

**ONTANON, ORNELLA**

Demanda de caso NI y final alivando trabajo colectivo de la parcela de C.

75072

2016

75072

20



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas**

**“BIORREMEDIACIÓN DE CROMO (VI) Y FENOL  
UTILIZANDO BACTERIAS AUTÓCTONAS DE LA  
PROVINCIA DE CÓRDOBA”**

**Mic. Ornella Ontañón**

**DIRECTOR: Dra. Elizabeth Agostini**

**CO-DIRECTOR: Dra. Paola González**

**Año 2016**

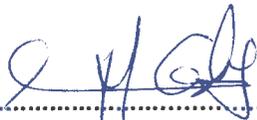
**ST067**

REF:
Clasif:
T-1017

75072

COMISIÓN ASESORA Y JURADO DE TESIS

**Dra. Stella Maris Castro, Universidad Nacional de Río Cuarto**

Firma ..... 

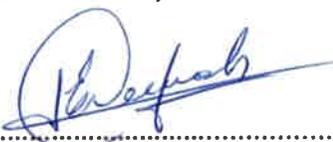
Aclaración ..... Stella Castro .....

**Dra. Diana Lía Vullo, Universidad Nacional de General Sarmiento**

Firma ..... 

Aclaración ..... Diana Vullo .....

**Dr. Edgardo Donati, Universidad Nacional de La Plata**

Firma ..... 

Aclaración ..... EDGARDO DONATI .....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Río Cuarto, 18 de marzo de 2016

Calificación..... 10 (diez) - SOBRESALIENTE .....

A mis directoras, las Dras. Elizabeth Agostini y Paola González, dos grandes personas y profesionales que me dieron la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y me aportaron las herramientas necesarias para capacitarme. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo y por el constante estímulo que me brindaron para crecer profesionalmente, pero por sobre todas las cosas por demostrarme confianza y darme libertad de trabajo.

A los miembros del tribunal de tesis, Dres. Stella Castro, Edgardo Donati y Diana Vullo, por su dedicación y valiosos aportes a lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral.

A mis compañeros de los laboratorios 8, 9 y 6A, por los lindos momentos compartidos y el cariño. Por su ayuda desinteresada en más de una oportunidad, en cuestiones laborales y extra-laborales. Gracias por hacerme sentir en familia. Me voy con ganas de quedarme y me llevo recuerdos hermosos de todos estos años junto a ustedes.

A los profesores, investigadores, becarios y técnicos del departamento de Biología Molecular. Por colaborar de diferentes maneras con el desarrollo de esta tesis, desde cederme su turno para usar un equipo hasta las charlas de pasillo o los almuerzos grupales. Estar rodeado de buena gente dispuesta a ayudar de forma desinteresada hace mucho más ameno el trabajo.

Al grupo COIMBRA y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación, por otorgarme el apoyo económico necesario para realizar parte de mi formación fuera del país. A todas las personas que forman parte del Laboratorio de Ciencias del Proteoma, de la Universidad de Siena y al profesor Tomas Macek y su equipo, de la Universidad Química y Tecnológica de Praga, por su gran aporte en mi aprendizaje. A todos aquellos que me acompañaron durante mi estadía allí e hicieron más fácil sobrellevar la distancia y las limitaciones con el idioma.

Gracias a mi familia, por acompañarme siempre, contenerme y apoyarme en mis decisiones, aunque eso signifique tenerme lejos y pasar nervios por mi ausencia. A mis abuelos, por enorgullecerse con mis logros y seguir malcriándome aunque esté pisando los 30. Agradezco especialmente a Berna, por su ayuda con el diseño de la tesis y su paciencia.

A Mati, por ser mi compañero a pesar de la distancia, por permitirme elegir libremente lo que quiero hacer y acompañarme en mis elecciones. Por no limitarme. Porque el fin de esta tesis significa un nuevo comienzo para nosotros.

Les agradezco a mis queridos Microbios, que siguen tan presentes en mi vida sin importar lo lejos que estén. Por la innumerable cantidad de recuerdos lindos con ustedes. Me llena el alma saber que de a poco cada uno va cumpliendo sus metas personales, porque siento a sus logros como propios y los míos son suyos también.

A mis amigas de Moldes, porque aunque cada una esté en sus cosas y nos dediquemos a actividades diferentes, siempre encontramos la manera de estar conectadas y de seguir compartiendo nuestras vidas.

Agradezco finalmente a la UNRC y a CONICET, organismos estatales de excelencia que me brindaron la posibilidad de realizar mis estudios de grado y postgrado. Porque creo que el acceso igualitario a una educación de calidad y el desarrollo científico son pilares fundamentales de todo país soberano.

La biorremediación microbiana surge como una tecnología ecológicamente amigable y costo-efectiva para el tratamiento de la contaminación ambiental. Tradicionalmente la búsqueda de microorganismos con potencial en biorremediación se ha basado en la selección de cepas aisladas capaces de remover un contaminante específico. Sin embargo, esta estrategia ha tendido a ser reemplazada en los últimos años por la búsqueda de cultivos microbianos eficientes para remediar mezclas de compuestos tóxicos de diferente naturaleza, considerando que la contaminación mixta es una realidad global.

El Cr(VI) y el fenol constituyen un ejemplo de contaminantes comúnmente encontrados en efluentes industriales de nuestro país y que han sido detectados conjuntamente en numerosas fuentes de agua naturales. Con el objetivo de seleccionar microorganismos capaces de remover simultáneamente ambos tóxicos, en esta tesis doctoral se aisló el cultivo mixto SFC 500-1, compuesto por dos cepas que se identificaron como *Acinetobacter guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Dicho cultivo mixto redujo Cr(VI) a Cr(III) hasta 35 mg/l y degradó fenol hasta 1000 mg/l. Además, fue capaz de remover simultáneamente esos compuestos en un amplio rango de pH y temperaturas y en diferentes medios de cultivo, inclusive en un efluente de curtiembre. Se demostró que el cultivo mixto co-remedió hasta 23 mg/l de Cr(VI) y 750 mg/l de fenol en 120 horas, bajo condiciones óptimas de operación que consistieron en un medio nutritivo de pH 7, 200 rpm de agitación y 30°C.

El escalado del proceso en un reactor de tanque agitado de 5 litros requirió reajustar las condiciones de operación para lograr la misma capacidad de remoción que en Erlenmeyers, aunque en tiempos más prolongados. Por otra parte, la inmovilización de las bacterias en una matriz de alginato de calcio resultó una estrategia útil para incrementar la eficiencia de remoción simultánea, incluso de concentraciones de los contaminantes que las células libres fueron incapaces de tolerar. La posibilidad de reutilización del cultivo mixto inmovilizado durante 5 ciclos consecutivos de remoción, así como su estabilidad durante el almacenamiento a 4°C constituyeron otras de sus importantes ventajas.

La implicancia de cada cepa en la detoxificación de los contaminantes se evaluó empleando ensayos de remoción y técnicas bioquímicas y moleculares. De esta manera se determinó que ambas bacterias reducirían Cr(VI) con diferente potencial, mediante cromato reductasas intracelulares dependientes de NADH. La localización de esas enzimas y su expresión en presencia de Cr(VI) y fenol varió de acuerdo a la cepa. Además, en *Bacillus* sp. se detectaron codificantes genéticos de bombas de expulsión de cromato tipo ChrA, posiblemente implicadas en su tolerancia al metal.

Por otro lado, se demostró que aunque ambas bacterias pueden crecer en presencia de elevadas concentraciones de fenol, sólo *A. guillouiae* posee la maquinaria enzimática capaz

de degradarlo a través de la *orto*-oxidación del anillo aromático y asimilar los productos formados vía ciclo de Krebs y del glioxilato. La tolerancia de esta cepa al compuesto se asoció con una reestructuración lipídica de sus membranas y la activación de mecanismos de defensa antioxidante. Tales procesos de respuesta al estrés se potenciaron en presencia de ambos contaminantes, ya que la reducción de Cr(VI) a Cr(III), posiblemente catalizada por una ferredoxin NADP reductasa, causaría daño oxidativo y alteración de estructuras esenciales para el funcionamiento celular.

En conclusión, en esta tesis doctoral se demostró la eficiencia de remoción simultánea de Cr(VI) y fenol del cultivo mixto SFC 500-1 bajo diferentes condiciones de operación, y se aportaron nuevos conocimientos para dilucidar los mecanismos de detoxificación de las cepas que lo componen. Esos resultados permiten proponer al cultivo mixto SFC 500-1 como un sistema biológico adecuado para ser aplicado en el tratamiento de soluciones o efluentes contaminados con Cr(VI) y fenol, ya sea en condiciones libres o inmovilizadas.

Bioremediation has emerged as an eco-friendly and cost-effective technology for the treatment of environmental pollution. Traditionally, searching for microorganisms with bioremediation potential has been based on selection of isolated strains able to remove a specific pollutant. However, this strategy is being replaced nowadays by the searching of native bacterial cultures efficient to remediate mixtures of toxic compounds, considering that co-pollution is a global problem.

Cr(VI) and phenol are pollutants commonly found in Argentinean industrial effluents, which have been detected in many aquatic natural sources. With the aim of selecting microorganisms able to simultaneously remove these toxics, in this doctoral thesis the mixed culture SFC 500-1 was isolated. It was composed by two different strains, identified as *Acinetobacter guillouiae* SFC 500-1A and *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Such mixed culture reduced Cr(VI) to Cr(III) up to 35 mg/l and degraded phenol up to 1000 mg/l. It was also capable of simultaneously remove these compounds in a broad range of pH, temperature and different culture media, even in a tannery effluent. It was demonstrated that mixed culture co-remediated Cr(VI) up to 23 mg/l and phenol up to 750 mg/l in 120 hours under optimal operational conditions (nutritive medium, pH 7, 200 rpm of agitation and 30 °C).

For increasing the work volume to a stirred tank reactor (5 liters) it was necessary to reset operational conditions. However, under optimal circumstances, removal in a pilot scale was slower than in Erlenmeyer flasks.

On the other hand, bacterial immobilization in a Ca-alginate matrix resulted to be a useful strategy to increase the simultaneous removal efficiency regarding to free cells. Other important advantages of immobilized bacteria were their reusability along 5 consecutive removal cycles, as well as their stability during storage at 4 °C.

The involvement of each strain in detoxification of contaminants was evaluated using removal assays and molecular and biochemical techniques. It was determined that both bacteria would reduce Cr(VI) with different potential, employing NADH-dependent intracellular chromate reductases. The location of these enzymes and their expression in presence of Cr(VI) and phenol varied according the strain. Moreover, *Bacillus* sp. would contain genetic codifiers of extrusion pumps like ChrA, possibly implied in Cr(VI) tolerance.

Furthermore it was demonstrated that both bacteria grew in the presence of high concentrations of phenol, but only *A. guillouiae* contains the enzymatic machinery to degrade this compound through *ortho*-oxidation, and assimilation via Krebs and glyoxylate cycle. In this strain, phenol tolerance was associated with the lipid restructuring of cell membranes and activation of antioxidant mechanisms. Such responses to stress increased in the presence of both pollutants, due to intracellular reduction of Cr(VI) to Cr(III), possibly catalyzed by a

ferredoxin NADP-reductase, which usually causes oxidative damage and disruption of cellular structures.

In conclusion, in this doctoral thesis the capability of mixed culture SFC 500-1 for simultaneously removal of Cr(VI) and phenol, under different operational conditions was demonstrated and new knowledge was provided to clarify the detoxification mechanisms of its component strains. These results allow us to propose the mixed culture SFC 500-1 as a biological suitable system to be applied for the treatment of effluents or solutions polluted with Cr(VI) and phenol, both in free or immobilized conditions.

Índice de tablas	xiii
Índice de figuras	xv
Abreviaturas	xix
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
1.1 Contaminación ambiental	1
1.2 Clasificación de los contaminantes ambientales	1
1.3 El metal pesado cromo	4
1.4 El fenol como compuesto aromático modelo	5
1.5 Contaminación mixta por Cr(VI) y fenoles	7
1.6 Estrategias para el tratamiento de aguas residuales y saneamiento ambiental	8
1.6.1 Tecnologías físico-químicas de remediación	8
1.6.2 Tecnologías biológicas de remediación	9
1.6.2.1 Biorremediación	11
1.7 Hipótesis	
<b>2. Objetivos</b>	13
2.1 Objetivo general	13
2.2 Objetivos específicos	13
<b>Diagrama general: Organización de la tesis</b>	
<b>CAPÍTULO I: “Aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de tolerar y remover simultáneamente Cr(VI) y fenol. Optimización de las condiciones de remoción”</b>	
<b>3. Introducción</b>	
3.1 Empleo de microorganismos ambientales en biorremediación	14
3.2 Cultivos mixtos versus cepas aisladas para remediar contaminantes	14
3.3 Biorremediación de Cr y fenol por bacterias de origen ambiental	15
3.4 Potencialidades y limitaciones de la biorremediación y su aplicación a campo	16
3.5 Reactores a escala piloto para biorremediación de contaminantes	18
<b>4. Materiales y métodos</b>	
4.1 Caracterización de la zona de muestreo	21
4.2 Aislamiento y selección de microorganismos tolerantes a Cr(VI) y fenol	21
4.2.1 Toma de muestras para el aislamiento de microorganismos	21
4.2.2 Conservación de los microorganismos aislados	23
4.2.3 Remoción de Cr(VI) y fenol por los microorganismos seleccionados	23
4.3 Caracterización bacteriana	23

4.3.1 Caracterización morfológica y bioquímica	23
4.3.2 Amplificación y secuenciación del gen codificante para el ARNr 16S	24
4.3.3 Identificación basada en el perfil de proteínas mediante MALDI-TOF	24
4.3.4 Condiciones experimentales para la remoción de los contaminantes	25
4.3.5 Ensayos de remoción de Cr(VI) o fenol	25
4.3.6 Ensayos de remoción simultánea de Cr(VI) y fenol	25
4.3.6.1 Selección de medio de cultivo	25
4.3.6.2 Efecto de las condiciones de cultivo en la remoción simultánea	26
4.3.6.3 Efecto de la concentración inicial de los contaminantes en la co-remoción	26
4.3.6.4 Remoción de Cr(VI) y fenol en un reactor de tanque agitado a escala piloto	26
4.4 Determinación del crecimiento microbiano	28
4.5 Métodos analíticos	28
4.5.1 Determinación de la concentración de Cr(VI)	28
4.5.2 Determinación de la concentración de Cr(III)	28
4.5.3 Determinación de la concentración de fenol	29
4.6 Composición de los medios de cultivo utilizados	29
4.7 Reactivos utilizados	29
4.8 Análisis estadístico	29
<b>5. Resultados y Discusión</b>	
<b>Diagrama de la organización de los resultados del primer capítulo</b>	
5.1 Caracterización de la zona de muestreo	31
5.2 Aislamiento y selección de microorganismos para remediación de Cr(VI) y fenol	33
5.3 Caracterización del cultivo mixto SFC 500-1	37
5.3.1 Caracterización bioquímica y clasificación taxonómica	37
5.3.2 Remoción individual de Cr(VI) o fenol por el cultivo mixto SFC 500-1	42
5.3.3 Remoción simultánea de Cr(VI) y fenol en diferentes medios de cultivo	44
5.3.4 Crecimiento y proporción de cada cepa durante el proceso de remoción	45
5.4 Implicancia de <i>A. guillouiae</i> y <i>Bacillus</i> sp. en la remoción de los contaminantes	47
5.4.1 Tolerancia y remoción de Cr(VI)	47
5.4.2 Tolerancia y remoción de fenol	48
5.4.3 Remoción de Cr(VI) en presencia de fenol: Comparación entre el cultivo mixto y los microorganismos aislados	50
5.5 Optimización de las condiciones de remoción simultánea del cultivo mixto SFC 500-1 a pequeña escala y a escala piloto	52

5.5.1 Efecto del pH, temperatura y velocidad de agitación	52
5.5.2 Efecto de la pre-adaptación a los contaminantes sobre la remoción simultánea	54
5.5.3 Efecto de la concentración inicial de los contaminantes sobre la remoción simultánea	55
5.5.4 Efecto del cambio de escala sobre la remoción simultánea	57

## **CAPÍTULO II: “Uso de la inmovilización en una matriz de alginato de calcio como estrategia para mejorar la eficiencia de biorremediación simultánea de Cr(VI) y fenol por el cultivo mixto SFC 500-1”**

### **6. Introducción**

6.1 Inmovilización microbiana	63
6.2 Técnicas de inmovilización	64
6.3 Inmovilización activa en alginato	65
6.4 Aplicación de la inmovilización activa como herramienta biotecnológica en biorremediación	66

### **7. Materiales y Métodos**

7.1 Inmovilización del cultivo mixto SFC 500-1 en una matriz de Ca-alginato	69
7.1.1 Preparación del inóculo	69
7.1.2 Inmovilización en Ca-alginato	69
7.1.3 Determinación de la viabilidad celular en el interior de las perlas	69
7.2 Optimización de la remoción de Cr(VI) y fenol por el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado en Ca-alginato	70
7.3 Aplicación de las células inmovilizadas para la remoción de diferentes concentraciones de Cr(VI) y fenol	70
7.4 Estabilidad y reutilización de las células inmovilizadas	71
7.5 Determinación de la concentración residual de los contaminantes	72
7.6 Determinación y cuantificación de los productos de degradación de fenol por HPLC	72
7.6.1 Obtención y preparación de las muestras	72
7.6.2 Detección y cuantificación de catecol, ácido <i>cis,cis</i> -mucónico y fenol por HPLC	72
7.7 Análisis estadístico	73

### **8. Resultados y Discusión**

#### **Diagrama de la organización de los resultados del segundo capítulo**

8.1 Implicancia del número de células viables sobre la remoción de Cr(VI) y fenol en condiciones inmovilizadas	74
8.2 Optimización del medio de reacción para la remoción de Cr(VI) y fenol por células	75

inmovilizadas

8.3 Efecto de la pre-adaptación a los contaminantes antes de la inmovilización	77
8.4 Efecto de la concentración inicial de Cr(VI) sobre la remoción	79
8.5 Efecto de la concentración inicial de fenol sobre la remoción	81
8.6 Estabilidad y reutilización del cultivo mixto inmovilizado	83
8.7 Determinación de los productos de remoción de Cr(VI)	86
8.8 Detección y cuantificación de fenol y los productos de su degradación	87

### **CAPÍTULO III: “Determinación de los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en la tolerancia y biorremediación de Cr(VI) y fenol”**

#### **9. Introducción**

9.1 Adaptación microbiana a la contaminación ambiental	91
9.2 Mecanismos bacterianos de resistencia a Cr(VI)	92
9.2.1 Eflujo del ion cromato	92
9.2.2 Reducción de Cr(VI) a Cr(III)	94
9.3 Mecanismos bacterianos de resistencia a fenol	98
9.3.1 Reestructuración de envolturas celulares y sistemas de eflujo como mecanismos de resistencia a fenol	99
9.3.2 Biodegradación aerobia de fenol	100
9.4 Inducción de respuesta antioxidante y mecanismos de protección intracelular que se desencadenan en presencia de Cr(VI) y fenol	103
9.5 Utilización de mecanismos de resistencia bacteriana como estrategias de biorremediación	105

#### **10. Materiales y Métodos**

10.1 Técnicas de biología molecular	106
10.1.1 Extracción de ADN genómico	106
10.1.2 Amplificación de genes involucrados en el metabolismo de Cr(VI) y fenol	106
10.2 Técnicas enzimáticas	109
10.2.1 Obtención de extractos proteicos	109
10.2.2 Determinación de actividad cromato reductasa en <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A y <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E	109
10.2.2.1 Preparación de los extractos enzimáticos totales	109
10.2.2.2 Fraccionamiento subcelular	110
10.2.2.3 Caracterización de la actividad cromato reductasa	110

10.2.3 Determinación de la vía de degradación de fenol en <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A	111
10.2.3.1 Obtención de los extractos enzimáticos	111
10.2.3.2 Evaluación de la actividad catecol dioxigenasa	112
10.3 Análisis estadístico	112
10.4 Evaluación de los cambios en el proteoma de <i>A. guillouiae</i> inducidos por la exposición a fenol o fenol y Cr(VI)	112
10.4.1 Condiciones de cultivo	112
10.4.2 Extracción de las proteínas totales	113
10.4.3 Electroforesis bidimensional de proteínas	114
10.4.4 Obtención y análisis de imágenes	114
10.4.5 Evaluación de los resultados y análisis estadístico de imágenes	114
10.4.6 Preparación de las muestras peptídicas y análisis por espectrometría de masas	115

## 11. Resultados y Discusión

### Diagrama de la organización de los resultados del tercer capítulo

11.1 Análisis molecular y bioquímico de la tolerancia y la capacidad de reducción de Cr(VI) en <i>A. guillouiae</i> y <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E	116
11.1.1 Detección del gen codificante para la bomba de eflujo ChrA	116
11.1.2 Detección del gen codificante para la enzima cromato reductasa en ambas bacterias	117
11.1.3 Evaluación de la actividad cromato reductasa	118
11.1.3.1 Caracterización de la actividad reductasa	118
11.1.3.2 Localización de la actividad reductasa	122
11.2 Análisis molecular y bioquímico de la capacidad de degradación de fenol por <i>A. guillouiae</i>	123
11.2.1 Detección del gen codificante para la enzima fenol hidroxilasa	123
11.2.2 Estudio de la vía de degradación de catecol	124
11.3 Cambios en el proteoma de <i>A. guillouiae</i> en presencia de fenol	126
11.3.1 Modificación en la expresión de enzimas implicadas en la oxidación de fenol y asimilación de carbono	126
11.3.2 Cambios en el metabolismo lipídico	130
11.3.3 Enzimas implicadas en la asimilación de nitrógeno y metabolismo de aminoácidos	132
11.3.4 Modificación en la expresión de proteínas de membrana	133
11.3.5 Cambios proteómicos asociados a procesos de transcripción y traducción	134

11.3.6 Modificación en la expresión de proteínas de respuesta al estrés	135
11.3.7 Proteínas implicadas en la tolerancia y/o remediación de otros compuestos aromáticos	136
11.4 Modificaciones en el proteoma de <i>A. guillouiae</i> producidas por la exposición a Cr(VI) y fenol	137
11.4.1 Modificación en la expresión de enzimas implicadas en la oxidación de fenol y en la asimilación de sus productos de degradación	138
11.4.2 Modificación en la expresión de proteínas posiblemente implicadas en la reducción de Cr(VI)	140
11.4.3 Expresión diferencial de proteínas asociadas al estrés oxidativo y respuesta antioxidante	141
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>12. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>148</b>
<b>13. Bibliografía</b>	<b>153</b>

<b>Tabla 1:</b> Parámetros físico-químicos obtenidos de muestras del efluente de curtiembre.	32
<b>Tabla 2:</b> Contenido de Cr y fenoles totales en efluente y sedimento de la zona de muestreo.	32
<b>Tabla 3:</b> Descripción morfológica de los aislamientos más tolerantes a Cr(VI) y fenol. Capacidad de remoción de los contaminantes de manera individual y simultánea, por los aislamientos seleccionados en medio líquido.	35
<b>Tabla 4:</b> Características morfológicas y bioquímicas de las cepas que componen el cultivo mixto SFC 500-1.	39
<b>Tabla 5:</b> Concentración de Cr(VI) removido en presencia de fenol y velocidad del proceso de remoción, utilizando cada cepa y el cultivo mixto.	51
<b>Tabla 6:</b> Distribución (%) de Cr(VI) y Cr(III) en sobrenadantes y perlas luego de 5 ciclos de remoción de 25 mg/l de Cr(VI) en presencia de 300 mg/l de fenol.	86
<b>Tabla 7:</b> Enzimas implicadas en la reducción de Cr(VI). Clasificación y descripción.	96
<b>Tabla 8:</b> Cebadores y condiciones de amplificación empleados.	108
<b>Tabla 9:</b> Viabilidad celular de <i>A. guillouiae</i> y concentración residual de fenol y Cr(VI) en el momento de la obtención de muestras para la extracción de proteínas totales.	113
<b>Tabla 10:</b> Controles de reacción.	120
<b>Tabla 11:</b> Actividad catecol 1,2-dioxigenasa de extractos celulares de <i>A. guillouiae</i> sometido a diferentes tratamientos.	125
<b>Tabla 12:</b> Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en su <i>orto</i> -degradación.	127
<b>Tabla 13:</b> Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en procesos de asimilación de carbono.	128
<b>Tabla 14:</b> Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en procesos de transferencia de electrones y síntesis de cofactores.	129
<b>Tabla 15:</b> Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en el metabolismo lipídico.	130
<b>Tabla 16:</b> Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en el metabolismo de nitrógeno.	133
<b>Tabla 17:</b> Proteínas de membrana expresadas diferencialmente en presencia de fenol.	134

<b>Tabla 18:</b> Proteínas implicadas en procesos de transcripción o traducción, expresadas diferencialmente en presencia de fenol.	135
<b>Tabla 19:</b> Proteínas involucradas en respuesta al estrés, expresadas diferencialmente en presencia de fenol.	136
<b>Tabla 20:</b> Proteínas implicadas en la degradación de otros compuestos aromáticos, sobre-expresadas en presencia de fenol.	137
<b>Tabla 21:</b> Proteínas implicadas en la degradación de fenol expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes.	138
<b>Tabla 22:</b> Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en los ciclos de Krebs, glioxilato, metilcitrato y reacciones del metabolismo energético.	140
<b>Tabla 23:</b> Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, posiblemente implicadas en la reducción de Cr(VI).	141
<b>Tabla 24:</b> Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en el metabolismo lipídico.	142
<b>Tabla 25:</b> Proteínas de membrana o implicadas en el metabolismo de sus componentes, expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes.	144
<b>Tabla 26:</b> Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en procesos de replicación, transcripción y traducción.	145
<b>Tabla 27:</b> Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en la respuesta antioxidante y defensa contra el estrés celular.	146
<b>Tabla 28:</b> Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en el metabolismo de aminoácidos.	147

<b>Figura 1:</b> Principales contaminantes detectados en sitios prioritarios enumerados por la US EPA debido a su grado de polución.	2
<b>Figura 2:</b> Clasificación de los contaminantes orgánicos según su estructura química.	3
<b>Figura 3:</b> Estructura química del fenol y algunos de sus derivados.	5
<b>Figura 4:</b> Estrategias de remediación biológica.	10
<b>Figura 5:</b> Ventajas y desventajas de la biorremediación microbiana.	18
<b>Figura 6:</b> Representación esquemática del procedimiento empleado para el aislamiento de microorganismos tolerantes a Cr(VI) y fenol.	22
<b>Figura 7:</b> Esquema del reactor de tanque agitado.	27
<b>Figura 8:</b> Canal a cielo abierto de descarga del efluente de curtiembre <b>(A)</b> y ubicación geográfica de la curtiembre y de la cuenca del arroyo El Barreal <b>(B)</b> .	31
<b>Figura 9:</b> Clasificación de los aislamientos tolerantes a Cr(VI) y fenol en base a sus características morfológicas.	34
<b>Figura 10:</b> Remoción simultánea de 10 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol <b>(A)</b> o 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol <b>(B)</b> por dos cultivos mixtos en diferentes medios de cultivo.	37
<b>Figura 11:</b> Microfotografías obtenidas con tinción de Gram del cultivo mixto SFC 500-1 <b>(A)</b> , y de las cepas 1 <b>(B)</b> y 2 <b>(C)</b> .	38
<b>Figura 12:</b> Árbol filogenético correspondiente a la cepa 1.	40
<b>Figura 13:</b> Árbol filogenético correspondiente a la cepa 2.	41
<b>Figura 14:</b> Remoción de Cr(VI) durante el crecimiento del cultivo mixto SFC 500-1 en presencia de diferentes concentraciones del metal.	42
<b>Figura 15:</b> Máximo crecimiento y velocidad de remoción de fenol alcanzados por el cultivo mixto SFC 500-1 en presencia de concentraciones crecientes del contaminante y diferentes medios de cultivo.	43
<b>Figura 16:</b> Remoción simultánea de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) por el cultivo mixto SFC 500-1 en diferentes medios de cultivo sintéticos.	45
<b>Figura 17:</b> Remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) en un efluente de curtiembre por el cultivo mixto SFC 500-1 y por la flora nativa.	46
<b>Figura 18:</b> Crecimiento del cultivo mixto SFC 500-1 en presencia y ausencia de Cr(VI) y fenol y remoción de ambos contaminantes a lo largo del tiempo.	47

<b>Figura 19:</b> Máximo crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de Cr(VI) y remoción del metal por <i>A. guillouiae</i> (A) y <i>Bacillus</i> sp. (B) luego de 72 horas de incubación.	48
<b>Figura 20:</b> Máximo crecimiento alcanzado por <i>A. guillouiae</i> (A) y <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E (B) en 72 horas en dos medios de cultivo con diferentes concentraciones de fenol.	49
<b>Figura 21:</b> Remoción de fenol en medio TY (A) y MM1 (B) por <i>A. guillouiae</i> .	50
<b>Figura 22:</b> Efecto del pH (A), temperatura (B) y velocidad de agitación (C) sobre la capacidad de remoción simultánea de Cr(VI) y fenol por el cultivo mixto SFC 500-1.	52
<b>Figura 23:</b> Remoción simultánea de fenol (A) y Cr(VI) (B), por el cultivo mixto SFC 500-1 creciendo en condiciones control, y pre-adaptado con diferentes concentraciones de esos contaminantes.	54
<b>Figura 24:</b> Remoción de diferentes concentraciones de Cr(VI) (10; 25; 50 mg/l) en presencia de fenol (100; 300; 500; 750 mg/l).	56
<b>Figura 25:</b> Remoción de Cr(VI) y fenol durante el crecimiento del cultivo mixto SFC 500-1 en un reactor de tanque agitado operado a diferentes velocidades de agitación.	58
<b>Figura 26:</b> Máximo crecimiento y remoción de Cr(VI) y fenol alcanzados por el cultivo mixto SFC 500-1 en un reactor de tanque agitado bajo diferentes condiciones de aireación.	59
<b>Figura 27:</b> Remoción de Cr(VI) y fenol, modificación del oxígeno disuelto y los valores de pH durante el crecimiento del cultivo mixto SFC 500-1 en Erlenmeyers (A) y en un reactor de tanque agitado (B).	61
<b>Figura 28:</b> Distribución de las especies de Cr(VI) y Cr(III) en sobrenadante y biomasa del cultivo mixto SFC 500-1 luego de 72 horas de crecimiento en medio TY con 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol.	62
<b>Figura 29:</b> Estructura de una molécula de alginato, conteniendo residuos de ácido $\beta$ -D-manurónico y ácido $\alpha$ -L-gulurónico.	65
<b>Figura 30:</b> Representación esquemática de la asociación de secuencias de poli-L-guluronato entrecruzadas mediante iones de calcio.	66
<b>Figura 31:</b> Ejemplos del empleo de inmovilización celular y enzimática en biorremediación de Cr(VI) o fenol.	68
<b>Figura 32:</b> Remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) en función de la cantidad de células del cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizadas en perlas de Ca-alginato durante tres ciclos consecutivos de reutilización.	74

<b>Figura 33:</b> Remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) en diferentes medios de cultivo por SFC 500-1 inmovilizado en una matriz de Ca-alginato durante tres ciclos consecutivos de reutilización.	76
<b>Figura 34:</b> Porcentaje de Cr(VI) removido y velocidad máxima de degradación de fenol alcanzados por el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado pre-adaptado (P-A) y sin adaptar (control).	78
<b>Figura 35:</b> Recuento de células viables del cultivo mixto SFC 500-1 pre-adaptado (P-A) y sin adaptar (control) inmovilizado en una matriz de Ca-alginato al final de cada ciclo de remoción.	79
<b>Figura 36:</b> Remoción de Cr(VI) y velocidad máxima de degradación de fenol obtenidos con células libres e inmovilizadas del cultivo mixto, expuestas a concentraciones crecientes de Cr(VI).	80
<b>Figura 37:</b> Velocidad máxima de degradación de fenol y porcentaje de remoción de Cr(VI) obtenidos con células libres e inmovilizadas, expuestas a concentraciones crecientes de fenol.	81
<b>Figura 38:</b> Recuento de células viables libres e inmovilizadas luego de la remoción total de concentraciones crecientes de fenol en presencia de 25 mg/l de Cr(VI).	82
<b>Figura 39:</b> Remoción de Cr(VI) y fenol por el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado en perlas de Ca-alginato durante varios ciclos de reutilización. Los controles se efectuaron con perlas no inoculadas.	84
<b>Figura 40:</b> Recuento de células viables del cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado, al finalizar cada ciclo de remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l).	85
<b>Figura 41:</b> Remoción de fenol y formación de catecol y ácido <i>cis,cis</i> -mucónico a lo largo del tiempo alcanzados por el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado en Ca-alginato, en medios no suplementados <b>(A)</b> y suplementados con Cr(VI) (25 mg/l) <b>(B)</b> .	88
<b>Figura 42:</b> <b>(A)</b> Cromatograma obtenido de una muestra conteniendo 300 mg/l de fenol, en presencia de Cr(VI) durante el 50% de remoción de fenol (pico 1: catecol, pico 2: ácido <i>cis,cis</i> -mucónico, pico 3: fenol residual). <b>(B)</b> Cromatograma obtenido de una muestra conteniendo 300 mg/l de fenol, en presencia de Cr(VI) al momento de la remoción total de fenol (pico 2: ácido <i>cis,cis</i> -mucónico, picos 4 y 5: compuestos no identificados).	90
<b>Figura 43:</b> Representación esquemática del contexto genómico de los genes <i>chr</i> en bacterias pertenecientes a diferentes géneros.	93
<b>Figura 44:</b> Árbol filogenético de la subfamilia de proteínas LCHR en procariontes, de acuerdo a su clasificación taxonómica.	94

<b>Figura 45:</b> Mecanismos de tolerancia bacteriana a Cr(VI).	97
<b>Figura 46:</b> Principales mecanismos de tolerancia bacteriana a fenol.	98
<b>Figura 47:</b> Vías de degradación aeróbica de fenol.	101
<b>Figura 48:</b> Cluster de genes implicados en la degradación de fenol y benzoato en <i>A. calcoaceticus</i> PHEA-2, <i>A. baumannii</i> AYE, <i>A. calcoaceticus</i> NCIB8250 y <i>A. baylyi</i> ADP1	103
<b>Figura 49:</b> Representación del protocolo utilizado para determinar la actividad cromato reductasa en las cepas <i>A. guillouiae</i> y <i>Bacillus</i> sp.	111
<b>Figura 50:</b> Producto de la amplificación parcial del gen <i>chrA</i> utilizando ADN genómico de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E.	117
<b>Figura 51:</b> Producto de la amplificación parcial del gen <i>chrR</i> empleando ADN genómico de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E y <i>A. guillouiae</i> (calle 3).	118
<b>Figura 52:</b> Remoción de Cr(VI) (%) por ELC de (A) <i>A. guillouiae</i> y (B) <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E durante 60 min de reacción.	119
<b>Figura 53:</b> Actividad específica cromato reductasa obtenida a partir de ELC de (A) <i>A. guillouiae</i> y (B) <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E.	120
<b>Figura 55:</b> Producto de la amplificación parcial del gen <i>mphL</i> empleando ADN genómico de <i>A. guillouiae</i>	124
<b>Figura 56:</b> Enzimas implicadas en la <i>orto</i> -degradación de fenol y reacciones de asimilación de carbono expresadas diferencialmente en <i>A. guillouiae</i> expuesto a fenol.	129
<b>Figura 57:</b> Enzimas implicadas en el metabolismo de AG y ciclo del metilcitrato expresadas diferencialmente en <i>A. guillouiae</i> expuesto a fenol.	131
<b>Figura 58:</b> Enzimas implicadas en el metabolismo de AG y la síntesis y degradación de PHB expresadas diferencialmente en <i>A. guillouiae</i> expuesto a Cr(VI) y fenol.	143

·OH	Radical hidroxilo
2D	Electroforesis bidimensional
4-AAP	4-aminoantipirina
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Actividad enzimática específica, definida como UE/miligramo de proteínas
AG	Ácidos grasos
AhpC	Alquil hidroperóxido reductasa, subunidad C
APS	Persulfato de amonio
ARNr 16S	Ácido ribonucleico que compone de la subunidad ribosomal 16S
CAA	Código Alimentario Argentino
Ca-alginato	Alginato de calcio
<i>cat A</i>	Gen codificante de la enzima catechol 1,2-dioxigenasa
CHAPS	3-[3-(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonato
ChrA	Proteína transmembrana involucrada en la expulsión del ion cromato
ChrR	Cromato reductasa aislada de <i>P. putida</i>
CIT	Fracción citoplasmática
CR	Cromato reductasas
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DES	Diferencias Estadísticamente Significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ )
DFC	Difenilcarbazida
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> disuelto
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreititol
EE	Error estándar
EFC	Aislamientos provenientes de efluentes, tolerantes a Cr(VI) y fenol
EL	Extracto de Levadura
ELC	Extractos proteicos libres de células
EROS	Especies Reactivas del Oxígeno
FADH	Flavina Adenina Dinucleótido
GC	Cromatografía Gaseosa
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación transferasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
K <sub>1a</sub>	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
LmPH	Fenol hidroxilasas multicomponente, subunidad mayor
LPS	Lipopolisacáridos
M	Fracción de membrana
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
MS	Espectrometría de masas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido (fosfato)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido

Omp	Proteína de membrana externa
ORF	Marcos abiertos de lectura
P-A	Células pre-adaptadas a los contaminantes
PBH	Poli $\beta$ hidroxibutirato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RND	Bombas de expulsión tipo Resistencia-Nodulación- Protección celular
SCHR/ LCHR	Bombas de eflujo de cromato monodominio y bidominio, respectivamente
SCOT	Succinil-CoA:3-cetoacil-coenzima A transferasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFC	Aislamientos provenientes de sedimentos, tolerantes a Cr(VI) y fenol
SOD	Superóxido dismutasa
SOS	Respuesta de reparación celular ante daño al ADN
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletildiamina
UE	Unidad de Actividad enzimática
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
US EPA	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos
vvm	Volumen de aire/volumen de medio/minuto
YieF	Cromato reductasa aislada de <i>E. coli</i>

## Introducción general



### 1.1. Contaminación ambiental

Toda sustancia no deseada que es introducida en el medioambiente se considera contaminante, más aún si genera algún tipo de riesgo ecológico o daño en la salud humana (Marcano y col., 2003). Si bien los contaminantes ambientales pueden provenir de procesos naturales, tales como la actividad volcánica o geotérmica, el crecimiento poblacional y el desarrollo industrial han constituido los principales causales de contaminación en los últimos siglos (Megharaj y col., 2011).

Se estima que a lo largo de la historia de la humanidad, se han sintetizado más de 6 millones de compuestos químicos, la mayoría de ellos durante el siglo XX (Alloway y Ayres, 1993). Actualmente, alrededor de 1000 nuevos químicos son producidos cada año, y más de 250.000 están disponibles comercialmente (CAS, 2011). Si bien el desarrollo de estos compuestos ha jugado un rol preponderante en el mejoramiento de la calidad de vida y el crecimiento económico global, no hay que perder de vista los efectos nocivos que traen como consecuencia su producción, comercialización y consumo. Esta situación se agrava si se considera que una tendencia creciente durante las últimas décadas es trasladar los procesos productivos a países en desarrollo, con limitada capacidad para gestionar los impactos ambientales que los mismos generan. La mezcla de los desechos industriales con los municipales es otro grave problema en estos países, que exponen a la población a combinaciones de sustancias peligrosas que no son eficientemente tratadas (Osibanjo y col., 2012).

El incremento en el daño ambiental, así como el interés por un desarrollo sustentable, han provocado una creciente preocupación social por la preservación del medioambiente, como así también por la recuperación de áreas afectadas tras siglos de prácticas incorrectas. Debido a ello, durante las últimas décadas se ha logrado un importante avance en la creación e implementación de políticas públicas a nivel global para combatir el deterioro medioambiental. En este contexto, los avances científicos han sido cruciales a la hora de desarrollar nuevas tecnologías para el tratamiento de desechos químicos de diversa naturaleza (Michel-Guillou y Moser, 2006).

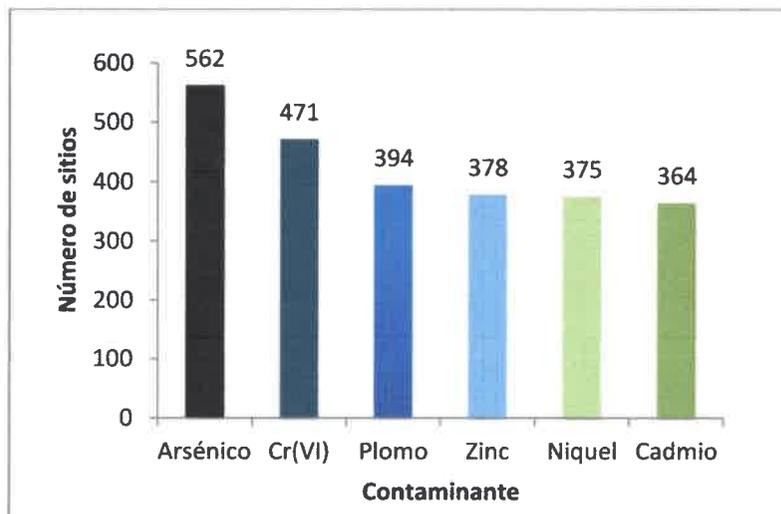
### 1.2. Clasificación de los contaminantes ambientales

De acuerdo a su naturaleza físico-química los contaminantes ambientales se pueden separar en dos grandes grupos, los compuestos inorgánicos y orgánicos. Los compuestos inorgánicos se clasifican en metales, metaloides y radionucleidos. Entre ellos, los metales revisten especial importancia debido a su amplia distribución en la naturaleza y su potencial

peligro para los organismos. Algunos metales como hierro, cobre, zinc, cobalto o níquel son micronutrientes esenciales para el desarrollo de una gran variedad de actividades celulares. Sin embargo, por encima de ciertas concentraciones éstos pueden ser perjudiciales para los seres vivos y se consideran contaminantes. Además, iones de otros metales como cromo, cadmio, plomo y mercurio suelen ser disruptivos para las funciones biológicas en concentraciones mucho más bajas que los anteriores (Gasic y Korban, 2006).

Los metales plomo, cromo, cadmio y mercurio junto con el metaloide arsénico conforman un grupo especial de compuestos químicos llamados metales pesados. La principal característica físico-química que comparten dichos metales pesados es su densidad superior a  $5 \text{ g/cm}^3$ . Además, desde un punto de vista ecológico, todos ellos presentan elevada toxicidad y capacidad para acumularse en la cadena alimenticia (Srivastava y Goyal, 2010). La contaminación con metales pesados es un serio problema asociado al incremento en actividades antropogénicas que involucran su extracción, producción y aplicación en diversos procesos.

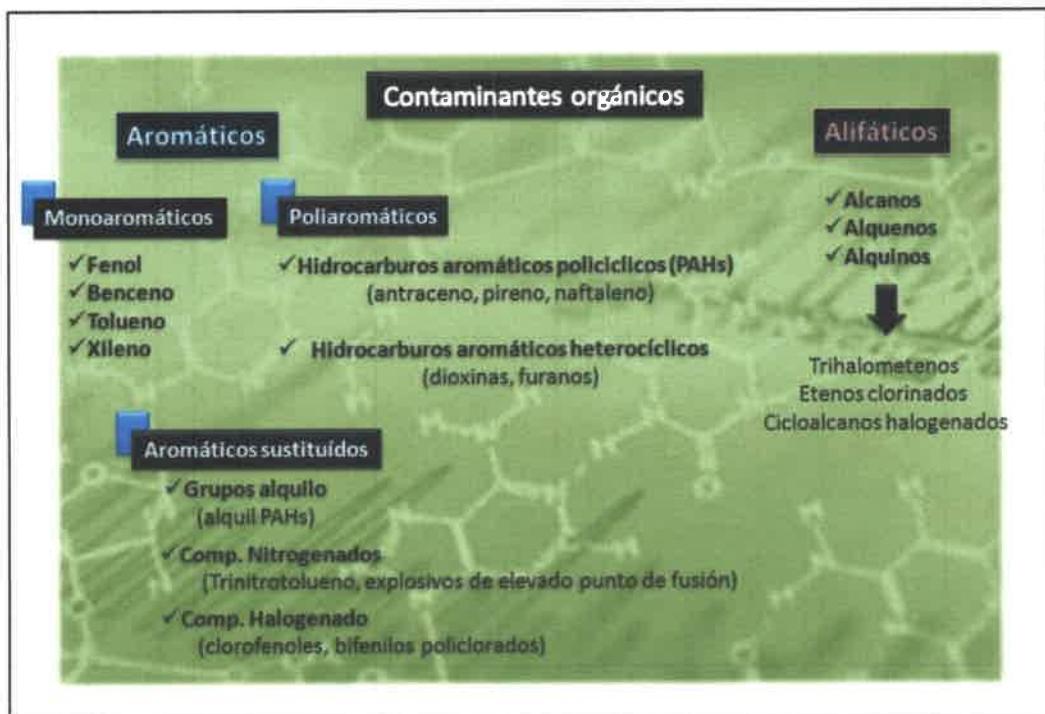
Como se puede observar en la figura 1, una investigación realizada por la Agencia de Protección medioambiental de los Estados Unidos (US EPA) determinó que los sitios declarados en emergencia debido a su grado de contaminación se encuentran afectados principalmente por metales pesados. Uno de los más frecuentemente encontrados es el cromo (Cr), en su forma hexavalente [Cr(VI)].



**Figura 1:** Principales contaminantes detectados en sitios prioritarios enumerados por la US EPA debido a su grado de polución. Un sitio puede contener más de uno de esos compuestos. (Extraída de Dhal y col., 2013).

Por otro lado, los desarrollos industriales y urbanos sumados a las prácticas agrícolas modernas han provocado un incremento en la contaminación por sustancias de naturaleza orgánica, muchas de ellas de origen sintético, que se conocen como xenobióticos. Entre esos compuestos orgánicos se puede mencionar a los hidrocarburos (alifáticos, monoaromáticos o policíclicos), compuestos halogenados, nitroaromáticos, organofosforados, solventes y pesticidas (Megharaj y col., 2011). La peligrosidad de estos compuestos radica en su toxicidad y potencial de bioacumulación en tejido graso debido a su hidrofobicidad. Asimismo, la mayoría de los contaminantes orgánicos sintéticos son extremadamente resistentes a procesos de degradación natural, característica que los hace muy persistentes en la naturaleza. El proceso de biomagnificación hace que estos compuestos resulten más nocivos para los organismos superiores, como el hombre, que para aquellos pertenecientes a niveles tróficos más bajos (McGuinness y Dowling, 2009).

En la figura 2 se indican algunos de los contaminantes orgánicos más importantes que pueden ser encontrados en la biósfera. Entre ellos, los compuestos aromáticos liberados principalmente a partir de la actividad petrolera y la industria química constituyen el grupo más numeroso.



**Figura 2:** Clasificación de los contaminantes orgánicos según su estructura química.

### 1.3. El metal pesado cromo

El cromo (Cr), como se ha mencionado previamente, es uno de los metales pesados más frecuentemente empleados en diferentes actividades industriales y se encuentra clasificado entre los más peligrosos para los seres vivos (Chrysochoou y Jhonston, 2012). En la naturaleza sólo se encuentra en forma combinada, fuertemente unido a diferentes minerales. La especie más importante desde un punto de vista económico es la cromita ( $\text{FeOCr}_2\text{O}_3$ ), la cual contiene en condiciones ideales, alrededor de un 46% de Cr (US EPA, 1984). Si bien este metal presenta nueve estados de oxidación, las especies Cr(III) y Cr(VI) son las más estables y, por lo tanto, más significativas en el medioambiente (Emsley, 1989).

La forma trivalente, Cr(III), es la más abundante en la naturaleza y menos tóxica, ya que forma óxidos insolubles, hidróxidos y sulfatos, que en general no atraviesan las membranas celulares y tienden a complejarse con sustancias orgánicas y precipitar (Cervantes y col., 2006). Esta especie es utilizada comúnmente como fijador de pigmentos y catalizador en la industria del cuero, fabricación de ladrillos refractarios, cerámica y pinturas (<http://www.npi.gov.au>; Sinha y col., 2002).

La forma hexavalente, Cr(VI), es alrededor de 1.000 veces más tóxica que la trivalente (Cervantes, 1991), y corresponde a la segunda forma más estable del metal, es un fuerte agente oxidante, que predomina en medio ácido formando cromato y dicromato (Lai y Lo, 2008). Estos compuestos de Cr(VI) ingresan al ambiente mayormente a través de procesos industriales, tales como la galvanoplastia y metalurgia, fabricación de acero y cemento, curtido, producción textil, de pigmentos y automotriz y conservación de la madera, entre otros (Thacker y col., 2006). La peligrosidad del Cr(VI) radica en su elevada solubilidad; esta propiedad hace que el metal liberado a partir de efluentes industriales pueda contaminar rápidamente fuentes de agua superficiales y subterráneas y afectar organismos de diferentes niveles ecológicos. La elevada solubilidad del Cr(VI) facilita también su ingreso a la célula, induciendo estrés oxidativo y daño sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. De acuerdo con la US EPA, el Cr(VI) se encuentra dentro de los 17 químicos más peligrosos para el hombre, debido a su carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogénesis, por inhalación, contacto o ingestión (Thacker y col., 2006).

Con el fin de reducir los niveles de Cr(VI) en el ambiente, diversos Organismos Regulatorios nacionales e internacionales han establecido límites máximos aceptables del metal. En Argentina, por ejemplo, se permite una concentración máxima de 2 mg/l de Cr total para vertidos de establecimientos industriales, reduciéndose dicho valor a 0,2 mg/l para Cr(VI). Para aguas de bebida, por otro lado, el Código Alimentario Argentino (CAA) indica un máximo

permisible de 0,5 mg/l de Cr total y 0,05 mg/l de Cr(VI). Más allá de ello, la concentración de este metal en aguas de uso industrial y de consumo, supera muchas veces los límites establecidos por la regulación vigente. Esta realidad plantea la necesidad de emplear diversas tecnologías para el tratamiento de efluentes contaminados descargados en el ambiente y para el saneamiento de sitios que se encuentren contaminados de forma crónica con el metal.

#### 1.4. El fenol como compuesto aromático modelo

Los fenoles son un grupo importante de compuestos aromáticos, que se encuentran ubicados en el puesto once de una lista de 126 contaminantes prioritarios publicada por la US EPA (Nayak y Singh, 2007). El fenol, también llamado ácido carbólico o hidroxibenceno, es uno de los miembros más representativos de este grupo (figura 3). Presenta un grupo hidroxilo como sustituyente del primer carbono en su anillo bencénico, que actúa como ácido débil altamente oxidable, soluble en numerosos compuestos orgánicos pero con limitada solubilidad en agua a temperatura ambiente.

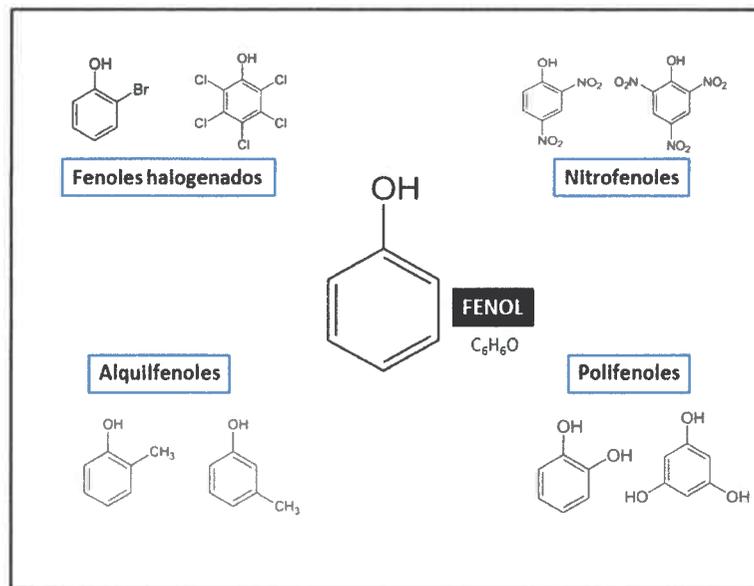


Figura 3: Estructura química del fenol y algunos de sus derivados.

En la naturaleza, el fenol puede ser producido a partir de la descomposición de materia orgánica, combustión de la madera, estiércol o alquitrán de hulla. La extracción de combustibles fósiles y ciertos procesos químicos son actividades humanas responsables de la generación de fenoles (Busca y col., 2008). Su principal aplicación industrial es en la síntesis de

resinas, como baquelita. También puede ser convertido en xileno, alquifenoles, clorofenoles, anilinas y otros intermediarios secundarios en la producción de surfactantes, fertilizantes y agroquímicos, explosivos, pinturas, en la industria textil, del caucho y antioxidantes (Basha y col., 2010).

