresión de la señal debido al complejamiento del metal agregado en presencia de exceso de ligando. Si la concentración de ligandos fuertes en el sistema es significativa la curvatura es pronunciada y en este caso la fracción de Cd' puede estar por debajo del límite de detección de la técnica. En la zona 2, se ha alcanzado la saturación de los ligandos presentes, y la curva aumenta linealmente con el agregado de Cd(II), observándose que la pendiente es comparable a la obtenida en ausencia de ligandos. Aunque no se observó en este trabajo, es posible alcanzar comportamiento no lineal como el de la tercera zona de la **Figura 2(b)**, en la cual se podrían dar por ejemplo procesos de formación de hidróxidos insolubles (Ruzic, 1996).

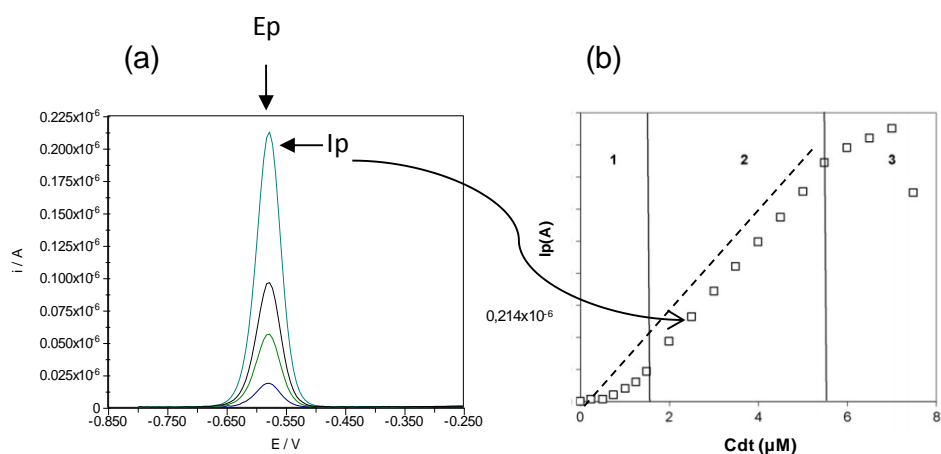


Figura 2 (a) Curva corriente vs potencial, I_p corresponde a corriente de pico, E_p potencial medio; (b) \square Curva de titulación en presencia de ligandos moderados; ---curva de titulación en ausencia de ligandos.

El criterio adoptado para determinar el fin de la titulación es la verificación del valor de la pendiente correspondiente a la zona 2 de la curva. Como ya se mencionó éste debe ser comparable (dentro del error experimental) al que se obtiene por titulación de dicha muestra en ausencia de ligandos moderados (**Figura 2(b)**). La concentración de Cd' luego de cada agregado se calcula a partir de la siguiente relación:

$$[Cd'] = \frac{I_p}{S} \quad (\text{Ec.A.9})$$

donde I_p es la corriente correspondiente a la oxidación de la fracción Cd' previamente reducido sobre la superficie del electrodo y S es la pendiente de la porción lineal de la curva de titulación. Empleando la Ec.A.9 es posible representar la curva de titulación, graficando $[Cd']$ en función de $[Cd]_t$. (**Figura 3**).

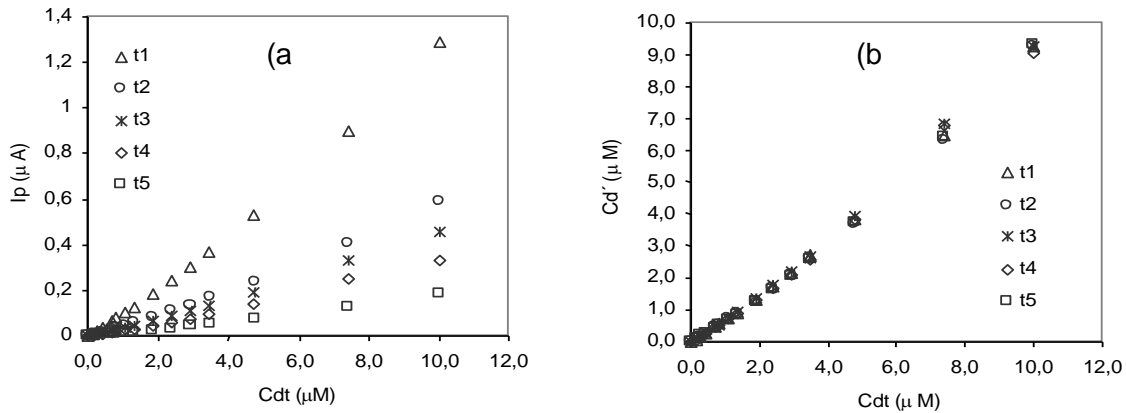


Figura 3 Curva de titulación para diferentes tiempo de preconcentración ($t_1 > t_2 > t_3 > t_4 > t_5$); (a) I_p vs C_{dt} ; (b) Cd' vs C_{dt} . (Ceretti, 2007).

La forma de la curva de titulación depende de diversos factores, algunas de los más importantes son: el valor de la constante condicional de formación del complejo metal-ligando (K'), el potencial de preconcentración, el tiempo de preconcentración y la labilidad cinética del complejo M-L

A partir de los balances de masa para el sistema 1metal -1ligando y usando la Ec. A.7, es se obtiene la expresión matemática para la curva de titulación del sistema estudiado en condiciones de equilibrio. Como se mencionó anteriormente, la concentración total de cadmio $[Cd]_t$ resulta de 2 contribuciones, la concentración de metal inicialmente presente en la muestra $[Cd]_i$ más la concentración de metal agregado en cada punto de la titulación. El balance de masa para cadmio puede expresarse también en función de la fracción lábil de metal $[Cd']$ y de la concentración de complejos $[CdL]$:

$$[Cd]_t = [Cd]_i + [Cd]_{ag} = [Cd'] + [CdL] \quad (\text{Ec.A.10})$$

Donde $[Cd]_{ag}$, es el Cd agregado y $[Cd]_t$ es cadmio total.

Análogamente la concentración de ligando total L_t es igual a la concentración de ligando que no forma complejos con el Cd(II) más la concentración de complejo $[CdL]$:

$$L_t = [L'] + [CdL] \quad (\text{Ec.A.11})$$

Utilizando la Ec.A.7, expresión para el Cdt, y el balance de masa para L (Ec.A.11) se obtiene:

$$[CdL] = \frac{L_t K' [Cd']}{1 + K' [Cd']} \quad (\text{Ec.A.12})$$

Empleando esta ecuación en el balance de masa de Cd (Ec.A.10) se obtiene la expresión analítica para la curva de titulación:

$$[Cd]_t = [Cd'] + \frac{L_t K' [Cd']}{1 + K' [Cd']} \quad (\text{Ec.A.13})$$

Tratamiento de datos: linealización de Ruzic y Scatchard

Los modelos de linealización de Ruzic (Ruzic, 1982) y Scatchard (Scatchard, 1949) permiten determinar de manera más precisa L_t y K' . En el método de Ruzic la evaluación de los parámetros K' y L_t puede hacerse a partir de la curva de titulación experimental. Reordenando la Ec.A.13 en la forma

$$\frac{[Cd']}{[Cd]_t - [Cd']} = \frac{[Cd']}{L_t} + \frac{1}{K' L_t} \quad (\text{Ec.A.14})$$

Donde $[Cd]_t - [Cd']$ es $[CdL]$ (ver Ec.A.10), por lo tanto, el cociente entre $[Cd']$ y $[CdL]$ se relaciona linealmente con la concentración de Cd' . A partir de los datos de la titulación en presencia de ligandos se obtiene el valor de $[Cd']$ y haciendo una medición independiente de la concentración de Cdt presente en el sistema, es posible graficar $[Cd'] / ([Cd]_t - [Cd'])$ en función de $[Cd']$.

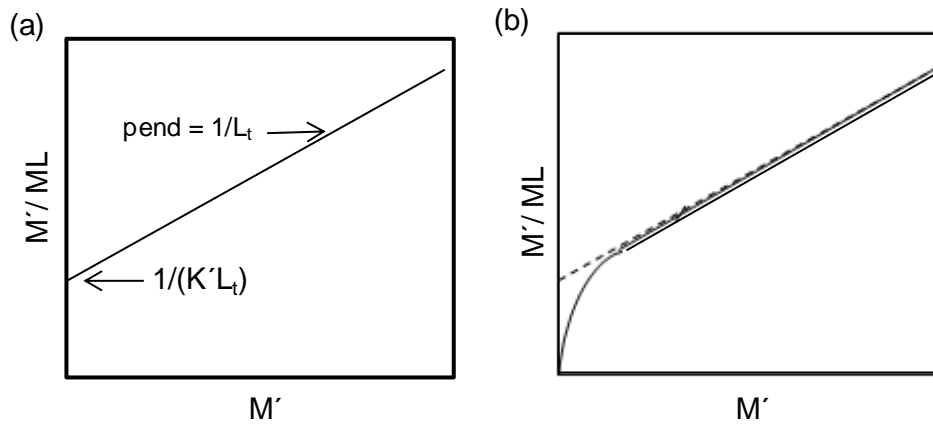


Figura 4 Gráfico correspondiente a la linealización por el método de Ruzic: (a) un grupo de ligando, (b) 2 grupos de ligandos (adaptación Ceretti, 2007).

Para el caso de un sistema 1 metal – 1 ligando la curva que se obtiene es una recta (**Figura 4(a)**). Esta linealización permite calcular la concentración de ligando total a partir de la pendiente de dicha recta y así obtener luego K' a partir de la ordenada al origen.

En el método de Scatchard se grafica el cociente $[CdL]/[Cd']$ en función de $[CdL]$ (Ec.A.15) y se obtienen K' y L_t a partir de la pendiente y de la ordenada respectivamente (**Figura 5**).

$$\frac{[CdL]}{[Cd']} = -K' [CdL] + K'L_t \quad (\text{Ec.A.15})$$

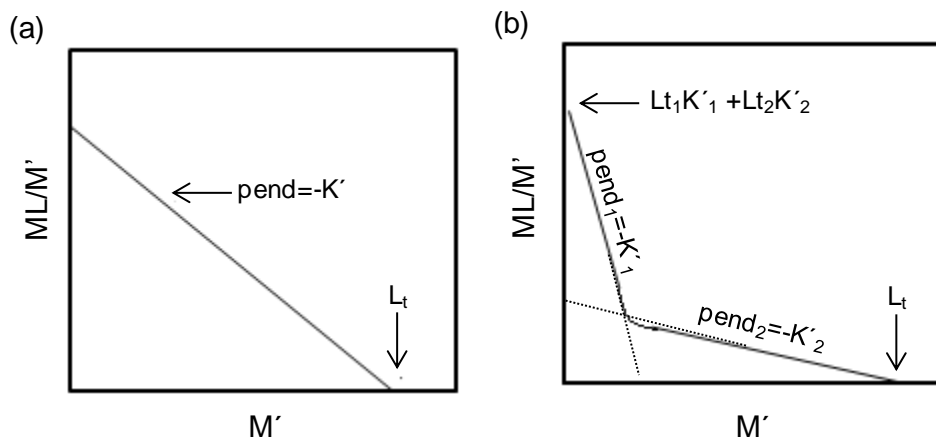


Figura 5 Linealización por el método de Scatchard: (a) un grupo de ligando, (b) 2 grupos de ligandos (adaptación Ceretti, 2007).

Teniendo en cuenta que los valores obtenidos a partir de la pendiente poseen menos incertidumbre que los calculados a partir de la ordenada de origen, se decidió obtener L_t y K' a partir de las pendientes de las linealizaciones de Ruzic y Scatchard, respectivamente.

Cuando se encuentran presentes más de un grupo de ligandos, los gráficos de Ruzic (**Figura 4(b)**) y Scatchard (**Figura 5(b)**) se apartan de la tendencia lineal. En esa situación el gráfico de Scatchard permite hacer una extrapolación a dos rectas y estimar L_t y K' para las dos familias de ligandos.

La curva de titulación puede ser expresada como (Ec.A.16) (Scarponi y col., 1996):

$$[Cd]_t = [Cd'] + \frac{K'_1 L_{t1} [Cd']}{1 + K'_1 [Cd']} + \frac{K'_2 L_{t2} [Cd']}{1 + K'_2 [Cd']} \quad (\text{Ec.A.16})$$

Si las constantes K'_1 y K'_2 difieren entre sí en menos de un orden de magnitud, es posible emplear un modelo no lineal a la Ec.A.16 para obtener los valores de K' y L_t que mejor ajusten con la curva experimental (Sosa y col., 2015).

Ventana analítica

La *ventana analítica* en estudios de especiación o CC indica el rango de valores del producto ($K' \cdot L_t$) permitidos. Es comparable al rango lineal o dinámico, es decir, el intervalo de concentración donde es aplicable un método analítico.

Scarponi y col. (1996) menciona las limitaciones experimentales existentes respecto del rango de valores de K' y L_t que pueden ser determinados. Debido a que la VPE es utilizada ampliamente en el estudio de metales presentes en aguas marinas, la mayoría de los casos descritos corresponden a dichos sistemas acuosos, donde las concentraciones típicas de ligando y metal son del orden de nM. Si se desea obtener valores significativos de ambos parámetros K' y L_t , es preciso trabajar dentro de la ventana analítica determinada por $100 \geq K' L_t \geq 0,01$ (**Figura 6**). Es decir que el ámbito de concentraciones de L_t condiciona el intervalo de valores de K' que pueden ser determinados a partir de la curva de titulación y viceversa. Para concentraciones de L_t en el orden de μM el rango de constantes condicionales K' que puede ser explorado comprende al intervalo $10^4 - 10^8$. Este ámbito de

valores de constante condicional de complejamiento es consistente con ligandos débiles y moderados. Para valores de K' mayores que 10^8 sólo uno de los parámetros que determinan la CC podrá evaluarse, la concentración de ligando L_t . La constante K' no podrá ser evaluada aunque puede decirse que será mayor o igual que 10^8 . Estos valores de K' corresponden a ligandos fuertes. Si $K' < 10^4$, no se detectará complejamiento en el sistema, el ligando no interacciona de manera apreciable con el metal y la curva de titulación tendrá el aspecto de una titulación en ausencia de ligandos (curva de calibración). En ese caso ni K' ni L_t podrán ser determinados (Ceretti, 2007).

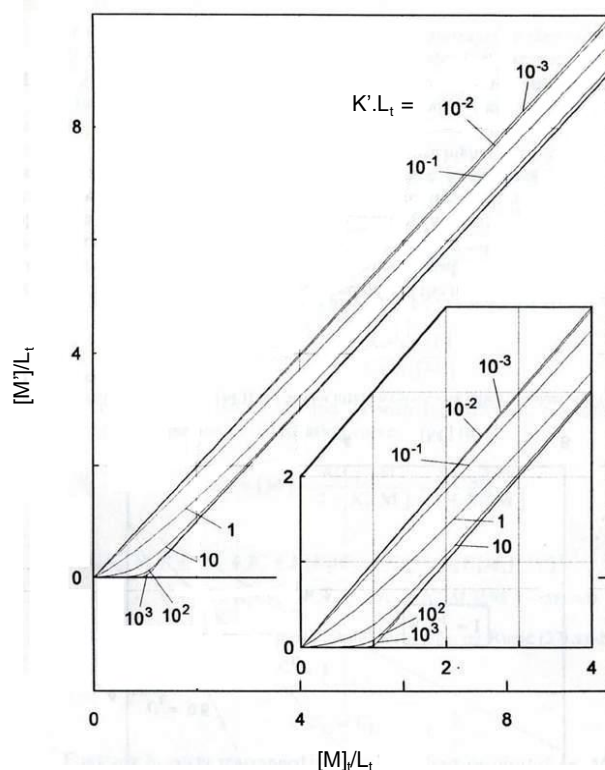


Figura 6 Curva de titulación teórica para un sistema 1metal - 1 ligando; $10^{-3} \leq K' L_t \leq 10^3$ (Scarponi y col., 1996).

La pendiente de la porción lineal alcanza un valor indistinguible al valor obtenido en ausencia de ligando sólo cuando se ha agregado un exceso considerable de titulante, el cual depende del producto de $K' L_t$. Esta situación debe ser considerada, pero no siempre las condiciones experimentales permiten alcanzarla.

Ligandos inertes y lábiles

Además del valor de la corriente de pico (I_p), es posible también medir el potencial de pico (E_p) para los sucesivos agregados del metal realizados durante la titulación. El gráfico E_p vs M_t permite obtener información cinética acerca de los complejos ML presentes en el sistema (van Leeuwen y col., 1989).