El efecto adverso de los compuestos fenólicos sobre los seres vivos se debe al daño que generan sobre la membrana plasmática, por alteración en la estructura lipídica e inducción de estrés oxidativo. Su peligrosidad para el medioambiente se asocia a su elevada toxicidad aún a bajas concentraciones, y a su persistencia, pudiendo causar la muerte en casos de exposición extrema (Yang y Lee, 2007).

El vertido de aguas residuales contaminadas con fenol y sus derivados sin tratar o sometidos a un tratamiento deficiente puede provocar serios impactos sobre los ecosistemas acuáticos y la salud humana. En muchos países, entre ellos Argentina, los procesos de potabilización de agua empleados no permiten la eliminación de fenoles. Por el contrario, se adiciona cloro, generándose compuestos fenilpoliclorados, que se encuentran entre los derivados fenólicos halogenados más tóxicos (Bravo y col., 1998; Michałowicz y Duda, 2007).

Esta situación demuestra la necesidad de limitar los vertidos de aguas residuales, reducir la concentración permitida de estos compuestos en fuentes hídricas y disponer de adecuados procesos de tratamiento. En este sentido, existe una diversidad de reglamentaciones nacionales e internacionales que definen los límites permitidos de fenoles en los efluentes industriales. En particular, la US EPA determina que el nivel de fenol en aguas residuales no debe exceder 0,17 mg/l (Bhattacharya y col., 2014) mientras que en Argentina, la ley de vertido de residuos industriales (Ley 24.051, anexo II) establece un nivel guía de fenol y/o fenoles totales de 1 µg/l para agua dulce superficial y agua de consumo humano ([www.cecopal.org](http://www.cecopal.org)). Sin embargo, más allá de los esfuerzos por restringir el uso y eliminación desmedidos de estas sustancias al medioambiente, existen reportes internacionales que informan sobre la presencia de fenol y sus derivados en elevadas concentraciones, en diferentes efluentes industriales y cursos de agua naturales (Petroutsos y col., 2008). Nuestro país no está exento de esa problemática, ya que se han detectado concentraciones de fenol que superan ampliamente los límites permitidos en diferentes fuentes hídricas, no sólo de uso industrial sino también de consumo humano (<http://www.holistica2000.com.ar>; Paisio y col., 2012).

### 1.5. Contaminación mixta por Cr(VI) y fenoles

El grado de contaminación ambiental y su alcance han cambiado en los últimos años. Ello se debe a diversos factores, pero probablemente uno de los más destacados hace referencia a la dispersión de contaminantes de diferente naturaleza desde sus sitios de producción/liberación hacia áreas remotas. Un claro ejemplo es la detección de contaminantes orgánicos persistentes, como muchos pesticidas, combinados con metales pesados en aguas antárticas (Bargagli, 2008).

La coexistencia de compuestos tóxicos orgánicos e inorgánicos en un mismo ambiente altera su comportamiento individual y exagera su eco-toxicidad, debido a efectos de interacción (Cheng y col., 2015). Por ejemplo, se conoce que la presencia de metales pesados en el suelo reduce la adsorción de lindano, favoreciendo su drenado y lixiviación (Guo y col., 2015). Esta situación permite comprender por qué los sitios más problemáticos en el mundo debido a su grado de polución se encuentran co-contaminados con metales y xenobióticos. La contaminación mixta además afecta seriamente la posibilidad de saneamiento, considerando que las tecnologías desarrolladas para el tratamiento de contaminantes orgánicos no necesariamente son adecuadas para la remediación de sustancias inorgánicas y viceversa (Sandrin y Maier, 2003).

En ese sentido, la contaminación mixta puede ocurrir por la combinación de diversos efluentes industriales en un receptor común, o bien por el vertido simultáneo de sustancias tóxicas a partir de una actividad industrial específica. En el último caso, la presencia de Cr(VI) y compuestos fenólicos en aguas residuales de diversas industrias, es una situación ampliamente reconocida. El tratamiento de maderas, refinado de petróleo, curtido y metalurgia son algunas de las actividades industriales responsables del vertido de estos compuestos entre sus residuos de producción (Liu y col., 2008).

En nuestro país existen diversos informes que indican la presencia combinada de metales y compuestos orgánicos en ríos o sus afluentes. Puede citarse, por ejemplo, la cuenca del río Bermejo, donde se detectó contaminación por residuos provenientes de petroleras de la zona y el río de La Plata, donde la presencia de Cr, plomo y compuestos fenólicos, provenientes de fuentes urbanas e industriales inadecuadamente controladas, constituyen un peligro para la población ([http:// www.cicplata.org](http://www.cicplata.org)). Por su parte, Castañé y col. (2006) informaron concentraciones de metales pesados (cromo, cobre, plomo, arsénico) y fenoles superiores a las permitidas, en las aguas del Río Reconquista.

Asimismo, una de las principales fuentes de contaminación mixta por Cr y fenol son las curtiembres. En ese sentido, se han detectado elevados niveles de esos contaminantes en

fuentes de agua de consumo humano de la región centro-norte de nuestro país (<http://www.greenpeace.org.ar>: Campaña Riachuelo 2012, <http://www.cicplata.org>). La problemática de la contaminación ocasionada por curtiembres, se asocia al empleo de compuestos tóxicos durante las diferentes etapas del curtido, siendo los más peligrosos el Cr(III) con la posible oxidación a Cr(VI) durante el curtido propiamente dicho, y sustancias químicas como pigmentos, productos fluorados, polímeros, fenoles, ésteres de ftalato, desengrasantes como el percloroetileno y tricloroetileno, empleados en los tratamientos posteriores, como teñido, re- curtido o desengrasado (Forcillo, 2002).

### **1.6. Estrategias para el tratamiento de aguas residuales y saneamiento ambiental**

La atenuación natural hace referencia a todos aquellos procesos físico-químicos o biológicos que ocurren espontáneamente y favorecen la remediación de ambientes contaminados. El problema de estos procesos naturales es que son lentos y por lo tanto, incapaces de contrarrestar la contaminación generada por la actividad humana al ritmo en que ésta se desarrolla en la actualidad (Dua y col., 2002). Por ello, y más aún en casos de contaminación extrema (vertidos, derrames accidentales, etc.), se emplean métodos alternativos para tratar de reducir la concentración de los contaminantes.

De acuerdo a lo establecido por la US EPA (2000), una tecnología de tratamiento implica cualquier operación unitaria o serie de operaciones que alteren la composición de una sustancia peligrosa o contaminante, a través de acciones físicas, químicas o biológicas, de manera que se reduzca la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminando (Volke Sepúlveda y Velasco Trejo, 2004). Las metodologías de remediación pueden clasificarse dentro de dos grandes grupos, las físico-químicas y las biológicas.

#### **1.6.1. Tecnologías físico-químicas de remediación**

Estas tecnologías son las más antiguas y han sido tradicionalmente utilizadas. Pueden aplicarse *in situ* o *ex situ*, y consisten en destruir, separar o contener el compuesto a tratar, de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas y el medio en el que se encuentre. Las principales metodologías físico-químicas empleadas para la decontaminación de metales pesados se basan en procesos de óxido-reducción, precipitación química, filtración, tratamientos electroquímicos, evaporación, intercambio iónico y ósmosis inversa (Malik, 2004). En el caso de los contaminantes orgánicos, se aplican procedimientos como extracción por solventes, oxidación química, incineración, fotocatalisis, ultrasonido y estabilización con aditivos inmovilizantes, entre otros (Atterby y col., 2002; Wessels Perelo, 2010). A pesar de que estas

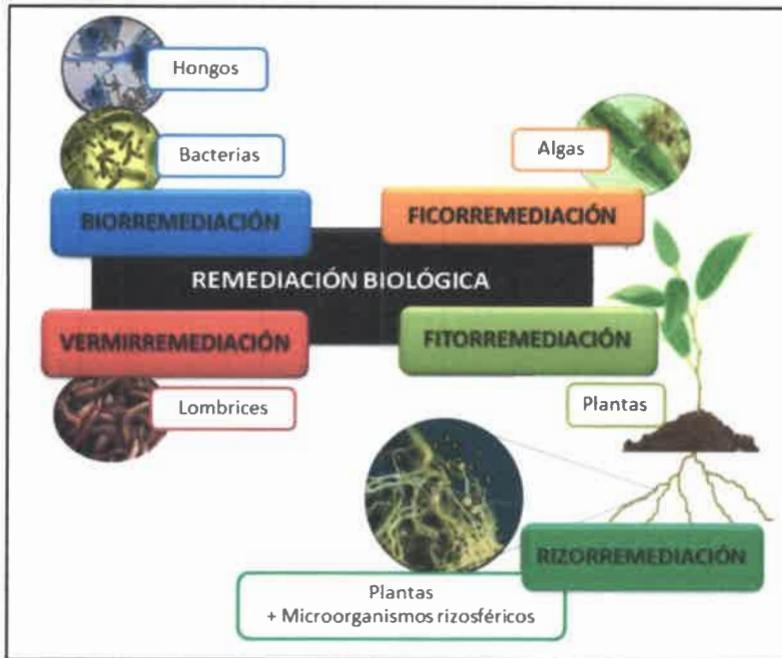
metodologías se han utilizado durante varias décadas para el tratamiento de grandes extensiones de áreas contaminadas, presentan serias desventajas, como su reducido costo-efectividad y la toxicidad de varios de los reactivos empleados o bien de los productos secundarios formados en ciertos procesos. Estas desventajas pueden ser más pronunciadas y los costos se agravan en el caso de aguas subterráneas contaminadas, desechos de minería y otras aguas residuales industriales, cuando los efluentes son voluminosos y contienen combinación de metales pesados y sustancias orgánicas (Malik, 2004; McGuinness y Dowling, 2009).

Las desventajas de estos sistemas han planteado la necesidad de encontrar metodologías alternativas para el tratamiento de contaminantes. Por lo tanto, en las últimas décadas, se ha incrementado significativamente el estudio de tecnologías biológicas, que prometen complementar eficientemente a los métodos de remediación físico-químicos (Paul y col., 2005).

### **1.6.2. Tecnologías biológicas de remediación**

La remediación biológica se basa en la utilización de las capacidades metabólicas de los organismos para degradar, transformar, secuestrar y/o detoxificar contaminantes ambientales de naturaleza orgánica o inorgánica. El término biorremediación se aplica principalmente a la utilización de microorganismos, mientras que la fitorremediación se refiere al uso de plantas y órganos vegetales para el tratamiento de compuestos químicos tóxicos (Glick, 2010). Más recientemente, han emergido la rizorremediación, tecnología que aprovecha los beneficios combinados de plantas y microorganismos rizosféricos para la remoción de contaminantes (Thijs y Vangronsveld, 2015) y la vermirremediación, que se refiere a la aplicación de nematodos y sus productos de digestión con el mismo fin (Sinha y col., 2009).

La figura 4 esquematiza las mencionadas estrategias de remediación.



**Figura 4:** Estrategias de remediación biológica. (Adaptada de Paisio y col., 2012).

Con el avance científico, cada vez existen más variantes de estas tecnologías, aplicadas al tratamiento de compuestos de diversa naturaleza. Por ejemplo, el empleo de órganos vegetales aislados y plantas transgénicas ha dado buenos resultados en la remoción de contaminantes orgánicos y metales pesados (Ibañez y col., 2014), mientras que el desarrollo de las tecnologías “ómicas” ha permitido comprender la dinámica de comunidades microbianas durante los procesos de biorremediación y rizorremediación (El Amrani y col., 2015). Asimismo, las técnicas de biorremediación libres de células, empleando enzimas microbianas han sido exitosamente desarrolladas para el tratamiento de químicos persistentes (Tanokura y col., 2015).

Este tipo de procesos biológicos presenta una amplia variedad de ventajas frente a los métodos físico-químicos convencionalmente empleados, destacándose su costo-efectividad, la necesidad de mínimos tratamientos posteriores, el empleo de los componentes del medio como fuentes únicas de nutrientes en muchos casos y sobre todo, su elevada aceptación pública, asociada posiblemente a que son tecnologías ambientalmente amigables y poco destructivas (Cordova-Rosa y col., 2009). Más allá de las ventajas previamente citadas, es importante destacar que no todas las tecnologías biológicas de remediación son igualmente eficientes. Muchos sistemas plantean algunos inconvenientes en cuanto a su aplicación, tales como lentitud, demandas geológicas, climáticas y nutricionales específicas y baja predictividad.

### 1.6.2.1. Biorremediación

La biorremediación microbiana es quizás, la más prometedora de las tecnologías biológicas previamente mencionadas. Diversos autores han descrito la elevada capacidad de los microorganismos para tolerar y remediar contaminantes ambientales, destacando a las bacterias entre los sistemas de biorremediación más eficientes (Singh y col., 2011). Éstas poseen la maquinaria metabólica necesaria para llevar a cabo la detoxificación de compuestos químicos de diversa naturaleza de manera rápida y efectiva. La principal ventaja de las bacterias sobre las plantas, además de su rápido crecimiento y adaptabilidad, es la posibilidad de degradar completamente compuestos orgánicos recalcitrantes, mineralizándolos a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Wood, 2008). A diferencia de lo que ocurre con los contaminantes orgánicos, los metales no pueden ser degradados, por lo que la biorremediación de estos compuestos por microorganismos se basa en la oxidación-reducción a formas menos tóxicas y/o biodisponibles (Malik, 2004). Otros fenómenos, como la absorción y adsorción a estructuras celulares de forma pasiva o activa ocurren para ambos tipos de compuestos (Wang y Chen, 2009).

La biorremediación microbiana puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. Los procesos *in situ* son los más atractivos debido a que en ellos los contaminantes pueden ser tratados directamente en el sitio afectado, reduciendo los riesgos de exposición y diseminación de la contaminación a través del transporte de los compuestos a tratar (Ortiz-Hernández y col., 2014). Las técnicas *in situ* pueden clasificarse, a su vez en dos grandes grupos: la bioestimulación y el bioaumentación. La primera permite incrementar el crecimiento de los microorganismos preexistentes a través del agregado de algún nutriente beneficioso y la segunda se basa en la inoculación de bacterias biorremediadoras, cuando la microbiota autóctona no tiene el potencial detoxificador necesario (Villegas y col., 2014).

Por otro lado, las principales técnicas de biorremediación *ex situ* son *landfarming*, compostaje y construcción de biopilas, aplicables a la remediación de suelos y sedimentos contaminados, o bien los biorreactores, que involucran el tratamiento de material líquido o sólido en el interior de un sistema controlado, que permite lograr elevadas velocidades de operación y alta eficiencia de remediación (Villegas y col., 2014).

En general, por tratarse de un proceso natural, la biorremediación cuenta con elevada aceptación pública. Además, las ventajas de su aplicación sumadas a sus reducidos costos, la convierten en una prometedora técnica para el tratamiento de efluentes industriales o de sus sedimentos contaminados. Sin embargo, entre algunas de sus desventajas se puede mencionar el prolongado tiempo necesario para una efectiva decontaminación de ciertos compuestos y su baja predictibilidad ante condiciones medioambientales diversas (Wessels Perelo, 2010).

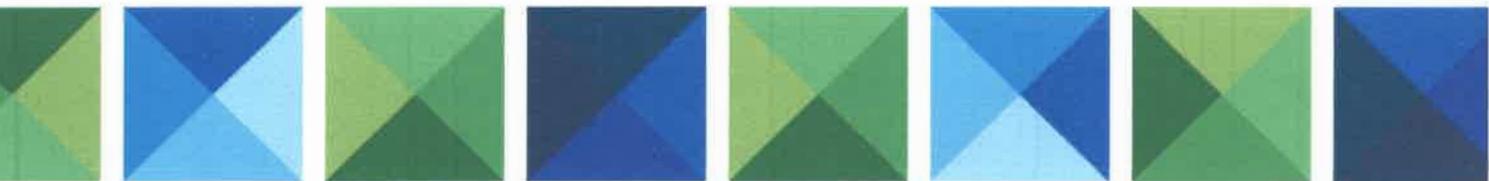
El sistema de biorremediación más utilizado que aplica el metabolismo microbiano para tal fin es el de los lodos activados, donde una mezcla compleja de microorganismos crece en reactores aireados oxidando la materia orgánica biodegradable y eliminando desechos fosforados y nitrogenados (Erijman y col., 2011). Sin embargo, estos sistemas suelen ser sensibles a la presencia de metales pesados, tales como el Cr(VI), lo cual implica una importante limitación para su aplicación en la remediación de efluentes con elevado contenido de estas sustancias tóxicas (Stasinakis y col., 2003).

En base a los antecedentes presentados es evidente el incremento de los niveles de contaminación por mezclas de sustancias de diversa naturaleza, tales como Cr(VI) y fenol, que se encuentran comúnmente juntos en diversos efluentes industriales y que han sido detectados en elevadas concentraciones en cursos de agua de nuestro país. Resulta relevante, por lo tanto, encontrar métodos efectivos y económicos para el tratamiento de efluentes industriales contaminados con esos compuestos. El desarrollo de sistemas de biorremediación utilizando microorganismos eficientes y con buena adaptabilidad a condiciones medioambientales diversas podría ser crucial para tal fin, así como la comprensión de los mecanismos implicados en la remoción simultánea de estos contaminantes. En este contexto, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

### **1.7. Hipótesis**

**“Bacterias nativas de la región, tolerantes a Cr(VI) y fenol, adaptadas a las condiciones climáticas y edáficas de zonas contaminadas, pueden ser utilizadas para la biorremediación eficiente de efluentes industriales o en aplicaciones ambientales (bioaumentación), contribuyendo a optimizar la eliminación de estas sustancias tóxicas. El uso de matrices simples de inmovilización permite incrementar la eficiencia del proceso de biorremediación, la reutilización de biomasa y su implementación a mayor escala”.**

## Objetivos



## 2.1. Objetivo General

Se propuso como objetivo general de este trabajo de tesis aislar, caracterizar e identificar microorganismos de sitios contaminados de la provincia de Córdoba; con capacidad para tolerar y remediar elevadas concentraciones de Cr(VI) y fenol simultáneamente. Por un lado se planteó evaluar su potencial para biorremediar ambos compuestos bajo diferentes condiciones ambientales y volúmenes de trabajo, en condiciones libres e inmovilizadas. Por otra parte se analizaron los mecanismos bioquímicos, fisiológicos y moleculares desarrollados en las bacterias ante la presencia de los contaminantes y que podrían ser responsables de la detoxificación.

## 2.2. Objetivos específicos

1. Aislar, caracterizar e identificar cepas bacterianas nativas tolerantes a Cr(VI) y fenol, a partir de muestras proveniente de zonas contaminadas de la provincia de Córdoba (cuenca del arroyo El Barreal-Elena).
2. Evaluar la remoción de Cr(VI) y fenol, de manera independiente y simultánea, modificando y optimizando las condiciones de cultivo para mejorar la eficiencia del proceso en diferentes escalas de trabajo.
3. Analizar la eficiencia de remediación de Cr(VI) y fenol utilizando las bacterias inmovilizadas en diferentes matrices, determinando los ciclos de reutilización de las células inmovilizadas.
4. Dilucidar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la tolerancia y/o detoxificación de Cr(VI) y fenol en el/los aislamiento/s seleccionado/s.

El siguiente diagrama representa la organización general de esta tesis e indica en qué secciones de la misma se describirán los resultados obtenidos en base a cada objetivo propuesto.

**CAPÍTULO I: "Aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de tolerar y remover simultáneamente Cr(VI) y fenol. Optimización de las condiciones de remoción"**

- Caracterización de la zona de muestreo
- Aislamiento y selección de bacterias en base a su tolerancia y capacidad de remoción de Cr(VI) y fenol
- Remoción individual y simultánea de los contaminantes en diferentes condiciones de cultivo
- Efecto del cambio de escala en la remoción simultánea

Objetivos 1 y 2

**CAPÍTULO II: "Empleo de la inmovilización bacteriana como estrategia para mejorar la remoción simultánea de Cr(VI) y fenol por los aislamientos seleccionados"**

- Inmovilización de los aislamientos seleccionados en una matriz de alginato de calcio
- Optimización de las condiciones de remoción de las células inmovilizadas
- Reutilización de las bacterias inmovilizadas
- Caracterización de los productos de remoción

Objetivo 3

**CAPÍTULO III: "Mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en la tolerancia y detoxificación de Cr(VI) y fenol por las bacterias en estudio"**

- Mecanismos de tolerancia a Cr(VI) y de reducción de Cr(VI) a Cr(III)
- Vía de degradación de fenol
- Desarrollo/Mitigación de procesos de estrés a causa de la exposición a los contaminantes

Objetivo 4

**CAPÍTULO IV: "Conclusiones y perspectivas"**

# Capítulo I

Aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de tolerar y remover simultáneamente Cr(VI) y fenol. Optimización de las condiciones de remoción.



# Introducción



### 3.1. Empleo de microorganismos ambientales en biorremediación

Los microorganismos pueden ser aislados prácticamente de todos los ambientes terrestres, ya que son capaces de adaptarse a condiciones tan diversas y extremas como temperaturas bajo cero, desecación, presiones elevadas de oxígeno o anaerobiosis. La presencia de compuestos tóxicos no representa, por lo tanto, una limitación para el crecimiento de muchos de ellos (Vidali 2001). Esta elevada adaptabilidad de los microorganismos en relación a otros sistemas biológicos, junto con su gran potencial metabólico, los hacen altamente atractivos para ser aplicados en la remediación de contaminantes. En este sentido, muchas bacterias adaptadas a crecer en ambientes contaminados con ciertos químicos tóxicos, han demostrado capacidad para metabolizarlos *in vitro* e incluso para detoxificar compuestos de estructura similar (Ojo y col., 2007). La presión selectiva y la transferencia horizontal de genes serían las principales causas de tal comportamiento (Cervantes y col., 2001; Watanabe, 2001; Wang y col., 2007). Además, se ha demostrado que la pe-adaptación de cultivos bacterianos en presencia de contaminantes durante tiempos prolongados a escala laboratorio puede inducir su tolerancia y su potencial para remediarlos (Ojo, 2007). Por lo tanto, el aislamiento de bacterias ambientales y su posterior mantenimiento en el laboratorio en presencia de los contaminantes, han sido estrategias ampliamente empleadas para desarrollar sistemas eficientes de biotratamiento de xenobióticos y metales pesados.

Los últimos avances en el área de la química analítica y la biología molecular han permitido incrementar el conocimiento del potencial biotecnológico de los microorganismos ambientales en el ámbito de la biorremediación. La comprensión de las vías implicadas, el co-metabolismo de sustratos y las relaciones simbióticas entre microorganismos han sido de gran ayuda a la hora de seleccionar cepas e incluso crear artificialmente cultivos mixtos aplicables en la detoxificación de compuestos recalcitrantes (Hays y col., 2015).

### 3.2. Cultivos mixtos *versus* cepas aisladas para biorremediar contaminantes

El estudio de microorganismos individuales ha sido muy útil hasta ahora para la comprensión de los distintos genes, vías metabólicas y enzimas involucrados en los procesos de biorremediación. Sin embargo, en los últimos años ha ganado importancia el concepto de cooperación metabólica, el cual indica que las poblaciones microbianas en el ambiente están compuestas por diversas comunidades, sinérgicas o antagónicas en lugar de cepas aisladas. De acuerdo a ese criterio, la detoxificación de contaminantes en la naturaleza ocurriría como



consecuencia de la interacción entre las cepas que coexisten en ella (Pazos y col., 2003; Trigo y col., 2009).

Si se considera a la contaminación ambiental desde un punto de vista global, hay que tener en cuenta que no existen actualmente áreas contaminadas con un solo tipo de compuesto; sino que la mayoría de los sitios afectados del planeta presentan combinaciones de contaminantes de diferente naturaleza. Por esta razón, encontrar un solo microorganismo capaz de detoxificar mezclas de los mismos es un objetivo altamente ambicioso y difícil de cumplir. En los últimos años se ha incrementado el uso de consorcios bacterianos con elevada eficiencia para biorremediar xenobióticos recalcitrantes o mezclas de tóxicos, gracias a la acción sinérgica de las capacidades metabólicas de sus componentes. Como muchos de esos consorcios son aislados directamente de zonas afectadas, tienen además, elevado potencial para adaptarse a las variaciones climáticas propias de esas zonas y para ser aplicados en bioaumentación (Angelim y col., 2013).

Las técnicas actuales independientes de cultivo permiten comprender las interacciones microbianas, potencial genético y capacidades metabólicas de los consorcios bacterianos presentes en áreas contaminadas. Esta es una gran ventaja a la hora de seleccionar potenciales sitios de aislamiento de microorganismos aplicables en biorremediación (Vila y col., 2015).

### 3.3. Biorremediación de Cr y fenol por bacterias de origen ambiental

Los metales pesados no son degradables y por lo tanto su biotratamiento se basa en la inmovilización o transformación química a especies menos tóxicas (Wessls- Perello, 2010). En el caso particular del Cr, la reducción de Cr(VI) a Cr(III) implica una disminución significativa de su toxicidad y la posibilidad de su inmovilización, lo cual además es una ventaja a la hora de reducir su diseminación en el ambiente (Focardi y col., 2013).

Los mecanismos de reducción bacteriana de Cr(VI) pueden ser variables, y dependen de la naturaleza y el potencial de cada cepa. Algunas especies son capaces de efectuar procesos de reducción tanto aeróbicos como anaeróbicos, aunque la mayor parte de las bacterias descritas lo hacen en presencia de oxígeno. En anaerobiosis el Cr(VI) actúa como aceptor final de electrones y en aerobiosis dicha reducción puede ser tanto enzimática como no enzimática (Dhal y col., 2013). También existen microorganismos capaces de inmovilizar Cr por adsorción o absorción a sus estructuras celulares. Aunque esta propiedad ha sido extensamente asociada a hongos y algas, ciertas bacterias pertenecientes principalmente a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y algunas actinobacterias han demostrado buen potencial

como agentes inmovilizadores del metal, antes, durante o después de su reducción de Cr(VI) a Cr(III) (Mishra y Doble, 2008).

Por otro lado, también se conoce la capacidad de muchos microorganismos para degradar compuestos fenólicos a sustancias menos tóxicas, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Sin embargo, debido a su elevada tolerancia y capacidad metabólica, las proteobacterias y actinobacterias se encuentran entre las mejor caracterizadas (Ruck y col., 2015).

Las bacterias son capaces de transformar compuestos fenólicos a un reducido número de intermediarios, que luego son convertidos en compuestos metabolizables a través de una serie de vías catabólicas, entre ellas el ciclo de Krebs. En el caso del fenol, uno de esos intermediarios es el catecol, que en condiciones ideales es mineralizado completamente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Ruck, 2015).

Si bien queda claro que tanto la biorremediación de Cr(VI) como la de fenol por bacterias han sido procesos ampliamente estudiados, el desarrollo de sistemas bacterianos capaces de remover esos compuestos simultáneamente no ha resultado tan sencillo. En ese sentido, aunque algunas cepas aisladas presentaron buen potencial para remover mezclas de esos contaminantes, los cultivos bacterianos mixtos naturales o generados en el laboratorio han resultado, en general, más eficientes (Shen y Wang, 1995; Srivastava y col., 2007; Liu y col., 2008; Tziotzios y col., 2008; Song y col., 2009). Sin embargo, existe escasa información sobre el efecto de factores ambientales en el proceso de remoción simultánea (Gunasundari y Muthukumar, 2013). La influencia del Cr(VI) sobre la detoxificación de fenol y viceversa tampoco han sido analizadas en profundidad, aunque se conozca claramente el impacto negativo de combinar sustancias tóxicas sobre las capacidades metabólicas de las bacterias involucradas (Sandrin y Maier, 2003).

#### **3.4. Potencialidades y limitaciones de la biorremediación y su aplicación a campo**

El principal objetivo de los estudios de biorremediación es transferir los resultados obtenidos en el laboratorio hacia el tratamiento *in situ* de áreas contaminadas. Sería arriesgado, entonces, creer que la simple selección de microorganismos en base a su tolerancia y capacidad de remoción *in vitro* permitiría obtener sistemas confiables y predecibles para ser aplicados a campo (Thompson y col., 2005). En ese sentido, existe una innumerable cantidad de factores bióticos y abióticos que influyen directamente en el rendimiento de los microorganismos, tales como la competencia con la flora nativa, temperatura, pH, concentración de oxígeno, disponibilidad de donadores y aceptores finales de

electrones y presencia de otros compuestos tóxicos co-contaminantes, entre otros (Pandey y Fulekar, 2012). Esto explica que muchas bacterias seleccionadas *in vitro* por su elevado potencial para remover contaminantes, fueran poco efectivas para el bioaumentación de efluentes contaminados (Tyagi y col., 2011). Por lo tanto uno de los pasos fundamentales al momento de seleccionar microorganismos aplicables en biorremediación es evaluar su eficiencia en una amplia variedad de condiciones de cultivo. El aislamiento de cepas autóctonas y su posterior empleo para la remoción de contaminantes es recomendable en cuanto a la seguridad ecológica que implica la posibilidad de reintroducir estas especies en la comunidad natural, así como también en la alta eficiencia del proceso, ya que los microorganismos autóctonos son fisiológicamente compatibles con su ambiente (Atlas y Bartha, 2001). Esta estrategia reduce, además, la competencia con la flora nativa, la posible patogenicidad sobre otros seres vivos y el riesgo de transferencia horizontal de genes (Boopathy, 2000).

Otro factor crucial para evaluar la aplicabilidad de microorganismos en el tratamiento de efluentes contaminados es la influencia que el cambio de escala pueda tener sobre el proceso, ya que la modificación en el volumen de trabajo de un Erlenmeyer a un recipiente de varios litros puede acarrear cambios drásticos en la mayoría de los parámetros de cultivo y la presión hidrostática del sistema. Esto implica que las condiciones de operación a pequeña escala no sean completamente extrapolables a escala industrial y un manejo erróneo de las mismas podría provocar importantes pérdidas económicas (Galindo y col., 2008).

Una solución para este tipo de problemas es la realización del escalado gradual del volumen de trabajo hasta alcanzar una escala industrial. Dicho proceso se centra en regular al menos tres parámetros centrales: la aireación, el mezclado y la eliminación del calor. En este sentido, el uso de biorreactores permite optimizar la transferencia de oxígeno a través de un adecuado control del flujo de aire y de la velocidad de agitación. Dicha agitación favorece, además, el mezclado y la disipación de calor (Najafpour, 2015).

La figura 5 resume algunas de las ventajas y limitaciones de la biorremediación empleando microorganismos, además de posibles alternativas para superar tales limitaciones, que han sido mencionadas a lo largo de esta introducción.

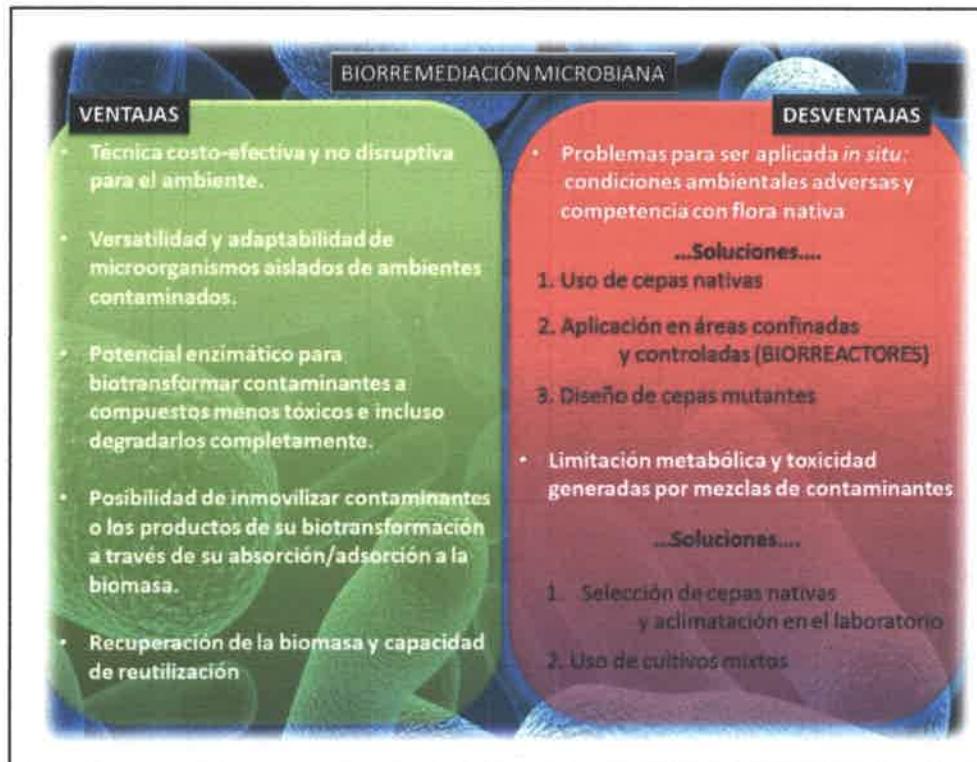


Figura 5: Ventajas y desventajas de la biorremediación microbiana.

### 3.5. Reactores a escala piloto para biorremediación de contaminantes

Los biorreactores o fermentadores son muy variables y se clasifican de acuerdo a su configuración, tamaño y forma en la que se operan. Pueden ser tan pequeños como un matraz de laboratorio o llegar a contener volúmenes de hasta cientos de miles de litros, en el caso de los fermentadores industriales a gran escala. Según la manera en la que se produce la aireación éstos pueden ser tanques aireados agitados, tanques de recirculación y reactores tubulares (Najafpour, 2015):

Los **tanques aireados agitados** son los más tradicionales. Consisten en un cilindro vertical con un eje central con hélices responsables de llevar a cabo la agitación mecánica. Además contienen deflectores que permiten la formación de corrientes de circulación durante la agitación y la distribución de las burbujas de aire insuflado. Los **tanques de recirculación** presentan tubos de aspiración interna y conductos de recirculación externa. Mediante este diseño, el flujo del medio de cultivo ocurre en una dirección definida, donde la fuerza motora se desarrolla a través del ascenso de burbujas de aire o por un sistema de flujo hidrodinámico. Por último, los **reactores tubulares (Air lift)** tienen forma de columna, por la que se introduce aire en la base del tubo y el ascenso de burbujas de aire constituye el único tipo de agitación

existente. Este tipo de reactores no permiten trabajar con concentraciones tan elevadas de biomasa como los de tanque agitado, pero son más económicos y simples de manipular.

Por otro lado, de acuerdo al modo de operación, un cultivo desarrollado en un biorreactor puede ser clasificado como *batch*, *batch* alimentado y continuo (Rao, 2010):

En los cultivos tipo *batch* todos los reactivos son incorporados al inicio del proceso, sin posterior entrada o salida de materiales. De esta manera se hace crecer a los microorganismos en un medio adecuado hasta el agotamiento de algún sustrato o la acumulación de posibles inhibidores. Los cultivos operados en modo *batch* alimentado (*fed batch*), por el contrario, presentan una corriente paulatina de alimentación pero sin una corriente de salida. Este método se emplea cuando se quieren evitar fenómenos de inhibición por carencia de sustrato y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa. Cuando en el biorreactor se incorpora medio de cultivo fresco a un ritmo constante y en la misma proporción sale medio con células, el proceso se opera en modo **continuo**. En este tipo de sistema se puede controlar la velocidad específica de crecimiento y producción.

Los experimentos de biorremediación en biorreactores a nivel laboratorio apuntan a simular las condiciones a las que serán expuestos los microorganismos en caso de una aplicación real. Los mismos permiten operar el proceso de forma controlada, rápida y disponer de la biomasa y los residuos generados al finalizar los experimentos (Kathiravan y col., 2011; Ahluwalia, 2014). En particular, los cultivos en sistema *batch* permiten estudiar el efecto de la concentración inicial de los contaminantes sobre la capacidad de remoción de los microorganismos y establecer las condiciones óptimas de cultivo, mientras que los sistemas continuos son útiles para el tratamiento de efluentes industriales durante tiempos prolongados. En general, los biorreactores aireados de tanque agitado se encuentran entre los más utilizados en biorremediación, ya que favorecen al correcto mezclado y suministro de oxígeno y permiten el desarrollo de cultivos bacterianos bajo las tres condiciones de operación previamente mencionadas.

Existe una gran cantidad de estudios de remediación de Cr(VI) o fenoles en biorreactores a escala piloto, empleando bacterias libres e inmovilizadas tanto en soluciones sintéticas como en efluentes reales (Quintelas y col., 2009; Agarry y col., 2008; Abu-Reesh, 2010; Uzun y col., 2010; Huang y col., 2011; Williams y col., 2014). Además, en los últimos años se han descrito sistemas microbianos para el tratamiento de grandes volúmenes de efluentes contaminados con dichos compuestos, en reactores operados continuamente durante tiempos prolongados. Tal es el caso del sistema *ChromBac*, que emplea células inmovilizadas de *A. haemolyticus* para reducir el Cr(VI) presente en efluentes de galvanoplastia (Ahmad y col., 2010), o los reactores de lecho fijo descritos por Bajaj y col. (2008) para

degradar fenol a partir de efluentes sintéticos mediante biofilms bacterianos. Sin embargo, a pesar de estos avances, la mayoría de los reportes sobre biorremediación simultánea de Cr(VI) y fenol se han llevado a cabo a nivel laboratorio, sin considerar los efectos que puede traer aparejado el cambio de escala sobre el potencial de remoción de los microorganismos (Lin y col., 2009; Garg y col., 2013).

## **Materiales y métodos**



#### 4.1. Caracterización de la zona de muestreo

Se seleccionó como sitio de estudio una curtiembre situada al sur de la provincia de Córdoba. Su ubicación geográfica se determinó mediante GPS. La toma de muestras del efluente industrial y los sedimentos en contacto directo con el mismo, se realizó en el canal donde dicha empresa descarga sus desechos a cielo abierto. El muestreo fue efectuado en 5 oportunidades durante el período 2011-2012, abarcando las cuatro estaciones del año, con el fin de analizar posibles variaciones estacionales. La determinación de pH y temperatura del efluente se realizó *in situ*, mediante un pehachímetro de bolsillo "Adwa AD 12". Los análisis de parámetros físico-químicos, como así también la determinación de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) fueron realizados en un laboratorio especializado y comparados con los valores permitidos por la legislación nacional. Se evaluó, además, el contenido de Cr(VI), Cr total y fenoles totales en efluente y sedimentos. Las concentraciones de Cr(VI) y Cr total se determinaron mediante los métodos de difenilcarbazida (DFC) y espectroscopía de emisión de plasma acoplado inductivamente o de emisión atómica, respectivamente. Los fenoles totales en el efluente se midieron mediante la técnica de 4-aminoantipirina (4-AAP). Las técnicas mencionadas serán descriptas en detalle en la sección "Métodos Analíticos".

#### 4.2. Aislamiento y selección de microorganismos tolerantes a Cr(VI) y fenol

##### 4.2.1. Toma de muestras para aislamiento de microorganismos

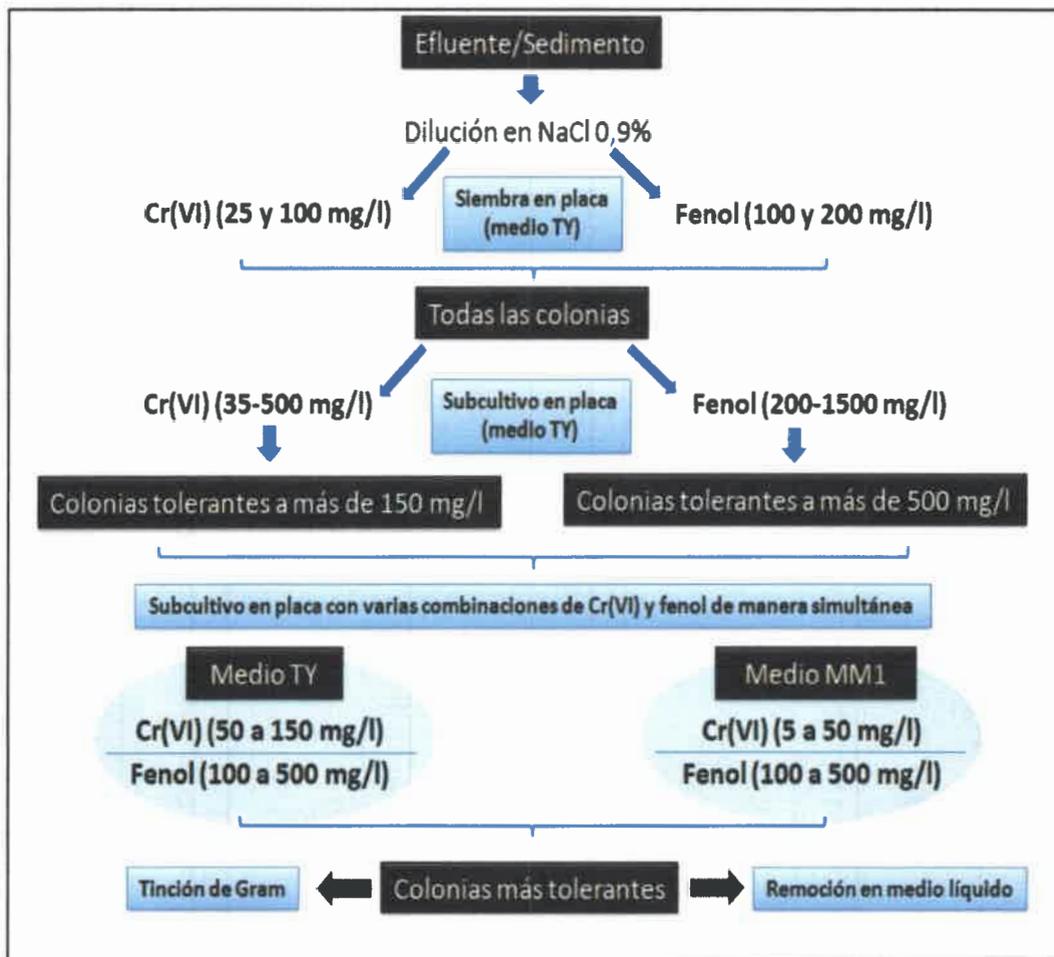
La toma de muestras para aislamiento y selección de microorganismos tolerantes a Cr(VI) y/o fenol, se realizó en dos oportunidades, en los meses de marzo y mayo de 2011, tanto de sedimento como de efluente de la zona de interés. Para llevar a cabo dicho procedimiento, se efectuaron diluciones de muestras de sedimento (hasta  $10^{-2}$ ) y efluente (hasta  $10^{-3}$ ) con solución fisiológica. Se sembró 0,1 ml de cada dilución por duplicado, en placas de petri conteniendo medio TY (Ver sección "Medios de cultivo") suplementado con Cr(VI) (25 y 100 mg/l) o fenol (100 y 200 mg/l).

Las placas se incubaron a 28 °C durante una semana y las colonias obtenidas se sembraron posteriormente en medio TY con concentraciones crecientes de Cr(VI) hasta 500 mg/l y fenol hasta 1500 mg/l. Aquellos cultivos bacterianos capaces de crecer en presencia de concentraciones superiores a 150 mg/l de Cr(VI) o 500 mg/l de fenol se consideraron los más tolerantes y se subcultivaron en placas conteniendo ambos contaminantes de manera

simultánea. Para ello se empleó medio TY con Cr(VI) (hasta 150 mg/l) y fenol (hasta 500 mg/l) y medio MM1 con Cr(VI) (hasta 50 mg/l) y fenol (hasta 500 mg/l).

Todos los microorganismos seleccionados en base a su tolerancia a las mayores concentraciones de uno o ambos contaminantes se analizaron mediante tinción de Gram. Los cultivos mixtos de bacterias que se desarrollaron en esas condiciones se conservaron como tales para los posteriores ensayos de remoción.

En la figura 6 se resume esquemáticamente la metodología previamente descrita.



**Figura 6:** Representación esquemática del procedimiento empleado para el aislamiento de microorganismos tolerantes a Cr(VI) y fenol.

#### 4.2.2. Conservación de los microorganismos aislados

Todos los cultivos bacterianos (puros o mixtos) se subcultivaron semanalmente en medio TY sólido a 28 °C.

Para el mantenimiento de los aislamientos más tolerantes, se empleó dicho medio suplementado con 20 mg/l de Cr(VI) y 100 mg/l de fenol. Además, para la conservación a largo plazo a -80 °C, se emplearon alícuotas de cada cultivo creciendo en medio TY en fase exponencial y se colocaron en tubos Eppendorf conteniendo glicerol estéril a una concentración final de 50% (v/v).

#### 4.2.3. Remoción de Cr(VI) y fenol por los microorganismos seleccionados

Se analizó la capacidad de los cultivos bacterianos seleccionados para remover Cr(VI) y fenol en medio líquido. Para ello, se realizaron pre-inóculos de cada cultivo en medio TY sin los contaminantes. Los microorganismos se cultivaron durante 18-24 horas a 28 °C y 150 rpm. La remoción se evaluó en tubos de 10 ml conteniendo:

- Medio TY con Cr(VI) (50 y 100 mg/l)
- Medio MM1 con fenol (50 y 100 mg/l)
- Medio TY con Cr(VI) 25 mg/l y fenol 100 mg/l
- Controles de cada condición sin inocular, empleados para analizar si hubo remoción debida a procesos fisicoquímicos a cada tiempo analizado (control 100%).

Todos los tubos se incubaron a 28 °C y 150 rpm durante 5 días. Al finalizar los experimentos se determinó la remoción de ambos compuestos, empleando las técnicas descritas en la sección "Métodos Analíticos".

Los aislamientos con mayor capacidad de remoción se analizaron en base a su capacidad de remoción simultánea en medio mineral MM1 y en medio TY. Las concentraciones evaluadas fueron 10 y 25 mg/l de Cr(VI) en presencia de 300 mg/l de fenol.

### 4.3. Caracterización bacteriana

#### 4.3.1. Caracterización morfológica y bioquímica

Los cultivos bacterianos seleccionados en base a su capacidad de remoción se caracterizaron morfológica y bioquímicamente. Para la caracterización morfológica, las colonias aisladas de cada bacteria se visualizaron en microscopio óptico Axiopot (Carl Zeiss), tras la tinción de Gram y verde de malaquita. Además se determinó el tamaño celular mediante medición microscópica.

En cuanto a la caracterización bioquímica, se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa mediante los test de descomposición de  $H_2O_2$  y discos de oxidasa (Britania), respectivamente. Además, se evaluó el perfil de utilización de azúcares y producción de enzimas de cada bacteria mediante el empleo de los sistemas comerciales API 20 NE y 20 E (API®, BioMerieux). Para determinar la movilidad de cada cepa se evaluó el patrón de crecimiento en medio semisólido SIM.

#### 4.3.2. Amplificación y secuenciación del gen codificante para el ARNr 16S

Se realizó la identificación a nivel de género mediante amplificación del gen codificante del ARNr 16S. La extracción de ADN, amplificación y secuenciación fue realizada por la empresa "Macrogen" (Seoul, Korea). Los cebadores utilizados para la amplificación del ADN fueron **518F**: 5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3' y **800R**: 5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'.

Las secuencias resultantes se compararon con las presentes en la herramienta BLAST, desde el servidor de la página del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias se alinearon con sus homólogas utilizando Clustal X, incluido en el programa BioEdit. El análisis evolutivo de los alineamientos y la selección del modelo de sustitución más adecuado se realizó mediante el programa jmodeltest. Finalmente se construyeron los árboles filogenéticos utilizando el software MEGA 4.0.

#### 4.3.3. Identificación basada en el perfil de proteínas mediante MALDI-TOF

La identificación a nivel de especie se realizó mediante MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*). Básicamente, una colonia aislada de cada cepa se trató con una solución saturada de alfaciano-4-hidroxicinámico, acetonitrilo y ácido trifluoroacético. Una vez cristalizada la muestra a temperatura ambiente, se realizó la ionización de las proteínas mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania). El espectro de masas obtenido se comparó de manera automática a partir de algoritmos integrados en el *software* del sistema, con una base de datos. La identificación se clasificó como confiable (puntuación  $\geq 2$ ), probable (puntuación entre 1,5 y 2) y no fiable (puntuación  $\leq 1,5$ ).

El tratamiento de las muestras, espectrometría de masas y valoración de los resultados se realizó en un laboratorio especializado.

#### **4.3.4. Condiciones experimentales para la remoción de los contaminantes**

Los ensayos de remoción utilizando el cultivo bacteriano seleccionado se realizaron en Erlenmeyers de 50 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo. En todos los experimentos se utilizó la misma metodología básica con modificaciones según los objetivos particulares de cada ensayo.

Los Erlenmeyers se inocularon con los microorganismos en fase de crecimiento exponencial tardía (18-24 h), para alcanzar una DO inicial estandarizada de 0,1. Además, se emplearon controles de crecimiento sin Cr(VI) ni fenol y controles conteniendo ambos contaminantes, sin inocular (controles 100%). Los cultivos se incubaron en agitación orbital a 150 rpm, a 28 °C, empleando un agitador New Brunswick mod. INNOVA 40R.

A intervalos de tiempo definidos en cada experimento, se midió espectrofotométricamente el crecimiento bacteriano a una longitud de onda de 600 nm y se evaluó la concentración residual de Cr(VI) y/o fenol. En ciertos experimentos el crecimiento bacteriano se evaluó determinando la viabilidad celular por recuento celular en placa, mediante la técnica que se describe en la sección 4.4.

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y los resultados representan la media de tres repeticiones independientes.

#### **4.3.5. Ensayos de remoción de Cr(VI) o fenol**

Se evaluó la capacidad de los microorganismos en estudio para remover 10, 25, 50 y 100 mg/l de Cr(VI) en medio TY, durante 72 horas de crecimiento.

Por otro lado, los ensayos de crecimiento y degradación de fenol se efectuaron en medio TY y medio MM1. Las concentraciones de fenol empleadas fueron 100, 300, 500, 750 y 1000 mg/l.

En cada experimento se utilizaron controles sin inocular (controles 100%) y controles de crecimiento sin los contaminantes (En el caso del medio MM1, se adicionó extracto de levadura 0,3% como fuente de carbono y nitrógeno).

#### **4.3.6. Ensayos de remoción simultánea de Cr(VI) y fenol**

##### **4.3.6.1. Selección del medio de cultivo**

La eficiencia de remoción se evaluó durante 3 días en medios con diferente composición nutricional conteniendo 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol. Además de MM1 y

TY, se emplearon medios MYT 1/2, MYT1/4 y MM2. La composición de esos medios se detalla en la sección 4.6.

También se analizó la co-remediación en el efluente de la curtiembre, que fue previamente filtrado (E).

#### **4.3.6.2. Efecto de las condiciones de cultivo en la remoción simultánea**

Se cuantificó la remoción de 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol bajo diferentes temperaturas, valores de pH y velocidades de agitación. Durante 72 horas se evaluó la remoción simultánea a temperaturas comprendidas entre 20 y 40 °C, pH entre 4 y 12 (Modificado con la adición de HCl o NaOH 1N) y velocidades de agitación entre 120 y 250 rpm. Las eficiencias de remoción alcanzadas a tiempo final fueron comparadas para cada condición de manera independiente.

Además se empleó la pre-adaptación de los microorganismos a ambos compuestos como posible estrategia para mejorar su capacidad de remoción. Para ello, el cultivo bacteriano crecido *overnight* en medio TY se inoculó en TY fresco conteniendo las siguientes concentraciones de los contaminantes:

- Cr(VI) 2,5 mg/l y fenol 100 mg/l
- Cr(VI) 5,0 mg/l y fenol 100 mg/l
- Cr(VI) 2,5 mg/l
- Fenol 100 mg/l

Dicho cultivo se utilizó posteriormente como inóculo para los ensayos de remoción de 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol. Se graficó la concentración residual de cada contaminante a lo largo de todo el experimento.

#### **4.3.6.3. Efecto de la concentración inicial de los contaminantes en la co-remoción**

Estos experimentos se realizaron empleado las condiciones óptimas seleccionadas a partir de los ensayos anteriores. Se analizó la remoción conjunta de mezclas de diferentes concentraciones de Cr(VI) y fenol durante 5 días. Las concentraciones analizadas fueron 10, 25 y 50 mg/l de Cr(VI) con 100, 300, 500 o 750 mg/l de fenol.

#### **4.3.6.4. Remoción de Cr(VI) y fenol en un reactor de tanque agitado a escala piloto**

Para el escalado del proceso de remoción simultánea se empleó un biorreactor de tanque agitado BIOFLO 2000 (New Brunswick Scientific) con una capacidad neta operativa de 5

litros. El mismo consta de un vaso de vidrio, cuatro *baffles*, un cabezal multipuerto de acero inoxidable, una turbina propulsora de doble hélice con seis placas planas intercaladas y un dispersor de aire de acero inoxidable. El aire se insufló asépticamente mediante un compresor acoplado al equipo.

La temperatura deseada se mantuvo por un proceso de calefacción- enfriado, llevado a cabo por una plancha calefactora y un sistema de circulación de agua fría dentro del equipo.

El reactor cuenta además con un sensor de pH, y fue acoplado con un sensor de O<sub>2</sub> disuelto (DO<sub>2</sub>) operado *ex situ*.

En la figura 7 se describe el reactor utilizado.

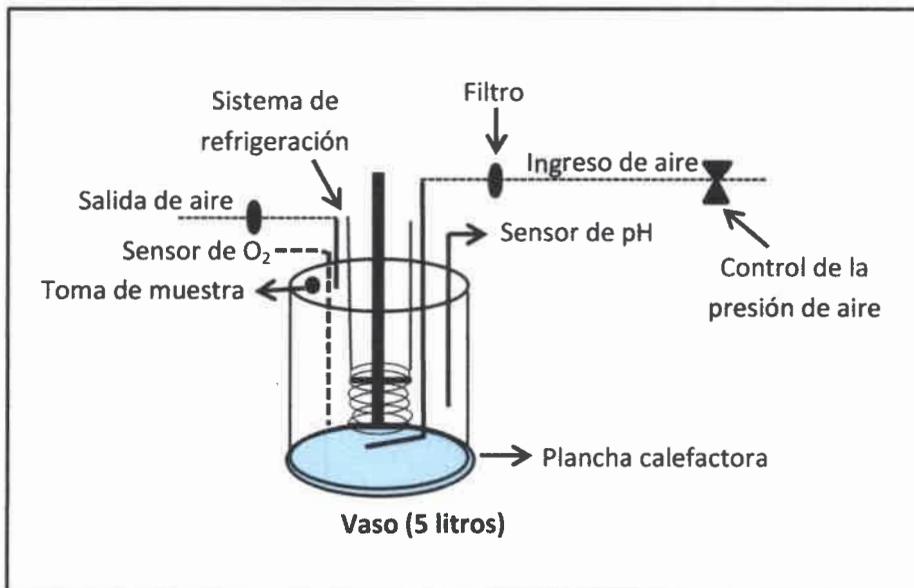


Figura 7: Esquema del reactor de tanque agitado.

El biorreactor se inoculó con el cultivo bacteriano creciendo en medio TY durante 20-24 horas empleando una relación del 7% v/v con respecto al medio de cultivo. El reactor no se usó a su máxima capacidad operativa, el volumen total de medio fue de 2 litros.

La concentración de contaminantes utilizada en los ensayos de remediación fue 25 mg/l para Cr(VI) y 300 mg/l para fenol. En estos ensayos se evaluó inicialmente el efecto de modificar la agitación de 200 a 500 rpm. Una vez seleccionada la velocidad óptima de agitación, se incrementó el influjo de aire proporcionado al sistema, de 1 vvm a 3 vvm.

Se evaluó además la implicancia de procesos físico-químicos en la remoción, empleando controles sin inocular.

Para cada experimento, se tomaron muestras de cultivo cada 8 horas y se determinó el crecimiento microbiano, pH, porcentaje de oxígeno disuelto ( $\text{DO}_2$  %) y concentración residual de cada contaminante.

#### 4.4. Determinación del crecimiento microbiano

En todos los experimentos, el crecimiento bacteriano se evaluó mediante turbidimetría, como absorbancia alcanzada a una longitud de onda de 600 nm. Además, en algunos ensayos se determinó la viabilidad celular mediante la técnica de la microgota (Spencer y Ragout, 2004). Para ello se sembraron diluciones de cada muestra en cápsulas de petri estériles con medio TY sólido. Cada placa se dividió en seis campos, en todos ellos, se sembraron tres gotas de 20  $\mu\text{l}$  de cada una de las diluciones seriadas (entre  $10^{-1}$  y  $10^{-8}$ ). Las placas se incubaron durante 24 horas en estufa a 28 °C, y posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

#### 4.5. Métodos analíticos

##### 4.5.1. Determinación de la concentración de Cr(VI)

Para la determinación de Cr(VI) se empleó el método de DFC descrito en APHA (1989) modificado. Para ello, se incorporaron 500  $\mu\text{l}$  de muestra previamente centrifugada, a 4,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada y luego se agregaron  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 N (500  $\mu\text{l}$ ) y DFC 5 mg/ml (200  $\mu\text{l}$ )

Los tubos se mezclaron y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción produce color violáceo en presencia de Cr(VI). La absorbancia se leyó por espectrofotometría a 540 nm.

##### 4.5.2. Determinación de la concentración de Cr(III)

Luego de la remoción simultánea de los contaminantes bajo condiciones óptimas, se centrifugó el medio remanente y se cuantificó el contenido de Cr(III) en sobrenadante y biomasa. Para ello, el *pellet* celular se secó en estufa a 65 °C hasta alcanzar peso constante. El contenido de Cr(III) de ambas muestras se determinó mediante la técnica de espectrometría de emisión de plasma acoplado inductivamente. Los resultados se expresaron como porcentajes, con respecto al Cr(VI) incorporado inicialmente.

#### 4.5.3. Determinación de la concentración de fenol

Se realizó por el método colorimétrico de 4-AAP descrito por Wagner y Nicell (2002). La muestra a analizar se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. Para la cuantificación del contaminante se emplearon 100  $\mu$ l de sobrenadante de muestra pura o diluida, que se agregaron a 700  $\mu$ l de bicarbonato de sodio (0,25 M pH 8,4). Posteriormente se produjo la condensación de fenol con 4-AAP 20,8 mM (100  $\mu$ l), seguida de la oxidación con  $K_3Fe(CN)_6$  83,4 mM (100  $\mu$ l), para generar un producto de color rojizo.

Los tubos se homogeneizaron en un agitador vórtex y se incubaron durante 6 min a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la absorbancia a 510 nm, empleando un espectofotómetro Beckman 640.

#### 4.6. Composición de los medios de cultivo utilizados

Los medios empleados fueron:

- **Medio TY** (Beringer, 1974): tripteína 5 g/l; extracto de levadura 3 g/l y  $CaCl_2$  0,52 g/l
- **Medio MYT1/2**: tripteína 2,5 g/l; extracto de levadura 1,5 g/l y  $CaCl_2$  0,26 g/l.
- **Medio MYT1/4**: tripteína 1,3 g/l; extracto de levadura 0,7 g/l y  $CaCl_2$  0,13 g/l.
- **Medio mineral MM1**:  $KH_2PO_4$  9,0 g/l;  $Na_2HPO_4$  2 g/l; NaCl 2,5 g/l;  $NH_4Cl$  1,0 g/l. En algunos experimentos de remoción de fenol se incorporó extracto de levadura (0,3%) como suplemento nutritivo.
- **Medio mineral MM2**:  $NH_4Cl$  1,0 g/l;  $CaCl_2 \cdot H_2O$  0,5 g/l;  $K_2HPO_4$  0,5 g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g/l;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,001 g/l.

Todos los medios presentaron un pH de alrededor de 6,8. Los medios sólidos se prepararon agregando agar (12-13 g/l).

#### 4.7. Reactivos empleados

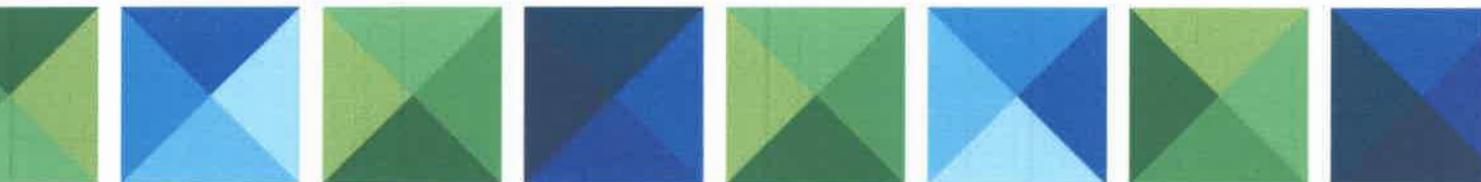
El Cr(VI) utilizado en todos los medios de cultivo se adicionó como  $K_2Cr_2O_7$  de grado analítico (Sigma). El fenol (Merck) presentó una pureza del 99,9%, al igual que el resto de los reactivos empleados para la determinación de la concentración residual de los contaminantes.

#### 4.8. Análisis estadístico

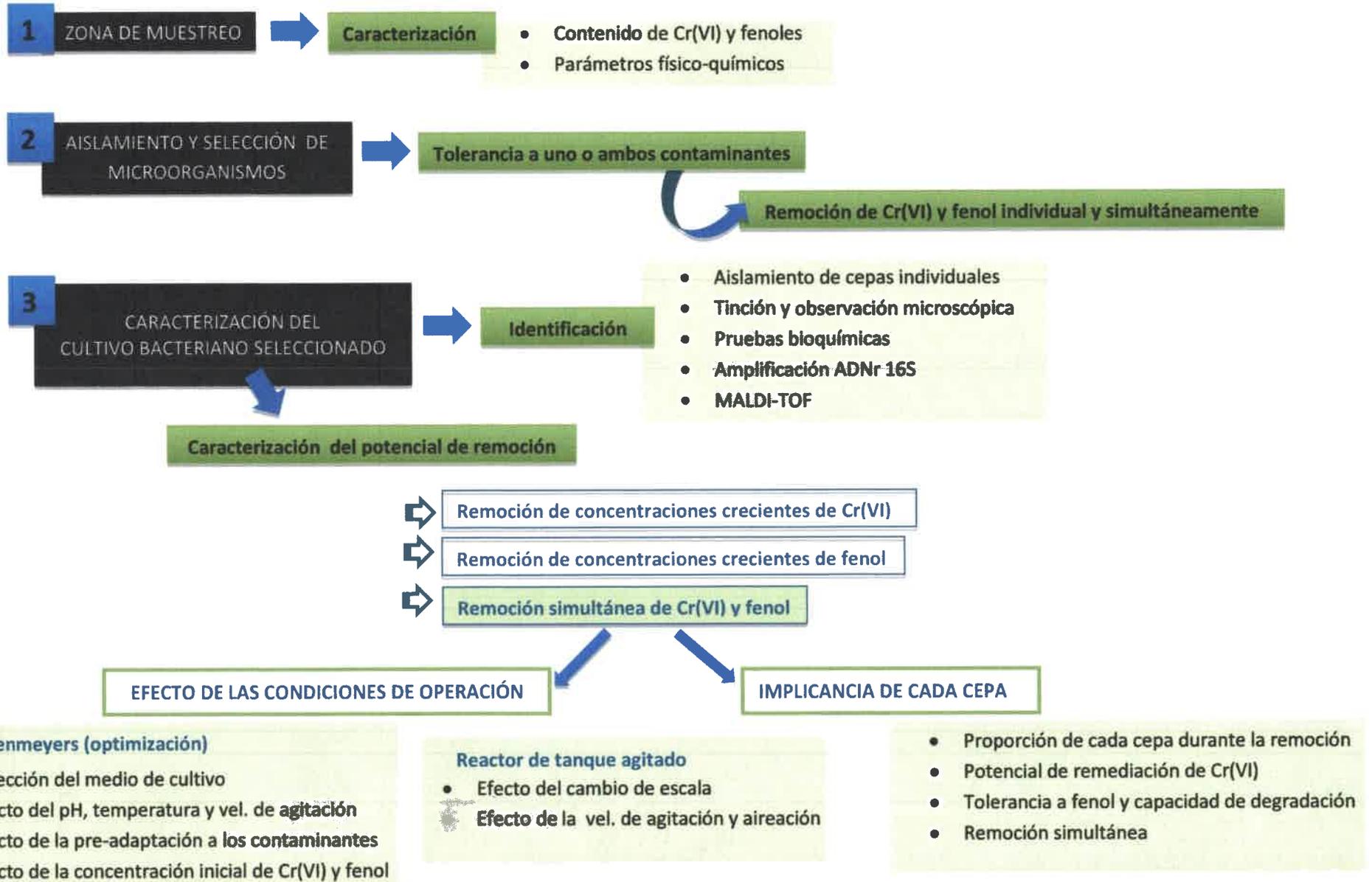
Todos los ensayos se realizaron independientemente, por triplicado, para establecer la variabilidad de los datos.

El análisis estadístico de los datos se efectuó mediante el paquete *Infostat*, versión estudiantil. Se analizaron los supuestos de homogeneidad de varianza y de normalidad, mediante los test de Levene y Shapiro Wilks, respectivamente. En caso de cumplirse los supuestos con los datos crudos o transformados, se efectuó el análisis de la varianza de una vía ANOVA. De lo contrario, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal Wallis. El análisis *a posteriori* se realizó empleando el test de Tukey con un nivel de significación de 0,05.

## Resultados y discusión

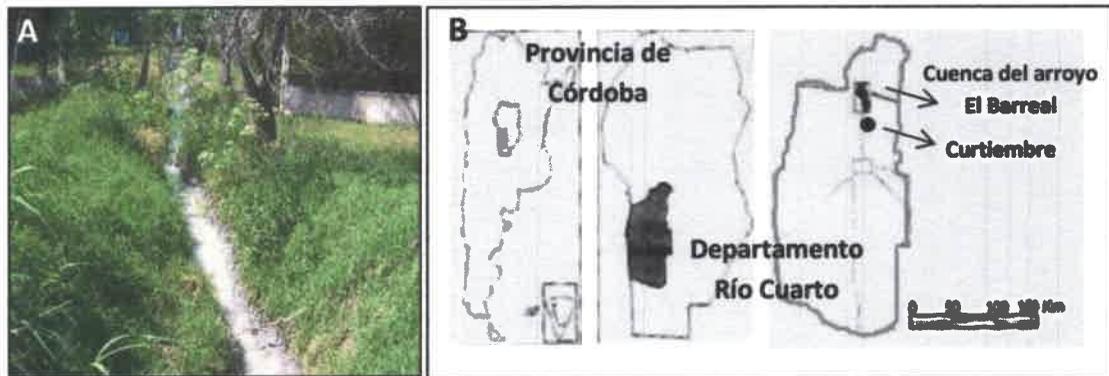


## Organización de los resultados del primer capítulo



### 5.1. Caracterización de la zona de muestreo

Se tomaron muestras de efluentes y sedimentos del canal de vertido a cielo abierto de una curtiembre ubicada en la localidad de Elena, Córdoba, Argentina. Dicho canal desemboca finalmente en un humedal conectado con el arroyo El Barreal. La localización exacta del sitio de muestreo es  $32^{\circ} 41' 26''$  S,  $64^{\circ} 43' 16''$  O. En la figura 8 se observa el canal de muestreo (A) y la ubicación geográfica de la curtiembre y la cuenca del arroyo El Barreal (B).



**Figura 8:** Canal a cielo abierto de descarga del efluente de curtiembre (A) y ubicación geográfica de la curtiembre y de la cuenca del arroyo El Barreal (B) (Imagen extraída de Matteoda y col., 2009).

Durante el periodo 2011-2012 se realizaron 5 muestreos, en los meses de marzo, mayo, agosto, noviembre y diciembre. Aunque la temperatura fluctuó de forma estacional, el pH fue alcalino en todos los casos, alcanzando un valor promedio de 10. Los datos más relevantes de la caracterización físico-química del efluente y del análisis del contenido de Cr y fenoles totales en efluente y sedimento se resumen en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1:** Parámetros físico-químicos obtenidos de muestras del efluente de curtiembre

Parámetro analizado	Valores promedio	Valores permitidos*
pH	10 ( $\pm 2$ )	6,5-10
Sól. Sedimentables (10 min)	Presenta	Ausentes
Sólidos Disueltos totales (mg/l)	18000 ( $\pm 700$ )	200-600
Alcalinidad total	860 ( $\pm 90$ )	NR (Máx. 400)
Conductividad eléctrica ( $\mu S/cm$ 20 °C)	8600 ( $\pm 1300$ )	3000
Bicarbonatos (mg/l)	910 ( $\pm 25$ )	NR (Máx. 300)
Sodio (mg/l)	1200 ( $\pm 700$ )	NR (Máx. 200)
Sulfatos (mg/l)	680 ( $\pm 300$ )	Máx. 1000
DQO (mg/l)	500-2000	Máx. 250
DBO (mg/l)	200-900	Máx. 50

\* Límites establecidos para aguas industriales y/o aguas de vertido a fuentes hídricas superficiales. Recopilación de datos de diferentes legislaciones Nacionales: Ley 24.051 de Residuos Peligrosos, Ley de Aguas (Decreto 849/1986), y Decretos Provinciales 415/99 (Córdoba), 336/03 (Bs As), 35/95 (Mendoza), 847/92 (Chaco).

NR: No Reglamentado para aguas de vertido. Los valores indicados entre paréntesis corresponden a los reglamentados para Agua Potable según capítulo XII del CAA Art. 983.

**Tabla 2:** Contenido de Cr y fenoles totales en efluente y sedimento de la zona de muestreo

Parámetro analizado	Valores determinados	Valores permitidos*	
		Uso Industrial	Uso humano
Cr total en sedimento (mg/kg)	2500- 6770	800 <sup>1</sup>	250 <sup>3</sup>
Cr total en efluente (mg/l)	1000- 10000	2 <sup>2</sup>	0,05 <sup>4</sup>
Cr(VI) en efluente (mg/l)	0,01-0,15	0,2 <sup>2</sup>	0,005 <sup>4</sup>
Fenoles totales en sedimento (mg/kg)	< 0,1	10	1
Fenoles totales en efluente (mg/l)	10,8- 17,5	0,1 <sup>2</sup>	0,001 <sup>4</sup>

\*<sup>1-3</sup> Concentración máxima permitida por la Ley de Residuos Peligrosos, para suelos de uso industrial y residencial, respectivamente.

\*<sup>2</sup> Concentración máxima permitida por la Ley de Residuos Peligrosos para aguas de vertido a fuentes hídricas fluviales.

\*<sup>4</sup> Límite máximo permitido para agua potable por el CAA.

Como puede observarse en las tablas 1 y 2, varios parámetros físico-químicos de los efluentes industriales todavía no están correctamente reglamentados. Sin embargo, ciertas medidas como el contenido de sólidos en suspensión, la conductividad eléctrica, DBO y DQO, sobrepasaron ampliamente los límites establecidos para aguas industriales liberadas a fuentes fluviales. Los elevados niveles de DBO y DQO son indicadores del elevado contenido de materia orgánica en los desechos del proceso de curtido (Hidalgo y col., 2003). La descarga de efluentes ricos en materia orgánica en fuentes de agua como ríos o arroyos, puede provocar fenómenos tales como la eutrofización, que conlleva a graves desequilibrios ecológicos.

Esta situación empeora si se tiene en cuenta que tanto el efluente analizado como los sedimentos en contacto con él presentaron contaminación por Cr y/o fenoles. La concentración de Cr en sedimentos varió en las diferentes muestras, pero en todas excedió ampliamente los niveles máximos permitidos por la Ley Nacional de Residuos Peligrosos para suelos de áreas industrializadas. El contenido del metal en el efluente, por el contrario, fue aceptable de acuerdo a la legislación para aguas de vertido. En ese sentido, el contenido de Cr reportado en diferentes efluentes de curtido a nivel internacional fue variable, en algunos casos se encontró por debajo de los niveles detectables (Brigden y col., 2000) y en otros excedió varias veces los límites permitidos (Dhungana y col., 2008). Sin embargo, un factor común en todos ellos es que la especie preponderante del metal fue Cr(III), lo cual se fundamenta en que la forma trivalente es la que se emplea en el proceso de curtido. El Cr(III) es muy insoluble y tiende a precipitar sobre las partículas de suelo.

Nuestros resultados concuerdan con los aportados por investigaciones preexistentes, que indican contaminación por Cr en la zona de la curtiembre en estudio. Por ejemplo, Matteoda y col. (2009) reportaron concentraciones de Cr superiores a las permitidas en el humedal conectado con el arroyo El Barreal, como así también en la vegetación situada en el ámbito de la laguna donde desemboca el efluente. Estos autores detectaron la presencia de un fenómeno de desorción de Cr de la fase sólida y su paso hacia el agua, lo cual acrecienta el problema de contaminación de la zona en estudio.

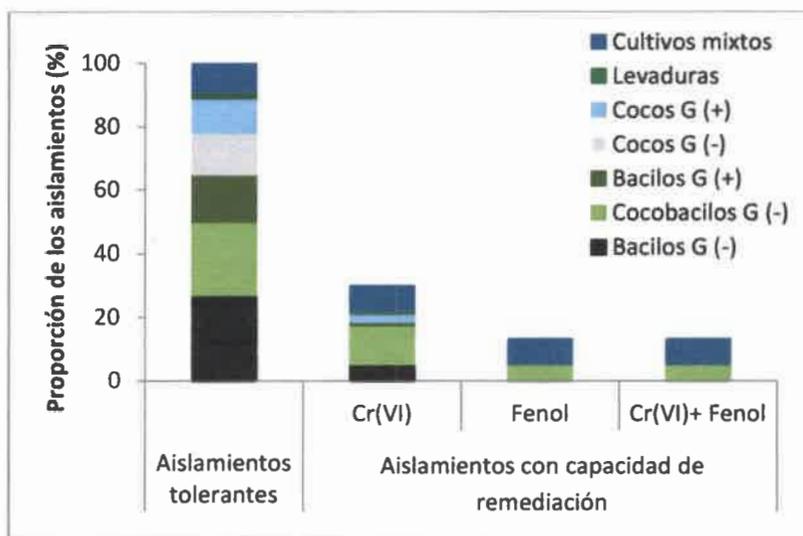
Por otro lado, la concentración de fenoles en el efluente superó significativamente los límites permitidos, pero no fue detectable en sedimentos. El fenol y sus derivados se emplean en tratamientos post-curtido y se encuentran entre los principales contaminantes liberados por las curtiembres (Costa y Olivi, 2009; Chandra y col., 2011).

## **5.2. Aislamiento y selección de microorganismos para remediación de Cr(VI) y fenol**

Con el fin de obtener bacterias tolerantes y potencialmente biorremediadoras de Cr(VI) y fenol se realizó el aislamiento de microorganismos a partir de las muestras de efluentes y sedimentos previamente caracterizados. En primera instancia, se seleccionaron 38 aislamientos capaces de tolerar hasta 100 mg/l de Cr(VI) o 200 mg/l de fenol en medio TY. De éstos, 20 fueron obtenidos de sedimento y 18 de muestras del efluente. Los aislamientos se clasificaron en base a sus características microscópicas mediante tinción de Gram (figura 9). Como puede observarse, el mayor porcentaje correspondió a bacilos y coco-bacilos G (-) y sólo el 8% de los aislamientos fueron cultivos microbianos mixtos. Se consideraron como tales a

aquellos cultivos conteniendo dos o más cepas con características morfológicas diferentes, capaces de coexistir en presencia de elevadas concentraciones de los contaminantes.

Posteriormente se evaluó la tolerancia a mayores concentraciones de cada contaminante, como así también a diferentes combinaciones de ambos compuestos. Los 11 aislamientos más tolerantes fueron nombrados y clasificados en base a su procedencia (efluente "E" o sedimento "S") y su tolerancia a Cr(VI) y fenol. En la tabla 3 se indican las características morfológicas de cada uno de los 11 aislamientos seleccionados y los resultados obtenidos para cada uno de ellos en los ensayos de remoción de Cr(VI) y/o fenol. Esos datos se resumieron en la figura 9, donde se clasificó como "aislamientos con capacidad de remediación" a aquellos que removieron en 120 horas más de 15 mg/l de Cr(VI) o 50 mg/l de fenol, como así también a los que removieron al menos un 50% de cada contaminante incorporado de forma conjunta.



**Figura 9:** Clasificación de los aislamientos tolerantes a Cr(VI) y fenol en base a sus características morfológicas (tinción de Gram). Los cultivos más tolerantes, capaces de remover Cr(VI), fenol o ambos contaminantes de forma conjunta se clasificaron como "Aislamientos con capacidad de remediación".

**Tabla 3:** Descripción morfológica de los aislamientos más tolerantes a Cr(VI) y fenol. Capacidad de remoción de los contaminantes de manera individual y simultánea, por los aislamientos seleccionados en medio líquido.

Aislamiento	Nombre	Características morfológicas	Máxima tolerancia (mg/l) <sup>(A)</sup>		Máxima remoción individual (mg/l)		Máxima remoción simultánea (mg/l) <sup>(D)</sup>	
			TY	MM1	Cr(VI) <sup>(B)</sup>	Fenol <sup>(C)</sup>	Cr(VI)	Fenol <sup>(C)</sup>
1	EFC 350-1	Cocobacilos (G-)	C150-F350	C10-F350	34	9,6	10	0
2	EFC 350-2	Levaduras	C150-F350	C5-F350	31,4	0	18,7	0
3	SFC 350-1	Cocobacilos (G-) y Bacilos (G+)	C70-F500	C25-F350	30	100	17	100
4	SFC 350-2	Cocobacilos (G-)	C150-F500	C10-F350	22,5	80	13,3	60
5	SFC 200-1	Bacilos (G-)	C150-F350	C10-F200	20	8	9,5	0
6	SFC 200-2	Cocobacilos (G-)	C70-F350	C5-F200	22,5	0	17,5	0
7	SFC 100-1	Cocobacilos (G-)	C70-F350	C10-F100	22,5	0	12,4	0
8	SFC 100-2	Bacilos (G+)	C10-F350	C10-F100	30,7	0	15	0
9	SFC 350-3	Cocobacilos (G-)	C50-F500	C10-F350	17	88	12,6	79
10	SFC 500-1	Cocobacilos (G-) y bacilos (G+) esporulados	C150-F500	C25-F350	30,7	100	19,8	100
11	SFC 500-2	Cocobacilos (G-) y Bacilos (G+)	C150-F500	C10-F500	29	100	14	100

<sup>(A)</sup> Tolerancia simultánea máxima a Cr(VI) y fenol [C: Cr(VI)- F (Fenol)].

<sup>(B)</sup> Máxima remoción a partir de Cr(VI) 50 mg/l en medio TY.

<sup>(C)</sup> Máxima remoción a partir de fenol 100 mg/l en medio MM1. Cuando la remoción fue inferior a 5 mg/l se consideró 0.

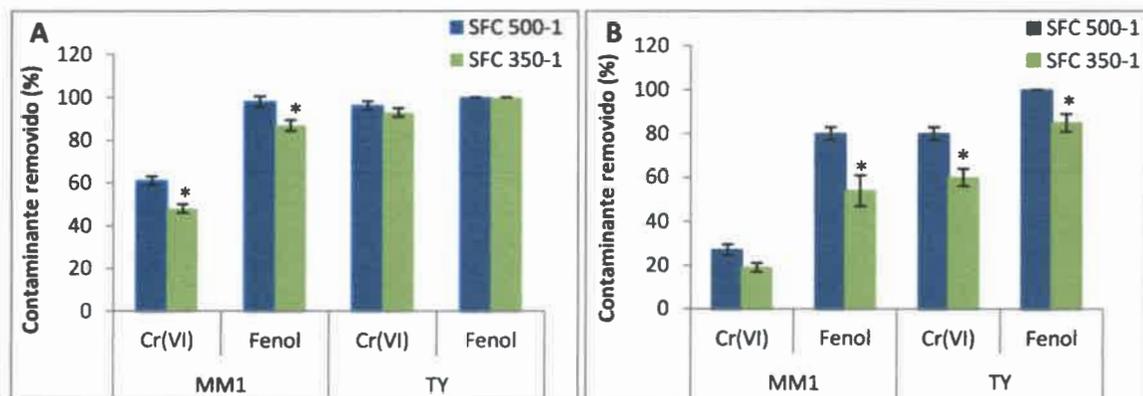
<sup>(D)</sup> Máxima remoción a partir de Cr(VI) 25 mg/l y fenol 100 mg/l en medio TY.

Como se observa en la tabla 3, la tolerancia a ambos compuestos, principalmente a Cr(VI), fue mayor en medio TY que en medio mínimo MM1. Este incremento de la tolerancia en medios nutritivos es un comportamiento común de muchas cepas bacterianas y podría deberse a que la materia orgánica fácilmente asimilable no sólo favorece su crecimiento, sino que además las protege contra la toxicidad de los contaminantes (Polti y col., 2007).

Cuando se evaluó el potencial de remoción utilizando cada contaminante de manera individual, los 11 aislamientos seleccionados fueron capaces de remover entre 17 y 34 mg/l de Cr(VI) en medio TY, pero sólo 5 degradaron al menos 80 mg/l del fenol incorporado en MM1. Dos cultivos bacterianos mixtos, llamados SFC 350-1 y SFC 500-1 presentaron el mayor potencial para la co-remediación de estos compuestos. El último resultado coincide con lo descrito por algunos autores, quienes indicaron que los consorcios de bacterias serían más eficientes que los cultivos puros para remediar mezclas de contaminantes, gracias a procesos simbióticos y cooperación metabólica (Supaphol y col., 2006; Megharaj y col., 2011).

La capacidad de los dos cultivos mixtos seleccionados para remover simultáneamente Cr(VI) y fenol se evaluó en el medio mineral MM1, con fenol como única fuente de carbono y en el medio nutritivo TY. Como se observa en la figura 10, la remoción de los contaminantes por ambos cultivos bacterianos dependió tanto del medio de crecimiento empleado como de la concentración inicial de Cr(VI) incorporada.

La comparación de los resultados obtenidos por ambos cultivos mixtos reveló que SFC 500-1 presentaría mayor potencial para co-remediar los contaminantes que SFC 350-1, principalmente en presencia de una mayor concentración inicial de Cr(VI). En medio MM1 conteniendo 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol (figura 10B), SFC 500-1 removió más del 25% del metal (alrededor de 6 mg/l) y degradó casi la totalidad del fenol incorporado. Dicho cultivo bacteriano fue más eficiente aún en medio TY, ya que removió hasta 20 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol en tres días de incubación.



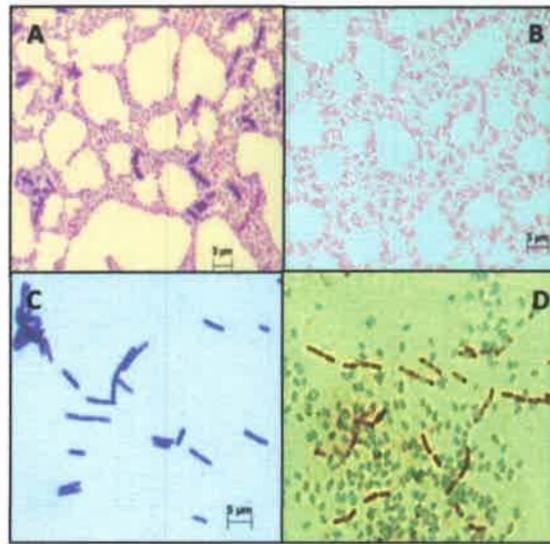
**Figura 10:** Remoción simultánea de 10 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol (A) ó 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol (B) por dos cultivos mixtos en diferentes medios de cultivo. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (DES) ( $p < 0,05$ ) en la remoción de cada contaminante alcanzada por ambos cultivos analizados.

Los resultados de remoción previamente descritos concuerdan con los obtenidos en los ensayos de tolerancia, demostrándose que el medio TY, con elevado contenido de nutrientes favorecería el crecimiento y el potencial de remediación de los microorganismos. Sin embargo, es importante destacar que las concentraciones de Cr(VI) y fenol removidas por el cultivo mixto SFC 500-1 en el medio mineral MM1 coinciden con los valores reportados en diversos efluentes industriales y aguas contaminadas, que superan ampliamente los límites permitidos por diferentes reglamentaciones internacionales (Vajpayee y col., 2001; Tripathi y col., 2011).

### 5.3. Caracterización del cultivo mixto SFC 500-1

#### 5.3.1. Caracterización bioquímica y clasificación taxonómica

En base a los resultados obtenidos en ensayos anteriores, se seleccionó al cultivo mixto SFC 500-1 para continuar con los experimentos de remoción. El mismo se compone de dos cepas bacterianas cuyas morfologías corresponden a cocobacilos Gram negativos (cepa 1) y bacilos Gram positivos esporulados (cepa 2). En la figura 11 se muestran las fotografías obtenidas luego de la tinción de Gram del cultivo mixto y cada cepa por separado. Además, se utilizó la tinción de verde de malaquita para la visualización de esporas en la cepa 2.



**Figura 11:** Microfotografías obtenidas con tinción de Gram del cultivo mixto SFC 500-1 (A), y de las cepas 1 (B) y 2 (C). La cepa 2 se visualizó además por tinción con verde de malaquita (D). La barra indica una escala de 5  $\mu\text{m}$ . Aumento: 1000 X.

Mediante la utilización de pruebas comerciales API se efectuó la caracterización bioquímica de las dos cepas. Los perfiles de coloración de las galerías API fueron interpretados siguiendo las indicaciones de los fabricantes y los resultados más destacados se muestran en la tabla 4. Además, en esta tabla se indica la morfología y el tamaño promedio de las células bacterianas determinado mediante microscopía óptica, como así también la actividad catalasa y oxidasa y el resultado de los ensayos de movilidad.

**Tabla 4:** Características morfológicas y bioquímicas de las cepas que componen el cultivo mixto SFC 500-1.

Características	Cepa 1	Cepa 2
<b>Morfología</b>	Cocobacilos G(-)	Bacilos G(+) esporulados
Tamaño (promedio)	0,7 $\mu\text{m}$	2,2 $\mu\text{m}$
<b>Movilidad</b>	-	+
<b>Producción de enzimas</b>		
Catalasa	+	-
Oxidasa	+	+
Proteasa	-	+
$\beta$ -glucosidasa	-	+
Ureasa	-	+
$\beta$ -galactosidasa	-	-
<b>Asimilación de fuentes de carbono</b>		
Glucosa	-	-
Fructosa	-	+
Maltosa	+	+
Manosa	+	+
Sacarosa	-	+
Ramnosa	-	-
Manitol	-	-
Sorbitol	-	-
N-acetilglucosamina	-	+
Ac. Glucónico	+	+
Ác. Cáprico	+	-
Ác. Adípico	+	-
Ác. Málico	+	-
Ác. Cítrico	+/-	-
Ác. Fenilacético	+	-

Para la identificación y clasificación taxonómica de ambas cepas se realizó en primer lugar la secuenciación del gen codificante para el ARNr 16S. La secuencia correspondiente a la cepa 1, mostró similitud con secuencias de especies del género *Acinetobacter* en un 99%. La secuencia de este gen, de 1473 pb, fue cargada en GenBank bajo el código de acceso JX198426 y la cepa se denominó *Acinetobacter* sp. SFC 500-1A.

Las relaciones filogenéticas entre *Acinetobacter* sp. SFC 500-1A y otras cepas de este género se representan en el dendograma de la figura 12, construido a partir de las secuencias

del gen ADNr 16S. Como se puede observar, esta cepa formó parte de un *cluster* que incluyó a cepas de *A. guillouiae*.

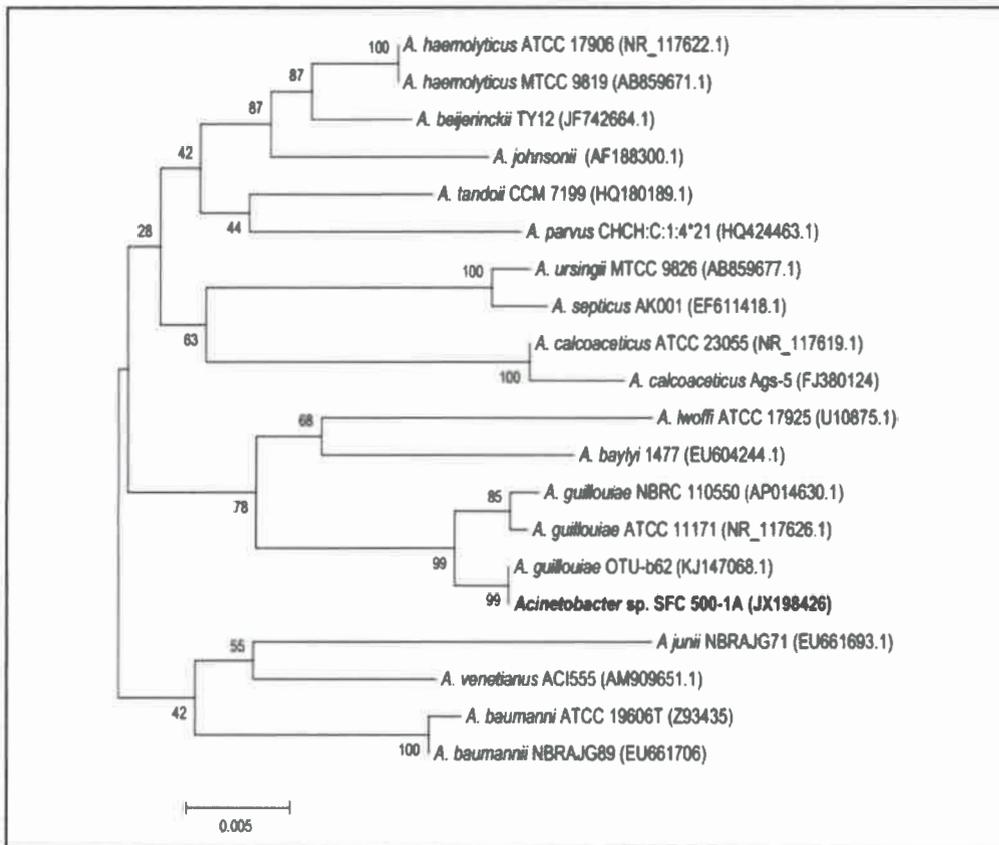


Figura 12: Árbol filogenético correspondiente a la cepa 1.

Por otra parte, el fragmento correspondiente a la cepa 2, de 1431 pb presentó elevada similitud (99-100%) con secuencias de especies del género *Bacillus*, especialmente con las especies *cereus* y *thuringiensis* (figura 13). Dicha secuencia fue cargada en GenBank bajo el número de acceso JQ701739. El segundo miembro del cultivo mixto se denominó *Bacillus* sp. SFC 500-1E.

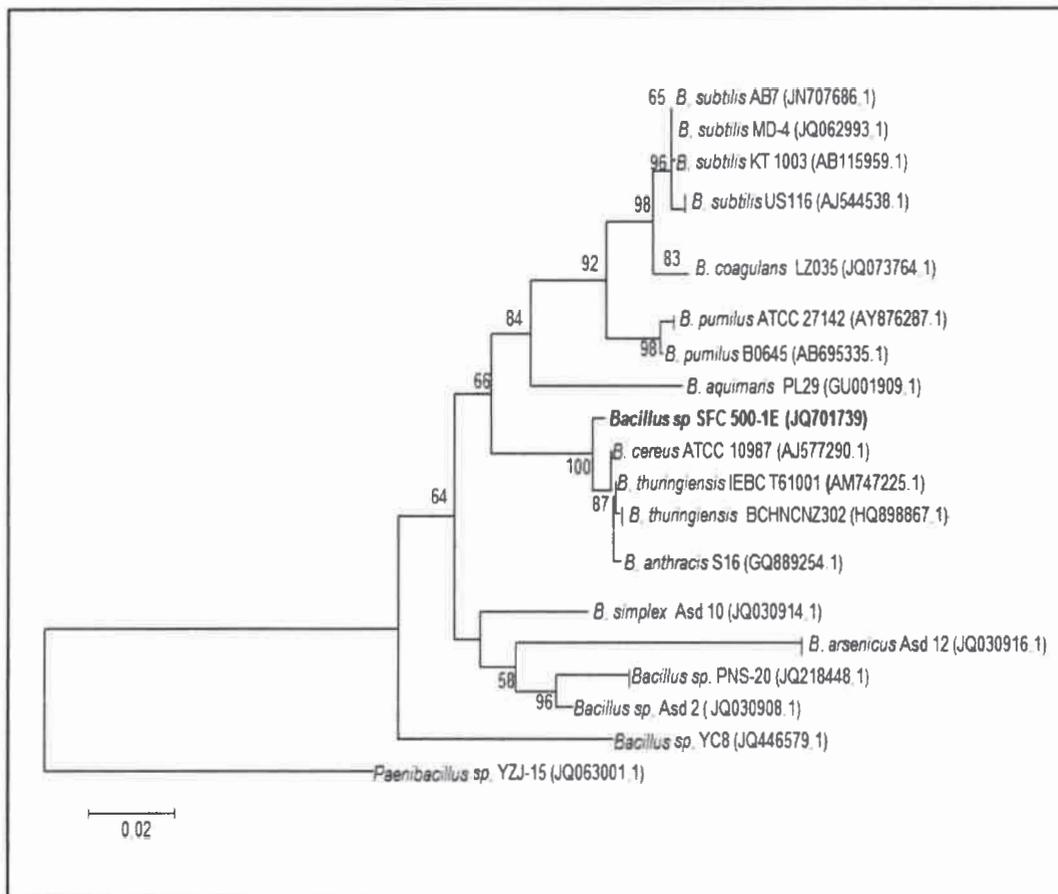


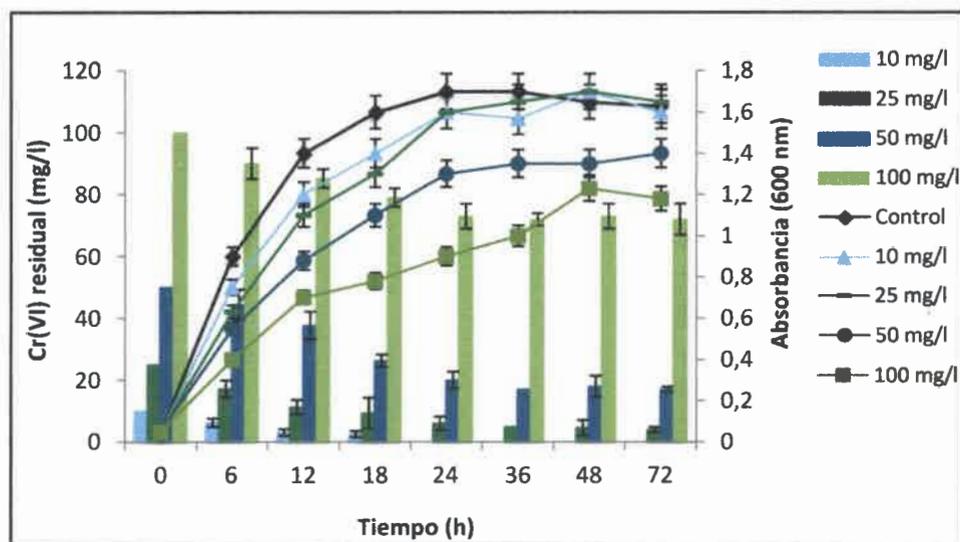
Figura 13: Árbol filogenético correspondiente a la cepa 2

La espectrometría de masas por desorción-ionización láser asistida por matriz y acoplada a un detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), es una técnica que ha sido adaptada para la identificación de microorganismos a nivel de especie e incluso de subespecie, que permite la obtención de resultados de una manera rápida y segura (Espinal y col., 2012). Dicha técnica se empleó para la identificación de las cepas en estudio a nivel de especie. De acuerdo a los resultados obtenidos, la cepa *Acinetobacter* sp. pertenecería a la especie *A. guillouiae* (score: 2,24), y la cepa *Bacillus* se clasificaría como *B. cereus* (score: 1,96). Como la confiabilidad de los resultados depende de los scores obtenidos, que deben ser mayores a 2, se decidió continuar nombrando a la cepa 2 como *Bacillus* sp. SFC 500-1E, mientras que la cepa 1 comenzó a denominarse *A. guillouiae* SFC 500-1A.

### 5.3.2. Remoción individual de Cr(VI) o fenol por el cultivo mixto SFC 500-1

Se analizó el crecimiento y la capacidad del cultivo mixto SFC 500-1 para remover concentraciones de Cr(VI) comprendidas entre 10 y 100 mg/l en medio TY. Los mismos parámetros se evaluaron en presencia de fenol entre 100 y 1000 mg/l, empleando los medios de cultivo TY y MM1.

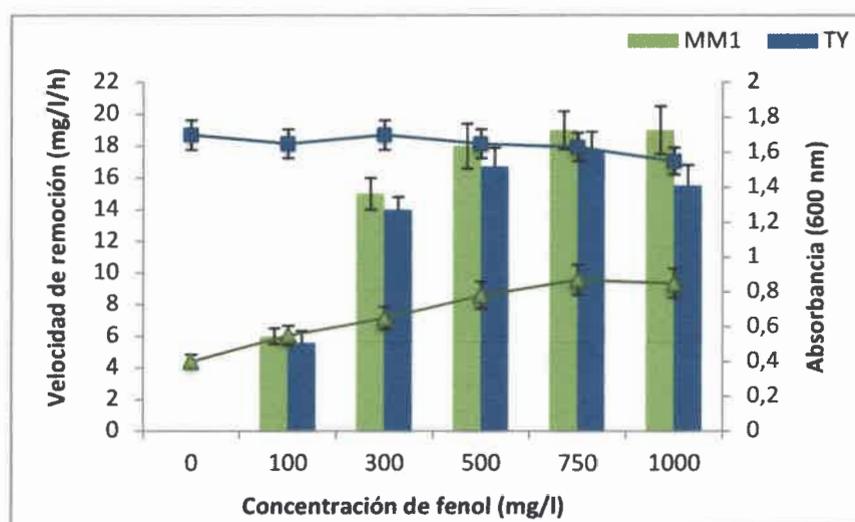
Como se observa en la figura 14 la adición de Cr(VI) en medio TY hasta 25 mg/l no afectó de forma marcada el desarrollo microbiano, pero concentraciones de 50 y 100 mg/l causaron una importante disminución en el crecimiento del cultivo mixto. A pesar de eso, SFC 500-1 removió total o parcialmente todas las concentraciones incorporadas, alcanzando un máximo potencial de remoción de 35 mg/l cuando se lo expuso a 50 mg/l del metal. La velocidad del proceso fue elevada durante las primeras 24 horas y se incrementó al aumentar la concentración de Cr(VI) de 10 a 50 mg/l.



**Figura 14:** Remoción de Cr(VI) (barras) durante el crecimiento (líneas) del cultivo mixto SFC 500-1 en presencia de diferentes concentraciones del metal. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

En cuanto a los resultados obtenidos en presencia de fenol (figura 15) este compuesto no afectó significativamente el crecimiento del cultivo mixto en el medio TY, que es nutricionalmente complejo. Por el contrario, en el medio mínimo MM1, el incremento en su concentración hasta 1000 mg/l favoreció significativamente el desarrollo bacteriano, alcanzando mayor crecimiento en presencia de este contaminante que en condiciones control.

A diferencia de lo ocurrido con Cr(VI), todas las concentraciones incorporadas de fenol (hasta 1000 mg/l) fueron completamente removidas de ambos medios de cultivo en menos de 72 horas. Por esta razón, se decidió graficar la velocidad de degradación del contaminante. Tal parámetro varió al modificarse su concentración inicial y el medio de cultivo empleado. En la figura 15 se puede observar que al aumentar la concentración de fenol, en general también aumentó la velocidad de los microorganismos para removerlo completamente. Esta tendencia fue similar en ambos medios de cultivo, pero las mejores velocidades de remoción se obtuvieron en el medio MM1, registrándose valores superiores a 18 mg/l/h para concentraciones de fenol de 750 y 1000 mg/l.



**Figura 15:** Máximo crecimiento (líneas) y velocidad de remoción de fenol (barras) alcanzados por el cultivo mixto SFC 500-1 en presencia de concentraciones crecientes del contaminante y diferentes medios de cultivo. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

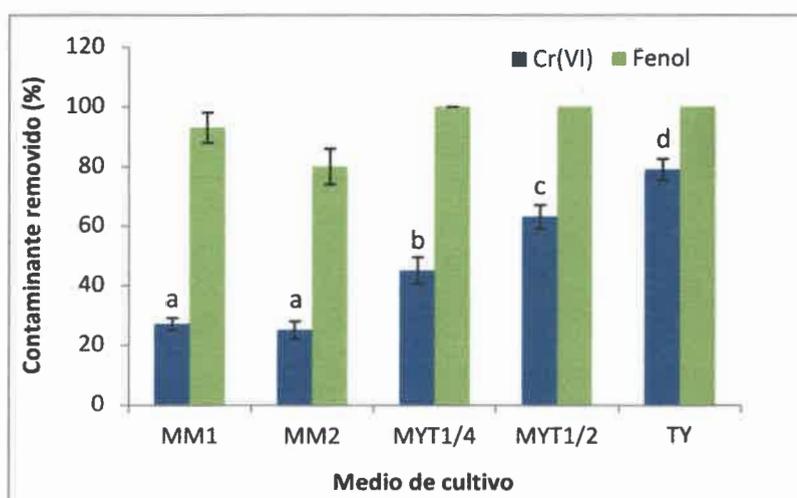
Como se puede deducir a partir de los resultados obtenidos, el Cr(VI) resultó más tóxico para el crecimiento bacteriano que el fenol, en menores concentraciones. Esto podría deberse a que el Cr(VI) no es un metal esencial para los microorganismos, mientras que el fenol, por ser un compuesto orgánico, es susceptible a la degradación enzimática y podría ser empleado como fuente de carbono (Basha y col., 2010).

Por otro lado, se demostró que la remoción de Cr(VI) por el sistema en estudio se limitaría con el tiempo de cultivo. El consumo de fuentes de electrones en el medio o la pérdida de células activas y la muerte celular causadas por el fuerte potencial oxidativo del Cr(VI) podrían explicar tal comportamiento (Ramírez-Díaz y col., 2008). Contrariamente, el

cultivo mixto demostró una elevada eficiencia para la remoción de fenol en condiciones nutricionales diversas, incluso en el medio TY, que contiene fuentes de carbono fácilmente asimilables. Este resultado revela su elevado potencial para ser aplicado en la remoción de fenol en ambientes de diversa composición, y le otorga ciertas ventajas con respecto a algunas bacterias que mostraron represión catabólica durante la degradación de compuestos orgánicos en presencia de otras fuentes de carbono (Ribeiro Bastos y col., 2000). Por otro lado, el crecimiento bacteriano asociado al proceso de remoción en un medio mineral sugiere que el cultivo mixto en estudio sería capaz de metabolizar el contaminante, empleándolo como fuente de carbono.

### 5.3.3. Remoción simultánea de Cr(VI) y fenol en diferentes medios de cultivo

Si bien se comprobó la capacidad del cultivo mixto SFC 500-1 para tolerar y remover simultáneamente ciertas concentraciones de Cr(VI) y fenol, esas determinaciones se realizaron en dos condiciones nutricionales extremas, es decir, en un medio rico y un medio mineral conteniendo sólo fenol como fuente de carbono. Con el fin de analizar el comportamiento de este sistema biológico para co-remediar ambos compuestos en condiciones nutricionales intermedias y seleccionar un medio de cultivo óptimo para continuar con los ensayos, se evaluó su eficiencia de remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) en medios con diferente contenido de nutrientes.



**Figura 16:** Remoción simultánea de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) por el cultivo mixto SFC 500-1 en diferentes medios de cultivo sintéticos, tras 72 horas de incubación. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Letras diferentes indican DES entre los porcentajes de remoción de Cr(VI) obtenidos bajo condiciones distintas.

En esos experimentos se logró una elevada remoción de fenol en todas las condiciones analizadas, pero la remoción de Cr(VI) varió según el medio de cultivo empleado. La figura 16 muestra que en los medios minerales con fenol como única fuente de carbono (MM1 y MM2), la remoción de Cr(VI) no excedió el 27%. Sin embargo, los porcentajes de remoción se incrementaron significativamente por encima de 45% y 62% cuando se emplearon medios conteniendo concentraciones crecientes de extracto de levadura y tripteína como fuentes adicionales de electrones (MYT1/4 y MYT1/2, respectivamente), obteniéndose los mejores resultados (80%) en el medio nutritivo TY. De manera similar, el crecimiento registrado fue mayor en aquellos medios nutricionalmente más ricos (Resultados no graficados).

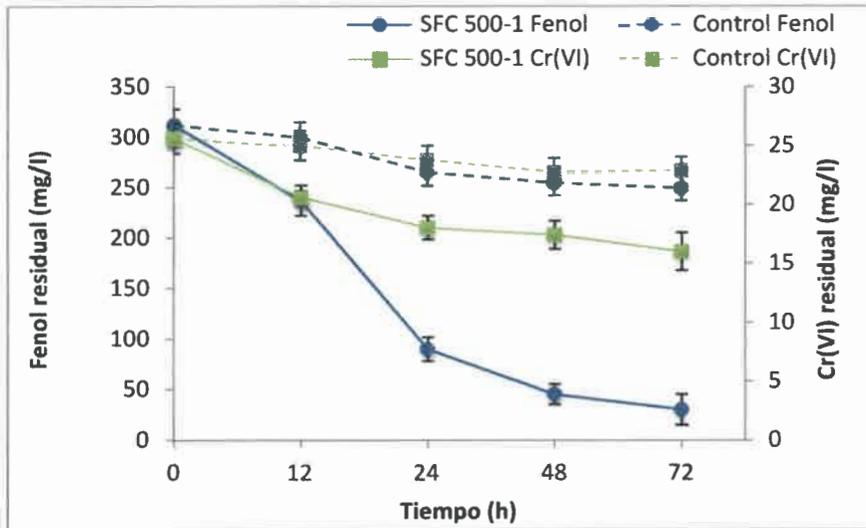
En los controles no inoculados, no se detectó remoción significativa de los contaminantes hacia el final de los experimentos, por lo cual se asume que el proceso dependió exclusivamente del metabolismo microbiano y no de factores abióticos.