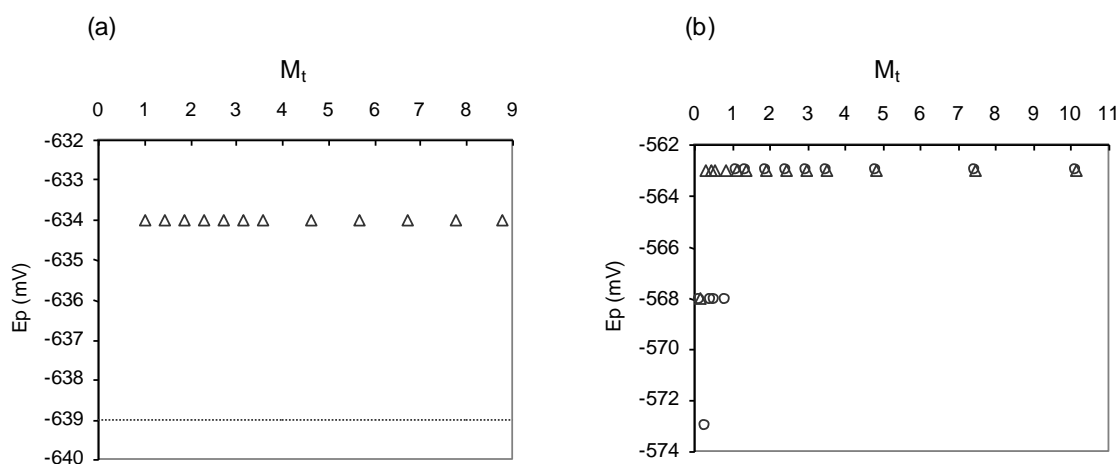


Figura 7 Gráfico E_p vs M_t , (a) ligando inerte; (b) ligando lábil (adaptado Ceretti, 2007).

Cuando el ligando L forma complejos inertes con M, el valor de E_p será constante e igual al obtenido en ausencia de L para dicho metal. En este caso los tiempos de preconcentración no afectarán el equilibrio. En cambio si los complejos son cinéticamente lábiles, el valor de E_p se modificará a lo largo de la titulación (**Figura 7**). En este caso, se necesitan usar menores tiempos de preconcentración, de manera de minimizar la descomposición del complejo y no incrementar la fracción de metal.

BIBLIOGRAFÍA



A

- AGA. (Febrero 2016). American Galvanizers Association. <http://www.galvanizeit.org/>
- Agdi, K., Bouaid, A., Martin, A. E., Hernando, P., Azmania, A., & Camara, C. (2000). Removal of atrazine and four organophosphorus pesticides from environmental waters by diatomaceous earth-remediation method. *J Environ Monit*, 2, 420-423.
- Ahmed, E., & Holmstrom, S. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications: minireview. *Microb Biotech*, 7, 196-208.
- AlAbbas, F., Williamson, C., Bholra, S., Spear, J., Olson, D., Mishra, B., & Kakpovbia, A. (2013). Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). *Int Biodeterior and Biodegradation*, 78, 34-42.
- Al-Aoukaty, A., Appanna, V. D., & Huang, J. (1991). Exocellular and intracellular accumulation of lead in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 is mediated by the phosphate content of the growth medium. *FEMS Microbiol Lett*, 83, 283-290.
- Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, R., Ocaktan, A., & Abdallah, M. (1994). Bacterial iron transport: Coordination properties of Pyoverdine PaA, a peptidic Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem.*, 33, 6391-6402.
- Alessandrello, M., & Vullo, D. (2015). Biotreatment of Cr(VI)-containing wastewater mediated. *Environ Eng Manag J*, in press.
- Arnou, L. (1973). Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J Biol Chem*, 118, 531-537.
- Arundhati, P., & Paul, A. (2008). Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J Appl Microbiol*, 48, 49-64.
- Asthana, R. K., Chatterjee, S., & Singh, S. P. (1995). Investigations on nickel biosorption and its remobilization. *Process Biochemistry*, 30, 729-734.
- ATSDR. (Febrero 2016). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>.

B

- Banin, E., Vasil, M., & Greenberg, E. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 11076-11081.
- Barbhaiya, H., & Rao, K. (1985). Production of pyoverdine, the fluorescent pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *FEMS Microbiol Lett*, 27, 233-235.
- Barelmann, I., Uría Fernández, D., Budzikiewicz, H., & Meyer, J.-M. (2003). The structure of the Pyoverdine from *Pseudomonas Fluorescens* strains accepted mutually by their respective producer. *Biometals*, 16, 263-270.
- Barkleit, A., Moll, H., & Bernhard, G. (2008). Interaction of uranium(VI) with lipopolysaccharide. *Dalton Transactions*, 2879-2886.
- Barnum, D. W. (1977). Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, DOPA, dopamine and other aromatic vic-diols. *Anal Chim Acta*, 89, 157-166.

- Barrionuevo, M., & Vullo, D. (2012). Bacterial swimming, swarming and chemotactic response to heavy metal presence: which could be the influence on wastewater biotreatment efficiency? *World J Microbiol Biotechnol*, 28.
- Beech, I., & Cheung, C. (1995). Interactions of exopolymers produced by sulphate reducing bacteria with metal ions. *Int Biodeter Biodegrad*, 59-12, 35.
- Beech, I., & Sunner, J. (2004). Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr Opin Biotechnol*, 15, 181-186.
- Beech, I., Hanjagsit, L., Kalaji, M., Neal, A., & Zinkevich, V. (1999). Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture. *Microbiology*, 145, 1491-1497.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem*, 54, 484-489.
- Bobrov, A., Kirillina, O., Fetherston, J., Miller, M., Burlison, J., & Perry, R. (2014). The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in mice. *Mol. Microbiol.*, 93, 759-775.
- Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T., Wecke, J., Lawrence, J., & Szewzyk, U. (2006). Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol Lett.*, 262, 31-38.
- Boronin, A. (1992). Diversity and relationships of *Pseudomonas* plasmids. In E. Gali, S. Silver, & B. Witholt (Eds.), *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology*. Washington, D.C: American Society for Microbiology.
- Boruah, H., & Kumar, B. (2002). Biological activity of secondary metabolites produced by strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Folia Microbiol*, 47, 359-363.
- Bott, A. (1995). Voltammetric determination of trace concentrations of metals in the environment. *Current Separations*, 14, 24-30.
- Boukhalfa, H., & Crumbliss, A. L. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals*, 15, 325-339.
- Boyd, A., & Chakrabarty, A. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J Ind Microbiol.*, 15, 162-168.
- Braissat, O., Decho, A., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K., & Visscher, P. (2007). Exopolymer substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*, 1-11.
- Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G., & Schalk, I. (2010). Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environ Microbiol Rep*, 2, 419-425.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., & Schalk, I. (2009a). New insights into the metals specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol*, 11, 1079-1091.
- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., & Lebeau, T. (2009b). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr-Hg- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore producing bacteria. *Chemosphere*, 74, 280-286.
- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci*, 59, 39-46.

- Bridge, T., White, C., & Gadd, G. (1999). Extracellular metal binding activity of the bacterium *Desulfococcus multivorans*. *Microbiology*, *145*, 2987-2992.
- Budzikiewiez, H. (1993). Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol Rev*, *104*, 209-228.
- Burd, G., Dixon, D., & Glick, B. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol.*, *46*, 237-245.
- Buthelezi, S. (2008). *Application of Bacterial Biofloculants for Wastewater and River Water Treatment Biochemistry, Genetics and Microbiology Theses*. University of KwaZulu-Natal, South Africa.
- Buthelezi, S., & Olaniran, A. P. (2010). Production and characterization of biofloculants from bacteria isolated from wastewater treatment plant in South Africa. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, *15*, 874-881.