Los resultados obtenidos permitirían seleccionar al medio TY como el más propicio para estimular la capacidad de biorremediación del cultivo mixto y correlacionar la remoción de Cr(VI) con la composición nutricional del medio empleado, considerando que la eficiencia del proceso fue mayor cuanto mayor contenido de materia orgánica tenía el medio. De forma similar, la utilización de medios de cultivo nutricionalmente complejos ha potenciado la capacidad de remoción de Cr(VI) de diversos microorganismos (Polti y col., 2007). Además, la incorporación de fuentes de electrones adicionales, como glucosa, ha sido planteada como una estrategia de bioestimulación para la remediación simultánea de Cr(VI) y contaminantes orgánicos por otros sistemas biológicos (Chirwa y Smit, 2010).

Los efluentes industriales contaminados con Cr(VI) y fenol suelen presentar variaciones periódicas en su composición y pueden ser tan pobres nutricionalmente como aquellos provenientes de industrias químicas y metalúrgicas o contener elevadas concentraciones de materia orgánica, como los efluentes de curtiembre, procesado de papel o industrias textiles (Tiku y col., 2010; Tripathi y col., 2011; Gunasundari y Muthukumar, 2013). Si se considera esa información, es destacable la capacidad del cultivo mixto para remover, en mayor o menor medida, ambos contaminantes en medios de cultivo con diferente concentración de nutrientes.

Para evaluar la aplicabilidad del cultivo mixto en un efluente real, se analizó durante 3 días la remoción simultánea de Cr(VI) y fenol en el efluente de curtiembre, recolectado en dos oportunidades independientes. En dichos experimentos se observó que el cultivo mixto removió casi la totalidad del fenol y alrededor del 35% del Cr(VI) incorporado. Tal resultado se debió probablemente a la acción sinérgica de la flora nativa con el cultivo mixto, considerando

que los controles con el efluente sin inocular presentaron capacidad de remediación (figura 17).



**Figura 17:** Remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) en un efluente de curtiembre por el cultivo mixto SFC 500-1 y por la flora nativa (control). Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

Lo más relevante de estos resultados es que SFC 500-1 no sólo sería capaz de remover los contaminantes en medios sintéticos, sino también en un efluente real, donde las condiciones de crecimiento no son las óptimas y además existe flora microbiana nativa, que puede alterar el desarrollo de bacterias exógenas. A lo largo de esta tesis, los experimentos continuarán llevándose a cabo en medios sintéticos, pero estos resultados constituyen una evidencia del potencial que el cultivo mixto presentaría para la remoción simultánea en aguas residuales de origen industrial.

#### 5.3.4. Crecimiento y proporción de cada cepa durante el proceso de remoción

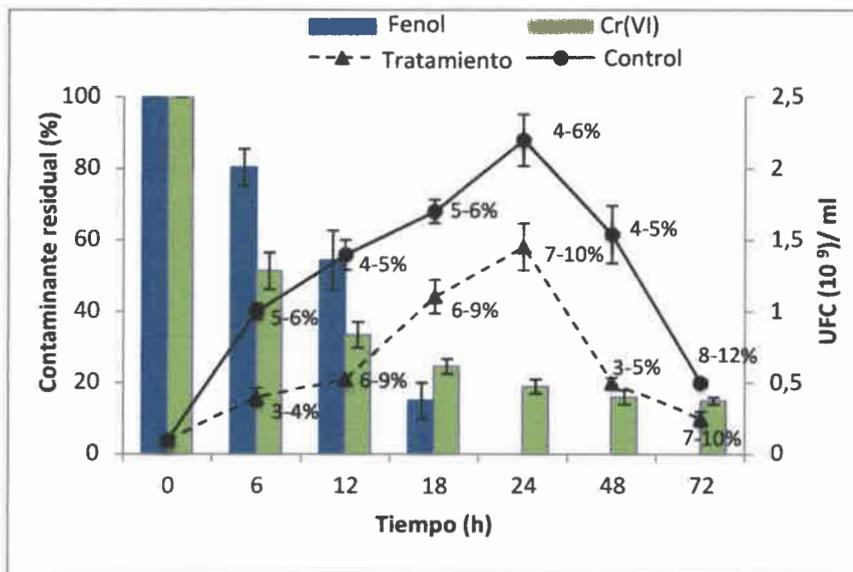
Se evaluó el recuento bacteriano durante la remoción simultánea de 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol en medio TY, bajo condiciones óptimas.

La figura 18 muestra que el número de células se incrementó en más de un logaritmo a lo largo de las primeras 24 horas de incubación, detectándose una marcada prevalencia de *A. guillouiae* con respecto a *Bacillus* sp., en una relación superior a 90:10 en la mayoría de los tiempos analizados. De manera similar, algunos autores establecieron que la abundancia relativa de las cepas que componen ciertos consorcios bacterianos de ambientes

contaminados permanece constante durante el proceso de remoción. Además, aquellos microorganismos con mayor capacidad de biorremediación suelen encontrarse en una proporción más elevada que los que no la poseen (Desai y col., 2009). La mayor proporción de *A. guillouiae* en el cultivo mixto podría estar relacionada, por lo tanto, con su implicancia en el proceso de remoción.

Por otro lado, la remoción se asoció directamente con el crecimiento microbiano, observándose un máximo durante las primeras 24 horas.

Estos resultados plantean la necesidad de comprender la función de cada cepa y su capacidad individual para remover los contaminantes en estudio.



**Figura 18:** Crecimiento del cultivo mixto SFC 500-1 en presencia (tratamiento) y ausencia (control) de Cr(VI) y fenol y remoción de ambos contaminantes a lo largo del tiempo. Las barras representan la concentración residual de cada contaminante a lo largo del tiempo y las líneas, la tendencia del crecimiento bacteriano. Los porcentajes sobre cada punto de la curva indican la proporción de *Bacillus* sp. en relación al recuento total. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

#### 5.4. Implicancia de *A. guillouiae* y *Bacillus* sp. en la remoción de los contaminantes

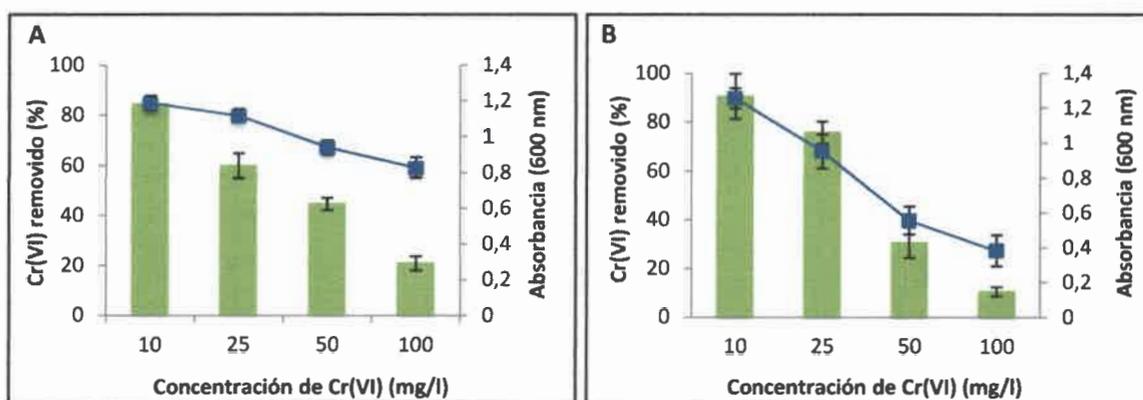
##### 5.4.1. Tolerancia y remoción de Cr(VI)

Se analizó durante 72 horas la capacidad de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E para crecer en medio TY conteniendo Cr(VI) (10-100 mg/l) y remover el compuesto.

Los dos microorganismos crecieron en presencia del metal, aunque su comportamiento varió con la concentración evaluada. El efecto negativo del Cr(VI) fue más

evidente sobre el crecimiento de *Bacillus* sp. que sobre el de *A. guillouiae* (figura 19A y B). En esta figura puede observarse además, que ambos microorganismos removieron elevados porcentajes de 10 y 25 mg/l de Cr(VI), siendo más eficiente *Bacillus* sp. Sin embargo, cuando la concentración se incrementó a 50 y 100 mg/l, *A. guillouiae* alcanzó mayores porcentajes de remoción.

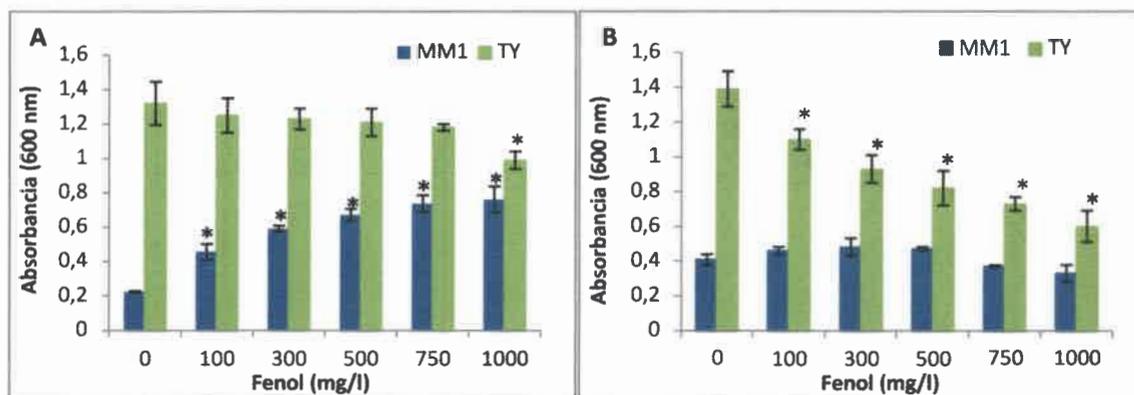
Estos resultados demuestran que el potencial del cultivo mixto para remediar Cr(VI) en las condiciones evaluadas sería producto de la actividad sinérgica de los microorganismos que lo componen y no sólo de uno de ellos.



**Figura 19:** Máximo crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de Cr(VI) (líneas) y remoción del metal (barras) por *A. guillouiae* (A) y *Bacillus* sp. (B) luego de 72 horas de incubación. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

#### 5.4.2. Tolerancia y remoción de fenol

En secciones anteriores se demostró una correlación entre el crecimiento del cultivo mixto y la remoción de fenol. Sin embargo, queda por comprender la capacidad de cada cepa para tolerar el compuesto y la influencia de éstas en el proceso de remoción/degradación del mismo. Por lo tanto, se evaluó en primer lugar el crecimiento de *A. guillouiae* y *Bacillus* sp. durante 72 horas en dos medios de cultivo diferentes, conteniendo concentraciones crecientes de fenol (100-1000 mg/l).

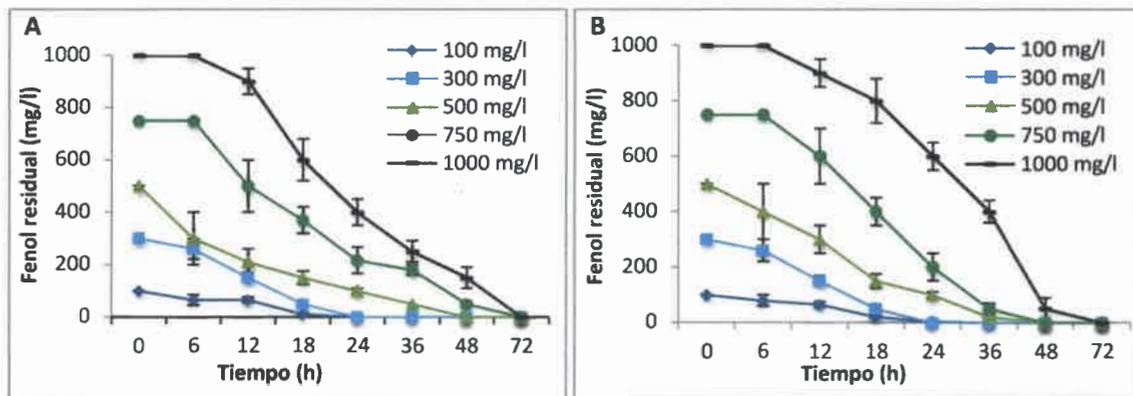


**Figura 20:** Máximo crecimiento alcanzado por *A. guillouiae* (A) y *Bacillus sp. SFC 500-1E* (B) en 72 horas en dos medios de cultivo con diferentes concentraciones de fenol. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Los asteriscos indican DES entre el crecimiento en condiciones de control (fenol 0 mg/l) y los tratamientos con diferentes concentraciones del contaminante, para cada medio de cultivo empleado.

En estos ensayos se determinó que el medio TY fue el más favorable para el desarrollo microbiano (figura 20). Sin embargo, la adición de fenol en este medio afectó de forma significativa el crecimiento de *Bacillus sp* ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, el crecimiento de *A. guillouiae* sólo se redujo parcialmente ante la presencia de 1000 mg/l del contaminante.

En medio MM1, las bacterias mostraron un comportamiento diferente. Mientras que el desarrollo de *A. guillouiae* fue reducido en el medio control (que contenía 0,3 g/l de extracto de levadura como suplemento nutritivo) y aumentó con el incremento de la concentración de fenol, *Bacillus sp.* alcanzó un crecimiento similar en presencia y ausencia del contaminante.

Si bien ambas bacterias crecieron en presencia de fenol, *Bacillus sp.* no fue capaz de remover concentraciones significativas del contaminante, aún después de 10 días de ensayo. Posiblemente su crecimiento basal en medio MM1 podría asociarse al consumo de los compuestos orgánicos presentes en el extracto de levadura. *A. guillouiae*, por el contrario, presentó elevada capacidad de degradación de fenol en ambos medios, coincidiendo con los resultados obtenidos con el cultivo mixto. La remoción máxima de 1000 mg/l se alcanzó entre las 48 y 72 horas en ambos medios (figura 21). Esta cepa sería, por lo tanto, la responsable de la elevada capacidad de remoción de fenol del cultivo mixto.



**Figura 21:** Remoción de fenol en medio TY (A) y MM1 (B) por *A. guillouiae*. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

En relación a los resultados obtenidos, *Acinetobacter* se conoce como un género bacteriano de gran interés científico y ambiental, debido a la capacidad de numerosas especies pertenecientes a dicho género para biodegradar, lixiviar y eliminar contaminantes orgánicos e inorgánicos peligrosos, entre otras diversas actividades biotecnológicamente importantes (El-Haleem, 2003). Sin embargo, *A. guillouiae* es una especie que se ha descrito recientemente (Nemec y col., 2010), por lo que no existe demasiada información acerca de su potencial para detoxificar compuestos de este tipo.

Por otro lado, *Bacillus* sp. fue capaz de tolerar fenol, pero no contaría con el potencial metabólico para degradarlo en las condiciones analizadas. Este comportamiento pone en evidencia el hecho de que una bacteria pueda tolerar un contaminante, no necesariamente está relacionado con su capacidad para detoxificarlo.

#### 5.4.3. Remoción de Cr(VI) en presencia de fenol: Comparación entre el cultivo mixto y los microorganismos aislados

Se evaluó la eficiencia de *A. guillouiae* y *Bacillus* sp. SFC 500-1E para remover 10, 25 y 50 mg/l de Cr(VI) en presencia de 300 mg/l de fenol. Los resultados se compararon con aquellos obtenidos por el cultivo mixto SFC 500-1, y se resumen en la tabla 5.

**Tabla 5:** Concentración de Cr(VI) removido en presencia de fenol y velocidad del proceso de remoción, utilizando cada cepa y el cultivo mixto.

Cr(VI) inicial	<i>A. guillouiae</i>		<i>Bacillus</i> sp.		Cultivo Mixto	
	Cr(VI) removido (mg/l)	Velocidad <sup>2</sup> (mg/l/h)	Cr(VI) removido (mg/l)	Velocidad <sup>2</sup> (mg/l/h)	Cr(VI) removido (mg/l)	Velocidad <sup>2</sup> (mg/l/h)
10 mg/l	8,9 ±0,6 <sup>a</sup>	0,30 ±0,03 <sup>a</sup>	9,0 ±0,5 <sup>a</sup>	0,32 ±0,02 <sup>a</sup>	9,7 ±0,3 <sup>a</sup>	0,37 ±0,04 <sup>a</sup>
25 mg/l	18,5 ±1,5 <sup>ab</sup>	0,54 ±0,1 <sup>a</sup>	16,0 ±1,0 <sup>b</sup>	0,48 ±0,1 <sup>a</sup>	19,9 ±1,1 <sup>a</sup>	0,81 ±0,04 <sup>b</sup>
50 mg/l	23,6 ±3,5 <sup>a</sup>	0,87 ±0,1 <sup>a</sup>	11,3 ±2,5 <sup>b</sup>	0,54 ±0,2 <sup>b</sup>	28,2 ±5,6 <sup>c</sup>	1,07 ±0,10 <sup>c</sup>

<sup>2</sup> Velocidad calculada hasta las primeras 24 horas.

Los datos representan la media ± EE (n=9). Letras diferentes indican DES ( $p < 0,05$ ) en las concentraciones de Cr(VI) removidas o en la velocidad de los procesos de remoción, entre los tres sistemas biológicos analizados.

En estos experimentos se observó que la remoción de 10 mg/l de Cr(VI) fue prácticamente total en los tres sistemas, sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, esta situación se modificó al incrementar las concentraciones del metal. De las dos cepas aisladas, *A. guillouiae* alcanzó el mayor porcentaje de remoción de 25 y 50 mg/l, aunque el cultivo mixto fue más eficiente en ambas condiciones. SFC 500-1 fue capaz de remover hasta 28 mg/l de Cr(VI), a una velocidad máxima de 1,07 mg/l/h, alcanzándose casi el total de la remoción durante las primeras 24 horas, mientras que los microorganismos aislados requirieron mayor tiempo para alcanzar su máxima capacidad.

En cuanto a la remoción de fenol, sólo *A. guillouiae* degradó completamente el compuesto en presencia de Cr(VI), con una eficiencia similar a la del cultivo mixto (datos no graficados). *Bacillus* sp., por el contrario, fue incapaz de remover este contaminante en 72 horas. En base a estos resultados se puede señalar a *A. guillouiae* como la cepa más adecuada para la remoción simultánea de ambos compuestos. Sin embargo, el cultivo mixto fue más eficiente para remover Cr(VI) en menor tiempo que sus componentes microbianos aislados, teniendo en cuenta que en 24 horas prácticamente se alcanzó la máxima remoción del metal.

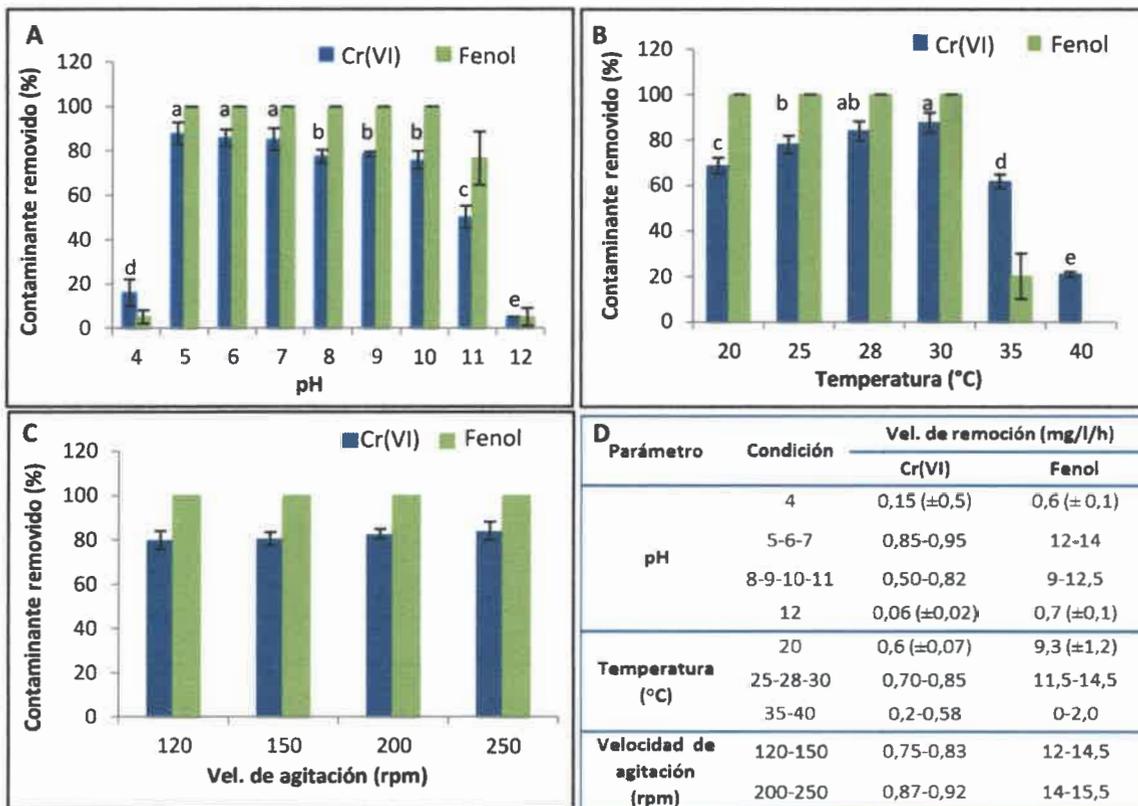
Existen numerosos reportes bibliográficos que evidencian la superioridad de los cultivos mixtos en relación a sus componentes microbianos para detoxificar mezclas de contaminantes, sugiriendo la importancia de las relaciones interespecíficas y la interacción metabólica en los procesos de biorremediación (Molokwane y col., 2008; Mikesková y col., 2012; Hays y col., 2015). En base a los resultados obtenidos y a los antecedentes citados, consideramos que es más propicio continuar con los experimentos de remoción empleando el cultivo mixto SFC 500-1, en lugar de sus cepas aisladas. Sin embargo, la comprensión del

potencial metabólico y los mecanismos implicados en el proceso requerirá de la evaluación individual de ambas bacterias.

### 5.5. Optimización de las condiciones de remoción simultánea del cultivo mixto SFC 500-1 a pequeña escala y a escala piloto

#### 5.5.1. Efecto del pH, temperatura y velocidad de agitación

La biorremediación no sólo depende de la capacidad intrínseca de los microorganismos empleados. Como todo sistema biológico, el potencial de los mismos para remover contaminantes es variable y se ve afectado por las fluctuaciones en diferentes parámetros físico-químicos del ambiente en el que se encuentren. Por lo tanto, se analizó el efecto de variar el pH, la temperatura y velocidad de agitación, sobre la capacidad de remoción simultánea de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) del cultivo mixto SFC 500-1 creciendo en medio TY.



**Figura 22:** Efecto del pH (A), temperatura (B) y velocidad de agitación (C) sobre la capacidad de remoción simultánea de Cr(VI) y fenol por el cultivo mixto SFC 500-1. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). En (D) se representan las velocidades de remoción obtenidas para cada compuesto en las diferentes condiciones evaluadas. Letras diferentes indican DES en la remoción de Cr(VI) alcanzada bajo distintas condiciones de operación analizadas.

A partir de esos experimentos se determinó que SFC 500-1 fue capaz de biotransformar ambos compuestos a pH ácido, neutro y alcalino, aunque las condiciones extremas (pH 4, 11 y 12) resultaron inhibitorias para el proceso (figura 22 A). Los valores de pH óptimos para la remoción de Cr(VI) estuvieron entre 5 y 7 y, aunque la remoción de fenol fue total en un rango de pH entre 5 y 10, las máximas velocidades del proceso se alcanzaron a pH 7. Por lo tanto, las soluciones neutras o ligeramente ácidas serían las más propicias para la remoción simultánea.

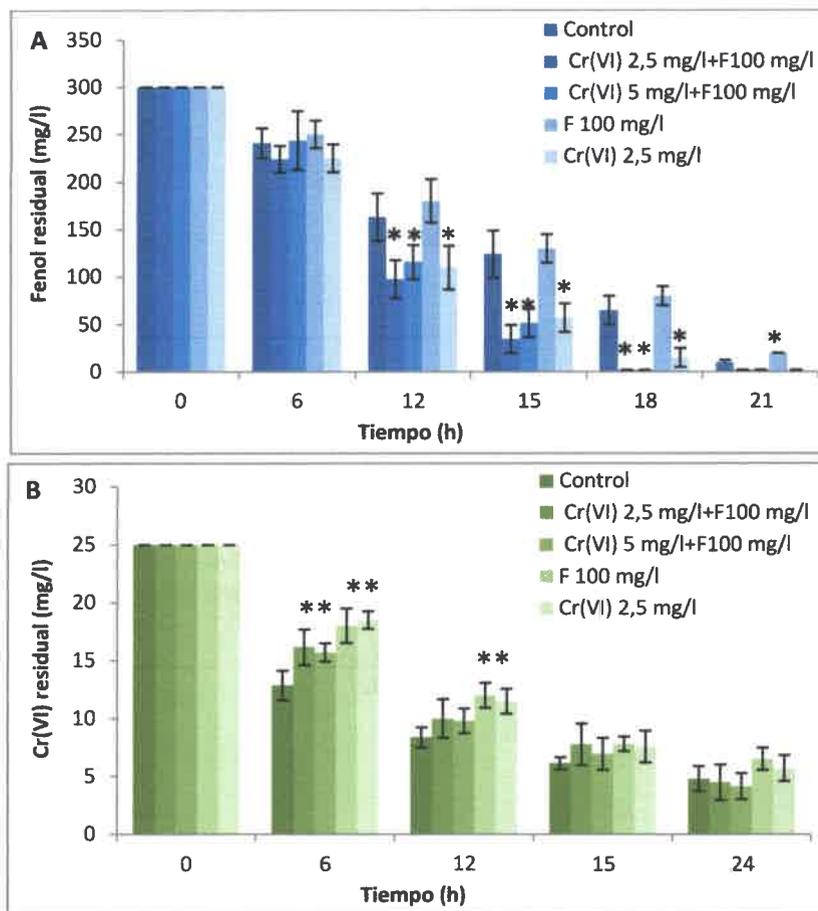
Por otro lado, al aumentar la temperatura de 20 a 30 °C se incrementó el potencial del cultivo mixto para remover Cr(VI), aunque los mejores resultados se obtuvieron entre 28-30 °C (Figura 22B). Además, la remoción de fenol fue total en ese rango de temperaturas. Sin embargo, la incubación a más de 35 °C afectó negativamente la degradación del compuesto orgánico, que se inhibió por completo a 40 °C.

Por último, si se considera que un aumento de 120 a 250 rpm de agitación aceleró el proceso de remoción simultánea (figura 22D), pero no modificó significativamente los porcentajes removidos de los contaminantes (figura 22C), se podría suponer que la velocidad de agitación sería el parámetro que menos afectó el potencial de los microorganismos en estudio para la remediación a escala laboratorio.

Las condiciones físico-químicas tales como el pH y la temperatura alteran fuertemente la ionización y el plegamiento de proteínas, afectando la actividad enzimática y los procesos celulares (Zhang y Li, 2011). Está claro, entonces, que exponer a los microorganismos a condiciones ambientales alejadas de las óptimas puede reducir fuertemente su potencial de biorremediación. Tal es el caso de la pérdida casi total en la capacidad de degradar fenol por *Pseudomonas* sp. SA01 al elevar dos unidades de pH por encima del óptimo (Shourian y col., 2009), o la inhibición del proceso de reducción de Cr(VI) por *Arthrobacter* sp. SUK 1201, ante una reducción en la temperatura de 30° a 25 °C (Dey y Paul, 2012). Resulta relevante, por lo tanto, destacar la versatilidad del cultivo mixto para remover ambos contaminantes bajo diferentes condiciones físico-químicas. Tal capacidad le confiere ciertas ventajas desde un punto de vista industrial sobre microorganismos más exigentes, considerando que el tratamiento biológico de efluentes contaminados requiere de la selección de cepas adaptables a las fluctuaciones periódicas en su composición y condiciones físico-químicas (Tadesse y col., 2004; Phugare y col., 2011).

### 5.5.2. Efecto de la pre-adaptación a los contaminantes sobre la remoción simultánea

Se evaluó el efecto de pre-adaptar al cultivo mixto SFC 500-1 a diferentes concentraciones de Cr(VI) y/o fenol durante 18-24 horas, sobre su capacidad para remover de forma simultánea Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l). Las condiciones de pre-adaptación evaluadas fueron Cr(VI) (2,5 y 5 mg/l) en presencia de fenol (100 mg/l) y Cr(VI) (2,5 mg/l) y fenol (100 mg/l) de manera independiente. Los resultados se grafican en la figura 23.



**Figura 23:** Remoción simultánea de fenol (A) y Cr(VI) (B), por el cultivo mixto SFC 500-1 creciendo en condiciones control, y pre-adaptado con diferentes concentraciones de esos contaminantes. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Los asteriscos indican DES ( $p < 0,05$ ) en relación a la remoción alcanzada por el control.

La pre-adaptación con ambos contaminantes, así como también con Cr(VI) mejoró la degradación de fenol, reduciéndose significativamente los tiempos necesarios para la

completa remoción de este compuesto aromático. Sin embargo, la pre-adaptación sólo con fenol no mejoró su remoción. Es de destacar que ninguna de las condiciones evaluadas favoreció la remoción de Cr(VI), que continuó siendo el compuesto limitante durante la co-remediación.

Estos resultados evidencian que el cultivo mixto es capaz de remover eficientemente Cr(VI) y fenol sin la necesidad de llevar a cabo un proceso de pre-adaptación a los mismos pero que, sin embargo, hacerlo crecer en presencia de bajas concentraciones de dichos contaminantes constituiría una estrategia para incrementar su potencial de remediación, probablemente a causa de la regulación e inducción de enzimas implicadas en el proceso (Ojo y col., 2007; Bajaj y col., 2008).

Además, su buena eficiencia de remoción en todas las condiciones analizadas, permite suponer que no se vería afectado por la presencia de trazas de estos contaminantes si se requiriera emplearlo en procesos operados de forma continua.

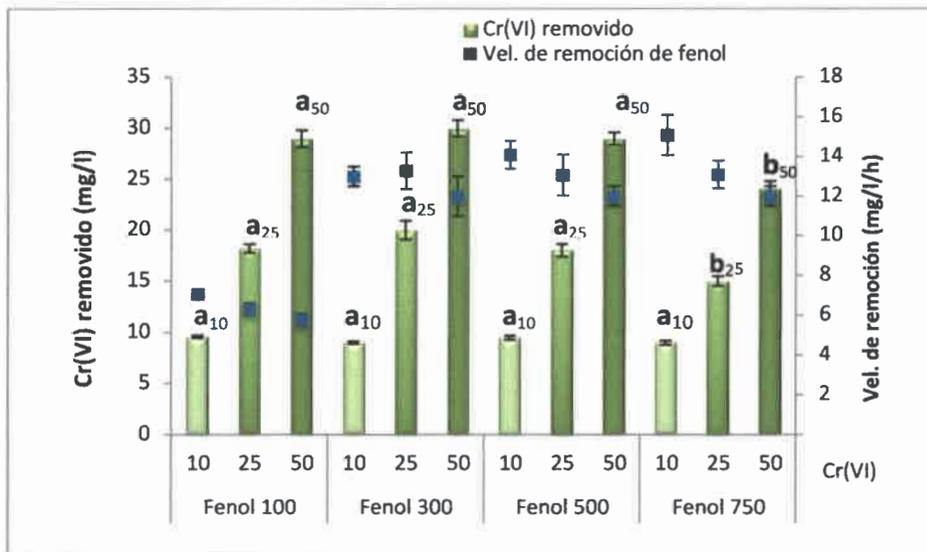
### **5.5.3. Efecto de la concentración inicial de los contaminantes sobre la remoción simultánea**

Se analizó la eficiencia del cultivo mixto SFC 500-1 para remover simultáneamente concentraciones crecientes de Cr(VI) (10, 25 ó 50 mg/l) en combinación con 100, 300, 500 y 750 mg/l de fenol.

En dichos ensayos se observó que la remoción de Cr(VI) varió según la concentración incorporada de ambos contaminantes, mientras que la remoción de fenol fue total en todas las condiciones. Por lo tanto, en la figura 24 se representan el Cr(VI) removido y la velocidad máxima de degradación de fenol alcanzados en 120 horas de ensayos para todas las combinaciones de los contaminantes evaluadas.

Como se resume en la figura 24, la máxima remoción de Cr(VI) fue de aproximadamente 30 mg/l, cuando se combinaron 50 mg/l del metal con 100, 300 y 500 mg/l de fenol. Dicho resultado fue similar al alcanzado cuando este contaminante se incorporó de manera individual en el medio de cultivo (Ver figura 14). Sin embargo, la presencia de 750 mg/l de fenol provocó una reducción significativa en la remoción de las concentraciones más elevadas de Cr(VI).

Por otro lado, como ya se mencionó, el fenol fue degradado completamente en todas las condiciones, con una máxima velocidad de 15,4 mg/l/h para 750 mg/l en presencia de 10 mg/l de Cr(VI). No obstante, el incremento en la concentración de Cr(VI) a 50 mg/l provocó una disminución significativa en la velocidad del proceso (12 mg/l/h).



**Figura 24:** Remoción de diferentes concentraciones de Cr(VI) (10; 25; 50 mg/l) en presencia de fenol (100; 300; 500; 750 mg/l). La remoción de Cr(VI) se representa con barras y los símbolos (■) indican la velocidad máxima de remoción de fenol. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Letras diferentes indican DES ( $p < 0,05$ ) en la remoción de cada concentración de Cr(VI) en presencia de diferentes concentraciones de fenol.

El análisis de los resultados de remoción simultánea requiere considerar las alteraciones fisiológicas y metabólicas que las mezclas de contaminantes pueden provocar sobre los microorganismos y el impacto que esto genera sobre su potencial de biorremediación. En ese sentido, la toxicidad que dichas mezclas generan sobre los microorganismos es a menudo mayor que la simple combinación de sus toxicidades individuales, a causa de procesos de interacción que muchas veces no son considerados (Malik y col., 2014). Un ejemplo típico de esta problemática es la inhibición que generan los metales pesados sobre la degradación de xenobióticos por diversas cepas bacterianas (Sandrin y Maier, 2003). En ese sentido, ciertos cultivos microbianos puros y mixtos mostraron diferentes tipos de alteración dosis-dependiente en sus capacidades de remoción de Cr(VI) y fenoles. Por ejemplo, la presencia de 3,5 mg/l de Cr(VI) causó un descenso del 50% en la degradación de 700 mg/l de fenol por *Acinetobacter* sp. B9 (Bhattacharya y col., 2014), mientras que la capacidad de un consorcio bacteriano para remover 250 mg/l de fenol se redujo casi completamente cuando se incorporaron 15 mg/l de Cr(VI) en su medio de cultivo (Liu y col., 2008).

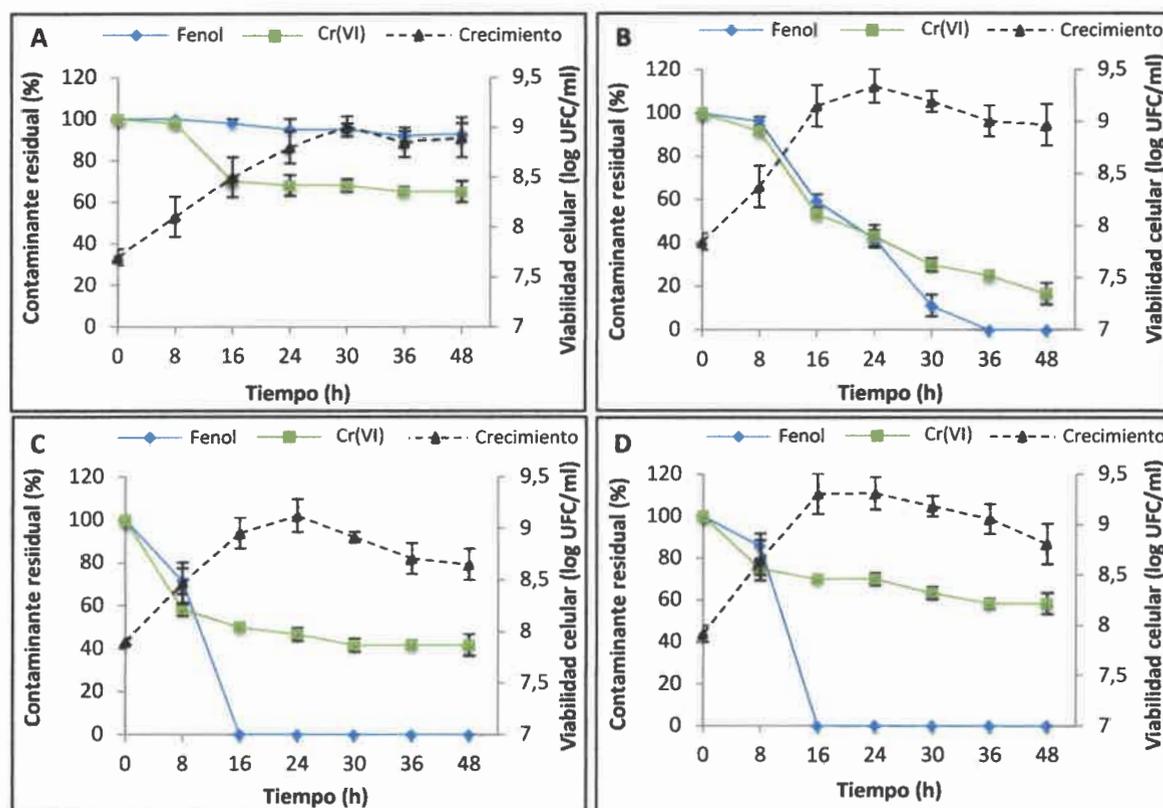
En base a esos antecedentes, resulta relevante que el cultivo mixto SFC 500-1 haya sido capaz de remover más del 50% de 50 mg/l de Cr(VI) en presencia de altas concentraciones fenol, alcanzando simultáneamente velocidades elevadas de degradación de dicho compuesto aromático.

#### **5.5.4. Efecto del cambio de escala sobre la remoción simultánea**

La utilización eficiente de microorganismos aerobios para diferentes procesos biotecnológicos requiere del desarrollo correcto de la aireación, mezclado y eliminación del calor, operaciones que permiten mantener la aerobiosis y cierta homogeneidad en los parámetros fisicoquímicos (Najafpour, 2015). Las mismas son fáciles de controlar en los fermentadores de laboratorio, pero a medida que aumenta el volumen a tratar, también lo hacen los parámetros de cultivo. Por lo tanto, un paso importante a la hora de optimizar las condiciones de remoción del cultivo mixto SFC 500-1 consistió en evaluar su comportamiento a mayor escala, teniendo en cuenta que esta tesis doctoral apunta a una posible aplicación del sistema para el tratamiento de grandes volúmenes de efluentes contaminados.

Para llevar a cabo tal objetivo, se empleó un reactor de tanque agitado de 5 litros de capacidad conteniendo 2 litros de medio TY, a pH 7 y 30 °C, donde se evaluó la remoción simultánea de 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol bajo diferentes condiciones de agitación (200, 300, 400 y 500 rpm) y de aireación (0, 1 y 3 vvm).

En primer lugar, la eficiencia del cultivo mixto para co-remediar Cr(VI) y fenol fue máxima cuando se lo agitó a 300 rpm, pero se redujo significativamente cuando la velocidad empleada fue 200 rpm, condición que había sido seleccionada como óptima en los experimentos efectuados en Erlenmeyers (figura 25 A y B). La agitación a 400 y 500 rpm aceleró la degradación de fenol, requiriéndose un tiempo menor a 16 horas para la remoción total. Sin embargo, no mejoró la remoción de Cr(VI) en el periodo evaluado (figura 25 C y D).



**Figura 25:** Remoción de Cr(VI) y fenol durante el crecimiento del cultivo mixto SFC 500-1 en un reactor de tanque agitado operado a diferentes velocidades de agitación: (A) 200 rpm, (B) 300 rpm, (C) 400 rpm y (D) 500 rpm. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=3).

Si se compara estos resultados con los obtenidos en Erlenmeyers (figura 22C), se puede deducir que al incrementar el volumen de trabajo, también se incrementó la influencia de la velocidad de agitación en la remoción. Además queda claro que las condiciones óptimas de agitación no fueron extrapolables de pequeña escala a mayores volúmenes. En ese sentido, cuando se trabaja con pocos mililitros de cultivo, con una agitación leve se puede lograr un correcto mezclado. Sin embargo, si se aplica esa misma velocidad de agitación para volúmenes significativamente mayores (100 veces, en este caso particular), podrían generarse regiones con deficiente contenido de nutrientes o inadecuadas temperaturas o pH, lo cual se asocia directamente con una pérdida de la productividad (Namdev y col., 1994).

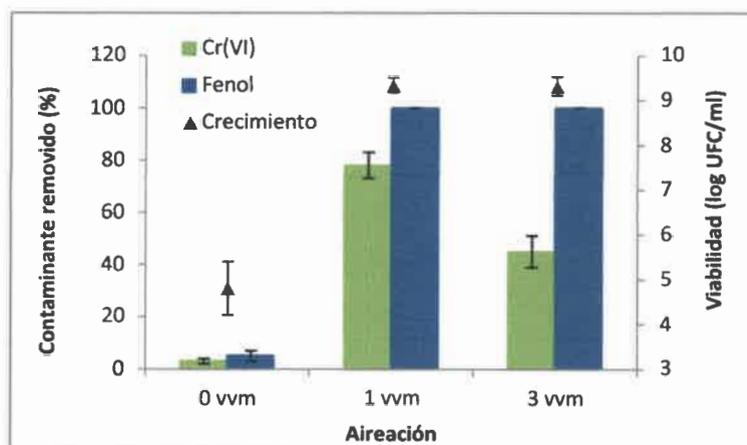
Todos los experimentos previamente mencionados se llevaron a cabo insuflando de forma constante 1 vvm de aire estéril. Por lo tanto se decidió evaluar el efecto de la aireación sobre el potencial del cultivo mixto para remover los contaminantes. Para ello, se analizó el comportamiento de los microorganismos cuando la velocidad de agitación fue 300 rpm,

incrementando a 3 vvm el aire insuflado. También se realizaron experimentos sin insuflar aire al sistema.

Como se observa en la figura 26, la remoción simultánea se modificó al variar el flujo de aire en el interior del reactor. Cuando no se incorporó una fuente adicional de oxígeno, el cultivo mixto no creció ni removió ninguno de los dos contaminantes durante las 48 horas evaluadas. Por lo tanto, la turbulencia producida durante el proceso de mezclado no sería suficiente para proporcionar una correcta aireación y, por consiguiente, una buena eficiencia de remoción.

Por otro lado, el cambio en la aireación de 1 a 3 vvm provocó la disminución en un 20% en la remoción de Cr(VI) en 48 horas y aceleró la remoción total de 300 mg/l de fenol, alcanzando una velocidad máxima de 18 mg/l/h contra valores de 8,5 mg/l/h logrados con 1 vvm.

La relevancia de este último resultado radica en cuestiones relacionadas con la aplicación del cultivo mixto en efluentes estancados o áreas contaminadas con escasa oxigenación. Considerando esto, tal vez el sistema en estudio sea más adecuado para ser aplicado en el interior de reactores o en piletas de tratamiento con regímenes de aireación.



**Figura 26:** Máximo crecimiento y remoción de Cr(VI) y fenol alcanzados por el cultivo mixto SFC 500-1 en un reactor de tanque agitado con diferentes condiciones de aireación. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=3).

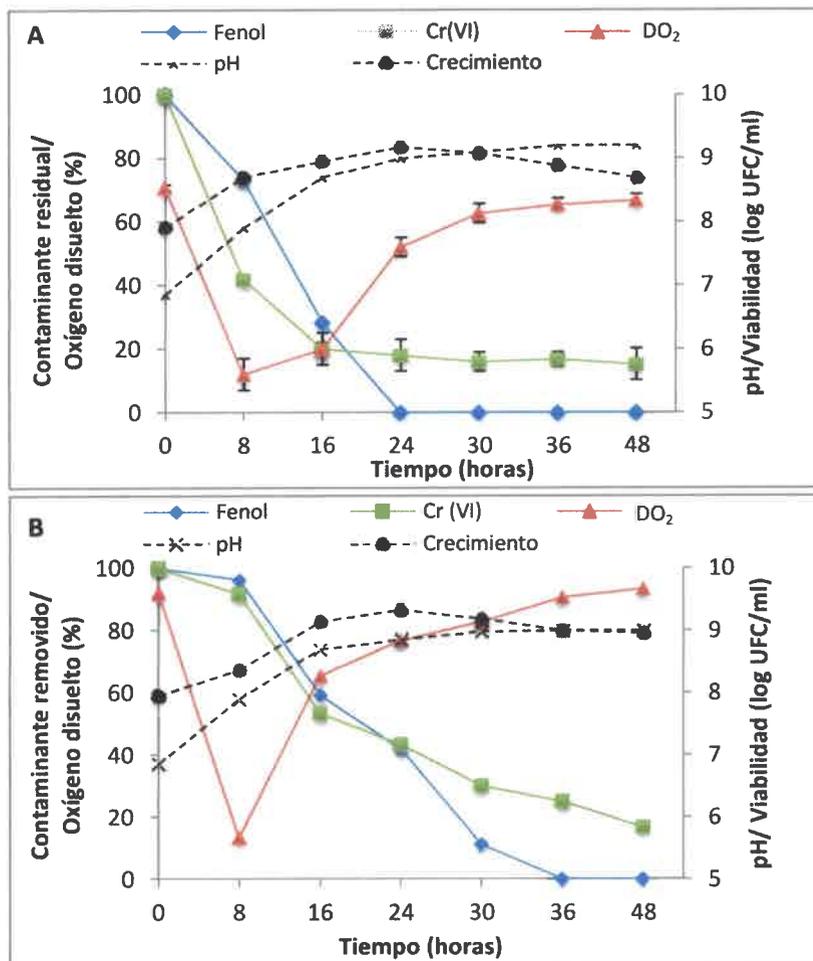
En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron como condiciones óptimas de operación en el reactor, para obtener la mejor remoción simultánea, una agitación a 300 rpm y una aireación de 1 vvm.

Un dato destacable es que el crecimiento bacteriano fue similar en todas las condiciones de trabajo en las que se insufló aire al sistema (figuras 25 y 26). Sin embargo, se detectó un incremento en la proporción de *A. guillouiae* sobre *Bacillus* sp. cuando se sometió al cultivo mixto a mayores velocidades de agitación y tasas de aireación (datos no graficados). Probablemente, esta modificación en la proporción de las cepas afectó el potencial de SFC 500-1 para remover los contaminantes.

Un comportamiento típico observado en reactores de tanque agitado es un aumento en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_La$ ) al aumentar la agitación y la aireación (Erazo y Cárdenas, 2001; Clarke y col., 2006; Garcia-Ochoa y Gómez, 2009), efecto que favoreció la degradación de fenol por algunas bacterias aerobias (Busca y col., 2008; Paisio y col., 2012). Es probable, entonces, que la mayor eficiencia de remoción de fenol observada cuando el cultivo mixto SFC 500-1 se desarrolló a mayor velocidad de agitación y aireación esté asociada además, con la estimulación de vías metabólicas que involucren fenol hidroxilasas, enzimas fuertemente dependientes de la presencia de oxígeno. No obstante, ese potencial incremento en el  $K_La$  por encima de ciertos niveles, tendría el efecto contrario sobre la remoción de Cr(VI). Si tal remoción se asocia a su reducción a la forma trivalente, podría suponerse algún tipo de alteración en la actividad de las enzimas implicadas en el proceso.

Es importante destacar que para validar las hipótesis planteadas, sería necesario realizar la determinación empírica de  $K_La$ , además de profundizar el conocimiento sobre los mecanismos que participan en la remoción simultánea observada.

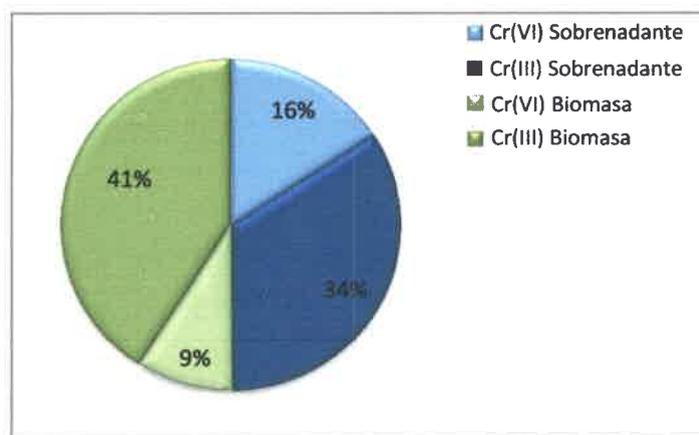
Finalmente, si se comparan los resultados obtenidos con el cultivo mixto para la co-remediación en Erlenmeyers y en un reactor de tanque agitado bajo condiciones óptimas, se puede observar que las concentraciones removidas de ambos contaminantes fueron similares en los dos sistemas, pero que el proceso fue más lento a escala piloto (figura 27). En Erlenmeyers el crecimiento y la remoción ocurrieron de forma simultánea, alcanzando su máximo antes de las primeras 24 horas (figura 27A), mientras que en el interior del reactor el desarrollo bacteriano fue rápido pero la remoción continuó incluso durante la fase de muerte celular (figura 27B).



**Figura 27:** Remoción de Cr(VI) y fenol, modificación del oxígeno disuelto y los valores de pH durante el crecimiento del cultivo mixto SFC 500-1 en Erlenmeyers (A) y en un reactor de tanque agitado (B). Los datos representan la media ± EE (n=3).

Por otro lado, se analizó la modificación del pH y la concentración de O<sub>2</sub> disuelto durante el transcurso del tiempo, parámetros que se comportaron de manera similar en las dos condiciones y dependieron del crecimiento microbiano (figura 27). El O<sub>2</sub> disuelto se redujo durante la fase de máximo crecimiento y se restableció casi por completo luego de 30-36 horas. Además, el crecimiento microbiano *per se* provocó una alcalinización en el medio de cultivo, alcanzándose valores de pH alrededor de 8,5 (datos no graficados), pero la remoción de los contaminantes elevó aún más el pH (9-9,5). En ese sentido, se ha descrito que la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por algunas cepas microbianas provoca la alcalinización del medio de cultivo debido a la formación de Cr(OH)<sub>3</sub> o complejos con compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo (Puzon y col., 2005).

En base a esos antecedentes, resultó relevante evaluar el contenido y distribución de las especies de Cr(VI) y Cr(III) en el sobrenadante y la biomasa luego del proceso de remoción y de esa manera comprender el potencial de los microorganismos que componen el cultivo mixto, para detoxificar el metal. En esos ensayos se demostró que alrededor del 75% del Cr(VI) se redujo a Cr(III), que fue posteriormente detectado en las dos fracciones investigadas, mientras que un 25% permaneció como Cr(VI), principalmente en el medio de cultivo (figura 28).



**Figura 28:** Distribución de las especies de Cr(VI) y Cr(III) en sobrenadante y biomasa del cultivo mixto SFC 500-1 luego de 72 horas de crecimiento en medio TY con 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol.

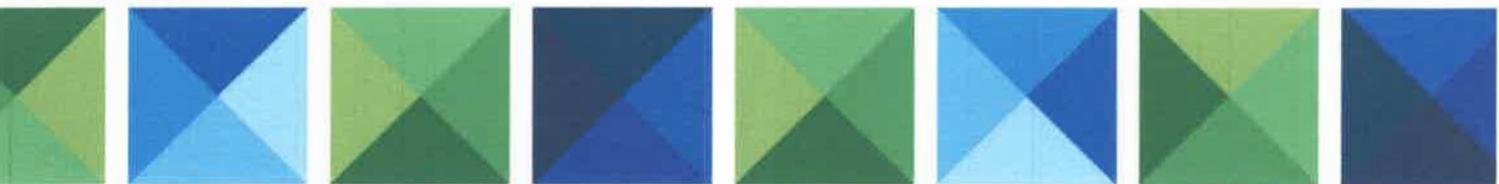
Es probable, entonces, que el cultivo mixto presente actividad cromato reductasa. Dicha capacidad resulta beneficiosa desde un punto de vista ambiental, si se considera la menor toxicidad del Cr(III) con respecto al Cr(VI). En ese sentido, los mecanismos descritos en la bibliografía para la reducción de Cr(VI) a Cr(III) varían en cada microorganismo. El proceso puede ser intra o extracelular y enzimático o no enzimático. En el caso de los procesos enzimáticos, las reductasas involucradas pueden ser muy diversas. Además, el Cr(III) tiende a complejarse con moléculas orgánicas, tales como proteínas intracelulares, componentes de la superficie microbiana y compuestos solubles, como el NADH, glutatión y nanopartículas. La formación de  $\text{Cr(OH)}_3$  es otro posible producto del proceso reductivo (Dong y col., 2013; Thatoi y col., 2014). Los resultados obtenidos hasta el momento aportan evidencias para suponer que el cultivo mixto sería capaz de retener en su biomasa parte del Cr(III) formado, aunque no permiten establecer un mecanismo específico de reducción de Cr(VI) ni comprender el destino final de Cr(III). Por lo tanto, en los próximos capítulos se intentará dilucidar de qué manera el metal podría interactuar con las bacterias en estudio.