C

- Cai, Y., Wang, R., An, M., & Liang, B. (2010). Iron-Depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through twitching mobility and quorum sensing. *Braz. J. Microbiol.*, *41*, 37-41.
- Celik, G., Aslim, B., & Beyatli, Y. (2008). Characterization and production of exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 y *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydr Polymers*, *73*, 178-182.
- Ceretti, H. (2007). *Agua y metales: Capacidad complejante con respecto a cadmio en sistemas acuosos de interés ambiental.(tesis de magister)*. Universidad de Buenos Aires.
- Ceretti, H. M., Vullo, D., Zalts, A., & Ramírez, S. (2010). Bacterial growth and complexing capacity in a culture medium supplemented with cadmium(II). *World J Microbiol Biotechnol*, *26*, 847-853.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, *87*, 113-130.
- Certini, G., Campbell, C., & Edwards, A. (2004). Rock fragments in soil support a different microbial community from the fine earth. *Soil Biol Biochem*, *36*, 1119-1128.
- Cescutti, P., Toffanin, R., Pollesello, P., & Sutherland, I. (1999). Structural determination of the acidic exopolysaccharide produced by a *Pseudomonas* sp. strain 1.15. *Carbohydr Res*, *315*, 159-168.
- Cezard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2015). Chemistry and Biology of Pioverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Current Med Chem*, *22*, 165-186.
- Chang, J., & Chen, C. (1999). Biosorption of lead, copper and cadmium with continuous hollow-fiber microfiltration process. *Sep. Sci. Technol.*, *248*, 137-140.
- Characklis, W. (1989). Biofilms and corrosion: A process analysis viewpoint. *Int Biodeterioration*, *25*, 323-326.
- Chen Xu, P. H.-C. (2009). Optimized isolation procedure for obtaining strongly actinide binding exopolymeric substances (EPS) from two bacteria (*Sagittula stellata* and *Pseudomonas fluorescens* Biovar II). *Bioresource technology*, *100*, 6010-6021.
- Chen, Y., Jurkevitch, E., Bar-Ness, E., & Hadar, Y. (1994). Stability Constants of Pseudobactin Complexes with Transition Metals. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, *58*, 390-396.
- Choi, S., & Yun, Y. (2006). Biosorption of cadmium by various types of dried sludge: an equilibrium study and investigations of mechanism. *J Haz Mat*, *138*, 378-383.
- Chung Chun Lam, C., Jickells, T., Richardson, D., & Russell, D. (2006). Fluorescence-based siderophore biosensor for the determination of bioavailable iron in oceanic waters. *Anal Chem*, *78*, 5040-5045.

- Clementi, F. (1997). Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit Rev Biotechnol*, 17, 327-361.
- Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2006). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: soluble or bound. *Process Biochemistry*, 41, 815-823.
- Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2007). Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation. *J Hazard Mater*, 129-137.
- Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2008). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. *J Hazardous Materials*, 151, 185-193.
- Conti, E., Flaibani, A., O'Regan, M., & Sutherland, I. W. (1994). Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. *Microbiology*, 140, 1125-1132.
- Cortese, M., Paszczynski, A., Lewis, T., Sebat, J., Borek, V., & Crawford, R. (2002). Metal chelating properties of pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas* spp. and the biological activities of the formed complexes. *Biometals*, 15, 103-120.
- Cox CD, G. R. (1979). Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 137, 1357-1364.
- Cox, P. (1995). *The Elements on Earth. Inorganic Chemistry in the Environment* (2nd ed.). New York: Oxford University Press.
- Crisponi, G., Dean, A., Di Marco, V., Lachowicz, J., Nurchi, V., Remelli, M., & Tapparo, A. (2013). Different approaches in the study of chelating agents for iron and aluminium overload pathologies. *Anal Bioanal Chem* 405, 405, 585-601.
- Crowley, D. (2006). Microbial siderophores in plant rhizosphere. In L. Barton, & J. Abadia (Eds.), *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms* (pp. 169-189). Netherlands: Springer.
- Csáky, T. Z. (1948). On the estimation of bound hydrylamine in biological materials. *Acta Chem Scand*, 2, 450-454.
- Czaczyk, K., & Myszk, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Pol J Environ Stud*, 16, 799-806.

D

- da Silva Ribeiro, P., & Morais Duarte, R. (2014). Development and validation of a simple spectrophotometric method for the determination of methyl dopa in both bulk and marketed dosage formulations. *Braz J Pharm Sci*, 50, 573-582.
- d'Abzac, P., Bordas, F., van Hullebusch, E., Lends, P., & Guibaud, G. (2010). Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80, 161-168.
- Daniel, A., Ceretti, H., Ramirez, S., & Vullo, D. (2007). Optimización de parámetros de trabajo para la eliminación de metales de sistemas acuosos por tratamiento biológico: *SAMIGE*.
- Daniel, M., Barrionuevo, M., Doyle, S., & Vullo, D. (2016). Kinetics of *Pseudomonas veronii* 2E biofilm development under. *Biochem Eng Journal*, 105, 150-158.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res. Int.*, 11, 1-13.
- Das, S., Bhunia, M., & Bhaumik, A. (2012). Solvothermal synthesis of mesoporous aluminophosphate for polluted water remediation. *Microporous and Mesoporous Materials*, 155, 258-264.

- Daveu, C., Servy, C., Dendane, M., Marin, P., & Ducrocq, C. (1997). Oxidation and nitration of catecholamines by nitrogen oxides derived from nitric oxide. *Nitric Oxide-Biol. Chem*, 1, 234-243.
- Davey, E., Morgan, M., & Erickson, S. (1973). A biological measurement of copper complexation capacity of Sea Water. *Limnol Oceanogr*, 18, 993-997.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 23, 153-177.
- Demange, P., Wenderbaum, S., Bateman, A., Dell, A., & Abdallah, M. (1987). Bacterial siderophores: structure and physicochemical properties of pyoverdins and related compounds. In D. V. Günther Winkelmann (Ed.), *Iron transport in microbes, plants and animals* (pp. 167-187). Weinheim: VCH.
- Deng, S., Bai, R., Hu, X., & Luo, Q. (2003). Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 588-593.
- Dermlim, W., Prasertsan, P., & Doelle, H. (1999). Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52, 698-703.
- Dertz, E. A., & Raymond, K. N. (2004). Biochemical and physical properties of siderophores. In J. Crosa, A. Mey, & S. Payne (Eds.), *Iron transport in bacteria* (pp. 3-17). Washington, DC: ASM Press.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., & Daniels, C. (2011). Microbial manipulations to improve fish health and production – a Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol*, 30, 1-16.
- Dimkpa, C., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., & Kothe, E. (2009). Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol*, 107, 1687–1696.
- Dimkpa, C., Svatoš, A., Merten, D., Büchel, G., & Kothe, E. (2008). Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata*) under nickel stress. *Can J Microbiol*, 54, 163-172.
- Doddamani, H. P., & Ninnekar, H. Z. (2001). Biodegradation of carbaryl by a *Micrococcus* species. *Curr Microbiol*, 43, 69–73.
- Duffus, J. H. (2002). "Heavy Metals"-A meaningless term? *Pure Appl Chem.*, 74, 793-807.
- Duhutrel, P., Bordat, C., Wu, T., Zagorec, M., Guerquin-Kern, J., & Champomier-Vergès, M. (2010). Iron Sources Used by the Nonpathogenic Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* as Revealed by Electron Energy Loss Spectroscopy and Secondary-Ion Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 76, 560-565.
- Durga, P., Devamma, M., & Prasad, T. (2014). A bird's eye view on biorremediation approaches of heavy metals contaminated soil regimes. *World J Environ Biosci*, 3, 1-18.

E

- Eboigbodin, K. E., & Biggs, C. A. (2008). Characterization of the Extracellular Polymeric Substances Produced by *Escherichia coli* Using Infrared Spectroscopic, Proteomic, and Aggregation Studies. *Biomacromolecules*, 9, 686–695.
- Edberg, F., Kalinowski, B., Holmström, S., & Holm, K. (2010). Mobilization of metals from uranium mine waste: the role of pyoverdins produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Geobiology.*, 278-292, 8.

Elouzi, A., Akasha, A., Elgerbi, A., El-Baseir, M., & El Gammudi, B. (2012). Removal of Heavy Metals Contamination By Bio-Surfactants (Rhamnolipids). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4, 4337-4341.

F

Filisetti-Cozzi, T., & Carpita, N. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem*, 197, 157-162.

Finlay, J., Allan, V., Conner, A., Callow, M., Basnakova, G., & Macaskie, L. (1999). Phosphate release and heavy metal accumulation by biofilm-immobilized and chemically-coupled cells of a *Citrobacter* sp. pre-grown in continuous culture. *Biotechnol Bioeng*, 63, 87-97.

Flemming, H. (1995). Sorption sites in biofilms. *Water Sci Technol*, 32, 27-33.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). the biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.

Freitas, F., Alves, D., & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnology applications. *Trends in Biotechnology*, 29, 388-398.

Freitas, F., Alves, D., Pais, J., Costa, N., Olivera, C., Mafra, L., Reis, M. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Biores. Technol.*, 100, 859-865.

Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., & Nielsen, P. (1996). Extraction of extracellular polymer from activated sludge using cation exchange resin. *Water Res*, 30, 1749-1758.

Frontini, M. (2005). Corrosión Microbiológica .(tesis de magister) Universidad de Mar del Plata.

Fu, H. (2004). *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*. New Jersey: Humana Press.

Fuchs, R., Schafer, M., Geoffroy, V., & Meyer, J. (2001). Siderotyping-A Powerful Tool for the Characterization of Pyoverdines. *Curr Top Med Chem*, 31-57.

G

Gadd, G. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol*, 11, 271-279.

Garavaglia, L., Cerdeira, S., & Vullo, D. (2010). Chromium (VI) biotransformation by beta- and gamma-Proteobacteria from natural polluted environments: a combined biological and chemical treatment for industrial wastes. *J Hazard Mater*, 15, 104-110.

Garg, S., Tripathi, M., & Srinath, T. (2012). Strategies for chromium bioremediation of tannery effluent. *Rev Environ Contam Toxicol*, 217, 75-140.

Garg, V., Kumar, R., & Gupta, R. (2004). Removal of malachite green dye from aqueous solution by adsorption using agro-industry waste: a case study of *Prosopis cineraria*. *Dyes and Pigments*, 62, 1-10.

Gauglitz, J., Zhou, H., & Butler, A. (2012). A suite of citrate-derived siderophores from a marine *Vibrio* species isolated following the Deepwater Horizon oil spill. *J Inorg Biochem*. 107: 90-95., 107, 90-95.

Gautam, R., Sharma, S., Mahiya, S., & Chattopadhyaya, M. (2015). Contamination of Heavy Metals in Aquatic Media: Transport, Toxicity and Technologies for Remediation. In S. Sharma (Ed.), *Heavy Metals In Water : Presence, Removal and Safety* (pp. 1-24).

- Georgiou, C., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., & Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem*, 391, 391-403.
- Gey, M. H., Unger, K. K., & Battermann, G. (1996). HPLC analysis of carbohydrates on POLYSPHERCH@OH columns using pulsed amperometric detection (PAD) with sodium hydroxide as post column detection reagent. *Anal Chem*, 356, 339-343.
- Gillam, A., Lewis, A., & Andersen, R. (1981). Quantitative determination of hydroxamic acids. *Anal Chem*, 53, 841-844.
- Gledhil, M., & Buck, K. (2012). The organic complexation of iron in the marine environment: a review. *Front. Microbiol.*, 3, 1-17.
- Glick, R., Gilmour, C., Tremblay, J., Satanower, S., Avidan, O., Deziel, E., . . . Banin, E. (2010). Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* , 192, 2973-2980.
- Good, N., Winget, G., Winter, W., Connolly, T., Izawa, S., & Sing, R. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 5, 467-477.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., & Nielsen, T. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl Environ Microbiol*, 69, 969-973.
- Guan, L. L., Kanoh, K., & Kamino, K. (2001). Effect of Exogenous Siderophores on Iron Uptake Activity of Marine Bacteria under Iron-Limited Conditions. *Appl Environ Microbiol* , 4, 1710-1717.
- Guibaud, G., Bhatia, Divya, d'Abzac, P., Bourven, I., & Bordas, F. (2012). Cd(II) and Pb(II) sorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from anaerobic granular biofilm: Evidence of pH sorption-edge. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43, 444-449.
- Guibaud, G., Bordas, F., Saaid, A., d'Abzac, P., & van Hullenbusch, E. (2008). Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. *Colloids and Surfaces*, 63, 48-54.
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., & Baudu, M. (2005). Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere*, 59, 629-638.
- Guibaud, G., Tixer, N., Bouju, A., & Baudu, M. (2003). Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere*, 1701-1710.
- Guibaud, G., van Hullebusch, E., & Bordas, F. (2006). Lead and cadmium biosorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludges: pH-sorption edge and mathematical equilibrium modelling. *Chemosphere*, 64, 1955-1962.
- Guo-Ping Shenga, H.-Q. Y.-Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 882-894.
- Guria, M., Guah, A., & Bhattacharyya, M. (2014). A green chemical approach for biotransformation of Cr(VI) to Cr(III), utilizing *Fusarium* sp. MMT1 and consequent structural alteration of cell morphology. *J Env Chem Eng*, 2, 424-433.

H

- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*, 3, 307-319.

- Habe, H., & Omori, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 67, 225-243.
- Hailes, A., & Bruce, N. (1993). Biological synthesis of the analgesic hydromorphone, an intermediate in the metabolism of morphine, by *Pseudomonas putida* M10. *Appl Environ Microbiol*, 59, 2166-2170.
- Halan, B., Buehler, K., & Schmid, A. (2012). Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends in Biotechnology*, 30, 453-465.
- Hood, S., & Zottola, E. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol*, 37, 145-153.
- Hu, Z., Hidalgo, G., Houston, P., Hay, A., Shuler, M., Abruña, H., Lion, L. (2005). Determination of spatial distributions of zinc and active biomass in microbial biofilms by two-photon laser scanning microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 71, 4014-4021.
- Huertas, M., Luque-Almagro, V., Martínez-Luque, M., Blasco, R., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. (2006). Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores. *Biochem Soc Trans* , 34, 152-155.

I

- ICdA. (Febrero 2016). *International Cadmium Association*. <http://www.cadmium.org/>.
- ICDACr. (Febrero 2016). *International Chromium Development Association*. <http://www.icdacr.com/>.
- INTI. (Febrero 2016). <http://www.inti.gob.ar/sabercomo/sc108/inti2.php>.

J

- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Oxford Journals Medicine & Health* , 68, 167-182.
- Jia, C., Li, P., Li, X., Tai, P., & Liu, W. G. (2011). Degradation of pyrene in solis by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from liquid cultures. *Process Biochem.*, 46, 1627-1631.
- Johnstone, T., & Nolan, E. (2015). Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Transactions*, 44, 6320-6339.

K

- Kachlany, S. C., Levery, S., Kim, J., Reuhs, B., Lion, I., & Ghiorse, W. (2011). Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environmental Microbiology*, 3, 774-784.
- Kalimuthu, K., RS, B., D, V., M, B., & S, G. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids Surfaces B*, 6, 150-153.
- Kalinowski, B., Liermann, L., Bratley, S., Barnes, A., & Pantano. (2000). X-ray photoelectron spectroscopic evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64, 1331-1343.
- Kamma Raunkjaer, T. H.-J. (1994). Measurement of Pools of Protein, Carbohydrates and Lipid in Domestic Wastewater. *Water Research*, 28.
- Kang, S., B. P., Kim, K., & McQuillan, A. (2006). Monitoring metal ion binding in single-layer *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using ATR-IR spectroscopy. *Langmuir*, 22, 286-291.
- Karapanagiotis, N., Rudd, RM, S., & JN, L. (1989). Extraction and characterization of extracellular polymeric in digested sewage sludge. *Journal Chem Technol Biotechnol*, 44, 107-120.

- Kazy, S., Sar, P., Singh, S., Sen, A., & D'souza, S. (2002). Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. *World J Microbiol Biotechnol*, 18, 583-588.
- Kilz, S., Lenz, C., Fuchs, R., & Budzikiewicz, H. (1999). Spectrometry, A Fast Screening Method for the Identification of Siderophores from Fluorescent *Pseudomonas* spp. by Liquid Chromatography/Electrospray Mass. *J Mass Spectrom*, 34, 281-290.
- Kim, S., Kim, J., Kim, C., & Oh, D. (1996). Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol Lett*, 18, 1161-1164.
- Klock, J. H., Wieland, A., & Seifert, R. (2007). Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: characterisation and isolation method optimisation. *Mar Biol*, 152, 1077-1085.
- Klopper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
- Knirel, Y. A., Bystrova, O. V., Kocharova, N. A., Zähringer, U., & Pier, G. B. (2006). Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Endotoxin Research*, 12, 324-335.
- Komuro, T., & Galanos, C. (1988). Analysis of *Salmonella* lipopolysaccharides by sodium deoxycholate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Chromatogr.*, 450, 381-387.
- Kraemer, S. M. (2004). Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. A review. *Aquatic Sciences*, 66, 3-18.
- Krauss, J., Weckesser, J., & Mayer, H. (1988). Structural analysis of the nontoxic lipid A of *Rhodobacter capsulatus* 37b4. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38, 157-163.
- Kumar, B., & Dube, H. (1991). Plant growth-promoting activity of fluorescent *Pseudomonas* from tomato rhizosphere. *Indian J Exp Biol*, 29, 366-370.