## Capítulo II

Empleo de la inmovilización bacteriana como estrategia para mejorar la remoción simultánea de Cr(VI) y fenol por los aislamientos seleccionados.



# Introducción



### 6.1. Inmovilización microbiana

La biorremediación de sustancias tóxicas por microorganismos constituye una estrategia prometedora para el tratamiento de contaminantes ambientales. Sin embargo el uso de microorganismos libres para tal fin puede presentar ciertas limitaciones, tales como el crecimiento desmedido, susceptibilidad a factores ambientales bióticos y abióticos, así como daño celular y muerte provocados por la toxicidad de los contaminantes (Kourkoutas y col., 2004). Otra importante desventaja de la biorremediación se basa en que la posibilidad de introducir bacterias exógenas en sitios afectados suele ser limitada, a causa del riesgo ecológico que puede representar su diseminación en el ambiente (Perullini y col., 2015). Debido a ello, se han desarrollado una amplia variedad de técnicas para incrementar la probabilidad del establecimiento, eficiencia y actividad de los microorganismos introducidos en un ambiente natural. Entre ellas se pueden citar la bioestimulación de la flora nativa, el uso de lodos activados y la inmovilización (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012).

La inmovilización celular consiste en limitar la ubicación física de los microorganismos en un espacio definido, de forma natural o inducida. Esta herramienta biotecnológica permite mantener elevada una actividad catalítica deseada y aumentar su estabilidad física y biológica (Saez y col., 2014). Un soporte adecuado para la inmovilización de microorganismos con aplicaciones ambientales debe favorecer la supervivencia celular, el metabolismo activo y la estabilidad durante tiempo prolongado. Se requiere, además, que el soporte no sea tóxico y que posea estabilidad biológica, mecánica y térmica, así como la porosidad adecuada para permitir el intercambio de nutrientes con el medio y una amplia superficie de adherencia (Gentry y col., 2004; Kourkoutas y col., 2004).

La inmovilización le confiere a los microorganismos protección contra el estrés ambiental y la predación por protozoos, mayor resistencia a la toxicidad gracias a la difusión controlada de contaminantes y la posibilidad de un suministro ininterrumpido de nutrientes dentro de la matriz (De Bashan y Bashan, 2010; Covarrubias y col., 2012). Además, las células inmovilizadas son metabólicamente más activas y estables que las células libres, pudiendo reutilizarse en repetidas oportunidades sin reducción de productividad o pérdida por dilución. El mantenimiento de la concentración celular dentro de la matriz y la resistencia a la liberación de microorganismos hacia el medio de reacción, son otras dos importantes ventajas de los sistemas inmovilizados respecto a los libres, los cuales permiten aprovechar el potencial metabólico de los microorganismos sin que éstos constituyan un residuo del proceso (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012; Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2012).

Más allá de las ventajas que presenta el uso de bacterias inmovilizadas en biorremediación, si el soporte seleccionado no es el adecuado, se pueden generar limitaciones operacionales, tales como pérdida de células por proliferación no controlada o posible inactivación de las mismas durante el proceso de inmovilización. Además pueden surgir inconvenientes asociados a problemas de difusión de los contaminantes a tratar o acumulación de intermediarios tóxicos en la matriz. Por lo tanto, la selección del soporte a emplear es un factor clave para la aplicación ambiental de bacterias inmovilizadas (Poopal y Laxman 2008).

## 6.2. Técnicas de inmovilización

Dependiendo de la forma en que se produzca la inmovilización, ésta puede clasificarse en inmovilización pasiva o activa (Moreno-Garrido, 2008). Muchos microorganismos presentan estructuras celulares tales como cápsula o fimbrias, que les permiten unirse a superficies y crecer en ellas, estableciendo aglomerados multicelulares de manera natural o pasiva. Durante la inmovilización pasiva es común la formación de biofilms a partir de sustancias poliméricas extracelulares, los cuales presentan canales que permiten el transporte de nutrientes y desechos y favorecen el desarrollo de micronichos para la remoción de los compuestos tóxicos (Kourkoutas y col., 2004). Las matrices orgánicas serían las más apropiadas para favorecer la adherencia y crecimiento celular, ya que poseen grupos radicales y nutrientes aprovechables como sustratos para los microorganismos (Cohen y col., 2001). En ese sentido, tanto cepas fúngicas como bacterianas inmovilizadas en estropajo, semillas o fibras de madera fueron eficientemente empleadas en la remediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos, tales como pesticidas, fenoles, compuestos poliaromáticos o metales pesados (Akhtar y col., 2004; Mazmanci y Ünayyar, 2005; Barragán y col., 2007; Yadav y Roy, 2014). Algunas matrices sintéticas como polipropileno, poliuretano, vidrio o carbón activado, también presentaron muy buena estabilidad como soportes para la inmovilización exitosa de microorganismos ambientales implicados en la detoxificación de este tipo de compuestos (Tallur y col., 2009; Clares y col., 2015; Mita y col., 2015).

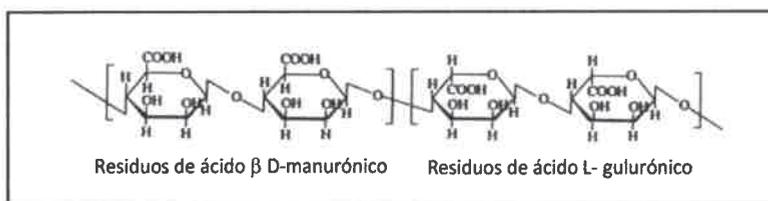
Otra alternativa para la inmovilización de microorganismos es su oclusión en una matriz porosa, que se basa en la inclusión de las células en una red rígida que evita su difusión al medio circundante y permite el ingreso de nutrientes, pudiendo emplearse polímeros sintéticos (resinas, colágeno, poliuretanos), proteínas (gelatina, colágeno, albúmina de huevo), o polisacáridos naturales (agar, carragenanos o alginatos) (Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta,

2008). Este tipo de inmovilización se denomina inmovilización activa y es una de las más empleadas (Moreno-Garrido, 2008).

Si bien las bacterias inmovilizadas en matrices de poliacrilamida, polivinil alcohol, agar, polisulfona y poliacrilonitrilo, entre otras, han mostrado mayor eficiencia de biorremediación que las células libres, el alginato de calcio (Ca-alginato) es frecuentemente una matriz de elección para estos propósitos, ya que permite la inmovilización de una elevada concentración de biomasa de diferentes especies de microorganismos y ofrece alta resistencia a la toxicidad de los contaminantes (Mollaey y col., 2010; Pal y col., 2013).

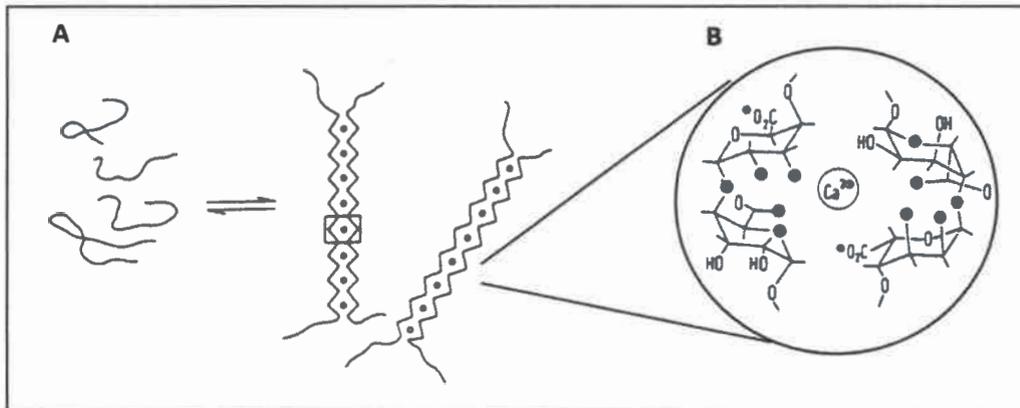
### 6.3. Inmovilización activa en alginato

Los alginatos son polisacáridos lineales presentes en la pared celular de las algas pardas, compuestos por cantidades variables de residuos de ácido  $\beta$  (1-4) D-manurónico y ácido  $\alpha$  (1-4) L-gulurónico. Estos residuos pueden variar ampliamente en su composición y secuencia y están dispuestos en un patrón de bloques a lo largo de la cadena (Figura 29). La composición y longitud de las secuencias determinan las propiedades físicas de los alginatos (Sutherland, 1991).



**Figura 29:** Estructura de una molécula de alginato, conteniendo residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (Fuente: MacGregor y Greenwood, 1980).

Las esferas de alginato se pueden preparar por goteo de una solución conteniendo alginato de sodio y el cultivo del microorganismo deseado, en una solución con metales divalentes o trivalentes tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  o  $\text{Al}^{3+}$ . La gelificación y polimerización se logran principalmente por el intercambio de iones de sodio del ácido gulurónico con los cationes de la solución. Dada su valencia múltiple, éstos atraen electrostáticamente los extremos aniónicos de dos cadenas adyacentes de alginato, formando un retículo sólido (Figura 30). La estabilidad del gel depende de la composición química del alginato y del catión polivalente empleado (Gombotz y Wee, 2012).



**Figura 30:** Representación esquemática de la asociación de secuencias de poli-L-guluronato entrecruzadas mediante iones de calcio. **A:** Conversión de cadenas de alginato a estructuras en forma de hélice entrecruzada que contiene iones  $\text{Ca}^{2+}$ . **B:** Formación de complejos con  $\text{Ca}^{2+}$ . Los átomos de oxígeno que intervienen en la esfera de coordinación se muestran como círculos rellenos. (Fuente: Rees, 1981).

El alginato posee varias características particulares que han permitido su empleo como matriz para el encapsulamiento y/o liberación controlada de proteínas, ácidos nucleicos, liposomas, microsomas y células. Estas propiedades incluyen (Gombotz y Wee, 2012):

- Presencia de un medio acuoso relativamente inerte dentro de la matriz.
- Capacidad de gelificación a temperatura ambiente, libre de disolventes orgánicos.
- Elevada porosidad, la cual permite altas tasas de difusión de macromoléculas.
- Control de la porosidad con procedimientos de revestimiento simples.
- Disolución y biodegradación del sistema bajo condiciones fisiológicas normales, para efectuar recuento celular o recuperación de los microorganismos.

El Ca-alginato es una de las matrices más comúnmente empleadas, no sólo en la biorremediación de una amplia variedad de contaminantes de distinta naturaleza, sino también en la industria farmacéutica, médica y alimenticia (Zarate y col., 2011; Mirzaei y col., 2012; Wright y col., 2012).

#### 6.4. Aplicación de la inmovilización activa como herramienta biotecnológica en biorremediación

A lo largo de los años se ha incrementado el uso de bacterias o de sus enzimas inmovilizadas para diferentes procesos productivos con interés biotecnológico.

La inmovilización activa en matrices como Ca-alginato, polivinilalcohol o quitosano ha resultado de gran utilidad en experimentos de biorremediación. Bacterias encapsuladas en esos polímeros mostraron elevada eficiencia para degradar compuestos orgánicos como colorantes, pesticidas y derivados de la industria petrolera, como así también para biotransformar metales pesados y radiactivos (Saez y col., 2014; Wang y col., 2012; Ghosh y col., 2014; Patel y Gupta, 2015; Sasaki y col., 2015).

Lo más atractivo de estos sistemas es la protección celular que los polímeros de oclusión le ofrecen a los microorganismos inmovilizados, favoreciendo la tolerancia y remoción de compuestos tóxicos. A modo de ejemplo, cepas pertenecientes a géneros como *Bacillus* y *Pseudomonas* inmovilizadas en alginato y pectina mostraron elevada capacidad para degradar concentraciones de fenol significativamente superiores a aquellas que toleraban en condiciones libres (Mollaei y col., 2010; Lu y col., 2012). Además, microorganismos de diversos grupos taxonómicos inmovilizados en geles pudieron reutilizarse en repetidas oportunidades para el tratamiento *in vitro* de efluentes contaminados (Chatterjee y col., 2011; Cruz y col., 2013; Bergero y col., 2015).

Asimismo, este tipo de matrices han sido aprovechadas para la inmovilización de enzimas. La principal ventaja de emplear enzimas radica en su especificidad de sustrato, limitándose así la generación de productos de remoción no deseados. Además, al prescindir de las células completas se reducen ciertos factores limitantes en biorremediación, tales como largos periodos de adaptación o el daño metabólico causado por químicos tóxicos sobre los microorganismos (Thatoi y col., 2014). En ese sentido, enzimas individuales purificadas, *pooles* de enzimas o extractos celulares inmovilizados han servido como herramientas biotecnológicas para dilucidar mecanismos y mejorar la capacidad de remediación de los microorganismos que las producen (Elangovan y col., 2010; da Silva y col., 2013; Rocha-Martin y col., 2014).

Existe una importante cantidad de trabajos de investigación en los cuales se utilizó la inmovilización activa de bacterias o sus enzimas para la biorremediación de Cr(VI) o fenoles (figura 31). Además, en algunos de ellos se empleó la resistencia a la difusión de materia generada por la matriz como estrategia para caracterizar los productos de degradación de fenoles. Sin embargo, existen escasos reportes que describan el potencial de microorganismos inmovilizados en dichos soportes para la remediación simultánea de este tipo de contaminantes (Tripathi y Garg, 2013).

En base a estos antecedentes, consideramos interesante evaluar la inmovilización del cultivo mixto SFC 500-1 en una matriz polimérica (Ca-alginato) como estrategia para incrementar su potencial de co-remediación de Cr(VI) y fenol.

BACTERIAS INMOVILIZADAS			
Remoción de fenoles		Remoción de Cr(VI)	
Kumar y col. (2012)	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Hora y col. (2015)	
Karigar y col. (2006)	<i>Arthrobacter</i> sp.	Ziagova y col. (2014)	
Mollaie y col. (2010)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Wasi y col. (2011)	
Lu y col. (2012)	<i>Bacillus</i> sp.	Pal y col. (2013)	
Ahmad y col. (2012)	<i>Acinetobacter</i> sp.	Shetty y col. (2011)	
ENZIMAS INMOVILIZADAS			
Remoción de fenoles		Remoción de Cr(VI)	
Polifenol oxidasas	Mukherjee y col. (2012)	Extractos enzimáticos	Camargo y col. (2004)
Catecol dioxigenasas	Wojcieszynska y col. (2012)	Extractos enzimáticos	Eiangovan y col. (2010)
Extractos enzimáticos	Silva y col. (2013)		
Sistemas multienzimáticos	Rocha-Martin y col. (2014)		

**Figura 31:** Ejemplos del empleo de inmovilización celular y enzimática en biorremediación de Cr(VI) o fenol.

## Materialles y métodos



## **7.1. Inmovilización del cultivo mixto SFC 500-1 en una matriz de Ca-alginato**

### **7.1.1. Preparación del inóculo**

El cultivo mixto SFC 500-1 se incubó en medio TY a  $28 \pm 2$  °C y en agitación (200 rpm) durante 20-24 h. Luego de ser cosechadas y resuspendidas en solución fisiológica, las células de dicho cultivo se inmovilizaron en una matriz de Ca-alginato o se emplearon como células libres en ensayos de biotransformación de Cr(VI) y fenol.

### **7.1.2. Inmovilización en Ca-alginato**

La inmovilización del cultivo mixto se realizó de acuerdo al método de Ravichandra y col. (2008), con algunas modificaciones. Las células crecidas de acuerdo a lo establecido en el apartado anterior, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min, se lavaron con solución fisiológica y se resuspendieron en medio TY fresco hasta obtener una concentración aproximada de  $2 \times 10^9$  UFC/ml. Dicha suspensión celular se mezcló con alginato de sodio (Sigma) al 4%, previamente autoclavado (1 atm, 120°C, 15 min), en una relación 1:3. Para lograr la formación de perlas con diámetro uniforme (3 mm), se mezcló la suspensión con una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,2 M a través de goteo constante empleando puntas de micropipetas de 1000  $\mu\text{l}$ .

Las perlas se mantuvieron en la solución de  $\text{CaCl}_2$  durante 20 min en agitación y se efectuaron tres recambios sucesivos de la misma, previos al lavado con solución fisiológica. Una vez lavadas, se conservaron en solución fisiológica a 4 °C durante un período no mayor a 7 días, hasta su utilización en ensayos de remoción.

### **7.1.3. Determinación de la viabilidad celular en el interior de las perlas**

Para la determinación de la viabilidad celular en la matriz, se tomaron 3 perlas y se colocaron en 200  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato de sodio 0,2 M, pH 7. Posteriormente las perlas se rompieron con pinzas hasta deshacerlas totalmente. El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de los microorganismos del cultivo mixto inmovilizados se efectuó mediante la técnica de la microgota (Spencer y Ragout, 2004), descrita en la sección 4.4 del primer capítulo. Para el recuento de células libres, se tomaron alícuotas de los medios de cultivo y se realizaron diluciones seriadas en placas con medio TY, siguiendo la misma técnica empleada para células inmovilizadas.

## **7.2. Optimización de la remoción de Cr(VI) y fenol por el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado en Ca-alginato**

Todos los ensayos de remoción utilizando células del cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizadas en perlas de Ca-alginato se realizaron en Erlenmeyers (50 ml) conteniendo 5 ml de medio de reacción, adicionado con 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol.

Para determinar el número de células viables óptimo para la remoción, se utilizó solución fisiológica conteniendo diferente cantidad de células inmovilizadas. Para ello, los Erlenmeyers se inocularon con las perlas necesarias para alcanzar aproximadamente  $3,6 \times 10^8$ ;  $7,2 \times 10^8$  y  $1,5 \times 10^9$  UFC por mililitro de medio de reacción (UFC/ml).

Posteriormente, se evaluó el efecto del medio de reacción sobre la remoción de los contaminantes, empleando la cantidad óptima de células determinada en el ensayo anterior. Los medios evaluados fueron TY, MYT1/4 (sección 4.6 del primer capítulo) y solución fisiológica adicionada con glucosa o extracto de levadura 0,3%.

Una vez seleccionado el medio más adecuado para la remoción simultánea se analizó el efecto de pre-adaptar el cultivo mixto con Cr(VI) 2,5 mg/l y fenol 100 mg/l. Los cultivos de 20-24 horas crecidos bajo estas condiciones, se centrifugaron y se resuspendieron en medio TY estéril sin los contaminantes. Las células se inmovilizaron siguiendo el protocolo ya descrito y se comparó la remoción de 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol, respecto a la alcanzada por perlas control (con bacterias no adaptadas).

En todos los ensayos se procesaron simultáneamente controles abióticos que consistieron en los mismos medios sin el agregado de perlas.

Todos los Erlenmeyers se incubaron a  $28 \pm 2$  °C en agitación (100 rpm) y se tomaron muestras a diferentes tiempos, para evaluar la concentración residual de los contaminantes y/o el recuento de células viables dentro de las perlas.

A las 24 horas de incubación se eliminó el medio de reacción y se agregó medio nuevo conteniendo Cr(VI) y fenol para analizar la capacidad de reutilización de las células inmovilizadas. Esto se efectuó durante tres ciclos consecutivos, en los ensayos de optimización de la remoción.

## **7.3. Aplicación de células inmovilizadas para la remoción de diferentes concentraciones de Cr(VI) y fenol**

Se estudió por un lado la remoción de Cr(VI) (10, 25 y 50 mg/l) manteniendo constante la concentración de fenol (300 mg/l) y por el otro, la degradación de fenol (100, 300,

500, 750, 1000 y 1500 mg/l), en presencia de una concentración constante de Cr(VI) (25 mg/l) por el cultivo mixto inmovilizado.

Paralelamente, a modo comparativo, se evaluó la co-remediación de las mismas concentraciones de los contaminantes utilizando igual cantidad de células libres.

A lo largo del proceso (cada 3, 6, 9 y/o 12 h) se tomaron muestras para analizar la concentración residual de Cr(VI) y fenol y su velocidad de remoción. Al finalizar el experimento se determinó la viabilidad celular dentro de las perlas y en el medio de cultivo de las células libres.

#### **7.4. Estabilidad y reutilización de las células inmovilizadas**

En primer lugar se determinó el tiempo máximo que se pueden almacenar las bacterias inmovilizadas en Ca-alginato, sin perder su capacidad de remoción. Para ello, las perlas se conservaron en solución fisiológica a 4 °C y cada 7 días se analizó la viabilidad celular y la remoción de los contaminantes, tal como se describió en secciones anteriores.

Para los ensayos de reutilización se inocularon Erlenmeyers conteniendo Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) y la cantidad de perlas determinada como óptima en base a resultados anteriores. Los mismos se incubaron hasta que las concentraciones residuales de los contaminantes permanecieron constantes en el medio de cultivo. Terminado ese periodo, se eliminó el medio de reacción remanente y se añadió medio estéril suplementado con la misma concentración de Cr(VI) y fenol. En estos ensayos se hizo un seguimiento de la remoción de los contaminantes cada tres o seis h. Además, se determinó el contenido de células viables en las perlas al final de cada ciclo, así como el Cr acumulado dentro de las perlas al final del proceso de remoción y la especiación del metal en las diferentes fases del sistema.

Al finalizar cada ciclo se tomaron muestras de los sobrenadantes y en el último ciclo se recolectaron todas las perlas de cada Erlenmeyer y se disolvieron empleando buffer fosfato de sodio 0,2 M, pH 7. Se determinó el contenido de Cr(VI) y Cr(III) en *pooles* de sobrenadantes y de perlas con y sin bacterias.

En los experimentos de reutilización se emplearon controles abióticos que consistieron en: perlas con células inactivadas en autoclave y perlas sin células, para evaluar la posible influencia de efectos de adsorción por la matriz de Ca-alginato o por la biomasa atrapada en ella.

### 7.5. Determinación de la concentración residual de los contaminantes

La concentración residual de Cr(VI) y Cr(III) se determinó siguiendo las técnicas descritas en la sección 4.5 del capítulo 1.

### 7.6. Determinación y cuantificación de los productos de degradación de fenol por HPLC

#### 7.6.1. Obtención y preparación de las muestras

Los productos de degradación de fenol fueron analizados a lo largo del primer ciclo de remoción de 300 mg/l del compuesto, en presencia y ausencia de 25 mg/l de Cr(VI). Para ello, Erlenmeyers conteniendo solución fisiológica como medio de reacción, se inocularon con la cantidad óptima de perlas y se incubaron hasta alcanzar la remoción total de fenol en ambas condiciones. Periódicamente se determinó la remoción a través de la técnica colorimétrica descrita por Wagner y Nicell (2002). Cuando se detectó la degradación de aproximadamente 50, 75, 90 y 100 % del compuesto, se tomaron alícuotas de 2 ml del medio de reacción. Además se obtuvieron muestras luego de la remoción total de fenol, como así también de medio sin inocular e inoculado con perlas sin células, las cuales fueron empleadas como controles de reacción.

Todos los sobrenadantes se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C y se conservaron a -20 °C al resguardo de la luz hasta su utilización.

#### 7.6.2. Detección y cuantificación de catecol, ácido *cis,cis*-mucónico y fenol por HPLC

El fenol y algunos metabolitos intermediarios formados durante su *orto*-oxidación fueron determinados según lo reportado por Tuah y col. (2009), por HPLC isocrática con detector UV a 280 nm, empleando una columna C18 (Chrompax) 150 x 4.6 mm. La fase móvil utilizada para la detección de fenol, catecol y ácido *cis,cis*-mucónico fue ácido acético (1 % v/v) en agua con un flujo de 1 ml/min. Los solventes utilizados fueron de calidad HPLC. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de nylon 0,25 µm para remover restos celulares, se acidificaron con HCl (pH final: 2,5) y se inyectaron alícuotas de 50 µl. Las muestras correspondientes a cada tratamiento se analizaron por triplicado.

Para la cuantificación de los compuestos en estudio, se construyeron curvas de calibración empleando patrones de los mismos, todos de alto grado de pureza y calidad HPLC: Fenol (Merck), catecol (Fluka AG) y ácido *cis,cis*-mucónico (Sigma).

### 7.7. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron independientemente, por triplicado, para establecer la variabilidad de los datos.

El análisis estadístico de los datos se efectuó mediante el paquete *Infostat*, versión estudiantil. Se analizaron los supuestos de homogeneidad de varianza y de normalidad, mediante los test de Levene y Shapiro Wilks, respectivamente. En caso de cumplirse los supuestos con los datos crudos o transformados, se efectuó el análisis de la varianza de una vía ANOVA. De lo contrario, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal Wallis. El análisis *a posteriori* se realizó empleando el test de Tukey con un nivel de significación de 0,05.

## Resultados y discusión



## Organización de los resultados del segundo capítulo

### 1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO CON CÉLULAS DEL CULTIVO MIXTO SFC 500-1 INMOVILIZADAS EN ALGINATO DE CALCIO

#### Implicancia de diferentes parámetros en la remoción simultánea de Cr(VI) y fenol

- Número de células viables inoculadas
- Medio de reacción
- Pre-adaptación a los contaminantes

### 2 COMPARACIÓN DEL POTENCIAL DE REMOCIÓN DE CÉLULAS INMOVILIZADAS VS CÉLULAS LIBRES

- Efecto de la concentración inicial de Cr(VI)
- Efecto de la concentración inicial de fenol
- Viabilidad celular luego de la remoción

### 3 POTENCIAL APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS INMOVILIZADAS EN UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO

#### Estabilidad y reutilización

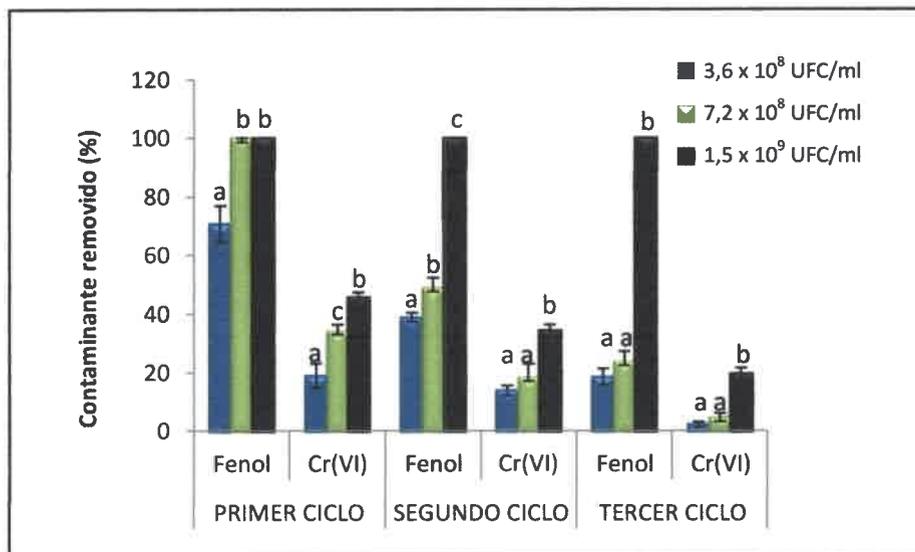
- Remoción tras almacenamiento en periodos prolongados de tiempo
- Reciclado de las perlas en varias instancias de remoción simultánea.

#### Biotransformación de los contaminantes

- Cr(VI): Reducción a Cr(III)/ Adsorción/ Absorción
- Fenol: Degradación/Formación de intermediarios/Adsorción/Absorción

### 8.1. Implicancia del número de células viables sobre la remoción de Cr(VI) y fenol en condiciones inmovilizadas

El contenido de microorganismos viables en las matrices poliméricas es un parámetro a estandarizar cuando se pretende utilizar bacterias inmovilizadas para la biorremediación de contaminantes ambientales. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de remoción simultánea de 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol utilizando diferente cantidad de células viables del cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizadas en perlas de Ca-alginato. En estos experimentos se inocularon Erlenmeyers conteniendo solución fisiológica como medio de reacción, con cantidad creciente de perlas para alcanzar recuentos iniciales de  $3,6 \times 10^8$ ;  $7,2 \times 10^8$  y  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml de medio. La remoción alcanzada en cada condición se evaluó durante tres ciclos consecutivos, como se puede observar en la figura 32.



**Figura 32:** Remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) en función de la cantidad de células del cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizadas en perlas de Ca-alginato durante tres ciclos consecutivos de reutilización. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Letras distintas indican DES en la remoción de cada contaminante durante el mismo ciclo de utilización de las perlas, empleando diferente cantidad de microorganismos viables.

La eficiencia de co-remediación de Cr(VI) y fenol se incrementó significativamente al aumentar la concentración de células viables inoculadas, obteniéndose los mejores resultados con un inóculo de  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml ( $p < 0.05$ ). En esas condiciones, el cultivo mixto inmovilizado removió un 47% de Cr(VI) durante el primer ciclo, 33% en el segundo y 19% en

el tercero. Simultáneamente, se registró la remoción total de fenol en todos los ciclos evaluados.

Sin embargo, cuando se empleó un menor número de células la remoción de Cr(VI) se redujo de manera significativa desde el comienzo del experimento y fue casi nula en el tercer ciclo de reutilización. Tal reducción en el inóculo también afectó negativamente el potencial de degradación de fenol del cultivo mixto, fundamentalmente en el segundo y tercer ciclo de uso de la biomasa inmovilizada.

En estos experimentos, el incremento en la biomasa inoculada se logró agregando un mayor número de perlas en el medio de reacción, lo cual favorece la difusión de nutrientes y contaminantes hacia las células a causa de una mayor disponibilidad de sitios de transferencia de nutrientes y contaminantes por unidad de volumen de la mezcla de reacción (Shetty y col., 2012).

Por el contrario, con el mismo fin, algunos investigadores mantuvieron constante el número de perlas inoculadas, aumentando la concentración de células inmovilizadas en ellas, pero esta estrategia no siempre ha dado buenos resultados, a causa de problemas de difusión generados por una disminución en los canales de transferencia intramatriz (Humphries y col., 2005).

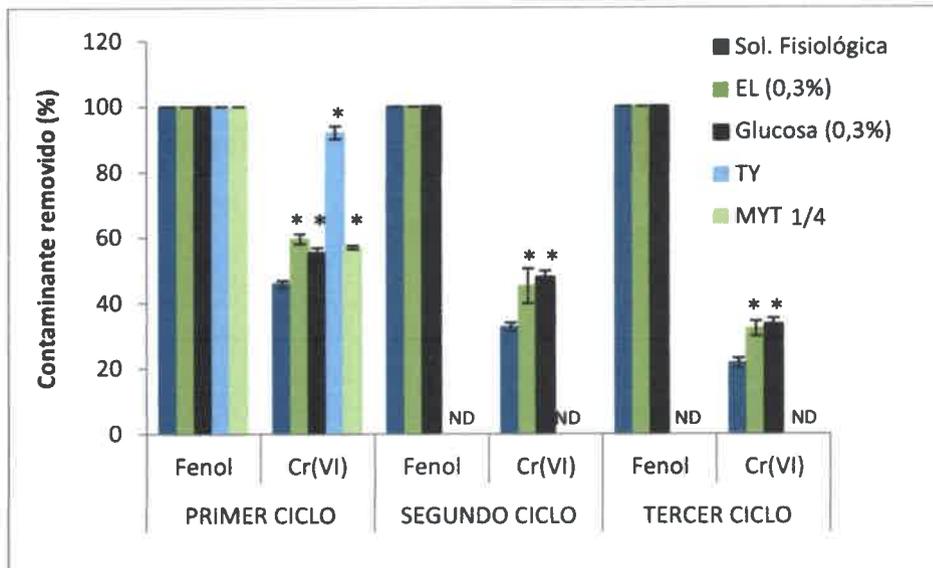
A partir de estos resultados se determinó que la inoculación con  $1,5 \times 10^9$  células del cultivo mixto ocluidas en Ca-alginato permitiría lograr una buena eficiencia de remoción simultánea, por lo que se seleccionó esta condición para continuar con los experimentos de remoción en condiciones inmovilizadas.

## **8.2. Optimización del medio de reacción para la remoción de Cr(VI) y fenol por células inmovilizadas**

La aplicación exitosa de células inmovilizadas para la biorremediación de contaminantes está fuertemente influenciada por la elección de la matriz, la composición del medio de cultivo y la interacción entre ellos (Dey y Paul, 2014). En ese sentido, el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado en una matriz de Ca-alginato y solución fisiológica como medio de reacción fue capaz de remover Cr(VI) utilizando la oxidación de fenol como única fuente de electrones. El Cr(VI) resultó ser el compuesto limitante en el proceso, ya que no se alcanzó su remoción completa independientemente de la concentración celular empleada.

Considerando que una posible estrategia para mejorar la eficiencia de remoción de Cr(VI) del cultivo mixto inmovilizado puede ser la incorporación de fuentes adicionales de electrones (González y col., 2014), se evaluó la capacidad de co-remediación de perlas

conteniendo el cultivo SFC 500-1 en los medios nutritivos TY y MYT 1/4. Además se analizó el efecto de adicionar extracto de levadura (0,3%) o glucosa (0,3%) a la solución fisiológica utilizada inicialmente como medio de reacción. Los resultados se detallan en la figura 33.



**Figura 33:** Remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l) en diferentes medios de cultivo por SFC 500-1 inmovilizado en una matriz de Ca-alginato durante tres ciclos consecutivos de reutilización. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Los asteriscos indican DES con respecto a los porcentajes de remoción de Cr(VI) obtenidos con solución fisiológica como medio de reacción. ND: No determinado.

En los experimentos realizados en medios TY y MYT el cultivo mixto removió hasta un 90% de 25 mg/l de Cr(VI) incorporados y degradó totalmente el fenol (300 mg/l) en 24 horas. Sin embargo, tales resultados no pudieron ser adjudicados sólo a las células inmovilizadas debido al excesivo crecimiento bacteriano detectado en el medio de reacción. Por la misma causa, tampoco se pudo reutilizar las perlas para ciclos subsecuentes. Probablemente algunas células se liberaron desde la matriz de Ca-alginato y se desarrollaron en el medio nutritivo. Otros microorganismos inmovilizados en polímeros tuvieron un comportamiento similar cuando se emplearon caldos nutritivos como medios de reacción para la reducción de Cr(VI); tal es el caso de *Pseudomonas* S4 ocluida en Ca-alginato, cuya densidad celular en el medio de cultivo fue incluso mayor que la alcanzada por cultivos libres al final del proceso de reducción (Frag y Zaki, 2010). De la misma manera, perlas de diferentes polímeros conteniendo *Arthrobacter* SUK 1201, fueron inestables cuando se las inoculó en caldo nutritivo, liberando elevada cantidad de células al medio (Dey y Paul, 2014). Algunos autores han sugerido que tal inestabilidad de las matrices poliméricas en medios

con elevado contenido de nutrientes podría deberse a su sensibilidad a iones y agentes quelantes presentes en el mismo, en el caso del alginato, el reemplazo de  $\text{Ca}^{2+}$  por otros iones lleva a un incremento en el tamaño de los poros, desestabilización y ruptura del gel (Cruz y col., 2013).

Cuando se agregó glucosa o extracto de levadura a la solución fisiológica, la remoción de  $\text{Cr(VI)}$  aumentó hasta alrededor de 60% en el primer ciclo, 48% en el segundo y 33% en el tercero, sin observarse alteraciones en la degradación de fenol. En estos casos no se observó turbidez en el medio de reacción, por lo que no existiría liberación de células durante el primer y segundo periodo de utilización. Sin embargo, hacia el tercer ciclo de remoción se detectó un incremento en la densidad celular de los medios que contenían extracto de levadura, motivo por el cual se decidió emplear glucosa como suplemento para mejorar la remoción simultánea. En ese sentido, el extracto de levadura ha sido empleado como fuente de carbono para el crecimiento de ambos microorganismos, sin embargo, si se observan los resultados detallados en la tabla 4 (primer capítulo), ninguna de las cepas empleadas fue capaz de asimilar glucosa. Probablemente, si hay liberación de células desde el interior de las perlas, la composición del medio no les permitiría crecer lo suficiente como para desarrollar turbidez durante el periodo evaluado.

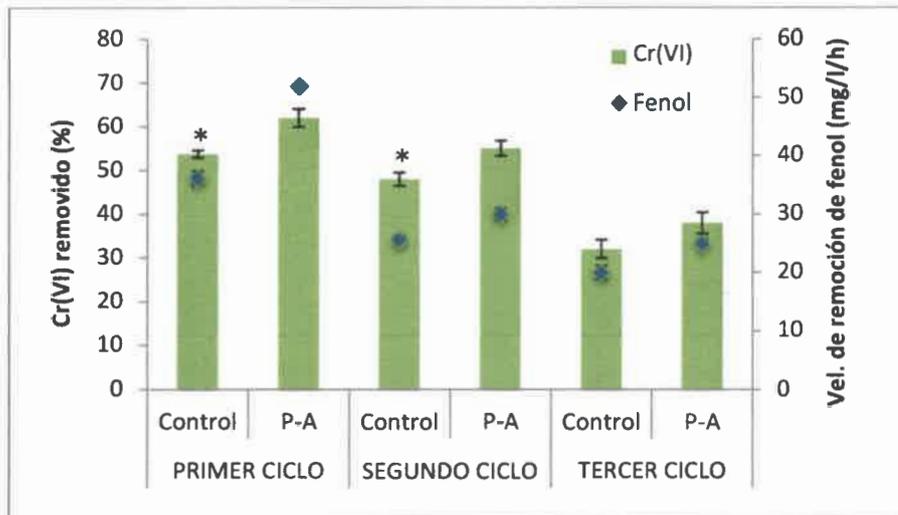
### **8.3. Efecto de la pre-adaptación a los contaminantes antes de la inmovilización**

En el primer capítulo se demostró que la pre-adaptación del cultivo mixto a bajas concentraciones de  $\text{Cr(VI)}$  y fenol permitiría mejorar la remoción simultánea. Considerando esos resultados, se analizó el efecto de dicha pre-adaptación sobre la capacidad de remediación de las células inmovilizadas. Para ello, se hizo crecer a los microorganismos en presencia de 2,5 mg/l de  $\text{Cr(VI)}$  y 100 mg/l de fenol antes de inmovilizarlos en Ca-alginato y se comparó su eficiencia de remoción con respecto a la obtenida por el cultivo mixto sin previa exposición a los contaminantes. Los experimentos de remoción se realizaron en solución fisiológica con glucosa (0,3%),  $\text{Cr(VI)}$  25 mg/l y fenol 300 mg/l, durante tres ciclos consecutivos.

Como se puede observar en la figura 34, las perlas de Ca-alginato que contenían el cultivo mixto pre-adaptado fueron capaces de remover el 63% del  $\text{Cr(VI)}$  incorporado, lográndose un incremento significativo en la eficiencia de remoción del metal con respecto a la alcanzada por células crecidas en condiciones control.

La remoción de fenol fue total en ambas condiciones evaluadas, pero la pre-adaptación celular provocó un incremento en la velocidad del proceso, alcanzándose tasas

superiores a 50 mg/l/h removidos durante el primer ciclo. En la figura 34 se grafican las velocidades registradas para la degradación total de fenol en los tres ciclos de utilización de las perlas, observándose que la pre-adaptación del cultivo mixto aceleró la degradación de este contaminante en un 40% durante el primer ciclo y alrededor del 20-25% en los ciclos siguientes.

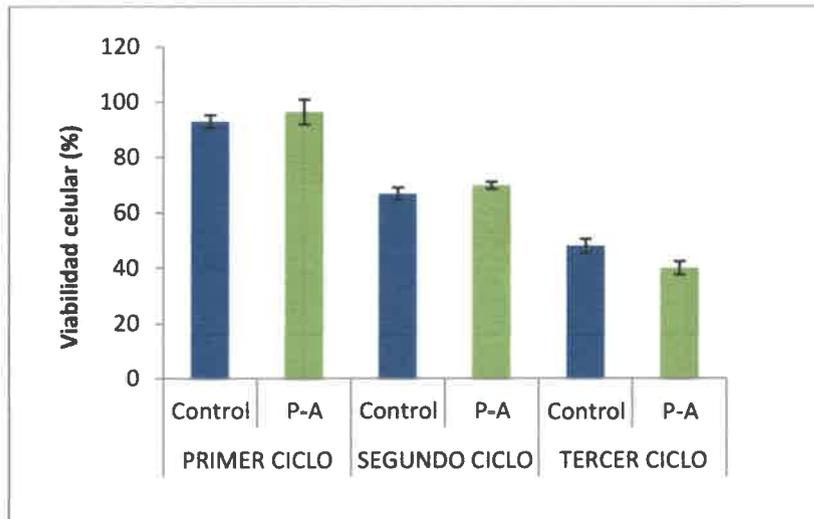


**Figura 34:** Porcentaje de Cr(VI) removido y velocidad máxima de degradación de fenol alcanzados por el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado pre-adaptado (P-A) y sin adaptar (control). Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Los asteriscos indican DES en la remoción de Cr(VI) obtenida en ambas condiciones, en cada ciclo de reutilización de las perlas.

Como se mencionó, el efecto positivo de aclimatar a los microorganismos con bajas concentraciones de compuestos tóxicos puede relacionarse con un aumento en su tolerancia o bien con la activación de ciertas vías metabólicas implicadas en el proceso (González y col., 2012; Ziagova y col., 2014). En ese sentido, el tratamiento de pre-adaptación no modificó la tolerancia del cultivo mixto a la concentración evaluada de los contaminantes, ya que la viabilidad celular dentro de las perlas al final de cada ciclo de remoción fue similar para ambas condiciones (figura 35). Por lo tanto, la mayor eficiencia de co-remediación alcanzada por SFC 500-1 luego de la pre-adaptación podría deberse a un mecanismo de activación metabólica más que a un incremento en la resistencia.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, a través de la inoculación de  $1,5 \times 10^9$  células del cultivo mixto SFC 500-1 pre-adaptadas con 2,5 mg/l de Cr(VI) y 100 mg/l

de fenol en un medio de reacción compuesto por solución fisiológica y glucosa (0,3%), se lograría una eficiente remoción simultánea de los contaminantes analizados. Queda por evaluar cómo afecta la concentración inicial de esos contaminantes a la capacidad de remoción de las bacterias inmovilizadas.



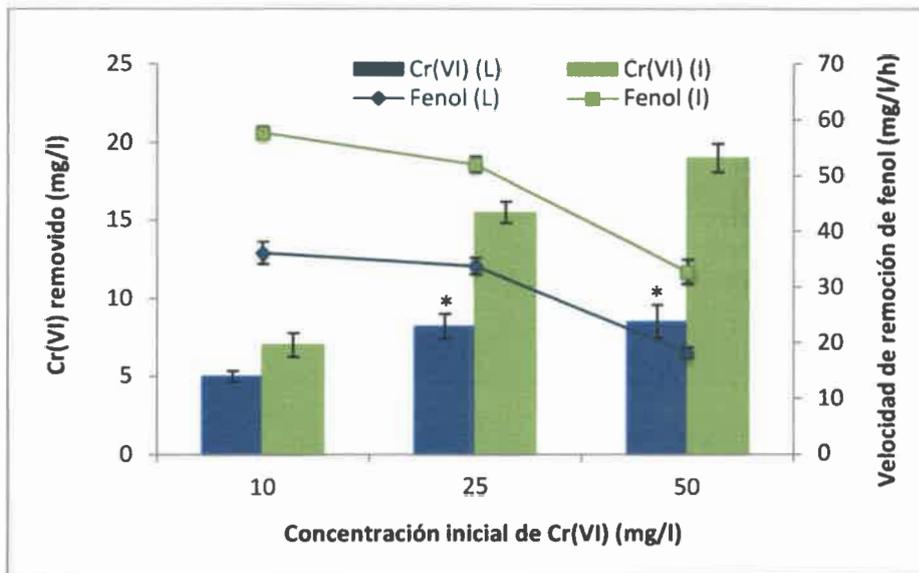
**Figura 35:** Recuento de células viables del cultivo mixto SFC 500-1 pre-adaptado (P-A) y sin adaptar (control) inmovilizado en una matriz de Ca-alginato al final de cada ciclo de remoción. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables con respecto al recuento inicial. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

#### 8.4. Efecto de la concentración inicial de Cr(VI) sobre la remoción

Se analizó el efecto de la inmovilización sobre la capacidad del cultivo mixto para remover diferentes concentraciones de Cr(VI) (10, 25 y 50 mg/l) en presencia de fenol (300 mg/l), bajo las condiciones óptimas seleccionadas, después de 24 horas de exposición.

En los experimentos realizados se observó que aunque el cultivo mixto inmovilizado no removió completamente ninguna de las concentraciones de Cr(VI) analizadas, su capacidad para remediar el metal se incrementó en presencia de mayores concentraciones de Cr(VI) en el medio de reacción (figura 36). Este es un comportamiento común de los microorganismos inmovilizados, cuya capacidad de remoción aumenta al incrementar hasta ciertos valores la concentración de los contaminantes (Pal y col., 2013; Dey y Paul, 2014). Este fenómeno se debería al proceso físico de difusión, responsable del transporte de materia dentro de las perlas hacia las células. Para que los contaminantes difundan dentro

de la perla, deben alcanzar cierta concentración en el medio de reacción. Si su concentración es baja, la difusión dentro de la perla será limitada y por lo tanto, la remoción también se vería afectada. Por el contrario, cuando se incrementa la concentración en la fase líquida, dentro del soporte se alcanzarían concentraciones mayores, lo cual favorecería al proceso de remoción (Martínez-Trujillo y García- Rivero, 2012).



**Figura 36:** Remoción de Cr(VI) (barras) y velocidad máxima de degradación de fenol (líneas) obtenidos con células libres (◆) e inmobilizadas (■) del cultivo mixto, expuestas a concentraciones crecientes de Cr(VI). Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Los asteriscos indican DES en la remoción de Cr(VI) alcanzada por células libres e inmobilizadas.

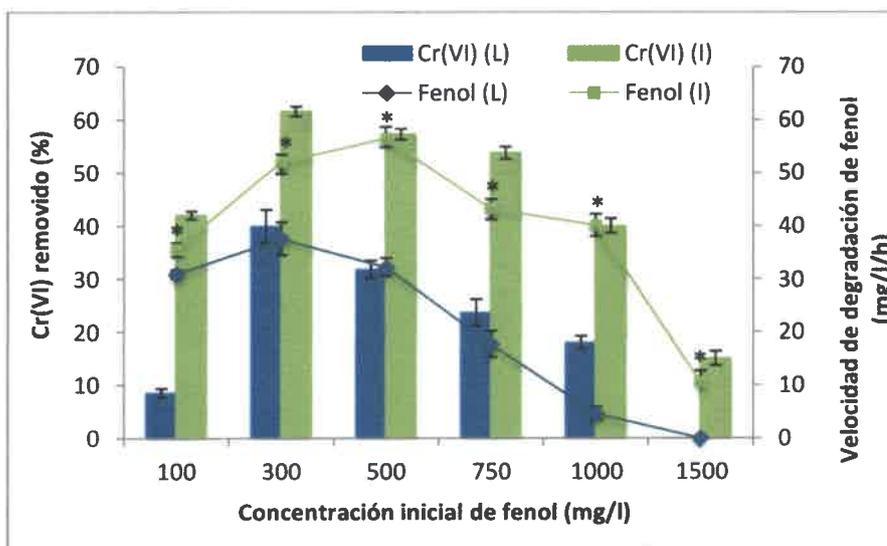
Bajo idénticas condiciones de operación las células inmobilizadas mostraron una capacidad de remoción significativamente superior que las células libres ( $p < 0,05$ ), alcanzando un máximo de 19 mg/l de Cr(VI) removidos en menos de 24 horas cuando se incorporó una concentración inicial de 50 mg/l del metal.

Por otro lado, la degradación de fenol fue total en todas las condiciones ensayadas (300 mg/l), sin embargo el proceso fue más lento en presencia de elevadas concentraciones de Cr(VI). Como se puede ver en la figura, el efecto negativo del Cr(VI) sobre la velocidad de degradación de fenol fue más marcado para las células libres que para las inmobilizadas. Esto se debería a que las sustancias poliméricas extracelulares constituyen una importante barrera para la difusión de sustancias tóxicas hacia las células, por lo que las bacterias inmobilizadas son menos susceptibles a esos tóxicos y metabólicamente más activas en su

presencia que los microorganismos planctónicos (Schwering y col., 2013; Otter y col., 2014). Esto explicaría el mejor rendimiento del cultivo mixto inmovilizado con respecto al libre para remover ambos contaminantes.

### 8.5. Efecto de la concentración inicial de fenol sobre la remoción

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones iniciales de fenol sobre la capacidad de remoción simultánea del cultivo mixto. Para ello, se expuso a SFC 500-1 en condiciones libres e inmovilizadas a concentraciones de fenol comprendidas entre 100 y 1500 mg/l en presencia de 25 mg/l de Cr(VI) (figura 37).



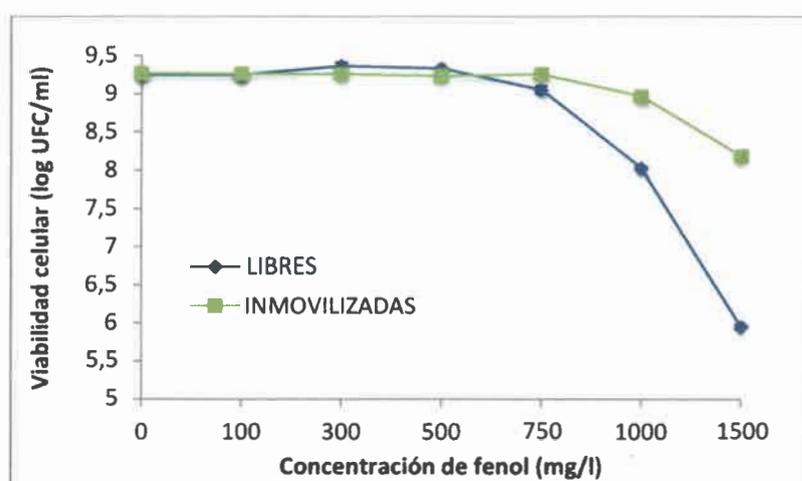
**Figura 37:** Velocidad máxima de degradación de fenol (líneas) y porcentaje de remoción de Cr(VI) (barras) obtenidos con células libres (◆) e inmovilizadas (■), expuestas a concentraciones crecientes de fenol. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Los asteriscos indican DES en la velocidad de degradación de fenol, alcanzada por células libres e inmovilizadas.

Se observó que el cultivo mixto fue capaz de remover completamente hasta 1000 mg/l de fenol tanto en condiciones inmovilizadas como libres. Sin embargo, la velocidad de degradación alcanzada por el sistema inmovilizado fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a la registrada para células libres. La velocidad máxima de degradación para las células inmovilizadas fue 56,5 mg/l/h cuando se incorporaron 500 mg/l de fenol, y se redujo hasta 40 mg/l/h para 1000 mg/l. Por el contrario, las células libres alcanzaron una velocidad

máxima de 37,6 mg/l/h para remover completamente 300 mg/l de fenol y de 18 mg/l/h para remover 1000 mg/l de este contaminante. Cuando se incorporaron 1500 mg/l, las células libres no fueron capaces de removerlo, mientras que el cultivo mixto inmovilizado lo removió completamente a una velocidad cercana a los 10 mg/l/h.

Por otra parte, las células inmovilizadas removieron más del 40% de Cr(VI) en todas las condiciones analizadas, mientras que las células libres removieron entre 8 y 40% del metal, o fueron incapaces de removerlo frente a concentraciones muy elevadas de fenol (1500 mg/l).

Además, como se observa en la figura 38, el recuento celular en las dos condiciones analizadas se mantuvo prácticamente constante hasta concentraciones de fenol de 750 mg/l, pero cuando se incorporaron concentraciones más elevadas, la toxicidad del compuesto fue mayor para las células libres que para las inmovilizadas. La proporción de los miembros del cultivo mixto dentro de las perlas se mantuvo relativamente constante en todos los experimentos, observándose una clara superioridad de *A. guillouiae* con respecto a *Bacillus sp.* Por el contrario, cuando se utilizaron células libres, a medida que se incrementó la concentración de fenol, también lo hizo la proporción de *Bacillus sp.*, que fue cercana al 100% en presencia de 1500 mg/l del contaminante.