L

- Lamont, I., Beare, P., Ochsner, U., Vasil, A., & Vasil, M. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*, 99, 7072-7077.
- Langley, S., & Beveridge, T. (1999). Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Appl Environ Microbiol*, 65, 489-498.
- Lartiges, B., Deneux-Mustina, S., Villemain, G., Mustin, C., Barrès, O., Chamerois, M., Babut, M. (2001). Composition, structure and size distribution of suspended particulates from the Rhine River. *Water Res*, 35, 808-816.
- Leela, K., & Sharma, G. (2000). Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering*, 33, 687-689.
- Leong, S., & Neilands, J. (1982). Siderophore production by phytopathogenic microbial species. *Arch Biochem Biophys*, 218, 351-359.
- Liermann, L., Guynn, R., Anbar, A., & Brantley, S. (2005). Production of a molybdophore during metal-targeted dissolution of silicates by soil bacteria. *J Chem Geology*, 220, 285-302.
- Lignet, C., Azadi, P., MacLeod, J., Dell, A., & Abdallah, M. (1992). Bacterial siderophores: the structures of the pyoverdins of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. *Tetrahedron Letters*, 13, 1737-1740.
- Linnik, P. M. (2000). Zinc, lead and cadmium speciation in Dnieper water-bodies. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 5, 261-270.

- Lins, R., & Straatsma, T. (2001). Computer simulation of the rough lipopolysaccharide membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J.*, *81*, 1037-1046.
- Liu, Y., Xu, W., Zeng, G., Tang, C., & Li, C. (2004). Experimental study on Cr (V) reduction by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Environ. Sci.*, *16*, 797-801.
- Lizon, C., & Fritsch, P. (1999). Chemical toxicity of some actinides and lanthanides towards alveolar macrophages: an in vitro study. *Int J Radiat Biol.*, *75*, 1459-1471.
- Loaëc, M., Olier, R., & Guezennec, J. (1997). Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Res.*, *31*, 1171-1179.
- Loper, J., & Schroth, M. (1986). *Iron, siderophores, and plant diseases* (T.R.Swinburne ed.). New York: Plenum.
- Lopez, A., Lazaro, N., Priego, J. M., & Marques, A. M. (2000). Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. *J Ind Microbiol Biotechnol*, *24*, 146-151.
- Lutkenhaus, J. (1977). Role of mayor outer membrane protein in Echerichia coli. *J Bacteriol*, *131*, 631-637.

M

- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2000). Microbila Ecology en T D Brock. In Ninth (Ed.), *Biology of Microorganisms* (pp. 642-719). Prentice Hall, N.J.
- Mancuso, N., C., Bowman, J., & Guezennec, J. (2005). Effet of incubation temperature on growth and production exopolisaccharides by antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. *Appl Environ Microbiol*, *71*, 3519-3523.
- Manh, T., & O'Tolle, G. (2001). Mechanis of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trens Microbiol*, *9*, 34-39.
- Martell, E., & Smith, R. (2010). NIST Standard Reference Database 46. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes. *Version 8.0*, <http://www.nist.gov/srd/nist46.cfm>.
- Martinez, R., Smith, D., Kulczycki, E., & Ferris, F. (2002). Determination of Intrinsic Bacterial Surface Acidity Constants using a Donnan Shell Model and a Continuous pKa Distribution Method. *Methods of Surface Characterization*, *253*, 130-139.
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, O., & Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol. Fertil. Soils*, *30*, 433-439.
- Mawji, E., Gledhill, M., Milton, J., Tarran, G., Ussher, S., & Thompson, A. (2008). Hydroxamate siderophores: occurrence and importance in the Atlantic Ocean. *Environ Sci Technol*, *42*, 8675-8680.
- McSwain, B., Irvine, R., Hausner, M., & Wilderer, P. (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl Environ Microbiol*, *71*, 1051-1057.
- Mehri, I., Khessairi, A., & Turki, Y. (2012). Effect of dose-respose of zinc and magnese on siderophore production. *American Journal of Environmental Sciences*, *8*, 143-151.
- Merja, M., & Tiina, M.-S. (1994). Methods for detection of *Pseudomonas* siderophores. *J Microbiol Meth*, *19*, 223-234.
- Meyer, J., & Abdallah, M. (1978). The Fluorescent Pigment of *Pseudomona fluorescens*: Biosynthesis, purification and Physicochemical Properties. *J Gen Microbiol*, *107*, 319-328.
- Meyer, J., Geoffroy, V., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., & Lemanceau, P. (2002). Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonas*. *Appl Environ Microbiol*, *68*, 2745-2753.

- Meyer, J.-M. (2007). Siderotyping and Bacterial Taxonomy: A Siderophore Bank for a Rapid Identification at the Species Level of Fluorescent and Non-Fluorescent *Pseudomonas*. In V. Ajit, & C. Sudhir (Eds.), *Microbial Siderophores* (pp. 43-65). Berlin: Springer.
- Miethke, M., & Marahiel, M. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Molec Biol Rev*, 7, 413–451.
- Mikkelsen, L., & Keiding, K. (2002). Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering. *Water Res*, 36, 2451-2462.
- Milagres, A., Arantes, V., Medeiros, C., & Machuca, A. (2002). Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. *Enzyme Microb Technol*, 30, 562–565.
- Montgomery, S. (2008). Successful Microbial Expression Systems. *Bioprocess Intl.*, 1-2.
- More, T., Yadav, J. Y., Tyagi, R., & Surampalli, R. (2014). Extracellular polymeric substances of bacterial and their potential environmental applications. *Environmental Management*, 144, 1-25.
- More, T., Yan, S., John, R., Tyagi, R., & Surampalli, R. (2012a). Bacterial polymer production using pre-treated sludge as raw material and its flocculation and dewatering potential. *Bioresour Technol.*, 121, 425-431.
- More, T., Yan, S., Tyagi, R., & Surampalli, R. (2010). Potencial use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresour Technol*, 101, 7691-7700.
- Morlay, C., Cromer, M., Mouginot, Y., & Vittori, O. (1998). Potentiometric study of Cu(II) and Ni(II) complexation with two high molecular weight poly(acrylic acids). *Talanta*, 45, 1177-1188.
- Muller, L., Gong, C., & Czerwinski, K. (2007). Complexation of uranium (VI) with the siderophore desferrioxamine B. *J Radioanal Nucl Chem*, 273, 683–688.
- N**
- Nagasawa, T., Nanba, H., Ryuno, K., Takeuchi, K., & Yamada, H. (1987). Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. Purification and characterization. *Eur J Biochem.*, 162, 691-698.
- Nagy, I., Compernelle, F., Ghys, K. V., & DeMot, R. (1995). A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of herbicides EPTC(S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain N186/21. *Appl Environ Microbiol*, 61, 2056-2060.
- Nair, A., Juwarkar, A., & Singh, S. (2007). Production and characterization of siderophores and its applications in Arsenic Removal from contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut*, 180, 199-212.
- Nakata, K., & Kurane, R. (1999). Production of an extracellular polysaccharide bioflocculant by *Klebsiella pneumoniae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 2064-2068.
- Nam, I., Chang, Y., Hong, H., & Lee, Y. (2003). A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 62, 284-290.
- Navon Venezia, S., Banin, E., E.Z, R., & Rosenberg, E. (1998). The bioemulsifier alasan: role of protein in maintaining structure and activity. *App Microbiol Biot*, 61, 3240-3244.
- Nawaz, K., Hussain, K., Choudary, N., Majeed, A., Ilyas, U., & Ghani, A. (2011). Eco-friendly role of biodegradation against agricultural pesticides hazards. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 177–183.
- Naz, T., Khan, M., Ahmed, I., Rehman, S., Rha, E., Malook, I., & Jamil, M. (2015). Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas* species isolated from sugar industry. *Toxicol Ind Health*

- Neilands, J. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J Biol Chem*, 270, 26723-26726.
- Nieboer, E., & Richardson, D. (1980). The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Pollut*, 1, 3-26.
- Nielsen, P., & Jahn, A. (1999). Extraction EPS. In J. Wingender, T. Neu, & H. Flemming (Eds.), *Microbial polymeric substances: characterization, structure and function* (pp. 49-72). Berlin: Springer-Verlag.
- Nilanjana, D., & Preethy, C. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol Res Inter*, 1-13.
- Noghabi, K., Zahiri, S., & Yoon, S. (2007). The production of a cold-induced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth conditions and its role in heavy metals absorption. *Process Biochemistry*, 42, 847-855.
- Nriagu, J. (1997). Industrial activity and metal emissions. In R. Socolow, C. Andrews, F. Berkhout, & V. Thomas (Eds.), *Industrial Ecology and Global Change*. Cambridge University Press.

O

- O'Connell, D., Birkinshaw, C., & O'Dwyer, T. (2008). Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology*, 99, 6709-6724.
- Oglesby-Sherrouse, A., Djapgne, L., Nguyen, A., Vasil, A., & Vasil, M. (2014). The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis.*, 70, 307-320.
- Olivera, M., & al, e. (2007). Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochem.Eng.J.*, 37, 177-183.
- OMS. (2008). *Guías de la OMS para la calidad del agua potable*.
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/es/.
- OMS, N. D. (2012). www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/es.
- Overhage, J., Priefert, H., Rabenhorst, J., & Steinbüchel, A. (1999). Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (vdh) gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52, 820-828.

P

- Pagnanelli F, Cruz Viggi C, Toro L (2010) Isolation and quantification of cadmium removal mechanisms in batch reactors inoculated by sulphate reducing bacteria: Biosorption versus bioprecipitation. *Bioresource Technology* 101 (9):2981-2987
- Paine, S. (1994). Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.*, 235, 329-344.
- Parikh, s., & chorover, j. (2007). Infrared spectroscopy studies of cation effects on lipopolysaccharides in aqueous solution. *Colloids and Surfaces*, 55, 241-250.
- Parker, D. L., Morita, T., Mozafarzadeh, M. L., Verity, R., McCarthy, J. K., & Tebo, B. M. (2007). Interrelationships of MnO₂ precipitation, siderophore-Mn-(III) complex formation, siderophore degradation, and iron limitation in Mn-(II)-oxidizing bacterial cultures. *Geochim Cosmochim Acta*, 71, 5672-5683.
- Parkin, J., & Chorover, J. (2007). Infrared spectroscopy studies of cation effects on lipopolysaccharides in aqueous solution. *Coll and Surf B: Biointer*, 55, 241-250.

- Perez-Miranda, S., Cabirol, N., George-tellez, R., Zamudio-Rivera, L., & Fernandez, F. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Method*, *70*, 127-131.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M., Cerning, J., & Desmazeaud, M. (2000). Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *FEMS Microbiol Lett*, *221*, 285-291.
- Plum, L., Rink, L., & Haase, H. (2010). The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *Int J Environ Res Public Health*, *7*, 1342-1365.
- Prasad, M., Sajwan, K. S., & Naidu, R. (2005). *Trace Elements in the Environment: Biogeochemistry, Biotechnology, and Bioremediation*. Boca raton, USA: Taylor and Francis Group.
- Preusting, H., Nijenhuis, A., & Witholt, B. (1990). Production and Characterization of Poly(3-Hydroxyalkanoates). In E. A. Dawes (Ed.), *Novel Biodegradable Microbial Polymers* (pp. 453-454). Springer Netherlands.

R

- Rajendran, P., Muthukrishnan, J., & Gunasekara, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian J Exp Biol*, *41*, 935-944.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol*, *28*, 142-149.
- Ramesh, A., Lee, D.-J., & Hong, S. (2006). Soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge. *Environ Biotechnol*, *73*, 219-225.
- Rehm, B. H. (2009). *Pseudomonas Applications* (Editorial Board ed.).
- Reuhs, B., Geller, D., Kim, J., Fox, J., Kumar Kolli, V., & Pueppk, S. (1998). *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl Environ Microbiol*, *64*, 4930-4938.
- Rioux, C., Jordan, D., & Rattray, J. (1983). Colorimetric determination of catechol siderophores in microbial cultures. *Anal Biochem*, *133*, 163-169.
- Robertson, E., & Firestone, M. (1992). The relationship between desiccation and exopolysaccharide production by a soil *Pseudomonas*. *Appl Environ Microbiol*, *58*, 1291-1297.
- Rondel, C., Marcato-Romain, C.-E., & Girbal-Neuhauser, E. (2013). Development and validation of a colorimetric assay for simultaneous quantification of neutral and uronic sugars. *Water Res*, *47*, 2901-2908.
- Ruchita, D., Wasiullah, Deepti, M., Kuppusamy, P., Udai, B. S., Asha, S., Diby, P. (2015). Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*, *7*, 2189-2212.
- Ruzic, I. (1996). Trace metal complexation at heterogeneous binding sites in aquatic systems. *Marine Chemistry*, *53*, 1-15

S

- Safa, M., Larouci, M., Meddah, B., & Valemens, P. (2012). The sorption of lead, cadmium, copper and zinc ions from aqueous solutions on a raw diatomite from Algeria. *Water Sci Technol.*, *65*, 1729-1737.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R., & Bestervelt, L. (2012). Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol*, *52*, 1-15.

- Salam, L., Ilori, M., & Amund, O. (2015). Carbazole degradation in the soil microcosm by tropical bacterial strains. *Braz J Microbiol*, *46*, 1037-1044.
- Salehizadeh, H., & Shojaosadati, S. (2002). Isolation and characterisation of a biofloculant produced by *Bacillus firmus*. *Biotechnology Letters*, *24*, 35-40.
- Sar, P., Kazy, S., & Singh, S. (2001). Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature. *Lett Appl Microbiol*, *32*, 257-261.
- Sayyed, R., Badgajar, H., Mhaske, M., & Chincholkar, S. (2005). Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. *Indian J Biotechnol*, *4*, 484-490.
- Scarponi, G., Capodaglio, G., Barbante, C., & Cescon, P. (1996). The anodicstripping voltammetric titration procedure for study of trace metal complexation in seawater. In S. Caroli (Ed.), *Element speciation in bioinorganic chemistry*. (p. Cap. 11). John, Wiley; Sons. Inc.
- Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *51*, 660-672.
- Schalk, I., Hannauer, M., & Braud, A. (2011). New role for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*, *13*, 2844-2854.
- Schenk, P., Carvalhais, L., & Kazan, K. (2012). Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends Biotechnol*, *30*, 177-184.
- Scher, F., & Baker, R. (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. *Phytopathol.*, *72*, 1567-1573.
- Schippers, B., Bakker, A., & Bakker, P. (1987). Interactions of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Microorganisms and the Effect of Cropping Practices. *Annual Review of Phytopathology.*, *25*, 339-358.
- Schmitt, J., & Flemming, H.-C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *41*, 1-11.
- Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem*, *160*, 47-56.
- Sedmak, J., & Grosserberg, S. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry*, *79*, 544-552.
- Sharma, A., & Johri, B. (2003). Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent Pseudomonas strain GRP3A in mung bean. *Microbial Res*, *158*, 77-81.
- Sheng, G., & Yu, H. (2007). Formation of extracellular polymeric substances from acidogenic sludge in H₂-producing process. *Appl Microbial Biotechnol*, *74*, 208-214.
- Shirvani, M., & Nourbakhsh, F. (2010). Desferrioxamine-B adsorption to and iron dissolution from palygorskite and sepiolite. *Appl Clay Sci.*, *48*, 393-397.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol Biotechnol*, *98*, 718-725.
- Solis, M., Solis, A., Perez, H., Manjarrez, N., & Flores, M. (2012). Microbial decoloration of azo dyes: a review. *Process Biochem.*, *47*, 1723-1748.
- Sosa, G. L., Zalts, A., & Ramirez, S. A. (2015). Complexing Capacity of Electroplating Rinsing Baths – A twist to the resolution of two ligand families of similar strength. *Anal Sci Technol*, En prensa.