**Figura 38:** Recuento de células viables libres e inmovilizadas luego de la remoción total de concentraciones crecientes de fenol en presencia de 25 mg/l de Cr(VI). Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

En base a estos resultados, se podría deducir que la inmovilización del cultivo mixto SFC 500-1 dentro de una matriz de Ca-alginato no sólo lo protegió de los efectos tóxicos de

elevadas concentraciones de fenol, sino que además favoreció su capacidad para degradarlo a alta velocidad y mejorar la remoción simultánea de Cr(VI). La inmovilización de microorganismos en perlas de este polímero ha sido previamente reportada como una herramienta efectiva para favorecer la degradación de elevadas concentraciones de fenoles por microorganismos ambientales, gracias a la protección celular y la activación metabólica que éste genera (Banerjee y col., 2011; Wang y col., 2012). En ese sentido, además de crear un microambiente más propicio para el desarrollo bacteriano, la inmovilización favorece la estabilización de las membranas, que son los principales blancos de acción de los fenoles, evitándose que de ese modo se desencadene una fuerte respuesta oxidativa y daño celular (Cassidi y col., 1996; Kadakol y col., 2011).

Queda claro que además de presentar una mayor resistencia ante la toxicidad de los contaminantes, el cultivo mixto inmovilizado demostró una elevada capacidad para remediarlos. La biodisponibilidad de mayores concentraciones de nutrientes, los cuales son atrapados por el soporte y la activación de genes específicos, serían los principales factores que estimulan el metabolismo celular de las bacterias inmovilizadas (Cohen y col., 2001).

#### **8.6. Estabilidad y reutilización del cultivo mixto inmovilizado**

La estabilidad durante prolongados periodos de almacenamiento y operación son factores esenciales a considerar para la aplicación práctica de un sistema inmovilizado en cualquier tipo de proceso.

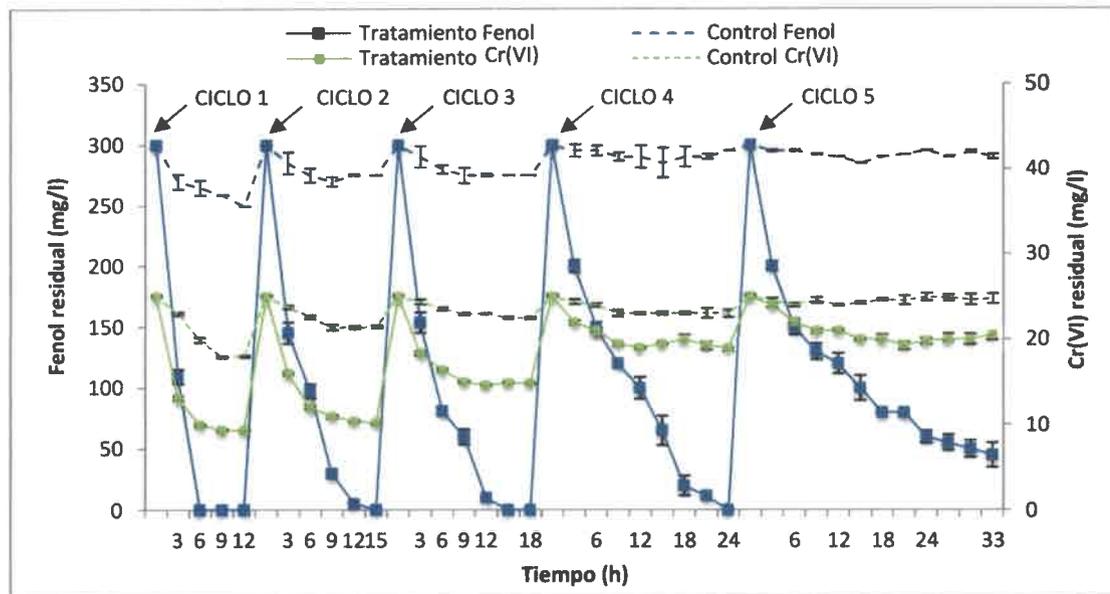
En este sentido, las perlas conteniendo el cultivo mixto SFC 500-1 mostraron buena estabilidad al ser almacenadas a 4°C y mantuvieron su potencial de remoción luego de periodos de conservación de 45 días. Sin embargo, luego de 60 días de almacenamiento, disminuyó la viabilidad celular dentro de las perlas, causando una reducción en su capacidad de co-remediación (resultados no graficados).

Por otro lado, aunque en experimentos anteriores se demostró la capacidad del cultivo inmovilizado para remover ambos contaminantes durante tres ciclos consecutivos, resultó interesante evaluar más profundamente su potencial de reutilización. Para ello se evaluaron parámetros tales como el número máximo de ciclos en los que el sistema conserva su eficiencia, los tiempos requeridos para la remoción simultánea en cada ciclo y la influencia de la matriz en el proceso.

La posibilidad de reutilización de SFC 500-1 inmovilizado se analizó aplicándolo en repetidos ciclos de remoción de 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol. En esas condiciones, el 100% del fenol fue removido hasta el cuarto ciclo consecutivo de utilización, aunque la

velocidad de degradación disminuyó a lo largo del tiempo. Como se puede observar en la figura 39, el tiempo necesario para remover completamente el fenol se extendió de 6 a 24 horas entre el primer y el cuarto ciclo de reutilización. En el quinto ciclo, la remoción disminuyó a un 85% luego de 33 horas de operación.

De manera similar, las bacterias removieron hasta 16 mg/l de Cr(VI) en 9 horas durante el primer ciclo y la eficiencia de remoción se redujo paulatinamente en los ciclos siguientes.

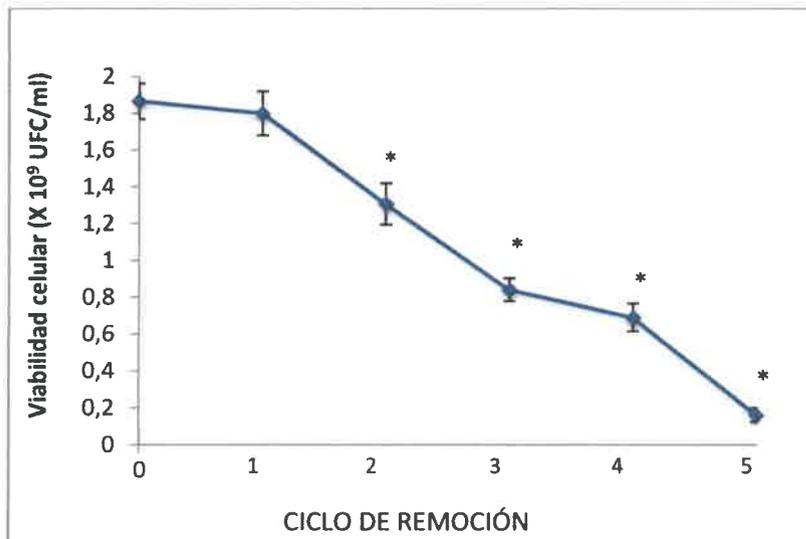


**Figura 39:** Remoción de Cr(VI) y fenol por el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado en perlas de Ca-alginato conteniendo durante varios ciclos de reutilización. Los controles se efectuaron con perlas no inoculadas. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Las flechas indican el comienzo de un nuevo ciclo de utilización de las perlas.

La disminución en la eficiencia de remediación a lo largo del tiempo es una característica común en los sistemas inmovilizados, aunque la cantidad de ciclos de reutilización depende de la matriz, de los microorganismos empleados y fundamentalmente del contaminante a tratar y su concentración. Por ejemplo, *B. cereus* AKG2 inmovilizado en Ca-alginato fue capaz de remover fenol durante tres ciclos consecutivos de reutilización, mientras que un consorcio formado por *Acinetobacter* sp. XA05 y *Sphingomonas* sp. FG03 inmovilizado en la misma matriz conservó elevada capacidad para degradar dicho contaminante durante 20 ciclos. Por el contrario, en la mayoría de los reportes disponibles en la bibliografía sobre remoción de Cr(VI) por células inmovilizadas, las bacterias no

podieron remover eficientemente el compuesto durante más de cinco ciclos (Pal y col., 2013; Ziagova y col., 2014; Dey y Paul, 2014).

Entre los principales causantes de la disminución de la eficiencia de remoción durante la reutilización prolongada de microorganismos inmovilizados se encuentran la desestabilización mecánica de las perlas, que provoca pérdida de células viables desde el interior de la matriz y el deterioro de las propiedades bioquímicas de las cepas implicadas (Tallur y col., 2009; Sinha y Khare, 2012). De acuerdo con esto, la disminución en la eficiencia de remoción del cultivo mixto SFC 500-1 se vio acompañada con una marcada pérdida de viabilidad celular en el interior de las perlas entre el primero y el quinto ciclo de utilización (figura 40). Además, hacia el final del proceso las perlas presentaron modificaciones en su apariencia, tales como incremento en el tamaño, cambio en la coloración de blanco-opaco a amarillento-translúcido y pérdida de estabilidad mecánica.



**Figura 40:** Recuento de células viables del cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado, al finalizar cada ciclo de remoción de Cr(VI) (25 mg/l) y fenol (300 mg/l). Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). Los asteriscos indican DES entre el recuento inicial (ciclo 0) y el obtenido al final de cada ciclo de utilización.

Más allá de la disminución en la eficiencia de remoción a lo largo del tiempo, la posibilidad de reutilizar las perlas durante 4-5 ciclos es muy importante, considerando la reducción en los costos operacionales que ello implica. Sin embargo y aunque se conocen las ventajas de aplicar microorganismos inmovilizados en lugar de células libres, existen escasos

reportes del uso de bacterias inmovilizadas para la remoción simultánea de mezclas de compuestos orgánicos e inorgánicos (Chakraborty y col., 2013; Shim y col., 2014).

Hasta el momento se ha relacionado la remoción de los contaminantes por el cultivo mixto inmovilizado principalmente con procesos biológicos, dependientes de su capacidad metabólica. No obstante, no hay que perder de vista que la matriz empleada podría tener capacidad para establecer una interacción físico-química con esos contaminantes. En este trabajo se detectó remoción de Cr(VI) y fenol por perlas sin inocular (control) durante los dos primeros ciclos de remediación, la cual disminuyó con el tiempo, haciéndose casi despreciable hacia el quinto ciclo (figura 39). Considerando esos resultados, la remoción estaría mayoritariamente asociada a procesos biológicos, pero no debería subestimarse la interacción entre los contaminantes y el polímero.

### 8.7. Determinación de los productos de remoción de Cr(VI)

Entre los principales mecanismos de remoción de Cr(VI) por bacterias se encuentra su reducción a Cr(III). Teniendo en cuenta que en el capítulo anterior se demostró la capacidad de SFC 500-1 para reducir el metal creciendo en condiciones libres, es probable que dicho proceso también esté involucrado también en la remoción llevada a cabo por células inmovilizadas.

Con el fin de determinar la implicancia de la reducción de Cr(VI) y de su adsorción/absorción en la matriz de alginato, al final de los cinco ciclos de reutilización de las perlas se determinó la presencia y distribución de Cr(VI) y Cr(III) tanto en dichas perlas como en el medio de reacción.

**Tabla 6:** Distribución (%) de Cr(VI) y Cr(III) en sobrenadantes y perlas luego de 5 ciclos de remoción de 25 mg/l de Cr(VI) en presencia de 300 mg/l de fenol.

CONDICIÓN	Sobrenadante		Perlas	
	Cr(VI)	Cr (III)	Cr(VI)	Cr (III)
Control	94,5 $\pm$ 0,6	-	5,3 $\pm$ 1,3	0,2 $\pm$ 0,1
Perlas inoculadas	64,6 $\pm$ 1,7	23,7 $\pm$ 0,9	5,7 $\pm$ 0,7	6,0 $\pm$ 0,5

Se consideró como 100% a la suma de todas las especies detectadas de Cr para cada condición. Control: Perlas no inoculadas. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=3).

Como se detalla en la tabla 6, tanto en las perlas inoculadas con el cultivo mixto como en su sobrenadante se detectaron ambas especies de Cr, lo que demuestra la expresión de mecanismos de reducción de Cr(VI) a Cr(III) en las células inmovilizadas. Sin embargo la proporción del metal en las perlas (11,7%) fue significativamente inferior a la registrada en el sobrenadante (88,3%). Además, aunque la mayoría del Cr(III) formado durante la reducción permaneció en el medio, una fracción del mismo se asoció a la matriz, probablemente por algún mecanismo de adsorción.

Por el contrario, en los controles sin inocular prácticamente la totalidad del Cr correspondió a la especie hexavalente, disuelta en el medio de reacción. La concentración de Cr(VI) registrada en las perlas luego de ambos tratamientos fue prácticamente la misma (alrededor de 5,5%), lo que reflejaría la escasa contribución de la adsorción en la matriz durante la remoción.

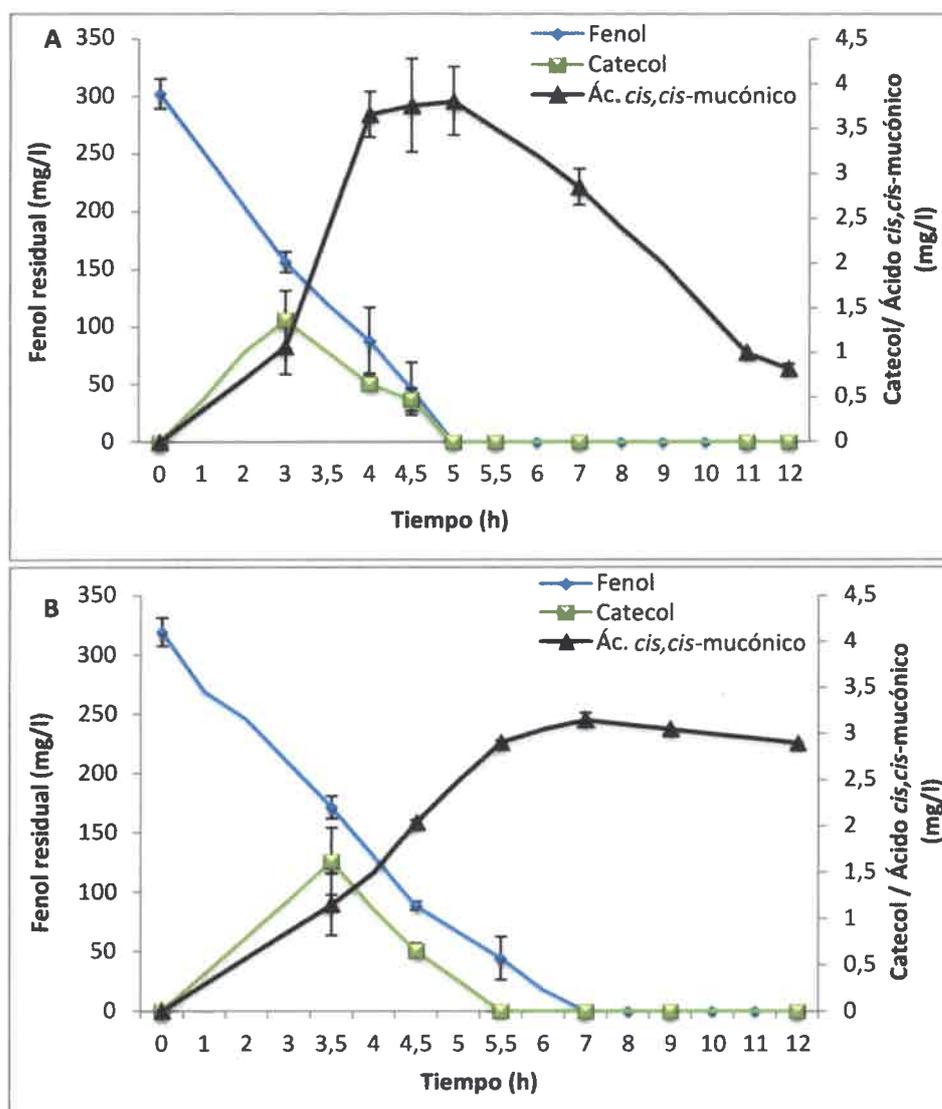
Este resultado concuerda con los obtenidos en el capítulo anterior y demuestra la capacidad del cultivo mixto para reducir Cr(VI) en diferentes condiciones de operación. Además permite confirmar que la remoción del metal se debe principalmente a mecanismos biológicos. Resultaría interesante poder profundizar respecto de dichos mecanismos biológicos que participan en la reducción de Cr(VI) a Cr(III) en las cepas que componen el cultivo mixto. En ese contexto, las cromato reductasas, principales enzimas bacterianas que catalizan la reducción son de gran interés y su aislamiento e inmovilización podría ser una herramienta biotecnológica útil para solucionar ciertas limitaciones que presenta el uso de células completas en biorremediación (Thatoi y col., 2014).

### 8.8. Detección y cuantificación de fenol y los productos de su degradación

Se conoce que la degradación de fenol por bacterias creciendo en condiciones aerobias requiere de al menos dos pasos fundamentales, en primer lugar, la oxidación de fenol a catecol y posteriormente la degradación de catecol a compuestos fácilmente asimilables por las células, que puede ocurrir a través de dos vías diferentes. En la vía *meta* el catecol es transformado a semialdehído 2-hidroximucónico y luego a acetaldehído y piruvato, mientras que en la vía *orto* los principales intermediarios son ácido *cis,cis*-mucónico y  $\beta$ -cetoadipato (Bhattacharya y col., 2014).

Como una primera aproximación para comprender qué vías intervienen en la remoción de fenol por las bacterias que componen el cultivo mixto, se analizó por HPLC la presencia de catecol en el medio de reacción de las perlas a lo largo del tiempo. Además, considerando que la vía *orto* es la más difundida entre las bacterias ambientales, también se

analizó la presencia del ácido *cis,cis*-mucónico (Alva y Peyton, 2003). Es importante destacar que esta vía de degradación es típica entre las bacterias del género *Acinetobacter*, al que pertenece la única cepa del cultivo mixto capaz de remover fenol, según se determinó en experimentos previos (Pandeti y col., 2011; Bhattacharya y col., 2014). Como el Cr(VI) podría interferir en la degradación de fenol, la presencia de esos metabolitos se evaluó tanto en presencia como en ausencia del metal (figura 41 A y B, respectivamente).



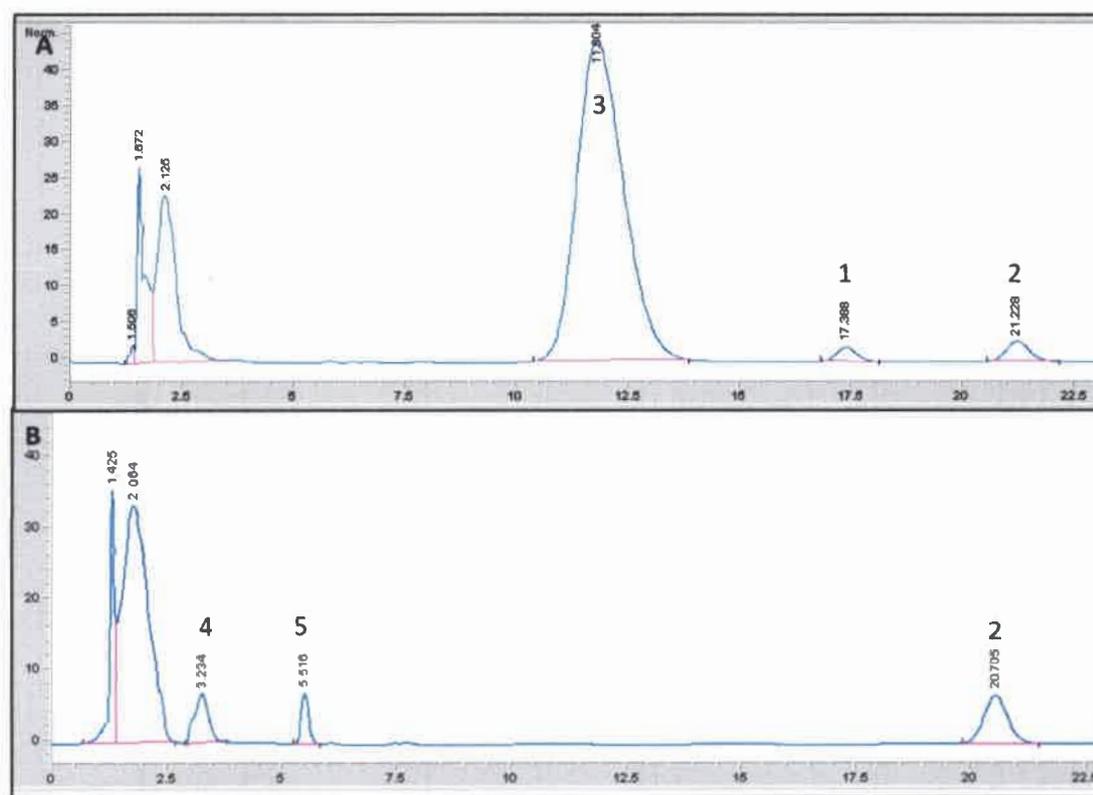
**Figura 41:** Remoción de fenol (300 mg/l) y formación de catecol y ácido *cis,cis*-mucónico a lo largo del tiempo por el cultivo mixto SFC 500-1 inmovilizado en Ca-alginato, en medios no suplementados (A) y suplementados con Cr(VI) (25 mg/l) (B). Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=3).

Los resultados obtenidos mediante HPLC confirmaron que la desaparición de fenol durante el transcurso del tiempo ocurrió tal como se había detectado mediante la técnica colorimétrica de Wagner y Nicell (2002). Además, cuando ocurrió el 50% de degradación de fenol, se observó el pico máximo de catecol. Sin embargo, este intermediario resultó más inestable en presencia de Cr(VI), ya que no se pudo cuantificar luego del 85% de degradación de fenol (Figuras 41 A y B). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, quienes indicaron que el catecol formado durante la oxidación de compuestos aromáticos podría liberarse parcialmente al medio de cultivo, alcanzando concentraciones inferiores a 20 mg/l y luego ser re-internalizado en las células o bien continuar siendo degradado en el medio (Alva y Peyton, 2003; Tuah y col., 2009).

Hacia el final del proceso de remoción de fenol en ambas condiciones analizadas se incrementó la concentración de ácido *cis,cis*-mucónico en el medio. Sin embargo, luego de la degradación total de fenol, el comportamiento de este intermediario a lo largo del tiempo fue diferente en presencia y en ausencia de Cr(VI). En los medios que sólo contenían fenol, la concentración de ácido *cis,cis*-mucónico disminuyó gradualmente a lo largo del tiempo, pero cuando ambos contaminantes estuvieron presentes, su concentración se mantuvo constante incluso varias horas después de la desaparición del fenol. Se sabe que cuando algunas bacterias crecen en condiciones desfavorables pierden su capacidad para reingresar ácido *cis,cis*-mucónico a las células durante la oxidación de compuestos aromáticos (Alva and Peyton, 2003). En este caso particular, el Cr(VI) podría haber alterado ciertas proteínas de membrana implicadas en el transporte de los productos de oxidación, provocando que la vía de degradación transcurra más lentamente (Williams y Shaw, 1997).

Independientemente de la condición analizada, luego de la completa remoción de fenol por el cultivo mixto, se observó la formación de otros productos, que no pudieron ser identificados. A modo de ejemplo, se muestran los cromatogramas obtenidos en presencia de Cr(VI) y fenol durante el 50 y 100% de su degradación (figura 42 A y B, respectivamente). Los picos 4 y 5 señalados en el cromatograma podrían corresponder a compuestos como muconolactona,  $\beta$  cetoadipato o succinato e indicarían que la reacción de oxidación continúa hasta la mineralización de fenol (Tuah y col., 2009). Sin embargo, debido a la ausencia de testigos comerciales de la mayoría de estos intermediarios, su identificación no es posible a través de HPLC o GC convencionales, sino que requiere la aplicación de técnicas más complejas como espectrometría de masas. Esto explicaría el reducido número de trabajos donde se detectan todos los compuestos formados durante la *orto* escisión de fenol (Senthilvelan y col., 2013).

El análisis por HPLC de los controles abióticos (sin perlas) reveló que no hubo desaparición de fenol durante todo el proceso. Por el contrario, en los controles abióticos con perlas no inoculadas se observó una disminución en la concentración de fenol entre 14 y 17%, probablemente debido a su adsorción por la matriz, ya que no se detectó la formación de ningún compuesto adicional.



**(A)** Cromatograma obtenido de una muestra conteniendo 300 mg/l de fenol, en presencia de Cr(VI) durante el 50% de remoción de fenol (pico 1: catecol, pico 2: ácido *cis,cis*-mucónico, pico 3: fenol residual). **(B)** Cromatograma obtenido de una muestra conteniendo 300 mg/l de fenol, en presencia de Cr(VI) al momento de la remoción total de fenol (pico 2: ácido *cis,cis*-mucónico, picos 4 y 5: compuestos no identificados).

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de los ensayos de remediación de contaminantes orgánicos es su mineralización o biotransformación a compuestos inocuos, los resultados obtenidos en este ensayo son relevantes ya que demostraron que tanto en presencia como en ausencia de Cr(VI), el fenol es eficientemente biorremediado por el cultivo mixto SFC 500-1 a través de la vía de escisión *orto*.

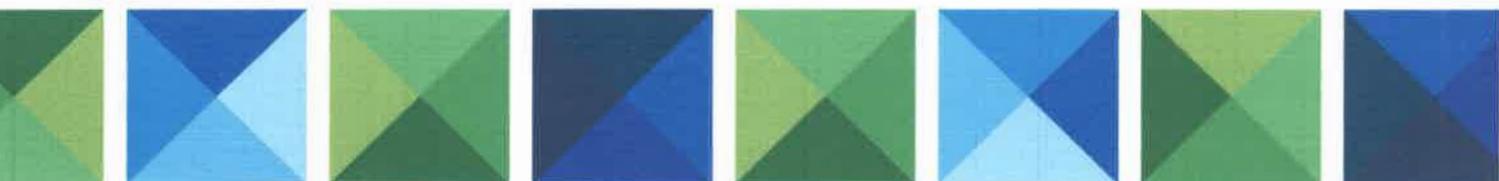
En el capítulo siguiente se realizará una evaluación más profunda de los mecanismos implicados en la remediación de ambos compuestos por las cepas que componen el cultivo mixto.

## Capítulo III

Mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en la tolerancia y detoxificación de Cr(VI) y fenol por las bacterias en estudio.



# Introducción



### 9.1. Adaptación microbiana a la contaminación ambiental

Los microorganismos son los seres vivos más abundantes y diversos del planeta, con una participación crucial en los ciclos biogeoquímicos y en el funcionamiento de los ecosistemas. La mayoría de las comunidades microbianas que existen en la naturaleza son extremadamente complejas en términos de estructuras ecológicas, patrones de interacción y fluctuaciones evolutivas (Song y col., 2014). La introducción de contaminantes en un ambiente determinado es uno de los principales factores que puede alterar dicha complejidad, modificando la diversidad microbiana a través de la selección de los individuos más tolerantes. En general, las comunidades bacterianas mejor adaptadas a las condiciones geoquímicas de sitios contaminados presentan abundancia de genes clave, involucrados en la tolerancia a contaminantes específicos tales como nitratos, metales pesados y solventes orgánicos (Hemme y col., 2010).

Se han identificado dos mecanismos principales por los cuales los microorganismos pueden mitigar los efectos nocivos de la exposición a los contaminantes. Uno de ellos es la transformación de los mismos en sustancias menos tóxicas a través de quelación, metilación y cambios en el estado redox de sustancias inorgánicas (Dimkpa y col., 2008; Borch y col., 2010; Rinklebe y col., 2010) o bien degradación, en el caso de compuestos orgánicos (Hussain y col., 2009). El otro mecanismo se basa en una serie de procesos de resistencia interna que permiten la supervivencia de los microorganismos y que pueden aplicarse tanto para contaminantes orgánicos como inorgánicos. Entre ellos se puede mencionar la presencia de barreras de exclusión y secuestro, sistemas de eflujo activo y activación de la respuesta antioxidante (Puglisi y col., 2012; Mani y col., 2013).

Los determinantes genéticos de la tolerancia y detoxificación de contaminantes de diferente naturaleza, se encuentran tanto en el cromosoma bacteriano como en elementos móviles, entre ellos plásmidos y transposones. El éxito de algunos microorganismos frente a otros en la supervivencia en ambientes contaminados estaría relacionado con mecanismos genéticos tales como recombinación, mutaciones o transferencia horizontal de genes (Puglisi y col., 2012).

La adecuada comprensión de estos mecanismos bioquímicos, fisiológicos y moleculares, es un requisito previo para la aplicación de bacterias en ambientes contaminados y en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para el monitoreo ambiental, selección y estudio del potencial biorremediador de ciertas cepas o comunidades.

## 9.2. Mecanismos bacterianos de tolerancia a Cr(VI)

Como ya ha sido descrito a lo largo de esta tesis, el Cr es uno de los metales pesados más tóxicos, y el incremento de su concentración en el ambiente a causa de la liberación desmedida por actividades industriales y mineras es una cuestión alarmante.

La capacidad de los microorganismos para tolerar este metal depende fuertemente del estado de oxidación en el que se encuentre. El Cr(III) tiende a precipitar y formar complejos insolubles, por lo que difícilmente atraviesa las membranas plasmáticas e ingresa al citoplasma (Zayed y Terry, 2003). Por el contrario, debido a su elevada reactividad, el Cr(VI) es altamente tóxico y suele ser internalizado en las células en su forma aniónica a través de sistemas de transporte de sulfato (Ramírez- Díaz y col., 2008). Sin embargo, existen cepas bacterianas con interesantes mecanismos de tolerancia que les permiten crecer en presencia de elevadas concentraciones de Cr(VI). Entre esos mecanismos se destacan la presencia de bombas de expulsión del tipo ChrA y de cromato reductasas (He y col., 2011), que se describirán a continuación.

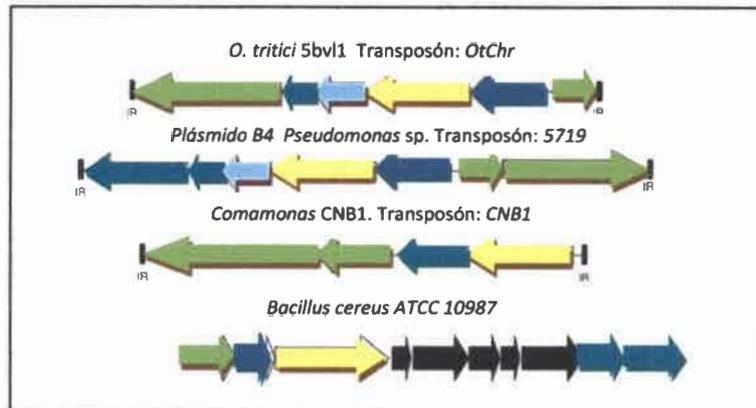
### 9.2.1. Eflujo del ion cromato

Uno de los mecanismos de tolerancia a Cr(VI) más estudiados es el eflujo del metal a través de la proteína ChrA, una bomba de expulsión transmembrana dependiente de la fuerza protón-motriz. Esta proteína pertenece a la superfamilia de transportadores CHR, y ha sido caracterizada en diversos géneros bacterianos, tales como *Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Bacillus*, *Shewanella* y *Ochrobactrum* (Viti y col., 2014). Además, algunos posibles homólogos fueron identificados luego del secuenciamiento de genomas bacterianos y se conoce su presencia en plantas, hongos y arqueas (Díaz- Pérez y col., 2007).

Las bombas de eflujo ChrA pueden ser monodominio (SCHR, de aproximadamente 200 aminoácidos) o bidominio (LCHR, de alrededor de 400 aminoácidos), aunque las bacterianas por lo general se clasifican dentro del segundo grupo y presentan alrededor de 10 segmentos  $\alpha$ - hélice transmembrana (Cervantes y Campos García, 2007).

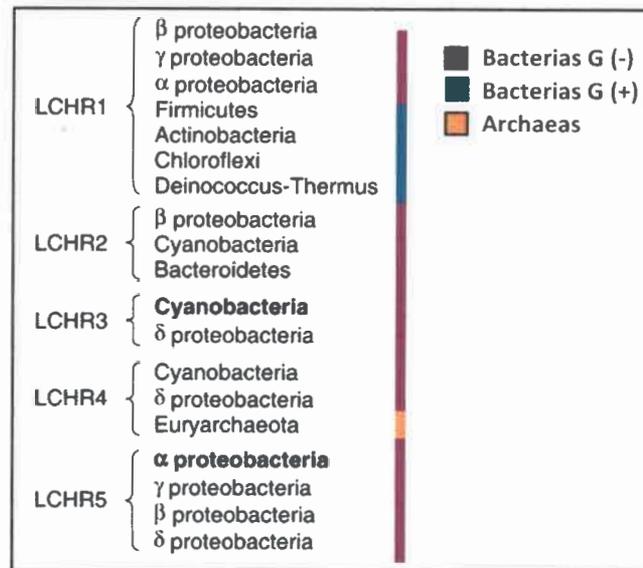
Los genes codificantes para las proteínas ChrA se encuentran incluidos en operones, que pueden estar presentes en el cromosoma bacteriano, aunque por lo general se asocian al ADN plasmídico. Esos operones presentan diferente número de marcos abiertos de lectura (ORF) y suelen estar flanqueados por secuencias correspondientes a transposasas y resolvasas, sugiriendo la posible transferencia horizontal de los mismos entre microorganismos (Vasconcelos Morais y col., 2011). Aunque el contenido y orientación de los genes en el operón

varía de acuerdo a la especie analizada, el único gen presente en todos los casos es *chrA*, tal como se puede observar en la figura 43.



**Figura 43:** Representación esquemática del contexto genómico de los genes *chr* en bacterias pertenecientes a diferentes géneros. IR: Regiones repetidas invertidas. Genes: ■ *chrA* (transportador del ion cromato) ■ *tnp* (transposasas); ■ *chrB* (posible regulador transcripcional); ■ *chrC* (posible proteína SOD); ■ resistencia a arsénico; ■ Función desconocida. (Adaptada de Vasconcelos Morais y col., 2011).

Si bien los genes *chrA* no están conservados dentro del dominio Bacteria, se conoce que las proteínas que éstos codifican se clasifican dentro de 6 subfamilias de transportadores bidominio LCHR, de alrededor de 400 aminoácidos de longitud. Bacterias correspondientes a un grupo taxonómico, por lo general presentan proteínas de la misma subfamilia (figura 44). Por ejemplo, todas las bacterias Gram positivas presentarían proteínas LCHR de la subfamilia 1 y las  $\gamma$  proteobacterias, aquellas correspondientes a LCHR 1 y 5.



**Figura 44:** Árbol filogenético de la subfamilia de proteínas LCHR en procariontas, de acuerdo a su clasificación taxonómica. (Adaptada de Díaz- Pérez y col., 2007).

Más allá del amplio conocimiento sobre las proteínas de la familia CHR, existen pocos trabajos relacionados con el estudio de la distribución del gen *chrA* en poblaciones de microorganismos (Caballero-Flores y col., 2012). Además, aunque la detección de determinantes genéticos de tolerancia a metales ha sido descrita como una herramienta eficaz a la hora de seleccionar cepas para su biotratamiento (Patra y col., 2010), aún no han sido diseñados cebadores género-específicos para evaluar la presencia de *chrA* en bacterias aisladas del ambiente.

### 9.2.2. Reducción de Cr(VI) a Cr(III)

La reducción microbiana de Cr(VI) a Cr(III) se considera un proceso de detoxificación del metal, el cual puede ocurrir tanto aeróbica como anaeróticamente y las enzimas involucradas comúnmente están codificadas a nivel cromosómico. En presencia de oxígeno el Cr(VI) es reducido mayormente por cromato reductasas, que son flavín mononucleótido reductasas dependientes de NAD(P)H. Las mismas son muy diversas dentro del dominio Bacteria y pueden presentar un amplio rango de tamaño, localización, condiciones de reducción y parámetros cinéticos (Ramírez Díaz y col., 2008). En cambio, las bacterias anaerobias utilizan Cr(VI) como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria (Elangovan y col., 2010).

La primera cromato reductasa descrita fue aislada de *Enterobacter cloacae* HO1, está asociada a la fracción de membrana y transfiere electrones a Cr(VI) a través de citocromos dependientes de NADH (Ohtake y col., 1990). Posteriormente a este hallazgo, han sido caracterizadas cromato reductasas pertenecientes a numerosos géneros bacterianos, por lo general, en el contexto de sustratos alternativos. Por ejemplo, las nitrorreductasas NfsA/ NfsB de *Vibrio harveyi*, con actividad secundaria cromato reductasa (Kwak y col., 2003), o la reductasa férrica FerB de *Paracoccus denitrificans*, que emplea Fe(III)-nitrotriacetato o Cr(VI) como sustratos (Mazoch y col., 2004). La amplia diversidad de estas enzimas, así como la multiplicidad de funciones que desarrollan, ha llevado a algunos autores a sugerir que la reducción de cromato es una función secundaria adquirida recientemente, como consecuencia del incremento del Cr(VI) antropogénico en el ambiente (Cervantes y Campos- García, 2007).

Las reductasas bacterianas pueden localizarse tanto en la **fracción de membrana** (Cheung y col., 2006) como en el **citoplasma** (Polti y col., 2010<sub>a</sub>). Las enzimas ubicadas en membrana reducen Cr(VI) **extracelularmente**, empleando agentes reductores de la cadena de transporte de electrones, mientras que las solubles pueden participar en procesos extra e **intracelulares** dependientes de NADH/NADPH (Thatoi y col., 2014).

Durante la reducción de Cr(VI), las células bacterianas sufren un fuerte estrés oxidativo debido a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROS) (Cheung y col., 2006). En base a la magnitud del estrés generado, las enzimas que reducen Cr(VI) pueden ser categorizadas como **reductoras de un electrón** o de **dos electrones** (Thatoi y col., 2014). En la reacción de transferencia de un electrón el Cr(VI) es reducido al intermediario inestable Cr(V), paso seguido de una transferencia de dos electrones para generar Cr(III). Mediante esta vía, una proporción de Cr(V) se vuelve a oxidar espontáneamente provocando la formación de una gran cantidad de EROS. Por el contrario, las transferasas de dos electrones catalizan la reducción directa a Cr(III) sin formación de Cr(V), generando así una cantidad mucho menor de EROS (Cheung y Gu, 2007).

Finalmente, en base a su homología de secuencia, las cromato reductasas pueden ser de **clase I** o **II**. Las enzimas más estudiadas de clase I son ChrR (*P. putida*) e YieF (*E. coli*), flavoproteínas diméricas dependientes de NADH involucradas en la reducción a través de la transferencia de uno y dos electrones, respectivamente (Ackerley y col., 2004). Otras flavoproteínas pertenecientes a este grupo son NemaA, de *E. coli* y ChrA de *B. cereus* y *B. thuringiensis* (Thatoi y col., 2014). Por otro lado, las cromato reductasas de clase II son un grupo de proteínas con actividad nitroreductasa, que reducen quinonas y nitrocompuestos

efectivamente y Cr(VI) de forma variable. Entre las enzimas de la clase II se encuentran NfsA de *E. coli*, NfsB de *V. harveyi* y ChfN de *B. subtilis* (Park y col., 2002; Kwak y col., 2003).

En la siguiente tabla se describen algunas enzimas con actividad cromato reductasa, presentes en diferentes géneros bacterianos.

**Tabla 7:** Enzimas implicadas en la reducción de Cr(VI). Clasificación y descripción.

Enzima	Clase	Tipo de enzima	Bacteria	PM (kDa)	Estructura	Referencia
<b>ChrR</b>	I	Quinona reductasa	<i>E. coli</i>			Eswaramoorthy y col., 2012
<b>Gh-ChrR</b>	I	Cromato reductasa	<i>G. hansenii</i>		Tetramero	Jin y col., 2012
<b>ChrR</b>	I	Flavoenzima	<i>P. putida</i>	50	Dímero	Park y col., 2000
<b>ChrA</b>	I	Flavoproteína	<i>P. aeruginosa</i>			Diaz-Perez y col., 2007
<b>Chr</b>	I	Cromato reductasa NADH-dependiente	<i>R. sphaeroides</i>	42	Monómero	Nepple y col., 2000
<b>YieF</b>	I	/ FMN o NAD(P)H dependiente	<i>E. coli</i>	50	Dímero	Ackerley y col., 2004
<b>NamA</b>	I	Cromato reductasa	<i>E. coli</i>	45	Monómero	Robins y col., 2013
<b>AzoR</b>	I	Azoreductasa				
<b>NfsA</b>	II	Nitroreductasa	<i>E. coli</i>	50	Dímero	Ackerley y col., 2004
<b>NfsB</b>	II		<i>V. harveyi</i>		Monómero	Kwak y col., 2003
<b>YdgL</b>	II	Nitroreductasa	<i>B. subtilis</i>	65	Dímero	Minton y col., 2004
<b>KefF</b>	II		<i>E. coli</i>			Prosser y col., 2010
<b>YcnD</b>	II	FMN reductasa	<i>B. subtilis</i>	72	Dímero	Morokutti y col., 2005

Además de los mecanismos enzimáticos, no hay que perder de vista que ciertos compuestos reductores intracelulares intervienen en la formación de Cr(III) a partir de Cr(VI). Entre esos compuestos se pueden mencionar aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos o glutatión (Vasconcelos Morais y col., 2011).

El destino final del Cr(III) formado es variable. En la mayoría de los casos, el metal tiende a asociarse a grupos carboxilos e hidroxilos de proteínas o ácidos nucleicos y/o acumularse en el citoplasma celular (Srivastava y Thakur, 2006; Pei y col., 2009). La precipitación de complejos insolubles de Cr(III) sobre la superficie de las células, así como su asociación por interacción química con moléculas de las membranas bacterianas, también ha sido descrito en muchas cepas con capacidad reductasa (Yang y col., 2007; Polti y col., 2010<sub>b</sub>). Sin embargo, en los últimos años se puso en evidencia la formación de complejos solubles por

coordinación entre la forma reducida del metal y pequeñas moléculas orgánicas. Esos complejos pueden permanecer en el medio de cultivo sin precipitar a pH neutro (Dong y col., 2013; Chen y col., 2012). Esto explicaría la presencia de elevadas concentraciones de Cr(III) detectadas en sobrenadantes post-remoción de algunos microorganismos (Park y col., 2000; Middleton y col., 2003).

Debido a la generación de EROS durante la reducción de Cr(VI), la sobreexpresión de proteínas antioxidantes representa un mecanismo de tolerancia adicional al estrés generado por la presencia del metal. Además, la inducción de mecanismos de protección y reestructuración de proteínas, respuesta SOS asociada a la reparación de daños en el ADN y la limitación en la incorporación del ion sulfato, pueden mencionarse como mecanismos de defensa celular contra el Cr(VI) (Brown y col., 2006; Vasconcelos Morais y col., 2011).

La figura 45 resume los principales mecanismos de tolerancia bacteriana a Cr(VI).

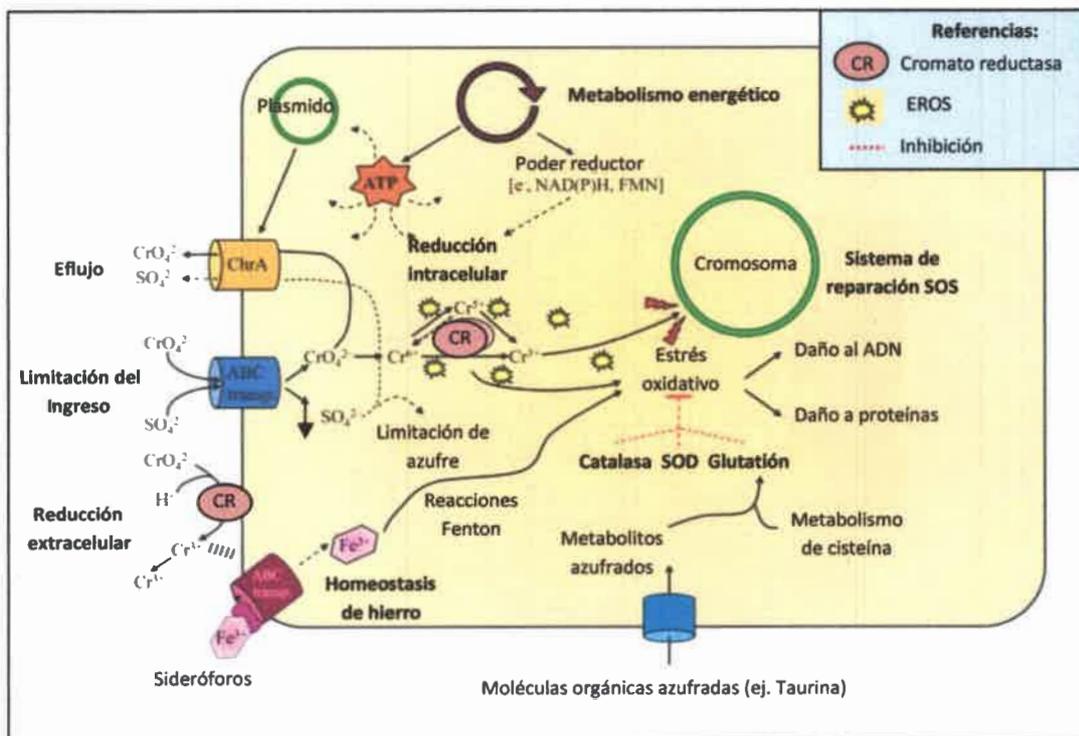
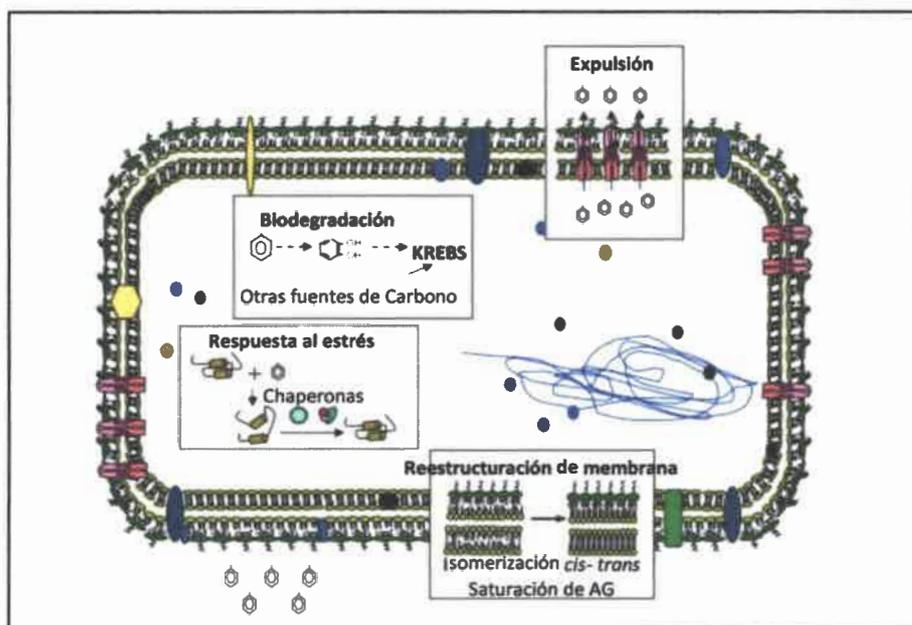


Figura 45: Mecanismos de tolerancia bacteriana a Cr(VI). (Extraída de Viti y col., 2014).

### 9.3. Mecanismos bacterianos de tolerancia a fenol

La toxicidad del fenol radica en su capacidad para acumularse en las membranas celulares y desorganizar su estructura, efecto que provoca la mayoría de los compuestos aromáticos que poseen un coeficiente de partición octanol/agua por debajo de 4. Su contacto con las células resulta en la pérdida de iones y metabolitos, cambios en el pH intracelular y potencial de membrana y daño oxidativo, pudiendo llevar eventualmente a la muerte celular de aquellas bacterias que no cuentan con las herramientas necesarias para combatir los efectos nocivos de este compuesto (Santos y col., 2004; Segura y col., 2012). Sin embargo, existen algunas cepas bacterianas que no sólo son capaces de tolerar elevadas concentraciones de fenol y compuestos similares, sino que además cuentan con el potencial enzimático para degradarlo y emplearlo como fuente de carbono para su crecimiento, contribuyendo, además, a su eliminación (Ramos y col., 2002; Al-Khalid y col., 2012). Dentro de los mecanismos más importantes de tolerancia al compuesto, se encuentran la **reestructuración de membranas** y **sistemas de expulsión**, mientras que la **biodegradación** no sólo permite transformarlo a sustratos carbonados asimilables, sino que además lo elimina del ambiente, protegiendo a otros organismos de su toxicidad (figura 46).



**Figura 46:** Principales mecanismos de tolerancia bacteriana a fenol. (Adaptada de Segura y col., 2012).

### 9.3.1. Reestructuración de envolturas celulares y sistemas de eflujo como mecanismos de tolerancia a fenol

Existen dos mecanismos principales que le permiten a las bacterias disminuir la fluidez de la bicapa lipídica generada por compuestos aromáticos. Uno de ellos es la isomerización *cis-trans* de ácidos grasos (AG) insaturados, que ocurre como una respuesta celular rápida. La respuesta a largo plazo consiste en incrementar la proporción de AG saturados. El comportamiento estérico de los AG insaturados con conformación *trans* es similar al de los AG saturados, ambos poseen una conformación extendida a lo largo que permite un “empaquetado” más denso de la membrana y por lo tanto, le otorgan mayor rigidez. En contraste, la configuración *cis* de la cadena acilo tiene una curva de 30° que causa un impedimento estérico y desordena la conformación de la membrana (Segura y col., 2012).

En el caso de las bacterias Gram negativas, la membrana externa juega un papel importante en la tolerancia al fenol, principalmente porque actúa como barrera de permeabilidad para el ingreso y expulsión de este compuesto (Zhang y col., 2011).

La reestructuración de otras envolturas celulares también se ha mencionado como mecanismo de tolerancia bacteriana al fenol. Por ejemplo, el aumento en el contenido de lipopolisacáridos en la membrana externa modifica su hidrofiliidad y crea una barrera contra moléculas aromáticas (Weber y col., 1996). De manera similar, algunas bacterias modifican la composición y concentración de peptidoglicano para estabilizar la pared celular y reducir la permeabilidad de compuestos como el fenol (Isken y de Bont, 1998; Sikkema y col., 1995; Santos y col., 2007).

A diferencia de lo que ocurre con el transporte de Cr(VI), los sistemas que regulan el movimiento de fenol hacia y desde el interior de las células no han sido tan extensamente estudiados. Sin embargo, existe una proteína monomérica de membrana externa, del tipo OmpA que ha sido fuertemente implicada en la incorporación de compuestos como benzoato y fenol y tiene actividad emulsificante, lo cual aumenta la biodisponibilidad de estos compuestos y favorece su internalización (Pessione y col., 2003). Ciertas bacterias sub-expresan este tipo de porinas como mecanismo de tolerancia a compuestos aromáticos (Zhang y col., 2011).

Entre las estrategias para sobrevivir al estrés causado por muchos xenobióticos, las bacterias han desarrollado sistemas de eflujo, que permiten la expulsión activa de diferentes compuestos que pueden no estar químicamente relacionados, desde el citoplasma celular o periplasma. Entre ellas, las bombas del tipo RND (Resistencia-Nodulación- Protección celular), se consideran las más eficientes. Este tipo de transportadores multicomponente se extienden

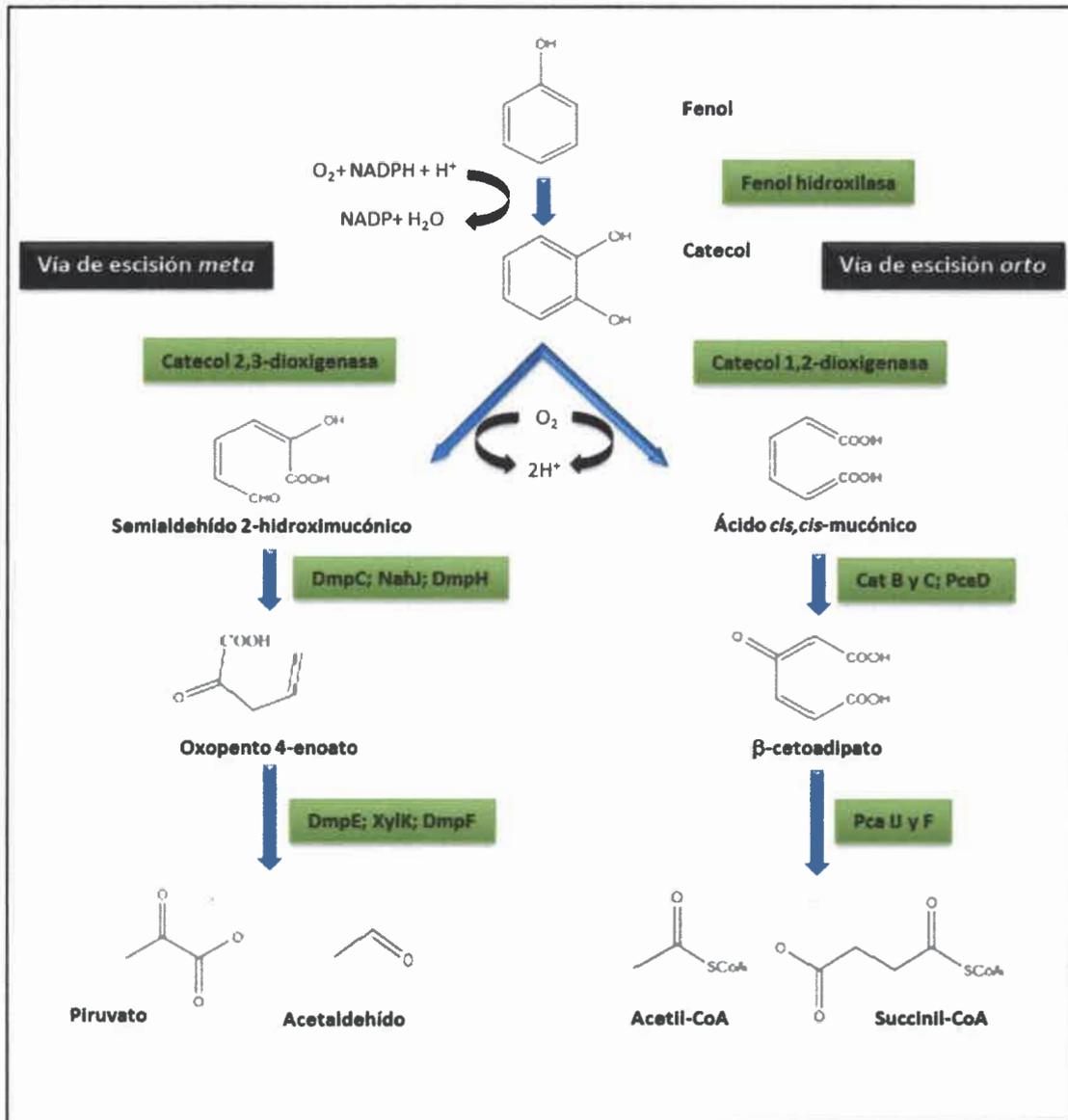
desde la membrana interna a la externa y han sido caracterizados en cepas bacterianas resistentes a benceno, tolueno y fenol, entre otros compuestos aromáticos (Roma-Rodriguez y col., 2010). Uno de los más conocidos es TolC, un sistema de expulsión tipo RND inespecífico implicado además en el transporte de múltiples solventes orgánicos y fármacos antimicrobianos (Nishino y col., 2003).

Los miembros de la familia de transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) también han sido relacionados con la tolerancia a este tipo de compuestos (Segura y col., 2012). Son sistemas con dominios transmembrana y de unión a nucleótidos, formados por una o varias proteínas, que tienen capacidad para ingresar o expulsar sustratos de amplio rango, como azúcares, aminoácidos, iones, drogas, polisacáridos y proteínas (Fernández y Hancock, 2012). Particularmente, la tolerancia a fenol por cepas de *Acinetobacter* y *P. putida* ha sido relacionada con la sobreexpresión de este tipo de proteínas, aunque no se conoce con certeza si su función es específicamente la eliminación del compuesto desde el interior de la célula (Pessione y col., 2003; Santos y col., 2004; Zhan y col., 2012).

### 9.3.2. Biodegradación aerobia de fenol

La biodegradación de fenol es un proceso de gran importancia para su eliminación del ambiente, debido a su elevada persistencia y toxicidad. Algunos organismos han desarrollado la capacidad para emplear este compuesto aromático como fuente de carbono y energía, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Xu y col., 2003). Si bien esta última se ha descrito en algunos microorganismos, tales como bacterias desnitrificantes y metanogénicas, sobre todo durante la descomposición de materiales de desecho en áreas de relleno sanitario y lodos activados (Basha y col., 2010), la biodegradación aeróbica es el proceso más difundido y estudiado en géneros bacterianos muy diversos.

Tal como ocurre con la mayoría de los compuestos aromáticos, el clivaje del anillo fenólico y su posterior degradación en condiciones aeróbicas involucra dos pasos fundamentales (figura 47). En primer lugar ocurre la activación, que es la etapa limitante y se basa en la monohidroxilación del anillo aromático por una fenol hidroxilasa para formar catecol. La segunda etapa consiste en la escisión del mismo catalizada por catecol dioxigenasas (Tuan y col., 2011).



**Figura 47:** Vías de degradación aeróbica de fenol. **Referencias:** semialdehído hidroximucónico deshidrogenasa (**DmpC**), 4-oxalocrotonato tautomerasa (**NahJ**), 4-oxalocrotonato descarboxilasa (**DmpH**), 2-hidroxi-pento-2,4-dienoato hidratasa (**DmpE**); 4-hidroxi-2-oxoalderato aldolasa (**XylK**); acetaldehído deshidrogenasa (**DmpF**); muconato cicloisomerasa (**Cat B**); mucinolactona isomerasa (**Cat C**); 3-oxoadipato enol-lactona hidrolasa (**PcaD**); 3-oxoadipato CoA transferasa (**PcaU**); β-cetoaldipil CoA tiolasa (**PcaF**). (Adaptada de Tsirogiani y col., 2004 y Zhan y col., 2012).

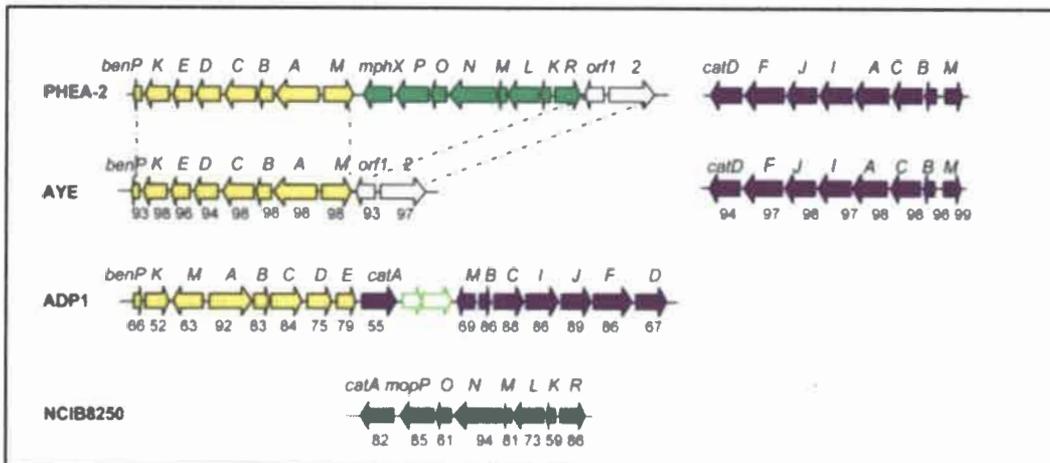
Se conocen dos tipos de fenol hidroxilasas, la enzima simple y la multicomponente, esta última es considerada predominante en bacterias medioambientales (Futamata y col., 2001). Las fenol hidroxilasas multicomponente (*LmPH-Large multicomponent phenol hydroxylase*) poseen seis subunidades, y el sitio catalítico está incluido en la subunidad de

mayor tamaño (Watanabe y col., 2002). El análisis de las secuencias de nucleótidos de diferentes *ImPH* ha revelado que este gen es altamente conservado entre las diversas especies (Xu y col., 2003; Watanabe y col., 2002; Sandhu y col., 2009).

Por otro lado, las metaloenzimas catecol dioxigenasas catalizan la adición de dos átomos de oxígeno molecular directamente en el catecol, con la subsecuente apertura del anillo. Las mismas se clasifican en dos grupos, las intradiol dioxigenasas (catecol 1,2-dioxigenasas), que producen la ruptura del anillo en posición *orto*, entre los carbonos 1 y 2 y las extradiol dioxigenasas (catecol 2,3-dioxigenasas), involucradas en el clivaje *meta* entre los carbonos 2 y 3. Los productos finales de estas vías son  $\beta$ -cetoacido (ácido *cis-cis* mucónico) y semialdehído 2-hidroxi-mucónico, respectivamente (Agarry y Solomon, 2008; Guzik y col., 2011). Luego, a través de una serie de reacciones de isomerización y descarboxilación se generan piruvato y acetaldehído o succinil-CoA y acetyl-CoA que ingresan al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, a partir del cual los microorganismos obtienen energía e intermediarios carbonados (El-Sayed y col., 2003).

Existen diferentes opiniones acerca de la productividad de estas vías. Algunos autores sugieren que la *orto* escisión de catecol es más productiva, ya que en ella los metabolitos formados son derivados directamente al ciclo de Krebs, con menor consumo energético (Indu Nair y col., 2008; El Azhari y col., 2010). Por el contrario, otros investigadores han demostrado que el rendimiento energético por mol de fenol es significativamente mayor en la *meta* degradación, debido a que sus metabolitos son asimilados a través del ciclo de Krebs y ciclo de glioxilato, generándose 3-fosfoglicerato y a partir de él más biomasa biodegradable por las células (Kiesel y Müller, 2002; Johnson y Beckham, 2015).

La mayoría de los trabajos de investigación realizados hasta el momento apuntan a la detección del gen *cat A*, codificante de la enzima catecol 1,2-dioxigenasa, como herramienta molecular para el estudio de microorganismos y comunidades degradadoras de compuestos aromáticos (El Azhari y col., 2010; Moreno y col., 2011). Dicho gen está incluido dentro de un operón de localización generalmente cromosómica que contiene más de 10 ORF y suele codificar, además, enzimas implicadas en la degradación de fenol (*mph*) y benceno (*ben*). Genes *cat A* de diferentes *phylum* han mostrado elevada similitud de secuencia, lo cual es un indicador de la evolución independiente de los genes *16S ADNr* y *cat A*, posiblemente a causa de la transferencia horizontal (Chae y col., 2007). La figura 48 representa esquemáticamente la disposición de los genes asociados a la degradación de fenol, benceno y catecol en diferentes especies del género *Acinetobacter*.



**Figura 48:** Cluster de genes implicados en la degradación de fenol y benzoato en *A. calcoaceticus* PHEA-2, *A. baumannii* AYE, *A. calcoaceticus* NCIB8250 y *A. baylyi* ADP1, respectivamente. Las flechas indican el sentido de transcripción. Cat A: catecol 1,2 dioxigenasa, cat B: *cis-cis* muconato cicloisomerasa, cat C: muconolactona isomerasa y cat M/R: regulador transcripcional, cat E,F,D: función desconocida. Ben: genes implicados en la degradación de benceno. Mph: genes implicados en la degradación de fenol. Orf: genes no identificados. (Extraída de Zhan y col., 2012).

#### 9.4. Inducción de respuesta antioxidante y mecanismos de protección intracelular que se desencadenan en presencia de Cr(VI) y fenol

A lo largo de esta introducción se ha mencionado que tanto el Cr(VI) como el fenol son compuestos tóxicos que inducen estrés oxidativo y alteración en las estructuras celulares de los microorganismos. La respuesta intracelular ante esos efectos nocivos generados por los contaminantes determinará su capacidad para tolerarlos.

En ese sentido, los mayores problemas causados tanto por la reducción de Cr(VI) a Cr(III) como por la exposición a fenol se relacionan con la generación desmedida de EROS. Entre ellas se incluyen radicales libres, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y especies no radicales, tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singlete (Lushchak y col., 2011). Los lípidos son los principales blancos de las EROS. Los radicales libres pueden atacar directamente los AG poliinsaturados de las membranas y provocar peroxidación lipídica, alterándose el correcto funcionamiento de la membrana y generándose más radicales, algunos fuertemente reactivos que provocan daños en otras moléculas, como por ejemplo las proteínas (Cabiscol y Ros, 2000).

El desarrollo de sistemas antioxidantes eficientes para combatir las EROS es una respuesta crucial para la supervivencia de los microorganismos expuestos a los contaminantes.

Enzimas como superoxidodismutasa (SOD), catalasa y peroxidasas juegan un rol preponderante en la defensa bacteriana ante la toxicidad generada tanto por Cr(VI) (Ramírez-Díaz y col., 2008) como por fenol (Santos y col., 2007).

Compuestos de bajo peso molecular, tales como piridoxina, vitamina C y E y glutatión, constituyen un grupo de moléculas antioxidantes capaces de neutralizar directamente ciertas EROS (Chen y Xiong, 2005). El glutatión corresponde a uno de los antioxidantes más concentrados en las células y tiene un rol muy importante en la defensa celular, principalmente frente a los metales pesados. Este tiol se puede encontrar bajo dos formas: reducida (GSH), como tripéptido  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina, y oxidada (GSSG). El estrés celular provoca variaciones en la proporción GSSG/GSH, aunque en condiciones normales el GSH es la forma más abundante. La capacidad del GSH para reducir EROS y autooxidarse es la que permite mantener el ambiente reductor intracelular (Sies, 1990). Las enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH juegan un papel muy importante en la defensa contra las EROS: la GSH peroxidasa (GPX) es un secuestrador de  $H_2O_2$  que usa GSH como reductor, mientras que la glutatión reductasa (GR) reduce GSSG para mantener estables los niveles de GSH/GSSG, empleando NADPH como fuente de poder reductor (Cabisco y Ros, 2000). Finalmente la enzima GSH-S-transferasa (GST) cataliza la conjugación nucleofílica de GSH con algunos sustratos electrofílicos (Vuilleumier 1997). Es importante destacar que el GSH ha sido descrito como un agente intracelular no enzimático que además de combatir las EROS, es capaz de reducir Cr(VI) a Cr(III) (Kiliç y col., 2010).

El sistema tiorredoxina (Trx), compuesto por NADPH, tiorredoxina reductasa y tiorredoxina, es otro importante complejo antioxidante celular que regula el balance ditiol/disulfuro. Mientras que algunas cepas pueden ser GSH-negativas, el sistema Trx es ubicuo en el reino Bacteria y esencial para el mantenimiento del balance redox y la supervivencia en condiciones de estrés (Lu y Holmgren, 2014).

El potencial tóxico de las EROS puede provocar serios daños sobre el ADN y las proteínas. En cuanto a estas últimas, el estrés oxidativo afecta principalmente a los residuos cisteína y metionina, modificando su conformación terciaria y alterando su capacidad catalítica, en el caso de las enzimas. La reparación del daño producido ocurre a través de mecanismos de reducción, que permiten restablecer su conformación original (Lushchak, 2011). Además, ciertas proteínas de respuesta ante el estrés oxidativo, térmico u osmótico suelen actuar como chaperonas, favoreciendo la reconstrucción de la estructura terciaria de otras proteínas o bien permitiendo la degradación de proteínas defectuosas por proteasas intracelulares (Cabisco y Ros, 2000).

En cuanto al daño causado sobre el ADN, que constituye una alteración celular más extrema ante el estrés provocado por contaminantes, existe un mecanismo de reparación bacteriano conocido como sistema SOS. Este sistema induce la detención de la replicación del ADN y la división celular e involucra más de 40 genes que codifican para proteínas implicadas en mecanismos de protección, reparación, replicación, mutagénesis y metabolismo de ADN (Viti y col., 2014). Entre esas enzimas se pueden mencionar helicasas, recombinasas y endonucleasas (Ramírez-Díaz y col., 2008).

### **9.5. Utilización de mecanismos de tolerancia bacteriana como estrategias de biorremediación**

La implementación de bacterias para la remediación de contaminantes requiere comprender la manera por la cual éstas interactúan con los compuestos tóxicos a los que serán expuestas. Es así que el estudio básico de los mecanismos implicados en la biorremediación de Cr(VI) y fenol, permitió el empleo de diversas cepas en la detoxificación de grandes volúmenes de soluciones contaminadas y el mejoramiento genético de otras, con el objetivo final de su aplicación *in vivo*.

El desarrollo de cepas bacterianas tolerantes y reductoras de Cr(VI) ha ganado interés en los últimos años. Por ejemplo, una cepa de *E. coli* modificada genéticamente, productora de la enzima cromato reductasa ChrR6, de elevada capacidad catalítica, mostró una interesante eficiencia de remediación con respecto a su par salvaje (Liger y col., 2004). De manera similar, el uso de mutagénesis ha servido como herramienta exitosa para promover la degradación de fenol a través de ciertas enzimas bien caracterizadas (Nešvera y col., 2015). El conocimiento de los determinantes moleculares relacionados con la biorremediación de fenol también ha permitido monitorear la expresión de ciertos genes en comunidades microbianas y comprender su posible potencial para la degradación del compuesto (Ramio-Pujol y col., 2013).

Por su parte, es interesante destacar que recientemente se ha demostrado la implicancia de enzimas claves en biorremediación, en otros procesos biotecnológicos importantes. Tal es el caso de la potencial aplicación de algunas cromato reductasas en terapia anticancerígena, o de las catecol dioxigenasas en la producción industrial (Thatoi y col., 2014; Xie y col., 2014).

En base a estos antecedentes y los resultados descriptos previamente, consideramos necesario evaluar los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en la tolerancia y remoción de Cr(VI) y fenol, en las cepas componentes del cultivo mixto SF 500-1.

## **Materiales y métodos**



## 10.1. Técnicas de biología molecular

### 10.1.1. Extracción de ADN genómico

El aislamiento de ADN genómico de ambas bacterias se realizó mediante el kit comercial Wizard Promega, a partir de 1 ml de cultivo microbiano crecido *over night* en medio TY. Para *A. guillouiae* el kit se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de *Bacillus* sp., se adicionó un paso inicial de tratamiento con lisozima (10 mg/ml) a 37°C para favorecer la lisis celular.

El ADN obtenido, se cuantificó por espectrofotometría UV a 260 nm y se empleó para amplificar por PCR, secuencias de genes involucrados en la tolerancia y/o remoción de los contaminantes de interés.

### 10.1.2. Amplificación de genes involucrados en el metabolismo de Cr(VI) y fenol

Se amplificaron por PCR genes involucrados en la tolerancia y reducción de Cr(VI) en ambas bacterias, mientras que aquellos genes codificantes de proteínas relacionadas al metabolismo de fenol, sólo se evaluaron en *A. guillouiae* SFC 500-1A. Los productos obtenidos por PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, se visualizaron mediante bromuro de etidio y se secuenciaron en la Unidad Genómica de INTA Castelar. Las secuencias se analizaron mediante el programa BioEdit v7.0.9, herramienta ClustalW y se compararon con aquellas presentes en la base de datos NCBI- BLAST.

Los cebadores seleccionados se describen a continuación y las condiciones de PCR se detallan en la tabla 8.

- **Amplificación parcial del gen *chrA***

La amplificación de *chrA* se realizó utilizando cebadores degenerados diseñados a partir de regiones altamente conservadas de secuencias conocidas del gen en diferentes cepas de *Bacillus* sp. o  $\gamma$ -proteobacterias, para *Bacillus* sp. SFC 500-1E o *A. guillouiae*, respectivamente. Dichas secuencias se obtuvieron desde la herramienta BLAST entrez y los alineamientos múltiples se realizaron utilizando ClustalW. Los cebadores diseñados se evaluaron mediante el programa OligoCALC, y fueron:

**Para *Bacillus* sp. SFC 500-1E:**

**CHRBAC- F** 5' GTY GCT CAT GCH ATA HGD GGA ATG GC 3' /

**CHRBAC- R** 5' GGH ARH ACR ACG TGH CCN CCD CC 3'

(Tamaño esperado del fragmento a amplificar: 350 pb).

**Para *A. guillouiae* SFC 500-1A:**

**Chr AF** 5' CBACCATRATCAGHGGNCCBGGBG3' /

**Chr AR** 5' GCTTYGGBGGVCCNGCNGGVC3'

(Tamaño esperado del fragmento a amplificar: 850 pb).

**ACICHRA F** 5' ATBACVCCNACCACVGCNGC 5'

**ACICHRA R** 5' GCTTYGGBGGVCCNGCNGG 3'

(Tamaño esperado del fragmento a amplificar: 800 pb).

**PSECHRA F** 5'-GAGCGTTGCGAATGAAGAGTCG-3'

**PSECHRA R** 5'GGAAGCATGAAACCGAGTCCC 3' (Diseñados por Caballero-Flores y col., 2012)

(Tamaño esperado del fragmento a amplificar: 1 kb).

- **Detección parcial del gen chr R de *E. coli* K12**

La detección del gen *chrR*, que codifica para la enzima cromato reductasa en *E. coli* K12 se realizó mediante la metodología descrita por Patra y col. (2010), empleando los cebadores diseñados por estos investigadores. Dichos cebadores fueron:

**ChrF** 5'TCACGCCGGAATATAACTAC 3' y **ChrR** 5'CGTACCCTGATCAATCACTT-3' (Tamaño esperado del fragmento a amplificar: 280 pb).

- **Detección del gen codificante de la enzima fenol hidroxilasa**

Se evaluó mediante PCR la presencia del gen codificante de la enzima fenol hidroxilasa multicomponente (LmpH) en *A. guillouiae* SFC 500-1A. Para la amplificación, se emplearon los cebadores **Lph1** (5'-AGG CAT CAA GAT CAC CGA CTG-3') y **Lph2** (5'-CGC CAG AAC CAT TTA TCG ATC- 3') diseñados por Xu y col. (2003) (Tamaño esperado del fragmento a amplificar: 680 pb).

Tabla 8: Cebadores y condiciones de amplificación empleados

Cebadores empleados	Gen a amplificar	Mezcla PCR		Condiciones de amplificación
CHRBAC- F/ CHRBAC- R	Proteína de expulsión ChrA <i>Bacillus sp.</i>	Buffer	1X	94 °C- 8 min 94 °C- 45 seg } 30 ciclos 60 °C-45 seg } 72 °C- 45 seg } 72 °C 5 min
		MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
		dNTP	0,2 mM	
		Cebadores	1 μM	
		ADN	2 μg	
		Taq polimerasa	2 U	
		Agua	csp 25 μl	
ChrA F/ ChrA R	Proteína de expulsión ChrA <i>A. guillouiae.</i>	Buffer	1X	94 °C- 5 min 94 °C- 1 min } 30 ciclos 60-65 °C-1 min } 72 °C- 1 min } 72 °C 5 min
		MgCl <sub>2</sub>	1-2 mM	
		dNTP	0,2 mM	
		Cebadores	0,5-2 μM	
		ADN	2 μg	
		Taq polimerasa	2 U	
		Agua	csp 25 μl	
ACICHRA F/ ACICHRA R	Proteína de expulsión ChrA <i>A. guillouiae.</i>	Buffer	1X	94 °C- 5 min 94 °C- 1 min } 30 ciclos 58-65 °C-1 min } 72 °C- 1 min } 72 °C 5 min
		MgCl <sub>2</sub>	1-2 mM	
		dNTP	0,2 mM	
		Cebadores	0,5-2 μM	
		ADN	2 μg	
		Taq polimerasa	2 U	
		Agua	csp 25 μl	
PSECHRA F/ PSECHRA R	Proteína de expulsión ChrA <i>A. guillouiae.</i>	Buffer	1X	94 °C- 5 min 94 °C- 1 min } 30 ciclos 58 °C -1 min } 72 °C- 1 min } 72 °C 5 min
		MgCl <sub>2</sub>	2 mM	
		dNTP	0,2 mM	
		Cebadores	2 μM	
		ADN	2 μg	
		Taq polimerasa	2 U	
		Agua	csp 25 μl	
chr R/ chr F	Cromato reductasa ChrR	Buffer	1X	94 °C- 5 min 94 °C- 45 seg } 30 ciclos 48 °C-45 seg } 72 °C- 45 seg } 72 °C 5 min
		MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	
		dNTP	0,2 mM	
		Cebadores	2 μM	
		ADN	2 μg	
		Taq polimerasa	2 U	
		Agua	csp 25 μl	
Lph 1/ Lph 2	Subunidad mayor enzima LmPH	Buffer	1X	94 °C- 5 min 94 °C-1 min } 30 ciclos 52 °C-90 seg } 72 °C- 1 min } 72 °C 5 min
		MgCl <sub>2</sub>	1 mM	
		dNTP	0,2 mM	
		Cebadores	0,5 μM	
		ADN	2 μg	
		Taq polimerasa	2,5 U	
		Agua	csp 25 μl	

## 10.2. Técnicas enzimáticas

### 10.2.1. Obtención de extractos proteicos

Los extractos enzimáticos totales o extractos libres de células (ELC) de ambos microorganismos se obtuvieron a partir de cultivos bacterianos sometidos a diferentes condiciones de crecimiento, dependiendo de la actividad a analizar.

Las células se recolectaron por centrifugación (10.000, 10 min, 4 °C) en ultracentrífuga (Allegra), se lavaron dos veces con buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7 y se resuspendieron en el mismo buffer en una relación 1:2. Todas las muestras se sonicaron en frío empleando Sonics VC 500 USA, con ciclos de 2 min a 40 Hz de amplitud. El homogeneizado resultante se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se empleó como extracto crudo para los ensayos de actividad enzimática.

El contenido de proteínas de cada muestra se estimó mediante el método de Bradford (1976), empleando como estándar albúmina sérica bovina.

### 10.2.2. Determinación de la actividad cromato reductasa en *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E

#### 10.2.2.1. Preparación de los extractos enzimáticos totales

Para la obtención de ELC, se emplearon cultivos bacterianos de 24 horas procedentes de 3 tratamientos diferentes:

- **Control:** Células en medio TY
- **Tratamiento 1:** Células en medio TY adicionado con 25 mg/l de Cr(VI).
- **Tratamiento 2:** Células en medio TY adicionado con 25 mg/l de Cr(VI) y 300 mg/l de fenol.

Las células se sonicaron, tal como se describió en el inciso 10.2.1, empleando 4 ciclos para *A. guillouiae* y 6 ciclos para *Bacillus* sp.

Para los ensayos se estandarizó la concentración de proteínas en 1 mg/ml.

Además, los sobrenadantes de los cultivos celulares con y sin Cr(VI) se filtraron empleando filtros *Millipore* (0,2 µm) y se utilizaron para evaluar actividad reductasa extracelular.

### 10.2.2.2. Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular de ambas bacterias se realizó de acuerdo a la técnica de Murugavelh y Mohanty (2012) con modificaciones. Para ello, una fracción de los ELC obtenidos mediante sonicado se re-centrifugó a 30.000 rpm durante 1 hora a 4 °C empleando ultracentrífuga (Beckman). Los sobrenadantes provenientes de este segundo centrifugado se emplearon como fracción citoplasmática (CIT) y los sedimentos como fracciones de membrana (M).

### 10.2.2.3. Caracterización de la actividad cromato reductasa

Se analizó la reducción de 10 mg/l de Cr(VI) por los ELC obtenidos de ambos microorganismos a partir de todos los tratamientos. Para ello se siguió la técnica de Mc. Lean y Beveridge (2001) con algunas modificaciones, utilizando tubos conteniendo 3 ml de dichos ELC, los cuales se incubaron a 30 °C y 100 rpm. El contenido de Cr(VI) se determinó mediante el método de DFC en intervalos progresivos de 15 min hasta los primeros 60 min.

De igual manera, se evaluaron los sobrenadantes de tratamientos con y sin Cr(VI), filtrados y suplementados con  $K_2Cr_2O_7$  para obtener una concentración final de 10 mg/l Cr(VI).

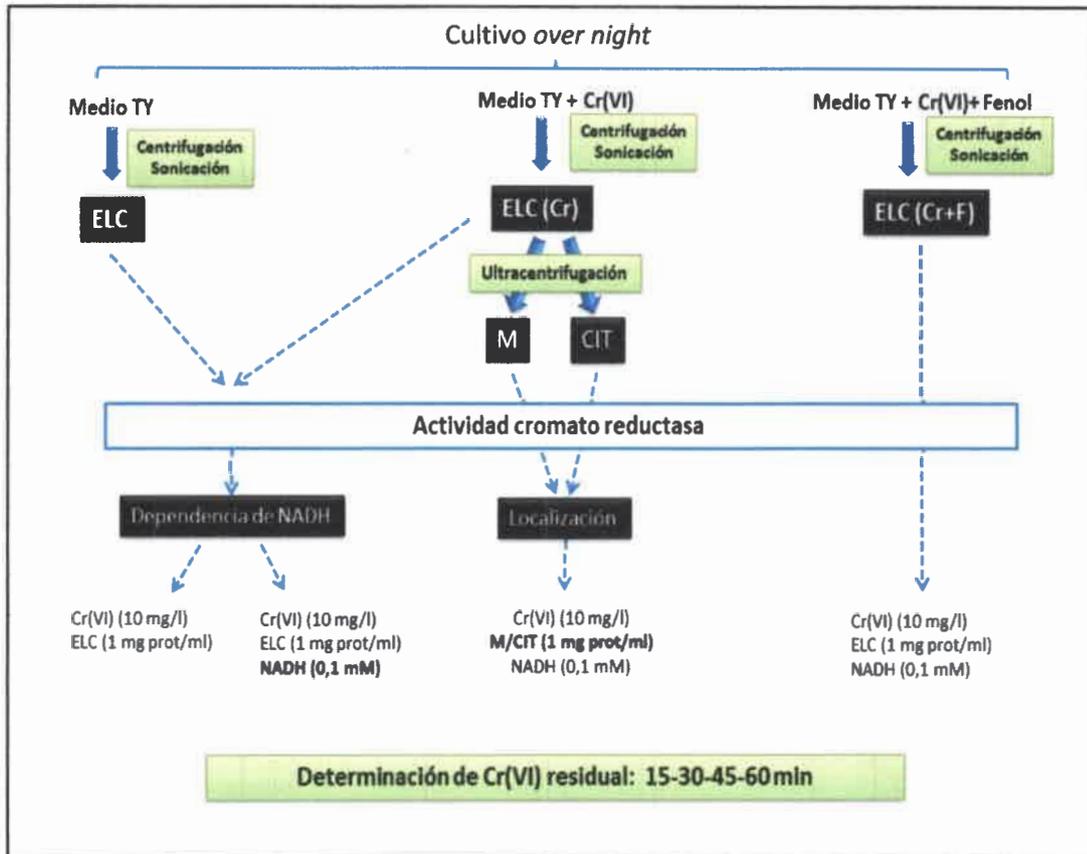
Para determinar si las posibles reductasas intracelulares eran dependientes de NADH, se comparó la actividad enzimática de ELC en ausencia y presencia de dicho cofactor en una concentración final de 0,1 mM.

Como controles de reacción se emplearon buffer fosfato con 10 mg/l de Cr(VI) y NADH 0,1 mM, así como cada extracto calentado a 100 °C durante 5 min.

Finalmente se evaluaron los extractos enzimáticos obtenidos mediante fraccionamiento subcelular (CIT y M) en presencia de NADH, para determinar la localización de cromato reductasas intracelulares.

Las actividades se expresaron como Unidades Específicas de Actividad Enzimática. Una Unidad de Actividad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 nmol de Cr(VI) por minuto a 30 °C. Todas las actividades se refirieron a 1 mg de proteínas.

La figura 49 resume de manera esquemática el proceso llevado a cabo para la determinación de la actividad enzimática cromato reductasa en ambas bacterias.



**Figura 49:** Representación del protocolo utilizado para determinar la actividad cromato reductasa en las cepas *A. guillouiae* y *Bacillus* sp.

### 10.2.3. Determinación de la vía de degradación de fenol en *A. guillouiae* SFC 500-1A

#### 10.2.3.1. Obtención de los extractos enzimáticos

Para la obtención de ELC se emplearon cultivos bacterianos de 100 ml crecidos en solución fisiológica conteniendo extracto de levadura 0,3%, bajo los siguientes tratamientos:

- Control
- Tratamiento 1: Adicionado con 500 mg/l de fenol
- Tratamiento 2: Adicionado con 500 mg/l de fenol y 10 mg/l de Cr(VI)
- Tratamiento 3: Adicionado con 500 mg/l de fenol y 25 mg/l de Cr(VI)

Las bacterias creciendo en condiciones control se recolectaron luego de 18-24 horas de cultivo, y las sometidas a los diferentes tratamientos, cuando alcanzaron aproximadamente el 50% de remoción de fenol. Las células se sonicaron, tal como se describió en la sección 10.2.1.

### 10.2.3.2. Evaluación de la actividad catecol dioxigenasa

La actividad de las enzimas catecol 1,2- y 2,3-dioxigenasa se determinó por espectrofotometría continua a 45 °C, durante 2 min con intervalos de 10 seg. La mezcla de reacción contenía, para un volumen final de 1 ml:

- Sustrato: Catecol en concentraciones comprendidas entre 0,05 y 0,4 mM
- Buffer fosfato de Potasio 50 mM pH 7
- Extracto enzimático (10-80  $\mu$ l)

La actividad catecol 1,2-dioxigenasa se evaluó a través de la formación de ácido *cis-cis* mucónico que se determinó a 260 nm (Pradhan e Ingle, 2007), mientras que la actividad catecol 2,3-dioxigenasa se determinó midiendo el incremento de la absorbancia a 375 nm, debido a la formación de semialdehído 2-hidroximucónico (El-Sayed y col., 2003).

Una UE se definió como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1  $\mu$ mol de producto por minuto. La Actividad Específica se expresó como UE/mg de proteína.

### 10.3. Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres repeticiones de cada ensayo por triplicado.

El análisis estadístico de los datos se efectuó mediante el paquete *Infostat*, versión estudiantil. En cada ensayo se analizaron los supuestos de homogeneidad de varianza y de normalidad, mediante los test de Levene y Shapiro Wilks, respectivamente. En caso de cumplirse los supuestos con los datos crudos o transformados, se efectuó el análisis de la varianza de una vía ANOVA y si no, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal Wallis. El análisis a posteriori se realizó empleando el test de Tukey con un nivel de significación de 0,05.

### 10.4. Evaluación de los cambios en el proteoma de *A. guillouiae* inducidos por la exposición a fenol o fenol y Cr(VI)

Estos experimentos se llevaron a cabo en el marco de una pasantía de investigación realizada en el Dpto de Ciencias de la Vida de la Universidad de Siena, Italia.

#### 10.4.1. Condiciones de cultivo

*A. guillouiae* se pre-cultivó en medio TY. Cultivos de 20 horas fueron centrifugados a 10.000 rpm por 15 min y re-suspendidos en medio MM1 con 3% de extracto de levadura hasta obtener un recuento celular de alrededor de  $2 \times 10^9$  UFC/ml.

Esa suspensión bacteriana fue luego inoculada en una proporción 1:5 en medio nuevo MM1 conteniendo extracto de levadura 3% (condición "Control"); extracto de levadura 3% más fenol (300 mg/l) (condición "Fenol"); extracto de levadura 3% más fenol (300 mg/l) y Cr(VI) (10 mg/l) (condición "Fenol+ Cr(VI)").

La remoción de los contaminantes en las condiciones "Fenol" y "Fenol + Cr(VI)" se monitoreó cada una hora. Cuando la remoción de fenol alcanzó entre 50 y 75%, las células fueron cosechadas por centrifugación a 4 °C.

La siguiente tabla resume las condiciones al inicio del experimento y al momento de la obtención de células para la extracción proteica (aproximadamente 8 horas después del comienzo de los experimentos).

**Tabla 9:** Viabilidad celular de *A. gullouiae* y concentración residual de fenol y Cr(VI) en el momento de la obtención de muestras para la extracción de proteínas totales.

CONDICIÓN	Control	Fenol	Fenol + Cr(VI)
Recuento inicial (UFC/ml)	$2,8 \times 10^8 (\pm 0,33 \times 10^8)$	$3,1 \times 10^8 (\pm 0,17 \times 10^8)$	$3 \times 10^8 (\pm 0,29 \times 10^8)$
Recuento final (UFC/ml)	$1,1 \times 10^9 (\pm 0,83 \times 10^8)$	$1,7 \times 10^9 (\pm 0,97 \times 10^8)$	$8,4 \times 10^8 (\pm 0,57 \times 10^8)$
Fenol removido (%)	-	60,8 ( $\pm 2,3$ )	54,2 ( $\pm 1,2$ )
Cr(VI) removido (%)	-	-	38 ( $\pm 3,9$ )

#### 10.4.2. Extracción de las proteínas totales

Los *pellets* obtenidos se lavaron 3 veces con solución fisiológica, se congelaron a -20 °C y se liofilizaron. La extracción de proteínas se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Kim y col. (2003) con algunas modificaciones. Se resuspendió 50 mg de *pellet* liofilizado de cada muestra en 200  $\mu$ l de buffer Tris-HCl (20 mM; pH 7,5) y se sonicó en hielo durante 8 min, alternándose 1 min de sonificado/30 seg reposo. La suspensión obtenida se trató durante 10 min con una solución de nucleasas, a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml de DNAsa/RNAsa. La suspensión resultante se centrifugó durante 30 min a 15.000 rpm y se liofilizó nuevamente.

El liofilizado se resuspendió en 25  $\mu$ l buffer I (Tris-HCl 50 mM; SDS 0,3%; DTE 0,2M), se calentó a 95°C durante 5 min y finalmente se llevó a volumen final de 200  $\mu$ l con solución de REID (Urea 7 M; Tiourea 2 M; CHAPS 4%; DTE 1%; Anfolina 0,5%).

La concentración de proteínas de cada muestra se cuantificó mediante la técnica de Bradford (1976).

#### 10.4.3. Electroforesis bidimensional de proteínas

La solución de proteínas (500 µg por muestra) se aplicó sobre una tira de gradiente de pH 4-7 no lineal. La rehidratación de dicha tira se realizó empleando un soporte cerámico (*IPG strip holder*), aplicando 30 V durante toda la noche.

Para el isoelectroenfoque se utilizó un equipo l'Ettan™ IPGphor™, que se operó durante toda la noche a 16 °C incrementando de manera gradual el voltaje desde 200 a 10000 V.

Luego del isoelectroenfoque, las tiras fueron incubadas en buffer de equilibrado (2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urea, 30% glicerol y trazas de azul de bromofenol) conteniendo 10 mg/ml de DTT primero y 25 mg/ml de iodoacetamida después.

La segunda dimensión de la electroforesis bidimensional se efectuó en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970); con modificaciones de Hochstrasser y col. (1988). Se utilizaron geles de gradiente lineal 9-16% de acrilamida de 1,5 mm de espesor que contenían: acrilamida 30%; PDA 0,8%; Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; Tiosulfato de sodio 5%; TEMED; APS 10% y agua bidestilada en diferentes proporciones. La corrida electroforética se efectuó a 10 °C, 40 mA/gel empleando el equipo PROTEAN II XI *electrophoresis kit* (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Los geles se visualizaron a través de tinción con plata, por la técnica de Oakley y col. (1980), modificada por Hochstrasser y col. (1988).

Una vez teñidos, los geles se conservaron en agua bidestilada.

#### 10.4.4. Obtención y análisis de imágenes

Una vez coloreados, los geles se escanearon con el densitómetro ImageScanner III (GE Healthcare). Posteriormente fueron analizados y confrontados con el *software* ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare).

#### 10.4.5. Evaluación de los resultados y análisis estadístico de imágenes

El gel obtenido para cada réplica de cada condición fue incorporado dentro de una clase. El análisis informático se realizó empleando el programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), tanto a nivel intra-clase como inter-clase, en base al volumen relativo de cada *spot* obtenido en relación al total de los *spots* para cada gel. El *software* asignó a cada *spot* un número aleatorio. Para el análisis estadístico a través del test de Tukey se comparó el volumen relativo de cada *spot* entre las réplicas de cada condición y entre las tres condiciones evaluadas. Aquellos *spots* que presentaron diferencias significativas en sus volúmenes relativos

mayores a 1,5 fueron tomados en consideración y seleccionados para ser analizados por MALDI TOF/MS.

#### **10.4.6. Preparación de las muestras peptídicas y análisis por espectrometría de masas**

Antes del análisis por espectrometría de masa, los fragmentos de geles correspondientes a cada *spot* seleccionado se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por Plesa y col. (2006) con algunas modificaciones. Los geles se lavaron con una solución de acetonitrilo y bicarbonato de amonio (50% v/v). Posteriormente se incubaron 45 min a 4 °C en una solución de bicarbonato de amonio conteniendo tripsina y luego *overnight* en bicarbonato de amonio 50 mM a 37 °C. Para la extracción de los péptidos de la pieza de gel, se incorporó ácido fórmico (5% v/v) y acetonitrilo absoluto. Las muestras de péptidos se secaron empleando vacío y se rehidrataron, antes de usar, con 5% de ácido fórmico. Una alícuota de péptido a partir de cada *spot* se analizó por espectrometría de masas a través de *Peptide Mass Fingerprint* PMF, empleando el espectrómetro Ettan MALDI TOF Pro (GE Healthcare), como se describió previamente (Soskic y col., 1999).

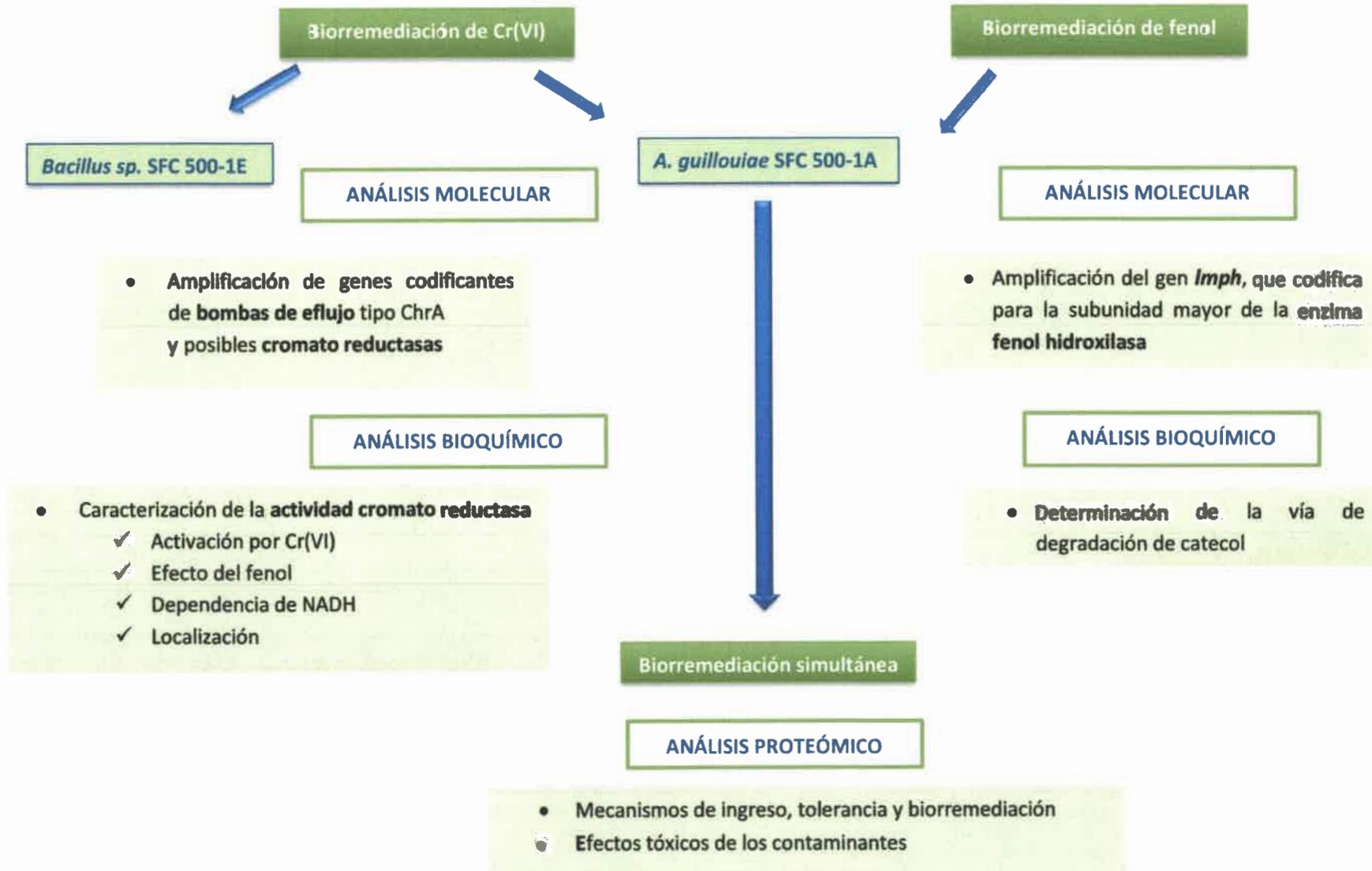
Los resultados obtenidos se analizaron empleando las bases de datos NCBI nr y Swiss Prot, por medio de la herramienta MASCOT (Matrix Science Ltd, London, UK, <http://www.matrixscience.com>), disponible on-line y limitada por los siguientes criterios: la taxonomía se limitó a proteobacterias, la tolerancia de masas fue 100 ppm y el número aceptado de sitios de clivaje se seleccionó en uno. La alquilación de cisteína por carbamidometilación se asumió como modificación fija, mientras que la oxidación de metionina se consideró como posible modificación.

## Resultados y discusión



## Organización de los resultados del tercer capítulo

### CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DEL POTENCIAL DE REMEDIACIÓN DE LAS CEPAS QUE COMPONEN EL CULTIVO MIXTO



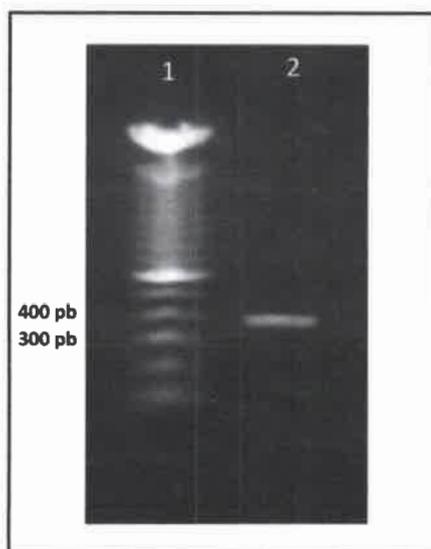
### 11.1. Análisis molecular y bioquímico de la tolerancia y la capacidad de reducción de Cr(VI) en *A. guillouiae* y *Bacillus* sp. SFC 500-1E.

#### 11.1.1. Detección del gen codificante para la bomba de eflujo ChrA

Las proteínas codificadas por el gen *chrA* son las principales responsables de la expulsión de Cr(VI) en el dominio bacteria. Si bien estas bombas de expulsión se encuentran ampliamente difundidas en la naturaleza, son diversas estructuralmente, por lo que no existen en la bibliografía cebadores universales para la detección de genes codificantes de las mismas en diferentes géneros bacterianos. Por lo tanto, se diseñaron cebadores en base al alineamiento múltiple de secuencias conocidas de *chrA* en diferentes cepas de *Bacillus* sp. y  $\gamma$ -proteobacterias, para analizar la presencia del gen en *Bacillus* sp. SFC 500-1E y *A. guillouiae*, respectivamente.

En el caso de *Bacillus* sp., se amplificó un fragmento de 350 pb (figura 50) que presentó un 99% de similitud con el gen codificante de un transportador de cromato en *Bacillus thuringiensis* MC28. Este resultado permitiría suponer la presencia de algún mecanismo de expulsión del metal en esta cepa, coincidiendo con reportes previos que describen la presencia de genes *chrA* y *chrl* plasmídicos flanqueados por secuencias de transposasas y resolvasas en diversas cepas del género (He y col., 2010).

Por el contrario, a partir de las muestras de ADN de *A. guillouiae* no se obtuvo amplificación de fragmentos del tamaño esperado con ninguno de los cebadores empleados. Este resultado se podría abordar desde dos perspectivas diferentes. Una de ellas es que probablemente esta cepa no presente bombas de expulsión tipo ChrA como mecanismo de tolerancia al metal, lo cual concuerda con el hecho de que no contiene plásmidos. En la bibliografía ha sido descrito que estos transportadores por lo general están codificados por genes de localización plasmídica, como podría ocurrir en el caso de *Bacillus* sp. SFC 500-1E, que presentó al menos un elemento de ADN circular extracromosómico de 11 Kb (datos no mostrados). La segunda opción es que los cebadores empleados hayan sido diseñados a partir de secuencias no homólogas a la que codifica para la proteína transportadora en esta bacteria. Esta posibilidad se fundamenta en que el gen *chrA* normalmente se localiza en secuencias móviles transponibles, por lo que *A. guillouiae* podría contener bombas de eflujo similares a las de bacterias de géneros alejados filogenéticamente.



**Figura 50:** Producto de la amplificación parcial del gen *chrA* utilizando ADN genómico de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (calle 2). En la calle 1 se sembró un marcador de peso molecular (100 pb).

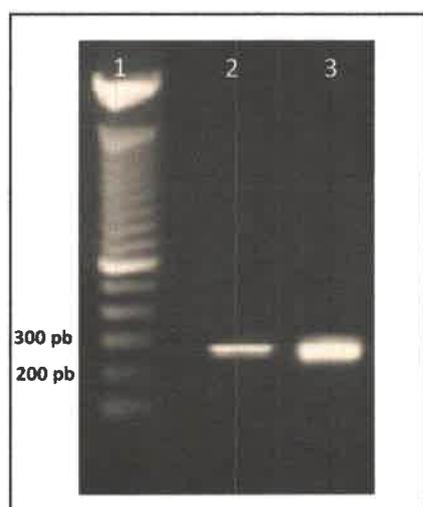
#### 11.1.2. Detección del gen codificante para la enzima cromato reductasa en ambas bacterias

La biotransformación de Cr(VI) a Cr(III) es una interesante estrategia utilizada por las bacterias para detoxificar el metal, que ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años. Sin embargo, aunque se conozcan claramente las propiedades catalíticas de muchas enzimas involucradas en el proceso, existen pocos estudios tendientes a evaluar sus determinantes genéticos. Los principales inconvenientes que surgen al intentar amplificar genes codificantes para cromato reductasas son su heterogeneidad estructural y su reducida conservación intraespecie (Thatoi y col., 2014).

Con el fin de detectar la presencia de tales genes en las cepas *A. guillouiae* y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, en el presente trabajo de tesis se emplearon tres pares de cebadores diseñados a partir de secuencias conocidas de cromato reductasas, descritas por otros autores.

Sólo utilizando uno de esos sets de cebadores, se amplificó por PCR un fragmento de alrededor de 250 pb en ambas bacterias (figura 51), que presentó un 100% de similitud con el gen *chrR* de la cromato reductasa de *E. coli* K12, *Bacillus atrophaeus* MM20 y *Arthrobacter aurescens* MM 10. Además, se detectó elevada similitud con genes codificantes de NADH-flavín oxidorreductasas y cromato reductasas de diferentes enterobacterias como *Serratia* sp.,

*Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Enterobacter* sp. Estos resultados concuerdan con los informados por Patra y col. (2010), quienes indicaron que cepas de bacterias alejadas filogenéticamente con diferente potencial para remediar Cr(VI) presentaron en su genoma secuencias con elevada similitud al gen de una cromato reductasa de *E. coli* K12. Si bien dicho hallazgo no es suficiente para asegurar que la actividad reductasa de estas bacterias se encuentre codificada por *chrR*, permitiría sugerir la utilidad de esos cebadores para la búsqueda de nuevas cepas de interés para la biorremediación de Cr(VI).



**Figura 51:** Producto de la amplificación parcial del gen *chrR* empleando ADN genómico de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (**calle 2**) y *A. guillouiae* (**calle 3**). En la **calle 1** se sembró un marcador de peso molecular (100 pb).

### 11.1.3. Evaluación de la actividad cromato reductasa

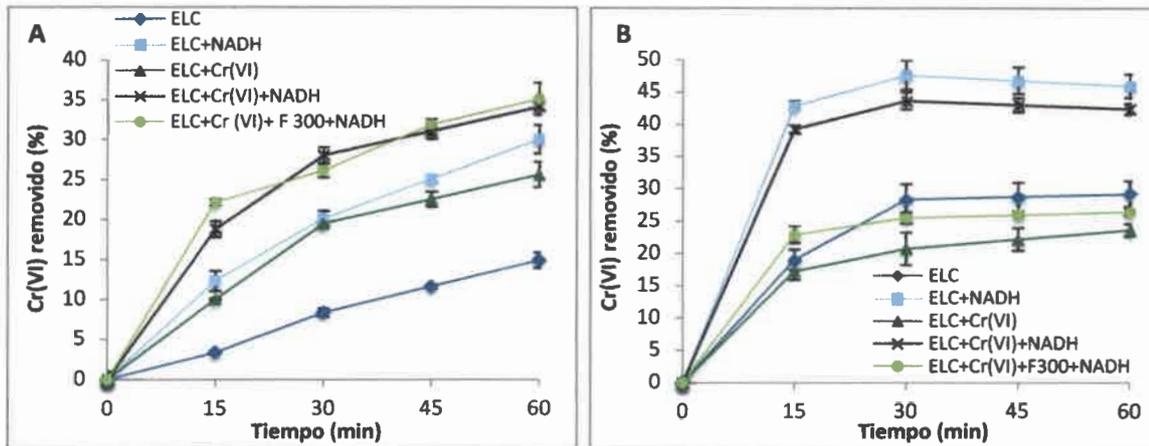
#### 11.1.3.1. Caracterización de la actividad reductasa

Se determinó la actividad cromato reductasa en ELC de *A. guillouiae* y *Bacillus* sp. durante 60 min. Los extractos analizados provenían de cultivos celulares creciendo en ausencia y presencia de Cr(VI) y de Cr(VI) más fenol. Además se analizó el efecto del NADH como dador de electrones.