- Srideri, M., Kumar, K., & Mallaiah, K. (2008). Production of catechol-type siderophores by *Rhizobium* sp. isolated from stem nodules of *Sesbania procumbens*. *Research Journal of Microbiology*, *3*, 282-287.
- Srivastava, S., & Thakur, I. (2012). Biosorption and biotransformation of chromium by *Serratia* sp. isolated from tannery effluent. *Environ Technol.*, *33*(1-3), 113-2.
- Steinmetz, I., Rohde, M., & Brenneke, B. (1995). Purification and characterization of an exopolysaccharide of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *pseudomallei*. *Infect Immun* , *63*, 3959-3965.
- Strain, S. M., Fesik, S. W., & Armitag, I. M. (1983). Structure and Metal-binding Properties of Lipopolysaccharides from Heptoseless Mutants of *Escherichia coli* Studied by ¹³C and ³¹P Nuclear Magnetic Resonance. *J Biol Chem*, *25*, 13466-13477.
- Subramaniana, S. B., Yana, S., Tyagia, R., & Surampallib, R. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: Isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering. *Water Res*, *44*, 2253–2266.
- Sutherland. (1980). Polisaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. In *Microbial adhesion to surface*.
- Sutherland, I. (2001a). Biofilm exopolysaccharide: a strong and sticky framework. *Microbiol*, *147*, 3-9.
- Sutherland, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, *11*, 663-674.

T

- Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2010). The Siderophore Pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 Is an Intrinsic Virulence Factor in Host Tobacco Infection. *J Bacteriol*, *1*, 117-126.
- Tapia, J., Muñoz, J., González, F., Blázquez, M., Malki, M., & Ballester, A. (2009). Extraction of extracellular polymeric substances from the acidophilic bacterium *Acidiphilium* 3.2Sup(5). *Water Sci Technol.* , *59*, 1959-1967.
- Taylor, R., May, I., Wallwork, A., Denniss, I., Hill, N., & Galkin, B. (1998). The applications of formo- and aceto-hydroxamic acids in nuclear fuel reprocessing. *Journal Alloys Compd.*, *271-273*, 534–537.
- Teitzel, G., & Parsek, M. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* , *69*, 2313-2320.
- Templeton, D., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., van Leeuwen, H., & Lobi'nski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.*, *72*, 1453-1470.
- Texier, A., Andres, Y., & Le Loirec, P. (1999). Selective biosorption of lanthanide (La,Eu,Yb) ions by *Pseudomonas aeruginosa* . *Environ. Sci. technol.*, *33*, 489-495.
- Texier, A.-C., Andrès, Y., Illemassene, M., & LE CLOIREC, P. (2000). Characterization of Lanthanide Ions Binding Sites in the Cell Wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.*, *34*, 610–615.
- Tombs, M., & Harding, S. (1997). *An introduction to polisaccharide biotechnology*. London: Taylor and Francis.
- Tortora, M., & Diaz-Ricci, J. (2011). Azospirillum brasilense siderophore with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch Microbiol*, *193*, 275-286.

Tseng, C., Burger, A., Mislin, G., Schalk, I., Yu, S., Chan, S., & Abdallah, M. (2006). Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *J Biol Inorg Chem*, *11*, 419-32.

Tsezos, M. (2009). Metal - microbes interactions: beyond environmental protection. *Advanced Materials Research*, *71-3*, 527-532.

U

USGS. (Febrero 2016). <http://minerals.usgs.gov/>.

V

van Leeuwen, H., Cleven, R., & Buffle, J. (1989). voltammetric techniques for complexation measurements in natural aquatic media. *Pure Appl Chem*, *61*, 255-274.

Varma, A., & Chincholkar, S. (2007). *Microbial Siderophores*. New York: Springer.

Velasquez, I., Nunn, B., Ibisinmi, E., Goodlett, D., Hunter, K., & Sander, S. (2011). Detection of hidroxamate siderophores in coastal and Sub-Antartic waters off the South Eastern Coast of New Zeland. *Marine Chemistry*, *126*, 97-107.

Vijayabaskar, P., S.Babinastarlin, T.Shankar, T.Sivakumar, & Anandapandian, K. (2011). Quantification and Characterization of Exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC121). *Adv BiolRes*, *5*, 71-76.

Villanueva, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana . *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *42*, 131-143.

Villegas, M. (2007). Biotechnological Production of Siderophores. In A. Varma, & S. Chincholkar (Eds.), *Microbial Siderophores* (pp. 220-231). Berlin: Springer.

Visca, G. C. (1992). Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl Environ Microbiol*, *58*, 2886–2893.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R., & Ivanova, E. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, *14*, 2535-2554.

Vullo, D. L., Ceretti, H. M., Daniel, M. A., Ramírez, S. A., & Zalts, A. (2008). Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresour Technol*, *99*, 5574–5581.

Vullo, D., Ceretti, H., Ramírez, S., & Zalts, A. (2003). Retención de metales en gel de alginato de calcio. *VI Reunión Anual de SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Latinoamérica*, Buenos Aires, Argentina.

Vullo, D., H.M, C., Hughes, E., Ramírez, S., & Zalts, A. (2005). Indigenous heavy metal multiresistant microbiota of Las Catonas stream. *Environ Monit Assess*, 81-97.

W

Wagner-Döbler, I., Lünsdorf, H., Lübbenhüsen, T., von Canstein, H., & Li, Y. (2000). Structure and species composition of mercury-reducing biofilms. *Appl Environ Microbiol*, *66*, 4559-4563.

Wang, J. (1985). *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation, and Applications*. Florida: VCH Publishers.

Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotech Adv*, *27*, 195-226.

- Wang, Q., Xiong, D., Zhao, P., Yu, X., Tu, B., & Wang, G. (2011). Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17. *Journal Appl. Microbiol.* , 111, 1065-1074.
- Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2011). Suitability of Immobilized *Pseudomonas fluorescens* SM1 Strain for Remediation of Phenols, Heavy Metals, and Pesticides from Water. *Water, Air, & Soil Pollution*, 220, 89-99.
- Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environ Monit Assess*, 185, 8147-8155.
- Watteau, F., & Berthelin, J. (1994). Microbial dissolution of iron and aluminum from soil minerals- efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. *Eur. Journal Soil Biol.*, 30, 1-9.
- Wei, H., & Aristilde, L. (2015). Structural characterization of multiple pyoverdines secreted by two pseudomonas strains using liquid chromatography - high resolution tandem mass spectrometry with varying dissociation energies. *Anal Bioanal Chem*, 407, 4629-4638.
- Weia, X., Fang, L., Cai, P., Huang, Q., Chen, H., Liang, W., & Rong, X. (2011). Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria. *Environ Pollut*, 159, 1369–1374.
- Whitfield, C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J Microbiol*, 34, 415-420.
- Wilson, M., McNab, R., & Henderson, b. (2002). Bacterial disease mechanisms. In *An introduction to cellular microbiology*. Cambridge university Press.
- Wingerder J, N. T. (1999). what are bacterial extracellular polymeric substances? In *Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure, and function*.
- X**
- Xu, G., & Goodell, B. (2001). Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. *J Biotech.*, 87, 43–57.
- Y**
- Ye, L., Ballet, S., Hildebrand, F., Laus, G., Guillemin, K., Raes, J., Cornelis, P. (2013). A combinatorial approach to the structure elucidation of pyoverdine siderophore produced by a *Pseudomonas putida* isolate and the use of pyoverdine as a taxonomic marker for typing *P. putida* subspecies. *Biometals*, 26, 561-575.
- Yee, N., & Fein, J. (2001). Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 2037-2042.
- Yoder, M., & Kisaalita, W. (2011). Iron specificity of a biosensor based on fluorescent pyoverdine immobilized in sol-gel glass. *Journal Biol. Eng.* , 5, 4-16.
- Yu, G.-H., He, P.-J., & Shao, L.-M. (2009). Characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) fractions from excess sludges and their effects on biofloculability . *Biosources Technology*, 100, 3193-3198.
- Z**
- Zabłocka-Godlewska, E., Przystaś, W., & Grabińska-Sota, E. (2014). Decolourisation of Different Dyes by two *Pseudomonas* strains under various growth conditions. *Water Air Soil Pollut.*, 225, 1846.
- Zane, H., & Butler, A. (2013). Isolation, structure elucidation, and iron-binding properties of Lystabactins, siderophores isolated from marine *Pseudoalteromonas* sp. *J Nat Prod*, 76, 648-54.

- Zhang, D., Wang, J., & Pan, X. (2006). Cadmium sorption by EPS produced by anaerobic sludge under sulphate-reducing conditions. *J Hazard Mater*, 138, 589-593.
- Zhang, T., Zhang, C., Li, S., Zhang, Y., & Yang, Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Braz J Microbiol*, 42, 1470-1478.
- Zhitkovich, A. (2011). Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. *Chem Res Toxicol*, 24, 1617-1629.