Tal como se muestra en la figura 52, todos los ELC filtrados removieron Cr(VI), lo cual sugiere la presencia de actividad cromato reductasa en las dos bacterias en estudio, que varió de acuerdo a la condición analizada.

Los ELC de *A. guillouiae* removieron un máximo de 35% del Cr(VI) incorporado, mientras que los de *Bacillus* sp. alcanzaron porcentajes superiores al 45%. La tendencia de la

remoción a lo largo del experimento también fue diferente para ambas bacterias. En el caso de los extractos de *A. guillouiae*, se registró remoción de Cr(VI) hasta los 60 min, con un incremento casi lineal en algunos extractos; mientras que casi todos los ELC de *Bacillus* sp., mostraron su máximo potencial durante los primeros 15 min de reacción.



**Figura 52:** Remoción de Cr(VI) (%) por ELC de (A) *A. guillouiae* y (B) *Bacillus* sp. SFC 500-1E durante 60 min de reacción. **Referencias:** ELC: Extractos obtenidos a partir de células creciendo en ausencia de Cr(VI). ELC+Cr(VI): Extractos obtenidos a partir de células creciendo en presencia de Cr(VI). ELC+Cr(VI)+F300: Extractos obtenidos a partir de células creciendo en presencia de Cr(VI) y fenol. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9).

Para corroborar que tal remoción se debió a procesos enzimáticos se utilizaron controles de reacción. Como se observa en la tabla 10, en los controles sin ELC la concentración de Cr(VI) no varió durante todo el experimento, demostrándose la ausencia de remoción inespecífica, debida a procesos físico-químicos. Además, cuando se emplearon los ELC de ambas bacterias tratados a 100 °C durante 5 min, se observó una pérdida casi total en la actividad reductasa. Estos resultados demuestran que el potencial de *A. guillouiae* y *Bacillus* sp. SFC 500-1E para remover Cr(VI) estaría asociado a mecanismos enzimáticos, lábiles a elevadas temperaturas y con capacidad catalítica diferente para cada bacteria.

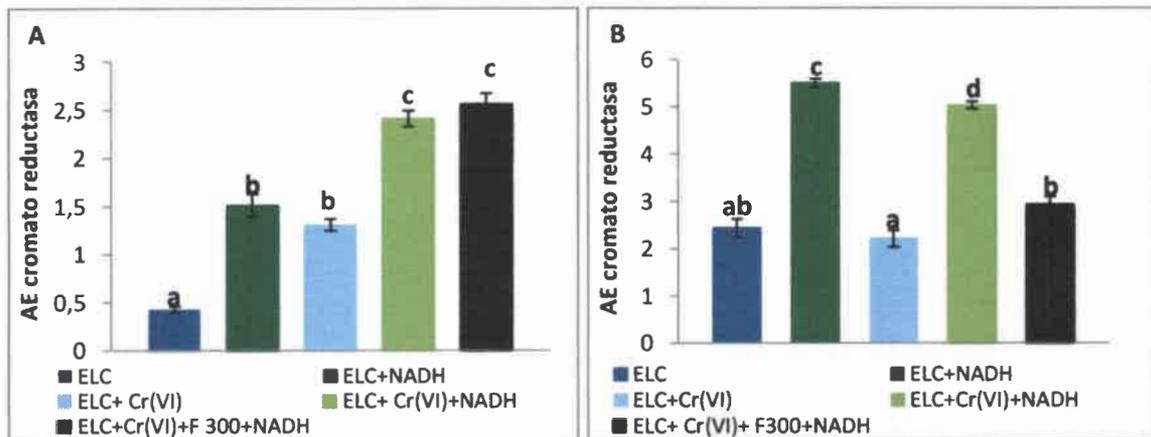
Tabla 10: Controles de reacción

Mezcla de reacción	Remoción de Cr(VI) (%)*
Buffer + Cr(VI)	ND
Buffer+ Cr(VI) + NADH	ND
ELC <sub>100°C</sub> <i>Aci</i> + Buffer+ Cr(VI) + NADH	2,0 (± 0,3)
ELC <sub>100°C</sub> <i>Bac</i> + Buffer+ Cr(VI) + NADH	5,1 (± 0,5)

\*Remoción registrada luego de 60 min de incubación.

Los datos representan la media ± EE (n=9).

Un análisis detallado de la figura 52 permite inferir que la actividad cromato reductasa de los extractos de cada bacteria varió según la condición en la que se hizo la extracción (presencia/ausencia de los contaminantes) y ante la adición de NADH en el medio de reacción. Además, se puede observar que la mayoría de los extractos alcanzó su máximo potencial de remoción a los primeros 15 minutos de reacción. Por lo tanto, la caracterización de dicha actividad se realizó dentro de ese período. Los parámetros evaluados fueron inducción por Cr(VI), influencia del agregado de NADH como cofactor y efecto del fenol sobre la actividad reductasa en ambas bacterias. Los resultados se graficaron en la figura 53.



**Figura 53:** Actividad específica cromato reductasa obtenida a partir de ELC de (A) *A. guillouiae* y (B) *Bacillus* sp. SFC 500-1E. **Referencias:** ELC: Extractos obtenidos de células creciendo en ausencia de Cr(VI). ELC+Cr(VI): Extractos obtenidos a partir de células creciendo en presencia de Cr(VI). ELC+Cr(VI)+F300: Extractos obtenidos a partir de células creciendo en presencia de Cr(VI) y fenol. Los datos representan la media ± EE (n=9). Letras diferentes indican DES entre la actividad cromato reductasa detectada en extractos sometidos a diferentes tratamientos.

A partir de los resultados obtenidos se demostró la existencia de una actividad cromato reductasa basal en todos los ELC analizados. Dicha actividad se incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) en los ELC obtenidos a partir de *A. guillouiae* creciendo en presencia de Cr(VI) (figura 53A). Por el contrario, los ELC de *Bacillus* sp. en presencia y ausencia del metal presentaron actividad similar (figura 53 B).

La incorporación de NADH como donante de electrones en los ELC provocó un incremento significativo en la actividad específica cromato reductasa de ambas bacterias, observándose un aumento de hasta el 236% en *A. guillouiae* y 127% en *Bacillus* sp. con respecto a los extractos en los que no se incorporó NADH (figura 53 A y B).

A partir de estos resultados se puede deducir que las cromato reductasas de *A. guillouiae* serían inducibles por Cr(VI), mientras que las de *Bacillus* sp. serían constitutivas y que todas ellas emplearían NADH como donante de electrones. El efecto activador del NADH sobre estas reductasas radica en que la mayoría de estas enzimas son flavoproteínas que utilizan dicho cofactor como fuente de poder reductor (González y col., 2005).

Por otro lado, se conoce que las cromato reductasas son un grupo de enzimas que emplean sustratos primarios diversos y pueden reducir Cr(VI) utilizándolo como sustrato alternativo (Thatoi y col., 2014). Tal es el caso de ciertas nitrorreductasas (Prosser y col., 2010) o azorreductasas (Robins y col., 2013) con potencial para transferir electrones al Cr(VI). Este concepto permitiría entender el comportamiento diferente detectado en ambas cepas ante la presencia de Cr(VI). De igual manera, mientras que algunas bacterias reportadas en la bibliografía mostraron actividad cromato reductasa constitutiva e independiente de Cr(VI) (Pal y col., 2005; Desai y col., 2008), en otras, dicha actividad se incrementó de manera marcada ante la exposición al metal (Thacker y Madamwar, 2005; Polti y col., 2010; Mala y col., 2015). La comprensión de los mecanismos que regulan esta respuesta variable puede ser muy interesante desde un punto de vista biotecnológico. Por ejemplo, la adición de los sustratos primarios de las enzimas en cuestión, o incluso de Cr(VI) en el medio de crecimiento de las bacterias que presentan cromato reductasas podría favorecer su producción y aplicación, más aún si éstas son secretadas al medio (Mala y col., 2015).

El crecimiento en presencia de Cr(VI) y fenol también afectó de manera diferente la actividad cromato reductasa de ambas bacterias. Dicha actividad no se modificó significativamente ante el agregado de fenol en el caso de *A. guillouiae*. Por el contrario, la incorporación simultánea de Cr(VI) y fenol redujo hasta un 42% la actividad enzimática de los ELC de *Bacillus* sp. SFC 500-1. Estos resultados coinciden con los obtenidos en ensayos con células enteras, en los cuales *A. guillouiae* removió conjuntamente Cr(VI) y fenol, mientras que *Bacillus* sp. toleró ambos compuestos, pero sólo removió Cr(VI). La actividad cromato

reductasa de *A. guillouiae*, estable en presencia de fenol, es una importante ventaja a la hora de su aplicación en biorremediación.

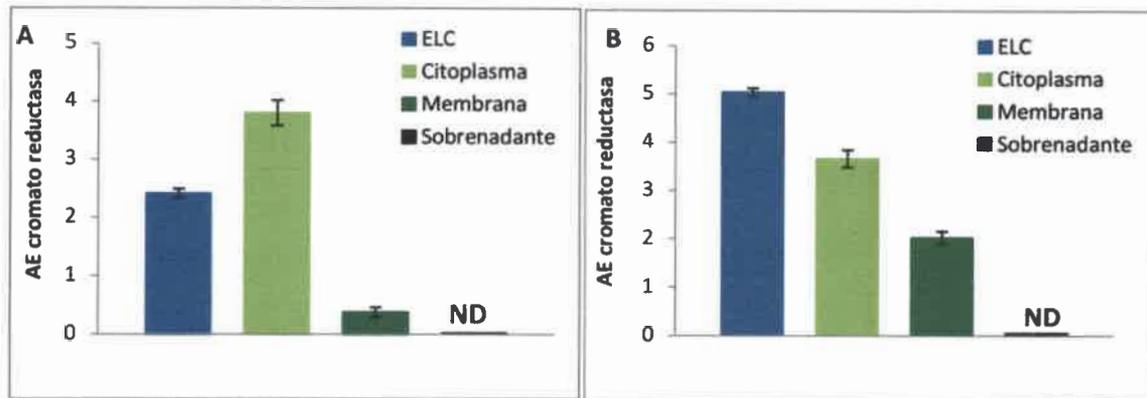
#### 11.1.3.2. Localización de la actividad reductasa

Se analizó la capacidad de diferentes fracciones celulares de ambas bacterias para remover Cr(VI) y la presencia de posibles reductasas extracelulares.

Cuando se utilizaron sobrenadantes de cultivo filtrados la remoción de Cr(VI) fue nula en todos los casos, lo que indicaría que ninguna de las bacterias en estudio presenta actividad reductasa extracelular (figura 54 A y B). Sin embargo, se detectó actividad reductasa en las diferentes fracciones celulares en presencia de NADH. En el caso de *A. guillouiae*, la fracción citosólica presentó mayor actividad específica (3,79 UE/mg de proteínas) que el ELC total (2,41 UE/mg de proteínas), mientras que en la fracción de membrana la actividad fue poco significativa (figura 54 A). Estos resultados indicarían que la actividad reductasa en esta bacteria se encuentra asociada a los componentes celulares solubles.

Si bien en *Bacillus* sp. la capacidad de reducción de Cr(VI) por la fracción de membrana (2,02 UE/mg de proteínas) fue inferior a la citosólica (3,66 UE/ mg proteínas), la actividad específica fue significativa en ambas fracciones (figura 54 B).

La mayoría de las reductasas de Cr(VI) descritas en la bibliografía tienen localización citosólica, como en el caso de las cepas *B. sphaericus* AND 303, *P. putida* y *Ochrobactrum* sp. DM1 (Park y col., 2000; Pal y col., 2005; Thacker y Madamwar, 2005), aunque en *E. cloacae*, *S. putrefaciens* MR-1, y *B. megaterium* TK W3 (Wang y col., 1990; Myers y col., 2000; Cheung y col., 2007), se asociarían a la fracción de membrana. Además, se ha detectado que algunos microorganismos presentan actividad reductasa en ambas fracciones, como es el caso de *E. coli* ATCC 33456 (Bae y col., 2005), *Streptomyces* sp. MC1 (Polti y col., 2010<sub>a</sub>) y diferentes cepas del género *Bacillus* (Iftikhar y col., 2007; Sau y col., 2010). En este último caso, los porcentajes de reducción en citoplasma fueron más elevados que en membrana, al igual que los resultados obtenidos en nuestro trabajo. La existencia de una única cromato reductasa con más de una localización, o de varias isoenzimas con diferente ubicación intracelular actuando de manera sinérgica, son hipótesis formuladas por diferentes autores para explicar este comportamiento en algunas bacterias (Shen y Wang, 1993; Sau y col., 2010).



**Figura 54:** Actividad específica cromato reductasa en diferentes fracciones subcelulares y sobrenadante de medio de crecimiento filtrado de *A. guillouiae* (A) y *Bacillus sp. SFC 500-1* (B), en presencia de NADH. Los datos representan la media  $\pm$  EE (n=9). ND: No detectada.

Los resultados obtenidos demostraron que los dos microorganismos estudiados tienen capacidad para reducir Cr(VI), concordando con los ensayos de remoción presentados en el capítulo 1. Si bien no se determinó el destino del Cr(III) formado por cada cepa, existen en la bibliografía algunos estudios que describen la capacidad de ciertos representantes del género *Acinetobacter* para acumular el metal intracelularmente, formando complejos con diversas estructuras celulares (Srivastava y Thakur, 2007; Pei y col., 2009; Essahale y col., 2012; Bhattacharya y Gupta, 2013). De forma similar, varias cepas de *Bacillus* se han destacado por su capacidad para acumular Cr(III), como también para adsorberlo a sus envolturas celulares (Mangaiyarkarasi y col., 2011; Chen y col., 2012; Dong y col., 2013).

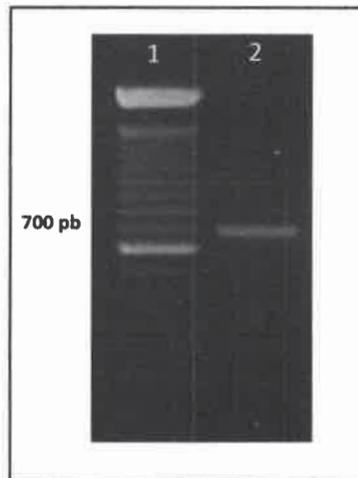
## 11.2. Análisis molecular y bioquímico de la capacidad de degradación de fenol por *A. guillouiae*

### 11.2.1. Detección del gen codificante para la enzima fenol hidroxilasa

La enzima fenol hidroxilasa cataliza la primera reacción de la degradación de fenol, transformándolo en catecol. La presencia de genes codificantes para la misma, podría indicar la capacidad de un microorganismo para degradar el contaminante.

De acuerdo a la literatura, existen dos tipos de fenol hidroxilasas, simple y multicomponente (Dong y col., 2008). Sin embargo, se conoce que la mayoría de las especies degradadoras de fenol pertenecientes al género *Acinetobacter*, presentarían la variante multicomponente (Pessione y col., 1999; Xu y col., 2003). Debido a que el gen *mphL* es el de

elección para realizar la detección molecular de la enzima, se utilizó el par de cebadores universales Lph1 y Lph2, diseñados en base a la secuencia nucleotídica de ese gen. Empleando dichos cebadores, se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 700 pb (figura 55).



**Figura 55:** Producto de la amplificación parcial del gen *mphL* empleando ADN genómico de *A. guillouiae* (calle 2). En la calle 1 se sembró un marcador de peso molecular (100 pb).

Mediante la secuenciación y el análisis de homología de dicho fragmento, se determinó que el producto amplificado presentó elevada similitud con el gen codificante de la subunidad mayor de la enzima fenol hidroxilasa de más de 25 cepas diferentes de *Acinetobacter* sp. Este resultado concuerda con lo establecido por Dong y col. (2008), quienes indicaron que dicho gen estaría conservado a nivel de género. Sin embargo, la mayor homología de secuencia (99%) se obtuvo con *A. calcoaceticus* NCIB8250. Esta bacteria presenta un operón con siete marcos de lectura abierta (ORFs) codificantes de las enzimas fenol hidroxilasa y catecol 1,2-dioxigenasa (Ehrt y col., 1995).

Por lo tanto, *A. guillouiae* presentaría genes codificantes para la enzima involucrada en la primera reacción de la vía de degradación de fenol. Los resultados permitirían, además, establecer que esta bacteria posee la variante multicomponente de la misma.

### 11.2.2. Estudio de la vía de degradación de catecol

Un intermediario clave en el proceso enzimático de degradación de fenol es el catecol. La conversión de catecol a compuestos alifáticos que ingresan al metabolismo central del

carbono es mediada inicialmente por catecol dioxigenasas. Estas enzimas son capaces de catalizar la desaromatización del sustrato mediante la inserción de oxígeno molecular en el anillo aromático. De acuerdo al sitio de clivaje, las mismas pueden ser clasificadas como catecol 1,2 ó 2,3-dioxigenasas.

Continuando con el estudio de los mecanismos involucrados en la degradación de fenol, se evaluó la capacidad de los ELC de *A. guillouiae* para biotransformar catecol a ácido *cis-cis* mucónico y acetaldehído 2-hidroximucónico, intermediarios clave de las vías *orto* y *meta*, respectivamente.

La bacteria no presentó actividad catecol 2,3-dioxigenasa, pero sí fue capaz de oxidar catecol por la vía *orto* (tabla 11), coincidiendo con lo reportado para otras cepas de *Acinetobacter*. La actividad específica catecol 1,2-dioxigenasa registrada en extractos proteicos provenientes de células tratadas con fenol fue elevada (0,65 U/mg prot.), comparada con la reportada para otros microorganismos degradadores de fenol (Dong y col., 2008; Nagamani y col., 2009). Esa diferencia podría verse reflejada en la eficiencia degradativa de cada cepa.

**Tabla 11:** Actividad catecol 1,2-dioxigenasa de extractos celulares de *A. guillouiae* sometido a diferentes tratamientos

Tratamiento	AE Catecol 1,2-dioxigenasa (U/mg prot.)
Extracto de levadura (0,3%)	ND
Fenol (500 mg/l)	0,65 (± 0,03)
Fenol (500 mg/l) + Cr(VI) (10 mg/l)	0,33 (± 0,03)
Fenol (500 mg/l) + Cr(VI) (25 mg/l)	0,19 (± 0,01)

Los datos representan la media ± EE (n=9). ND: No detectada.

En el presente trabajo también se pudo determinar que en *A. guillouiae* la actividad catecol 1,2-dioxigenasa sería inducible por fenol, ya que no se detectó dicha actividad en extractos provenientes de células creciendo en ausencia del compuesto. De acuerdo a Pradhan e Ingle (2007), las enzimas claves para la degradación de sustratos aromáticos son sintetizadas por los microorganismos sólo cuando tales sustratos están presentes en su medio de crecimiento. Además del fenol, los catecoles sustituidos y el benceno actuarían como inductores de la actividad catecol dioxigenasa (Guzik y col., 2011).

Por otro lado, algunos iones metálicos pueden provocar cambios conformacionales sobre las enzimas, alterando su capacidad catalítica. En este sentido, varios investigadores han descrito la inhibición de la actividad catecol dioxigenasa por  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  (Iwagami y col., 2000; Guzik y col., 2012). Por lo tanto, con el fin de evaluar el efecto del Cr(VI)

sobre la actividad enzimática de *A. guillouiae*, se incorporaron concentraciones de 10 y 25 mg/l del metal en su medio de cultivo. Los extractos proteicos de la bacteria creciendo en tales condiciones, presentaron una reducción significativa de la capacidad de oxidación de catecol. El impacto negativo del Cr(VI) sobre estas enzimas podría deberse a una alteración en el metabolismo celular generada por la toxicidad del compuesto sobre el microorganismo. Por otro lado, la presencia de cromato reductasas intracelulares podría constituir un problema adicional, debido a que las mismas catalizan la formación de Cr(III) a partir de Cr(VI). La forma trivalente del metal tiende a unirse a proteínas, provocándole daños estructurales y funcionales (Ramírez- Díaz y col., 2008).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de remoción detallados en el primer capítulo, la detección de productos de degradación por HPLC y la caracterización molecular y bioquímica de *A. guillouiae*, se podría inferir su capacidad para biotransformar fenol a ácido *cis-cis* mucónico, compuesto fácilmente metabolizable por las células que posee un importante interés comercial (Xie y col., 2014).

Si se considera que no se detectó actividad catecol 2,3-dioxigenasa y que no hay información bibliográfica sobre determinantes genéticos de la *meta* fisión de catecol en el género *Acinetobacter*, es probable que el microorganismo en estudio no presente tal vía de degradación.

La metodología empleada hasta el momento permitió dilucidar algunos procesos celulares desarrollados en las bacterias en estudio ante la presencia de los contaminantes. Sin embargo, quedan muchos interrogantes relacionados con mecanismos de ingreso y expulsión y efectos de la presencia simultánea de dichos compuestos sobre la remediación individual. Considerando que *A. guillouiae* fue la única cepa del cultivo mixto con capacidad de remediación simultánea se la seleccionó para continuar con la caracterización de tales mecanismos. Para ello, se utilizó como herramienta a la proteómica.

### **11.3. Cambios en el proteoma de *A. guillouiae* en presencia de fenol**

#### **11.3.1. Modificación en la expresión de enzimas implicadas en la oxidación de fenol y asimilación de carbono**

La exposición de *A. guillouiae* a fenol provocó la expresión diferencial de 55 proteínas, siete de ellas correspondieron a enzimas directamente implicadas en su degradación (tabla 12). Las más sobre-expresadas fueron 3-oxoadipato CoA-transferasa (sub A), catecol 1,2-

dioxigenasa y muconato cicloisomerasa. Este resultado confirma la capacidad de *A. guillouiae* para transformar fenol a través de la vía *orto*, como fue previamente demostrado. La proteína 3-oxoadipato CoA-transferasa es una de las últimas enzimas en la vía de degradación de fenol y la más sobre-expresada en las condiciones evaluadas. La misma cataliza la transferencia de CoA desde una molécula de succinil-CoA, hacia la de  $\beta$ -cetoadipato para producir finalmente acetil-CoA y regenerar succinato (Santos y col., 2007). En el último paso interviene además una enzima tiolasa, cuya expresión no se modificó significativamente en las condiciones evaluadas.

**Tabla 12:** Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en su *orto*-degradación.

PROTEÍNA	Código de acceso	pl	PM (Da)	Cambio de expresión (veces)*
Fenol hidroxilasa	gi 2605613	4,69	39747	+6,6
Fenol hidroxilasa, proteína P5	gi 490859324	4,73	39756	+6,5
Fenol hidroxilasa	gi 490859323	5,51	13896	+8,4
Catecol 1,2-dioxigenasa	gi 490859513	4,87	34595	+14,3
Muconato cicloisomerasa	gi 490859524	5,52	39982	+17,8
3-oxoadipato CoA-transferasa sub A	gi 674995151	5,26	24326	+26,9
3-oxoadipato CoA-transferasa sub B	gi 674994779	4,89	23206	+2,0

\*Sobre-expresión (+) de proteínas ante la exposición de la bacteria a fenol, con respecto a la condición control.

La información bibliográfica indica que el acetil-CoA producido a partir de la *orto*-oxidación del catecol sería asimilado en el ciclo de Krebs. En base a esos antecedentes y a los resultados obtenidos, se esperaría una sobre-expresión de las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs luego de la exposición de *A. guillouiae* a fenol. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, las enzimas 2-oxoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa, fueron sub-expresadas; mientras que se duplicó la expresión de isocitrato liasa, clave en la derivación de sustratos hacia el ciclo del glioxilato (tabla 13).

Las bacterias que catalizan la *meta* degradación de catecol asimilan carbono con un elevado rendimiento energético a través del ciclo del glioxilato, gracias a la liberación de un número sustancial de equivalentes de reducción durante el proceso (Jiang y col., 2004). Este ciclo permite generar succinato y malato sin pérdida de carbono en forma de CO<sub>2</sub>, alimentando al ciclo de Krebs y favoreciendo la formación de oxaloacetato, que es el principal sustrato de muchos procesos biosintéticos celulares (Kornberg, 1966).

En base a estos resultados, *A. guillouiae* degradaría fenol a través de la vía *orto*, pero asimilaría los productos de degradación de forma similar a las bacterias que presentan la vía *meta*, lo cual podría ser una estrategia de esta cepa para aumentar el rendimiento a partir de las fuentes de carbono incorporadas. Aunque este tipo de respuesta ante la exposición a fenol no ha sido descrita en otros microorganismos, sí se ha observado la derivación de metabolitos desde el ciclo de Krebs al del glioxilato, en bacterias creciendo en presencia de otros compuestos aromáticos (Qi y col., 2007; Wijte y col., 2011). De igual manera, Kornberg y Madsen (1957) indicaron que la activación del ciclo del glioxilato como vía auxiliar al ciclo de Krebs suele ocurrir cuando un microorganismo crece a expensas de más de una fuente de carbono, como ocurre en este caso, en el que *A. guillouiae* se cultivó en un medio con extracto de levadura y fenol.

**Tabla 13:** Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en procesos de asimilación de carbono.

PROTEÍNA	Código de acceso	pI	PM (Da)	Cambio de expresión (veces)*
Isocitrato liasa	gi 490994972	5,34	59752	+1,9
$\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa	gi 490855236	5,24	43528	-1,4
Succinil-CoA sintetasa (sub $\beta$ )	gi 490855232	4,91	41849	-1,5

\*Sobre (+) o sub-expresión (-) de proteínas ante la exposición de la bacteria a fenol, con respecto a la condición control.

La sobre-expresión de una flavoproteína involucrada en la transferencia de electrones desde el NADH hacia la cadena respiratoria, así como de la subunidad catalítica de la enzima ATP sintetasa, demuestran que la bacteria creciendo en presencia de fenol presentaría un metabolismo energético más activo que cuando lo hace en ausencia del contaminante (tabla 14). Además, la inducción de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina sintetasa y piridoxina/piridoxamina 5'-fosfato oxidasa, enzimas asociadas a la síntesis de riboflavina y vitamina B6, respectivamente, sugiere la necesidad de sintetizar cofactores para las reacciones de óxido-reducción celulares, tales como la oxidación de fenol y el metabolismo de carbohidratos (Belitsky, 2004).



### 11.3.2. Cambios en el metabolismo lipídico

Los resultados anteriores demostraron que el fenol incorporado en el medio de cultivo sería degradado por *A. guillouiae* y empleado en procesos celulares de asimilación de carbono. Sin embargo, no hay que perder de vista la naturaleza tóxica del compuesto para las estructuras celulares. Dicha toxicidad por lo general se correlaciona con su hidrofobicidad y con la capacidad de disolver membranas biológicas. En general, la presencia de fenol provoca un incremento en la fluidez de las membranas fosfolipídicas (Loffhagen y col., 2002). En este contexto, *A. guillouiae* mostró algunos resultados ambiguos en cuanto a la expresión de enzimas del metabolismo lipídico (tabla 15). Por un lado, se indujo la enzima acil-CoA sintetasa, implicada en la activación de ácidos grasos para su degradación, lo cual podría relacionarse con un efecto tóxico provocado por el fenol sobre la membrana pero, además, se incrementó la expresión de acetil-CoA carboxilasa, enzima regulatoria que transforma acetil-CoA a malonil-CoA para iniciar la síntesis de ácidos grasos. A su vez, se redujo la expresión de la enzima oxoacil-ACP reductasa, involucrada en el proceso de elongación de la cadena carbonada de los ácidos grasos.

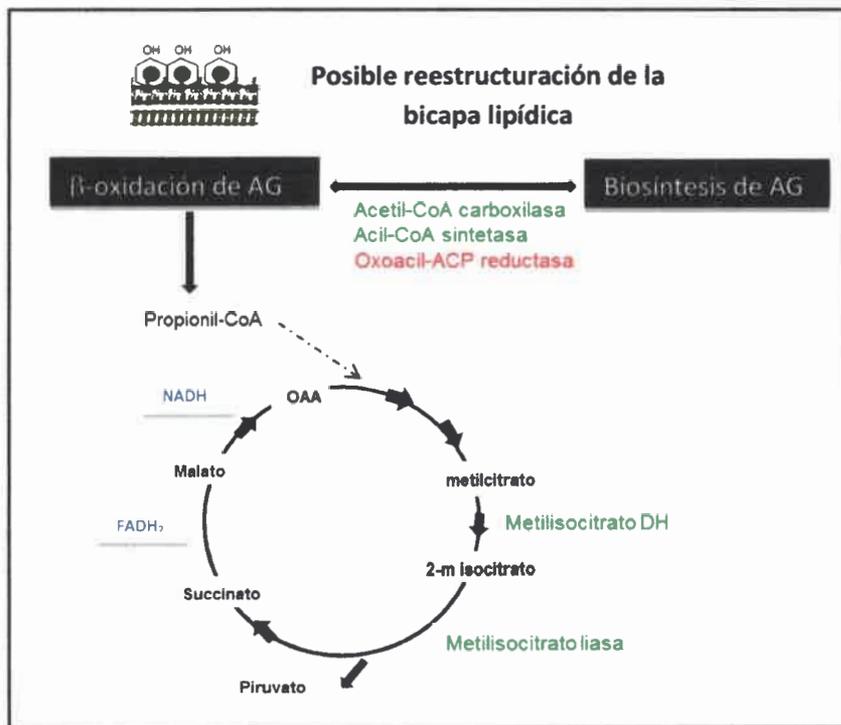
Por otro lado, se observó una marcada sobre-expresión de la enzima metilisocitrato liasa, implicada en el ciclo del metilcitrato. La enzima 2-metilisocitrato deshidratasa también se sobre-expresó en presencia de fenol. Dicha vía suele activarse ante elevadas concentraciones de propionato, compuesto tóxico generado a partir de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos ramificados y de cadena impar. La detoxificación de propionato vía metilcitrato produce piruvato e intermediarios del ciclo de Krebs (Gould y col., 2006).

**Tabla 15:** Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en el metabolismo lipídico.

PROTEÍNA	Código de acceso	pI	PM (Da)	Cambio de expresión (veces)*
Acil-CoA sintetasa	gi 674994296	5,47	61810	+2,9
Acetil-CoA carboxilasa	gi 690996038	5,42	50820	+1,9
Oxoacil-ACP reductasa	gi 490861494	4,82	27142	-2,1
Succinil-CoA:3-cetoacil-coenzima A transferasa (SCOT) (sub A)	gi 490859391	4,91	25304	-6,7
3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	gi 674995203	5,61	27591	-3
Metilisocitrato liasa	gi 490858658	4,99	32621	+181
2-metilisocitrato deshidratasa	gi 490860929	5,11	95978	+1,8

\*Sobre (+) o sub-expresión (-) de proteínas ante la exposición de la bacteria a fenol, con respecto a la condición control.

Las principales respuestas celulares ante la fluidificación de las membranas por el fenol, es la modificación de los ácidos grasos que componen las membranas, ya sea por incorporación de ácidos grasos de cadena corta, o de ácidos grasos insaturados en posición *trans* (Megharaj y col., 2011). Las modificaciones observadas en la expresión de enzimas del metabolismo de ácidos grasos en *A. guillouiae* podrían asociarse, entonces, con un proceso de reestructuración de las membranas fosfolipídicas provocado por el estrés oxidativo que genera el fenol (figura 57).



**Figura 57:** Enzimas implicadas en el metabolismo de AG y ciclo del metilcitrato expresadas diferencialmente en *A. guillouiae* expuesto a fenol. En verde se indican las enzimas sobre-expresadas y en rojo las sub-expresadas en presencia del contaminante.

Por otro lado, entre los mayores reservorios celulares de energía de ciertos organismos procariontes, se encuentran los gránulos de poli  $\beta$  hidroxibutirato (PBH). Cuando las fuentes de energía exógenas se han agotado, las bacterias comienzan a utilizar estas reservas lipídicas, generando acetil-CoA, que posteriormente es internalizado en el ciclo de Krebs. En el proteoma de *A. guillouiae* creciendo en presencia de fenol se detectó una sub-expresión de dos enzimas esenciales para la degradación de PBH, succinil-CoA:3-cetoacil-coenzima A

transferasa y 3-hidroxiacetil-CoA transferasa. Estos resultados indicarían que la bacteria no necesita obtener energía adicional a partir de reservas celulares cuando crece en presencia de fenol como fuente de carbono. Esto último concuerda con la hipótesis anterior, que indicaba que los cambios detectados en el metabolismo de ácidos grasos estarían más relacionados con modificaciones estructurales, que con requerimientos energéticos.

Los resultados obtenidos podrían sugerir, además, la presencia de alguna vía biosintética de PHB, lo cual constituiría otra interesante capacidad de este microorganismo, aprovechable desde un punto de vista biotecnológico.

### 11.3.3. Enzimas implicadas en la asimilación de nitrógeno y metabolismo de aminoácidos

Entre los cambios en el proteoma de *A. guillouiae* en respuesta al fenol, puede citarse también la disminución en la expresión de la proteína PII1, proteína reguladora del metabolismo del nitrógeno que activa o bloquea el ingreso de  $\text{NH}_4$  en las células, de acuerdo a los niveles de oxoglutarato y glutamina citoplasmáticos (Fernández-Reyes y col., 2009). Cuando existen limitaciones celulares de nitrógeno, la proteína PII1 normalmente es sobre-regulada, al igual que la enzima glutamina sintetasa, causando la incorporación y asimilación de  $\text{NH}_4$  (Hu y col., 2005). La sub-expresión de ambas proteínas indicaría que la bacteria no presentó limitaciones nutricionales de nitrógeno mientras creció en presencia de fenol.

Por otro lado, se detectaron modificaciones en el contenido celular de proteínas asociadas al metabolismo de los aminoácidos alanina (D-alanina-D-alanina ligasa), glutamato (imidazol glicerol fosfato sintetasa, glutamina sintetasa) y tirosina (dihidrodipicolinato reductasa, tirosil-tRNA sintetasa) (tabla 16). Este hallazgo tiene relación con el ya mencionado incremento en la biosíntesis celular a causa de la incorporación de fenol, efecto que se traduciría en un incremento en el metabolismo de aminoácidos.

Además, las enzimas D-alanina-D-alanina ligasa, dihidrodipicolinato reductasa e imidazol glicerol fosfato sintetasa, están involucradas de diferentes maneras en la síntesis de peptidoglicano o de sus precursores. Si bien las respuestas microbianas más comunes ante la presencia de compuestos aromáticos consisten en la reestructuración lipídica o polisacáridica de sus membranas (Pessione y col., 2003), probablemente esta sobre-expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular tenga relación, además, con una adaptación de las envolturas celulares bacterianas ante la toxicidad del fenol.

**Tabla 16:** Proteínas expresadas diferencialmente en presencia de fenol, implicadas en el metabolismo de nitrógeno.

PROTEÍNA	Código de acceso	pl	PM (Da)	Cambio de expresión (veces)*
Proteína PII 1	gi 490863245	5,39	12198	-1,8
Glutamina sintetasa	gi 490862518	5,09	52387	-5,3
D-alanina-D-alanina ligasa	gi 490856584	4,92	33574	+2,1
Imidazol glicerol fosfato sintetasa	gi 490954769	5,34	27311	+9,3
Dihidrodipicolinato reductasa	gi 490856795	5,54	28525	+++
Tirosil-tRNA sintetasa	gi 490856878	5,37	44890	+1,5
tRNA dimetilaliltransferasa	gi 490858824	5,51	36182	+2,7

\*Sobre (+) o sub-expresión (-) de proteínas ante la exposición de la bacteria a fenol, con respecto a la condición control

+++ : Inducción total de la proteína en presencia de fenol.

#### 11.3.4. Modificación en la expresión de proteínas de membrana

Las envolturas celulares bacterianas son las primeras estructuras que tienen contacto con los contaminantes y actúan como barreras para el ingreso y salida de los mismos hacia y desde el interior celular. Como se indicó previamente, en respuesta a la toxicidad generada por el fenol en el proteoma de *A. guillouiae* se observaron modificaciones tanto en el metabolismo de ácidos grasos, componentes mayoritarios de la membrana fosfolipídica, como en la síntesis de peptidoglicano. Además, la exposición al contaminante causó sobre-expresión de los péptidos componentes de ciertos transportadores de membrana, entre ellos, la proteína de unión al ATP, parte esencial de los transportadores del tipo ABC (Tabla 17). La familia ABC incluye transportadores tanto para la captura como para el eflujo de diversos sustratos, entre ellos azúcares, aminoácidos, iones, drogas, polisacáridos, proteínas y algunos antibióticos. Estos transportadores también han sido descritos como herramientas que poseen los microorganismos tolerantes a compuestos aromáticos para expulsarlos de la célula y, de esta manera, reducir su toxicidad (Ramos y col., 2002). Por lo tanto, considerando la capacidad de estos complejos proteicos para movilizar diferentes sustancias desde y hacia el interior de la célula, se podría suponer que están implicados no sólo en la expulsión de fenol, sino también de algunos de los productos de su degradación. Esto podría explicar los resultados obtenidos en el capítulo anterior, cuando se detectó la presencia de catecol y ácido *cis,cis*-mucónico en el medio de cultivo durante el proceso de remoción de fenol.

Otra de las proteínas de membrana sobre-expresadas en presencia de fenol fue la proteína Omp38. La misma es del tipo OmpA, una familia de proteínas monoméricas localizadas en la membrana externa y detectadas también en *A. calcoaceticus* y *A. radioresistens* (Finkel, 2003). Hay evidencias de la implicancia de estas proteínas en la

emulsificación de compuestos aromáticos, lo cual incrementa su biodisponibilidad y favorece su incorporación intracelular (Pessione y col., 2003). Esto podría indicar que dicha porina tendría alguna función asociada con la incorporación de fenol en el interior de la célula.

Por último, la porina OprB, inducible por glucosa, también fue sobre-expresada en presencia de fenol, contrariamente a lo descrito en otras bacterias, las cuales generalmente sub-expresan dicha proteína en presencia del contaminante (Shrivastava y col., 2011). Según lo descrito por Wylie y Worobec (1995), si bien esta proteína de membrana estaría fuertemente asociada al transporte de glucosa, también tendría capacidad para internalizar en la célula otros compuestos, mayormente aquellos que contienen grupos hidroxilos. En ese sentido, se podría suponer que el fenol sería internalizado en las células a través de estos canales.

Por lo tanto, el contenido intracelular de fenol y de sus productos de oxidación podría estar regulado a través de estas tres proteínas de membrana. Por un lado Omp38 y OprB estarían involucradas en la incorporación del compuesto aromático, mientras que los transportadores del tipo ABC serían los encargados de expulsar los productos de degradación que se encuentren en exceso en el interior celular, y por qué no, el mismo fenol. Esta podría ser una estrategia de la bacteria para mantener baja la concentración de fenol intracelular y de esta manera, incrementar su tolerancia al mismo.

**Tabla 17:** Proteínas de membrana expresadas diferencialmente en presencia de fenol.

PROTEÍNA	Código de acceso	pl	PM (Da)	Cambio de expresión (veces)*
Proteína de unión al ATP	gi 490863632	5,42	56524	+2,2
Proteína Omp38 de memb. externa	gi 490860976	5,70	37212	+2,7
Porina OprB inducible por glucosa	gi 490861972	4,57	47373	+2,3

\*Sobre-expresión (+) de proteínas ante la exposición de la bacteria a fenol, con respecto a la condición control.

### 11.3.5. Cambios proteómicos asociados a los procesos de transcripción y traducción

Las proteínas RNA polimerasa y S1, presente en la subunidad ribosomal 30S se sobre-expresaron más de tres veces en presencia de fenol (tabla 18). Este resultado podría indicar un incremento en la capacidad de síntesis proteica en presencia del contaminante, lo cual sería lógico, considerando que muchas enzimas, fundamentalmente involucradas en la degradación de fenol, se sintetizaron en exceso cuando la bacteria creció en presencia del contaminante.

Sin embargo, otras proteínas involucradas en la transcripción y traducción fueron sub-expresadas. Entre ellas se puede mencionar el factor de elongación Tu, la proteína L9 de la subunidad ribosomal 50S y el factor de terminación NusA. Este comportamiento ha sido descrito en cepas de *Acinetobacter* resistentes a antibióticos que actúan a nivel de las

envolturas celulares, cuando crecen en presencia de los mismos (Fernández-Reyes y col., 2009; Chopra y col., 2013). Aparentemente, ciertas cepas de este género, tolerantes a compuestos químicos tóxicos, expresan de manera diferencial las proteínas implicadas en procesos de síntesis, a modo de mecanismo de defensa celular. Por lo general, este tipo de respuesta se expresa fenotípicamente con un incremento en el tiempo de generación y en la fase lag durante el crecimiento microbiano, características típicas del desarrollo de microorganismos en presencia de contaminantes ambientales (Fernández-Reyes y col., 2009).

**Tabla 18:** Proteínas implicadas en procesos de transcripción o traducción, expresadas diferencialmente en presencia de fenol.

PROTEÍNA	Código de acceso	pI	PM (Da)	Cambio de expresión (veces)*
RNA polimerasa (sub. $\beta$ )	gi 490856432	5,40	152081	+3,9
Proteína S1 (sub ribosomal 30S)	gi 490834779	4,97	61188	+3,5
Factor de elongación Tu	gi 691019727	4,99	41343	-2,2
Proteína L9 (sub ribosomal 50S)	gi 490857291	5,65	15716	-1,9
Factor de terminación de la transcripción NusA	gi 490856294	4,45	54857	-2,4

\*Sobre (+) o sub-expresión (-) de proteínas ante la exposición de la bacteria a fenol, con respecto a la condición control.

### 11.3.6. Modificación en la expresión de proteínas de respuesta al estrés

El daño en la membrana ante la exposición a fenol, provoca la generación de estrés oxidativo que generalmente se correlaciona con la reducción en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria e incremento en el contenido celular de peróxido de hidrógeno, uno de los principales disparadores de la respuesta celular antioxidante (Domínguez-Cuevas y col., 2006).

En cuanto a la respuesta antioxidante de *A. guillouiae* en presencia de fenol, se observó la sobre-expresión de una peroxidasa con elevada homología con AhpC (alquil hidropéroxido reductasa, subunidad C) (tabla 19). Esta proteína reduce peróxidos lipídicos y otros hidropéroxidos orgánicos producidos durante el estrés oxidativo a formas no tóxicas (Ochsner y col., 2001). La sobre-expresión de AhpC ha sido relacionada con un incremento en la tolerancia bacteriana a diferentes compuestos tóxicos, tales como peróxido de hidrógeno, cadmio y compuestos aromáticos. En el caso de *A. calcoaceticus*, por ejemplo, esta proteína actúa como importante antioxidante cuando la bacteria crece en presencia de tolueno y fenol (Santos y col., 2004).

Se conoce que otro de los daños que generan los compuestos aromáticos sobre las estructuras celulares, es el plegamiento erróneo de proteínas. Para contrarrestar tal efecto, una de las respuestas celulares más difundidas es la inducción de chaperonas relacionadas al estrés térmico (*heat shock proteins*) (Domínguez-Cuevas y col., 2006). En el caso de *A. guillouiae*, la chaperona DnaK fue sobre-expresada casi tres veces luego de la exposición a fenol, tal como ocurre en otros microorganismos de este género, expuestos a compuestos aromáticos (Benndorf y col., 2008). La sobre-expresión de DnaK demuestra la necesidad celular de proteger a las proteínas formadas ante procesos de agregación y desnaturalización, así como promover el correcto plegamiento y funcionalidad de las mismas.

Finalmente, la proteína OsmC, generalmente inducida por estrés osmótico, fue también sobre-expresada en presencia de fenol. Esta chaperonina ha sido relacionada con procesos de defensa celular ante diferentes condiciones de estrés y por lo tanto, podría participar también en la respuesta antioxidante de *A. guillouiae* ante el estrés generado por fenol. Su sobre-expresión ha sido previamente reportada en otras cepas, creciendo en condiciones similares (Domínguez-Cuevas y col., 2006; Giuffrida y col., 2012).

Dichas respuestas al estrés, así como el proceso de oxidación de fenol probablemente fueron regulados a nivel transcripcional por la proteína AraC, ya que esta proteína cumple un papel fundamental en la regulación de la respuesta a diferentes tipos de estrés en bacterias (Wang y col., 2014) y en *A. guillouiae* fue sobre-expresada casi 50 veces en presencia de fenol.

**Tabla 19:** Proteínas involucradas en respuesta al estrés, expresadas diferencialmente en presencia de fenol.

PROTEÍNA	Código de acceso	pl	PM (Da)	Cambio de expresión (veces)*
Peroxidasa	gi 736606013	5,40	23992	+2
Chaperona DnaK	gi 491176517	4,73	69575	+2,9
Proteína OsmC	gi 490856544	5,91	14891	+2,8
AraC, regulador transcripcional	gi 490856041	5,68	38534	+46

\*Sobre-expresión (+) de proteínas ante la exposición de la bacteria a fenol, con respecto a la condición control

### 11.3.7. Proteínas implicadas en la tolerancia y/o remediación de otros compuestos aromáticos

El estudio proteómico de *A. guillouiae* reveló su capacidad para la degradación enzimática de fenol a través de la vía *orto*. Considerando que el catecol, junto al protocatecuato, son los principales intermediarios formados en la mayoría de las vías

catabólicas de compuestos aromáticos, este resultado ya lo convierte en un interesante microorganismo para la remediación de compuestos aromáticos de diferente naturaleza (Yu y col., 2004). De manera adicional, se observó que el fenol estimularía la expresión de enzimas importantes en el catabolismo de otros compuestos aromáticos, tales como compuestos nitroaromáticos y flavonoides (tabla 20). Esta inducción enzimática por análogos estructurales ha sido detectada en diferentes microorganismos capaces de degradar compuestos de naturaleza aromática y suele emplearse como estrategia de pre-adaptación en biorremediación (Wenzel, 2009).

La quercetin 2,3-dioxigenasa cataliza el clivaje del anillo del quercetin y otros flavonoides, para producir protocatecuato (Hirooka y col., 2010). Los flavonoides son importantes compuestos implicados en la señalización celular y en la interacción planta-microorganismo. Aquellas bacterias capaces de degradar flavonoides, han sido señaladas como buenas candidatas para colonizar la rizósfera y por lo tanto, para ser aplicadas en procesos de fitorremediación asistida (Gerhardt y col., 2009). Las nitrorreductasas, por su parte, presentan un rol central en la activación de compuestos aromáticos nitrosustituídos para su biorremediación (Liu y col., 2007; Emptage y col., 2009). Este último resultado indicaría que *A. guillouiae* no sólo es capaz de degradar fenol a través de la vía *orto*, sino que además sería capaz de degradar compuestos aromáticos nitrosustituídos y policíclicos. Tal hallazgo genera nuevas perspectivas en cuanto a las potenciales capacidades biotecnológicas de esta cepa.

**Tabla 20:** Proteínas implicadas en la degradación de otros compuestos aromáticos, sobre-expresadas en presencia de fenol.

PROTEÍNA	Código de acceso	PI	PM (Da)	Cambio de expresión (veces)*
Quercetin 2,3-dioxigenasa	gi 736602565	5,08	35449	+2,4
Quercetin 2,3-dioxigenasa	gi 490856510	5,27	31975	+6,7
Nitroreductasa	gi 736609117	5,22	21835	+5,6

\*Sobre-expresión (+) de proteínas ante la exposición de la bacteria a fenol, con respecto a la condición control

#### 11.4. Modificaciones en el proteoma de *A. guillouiae* producidas por la exposición a Cr(VI) y fenol

Cuando se expuso a la bacteria simultáneamente a Cr(VI) y fenol, la expresión de ciertas proteínas mantuvo el mismo comportamiento que cuando creció sólo en presencia de fenol. Sin embargo, se observaron modificaciones en la concentración relativa de otras

proteínas y enzimas, implicadas fundamentalmente en reacciones de óxido-reducción o en procesos de generación/mitigación de estrés oxidativo.

#### 11.4.1. Modificación en la expresión de enzimas implicadas en la oxidación de fenol y en la asimilación de sus productos de degradación

La detección de las enzimas implicadas en la *orto*-degradación de fenol confirmó la capacidad de esta bacteria para biotransformar el compuesto en presencia de Cr(VI). Sin embargo, la expresión de la mayoría de esas enzimas fue significativamente inferior a aquella observada sólo en presencia de fenol, como se puede observar en la tabla 21. Esto seguramente se traduce en una menor actividad enzimática y una menor eficiencia en la degradación de fenol en presencia del metal.

**Tabla 21:** Proteínas implicadas en la degradación de fenol expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes.

PROTEÍNA	Cód. Acceso	Diferencia de expresión (veces)		
		Fenol/ Control <sup>(a)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Control <sup>(b)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Fenol <sup>(c)</sup>
Fenol hidroxilasa (sub DMS oxigenasa)	gi 2605613	+6,6	+3,7	-1,7
Fenol hidroxilasa (sub P5)	gi 490859324	+6,5	+3,0	-2,1
Fenol hidroxilasa	gi 490859323	+8,4	SD	-4,1
Fenol hidroxilasa (sub P1)	gi 490859317	SD	+12,3	+11,3
Muconato cicloisomerasa 1	gi 490859524	+17,7	+12,7	SD
Catecol 1,2-dioxigenasa	gi 490859513	+14,3	+8,9	-1,6
3-oxoadipato CoA-transferasa (sub. A)	gi 674995151	+26,9	+19,9	-1,3
3-oxoadipato CoA-transferasa (sub. B)	gi 674994779	+2,0	+3,0	-1,4
Muconolactona Delta-isomerasa	gi 490958629	SD	+32,9	++++

<sup>a</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **fenol y el control**;

<sup>b</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **Cr(VI)+fenol y el control**;

<sup>c</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre **ambos tratamientos**.

(+): sobre-expresión; (-) sub-expresión; ++++ inducción total; SD sin diferencias

La fenol hidroxilasa ha sido descrita como una proteína multicomponente (Divari y col., 2003). La expresión diferencial de las subunidades P1 y P5 de dicha enzima en presencia y ausencia de Cr(VI) revela, tal vez, un mecanismo de adaptación ante la toxicidad del metal. El hallazgo más destacable en lo referente a las proteínas involucradas en la oxidación de fenol, es que la expresión de la enzima muconolactona delta isomerasa no se modificó significativamente en presencia de fenol con respecto al control, pero sí lo hizo cuando ambos contaminantes se incorporaron simultáneamente. Esto podría relacionarse con la etapa de la

remoción en la que se tomó la muestra para cada condición y con procesos tales como la regulación por sustrato/producto o conformación y estabilidad de la enzima en diferentes condiciones celulares.

La diferencia en el contenido celular de esas enzimas provocó modificaciones en otros procesos asociados al metabolismo de carbono en *A. guillouiae* (tabla 22). Probablemente la degradación de fenol fue más lenta o menos eficiente en presencia de Cr(VI), produciéndose una menor concentración de acetil-CoA y succinato que ingresarían a las vías asimilatorias. En primer lugar, la enzima isocitrato liasa se mantuvo a niveles basales cuando ambos contaminantes fueron incorporados en el medio de cultivo. Por lo tanto, en presencia de Cr(VI) no se derivarían los intermediarios del ciclo de Krebs al ciclo del glioxilato, como ocurre sólo en presencia de fenol. Como se mencionó previamente, el principal objetivo de esta estrategia celular sería derivar los productos de degradación del compuesto aromático a procesos de síntesis de componentes celulares y no sólo a la producción de energía a través del ciclo de Krebs. Sin embargo, en presencia de Cr(VI) y fenol, las enzimas claves en los procesos descarboxilativos del ciclo de Krebs continuaron sub-expresadas y se observó la sub-expresión adicional de la enzima aconitato hidratasa. Es posible que ésta sea una estrategia celular para disminuir la transferencia de equivalentes de reducción a la cadena de transporte de electrones, proceso que puede potenciar el daño oxidativo generado por la mezcla de contaminantes a la cual fue expuesta la bacteria (Chutoam y col., 2013). Se trata de una reacción típica de muchos microorganismos expuestos a metales pesados (Yung y col., 2014). El incremento detectado en la expresión de la enzima succinato deshidrogenasa, que interviene en el ciclo de Krebs y cadena de transporte de electrones concuerda con esta hipótesis. Se ha indicado que los centros redox de esta enzima están organizados de manera tal que previenen la formación de EROS durante la oxidación de succinato a fumarato y la reducción de flavinas (Yankovskaya y col., 2003).

Un efecto similar se produjo sobre las enzimas del ciclo del metilcitrato. Mientras que la metilisocitrato deshidratasa no se modificó en presencia de ambos contaminantes con respecto al medio control, la expresión de la enzima metilisocitrato liasa fue significativamente inferior a la alcanzada sólo en presencia de fenol.

La disminución en el metabolismo energético celular en *A. guillouiae* durante la exposición simultánea a ambos contaminantes sería la responsable de la reducción en la expresión de enzimas implicadas en la transferencia de electrones y generación de ATP, tales como ATP sintetasa y flavoproteína de transferencia de electrones, con respecto a los resultados obtenidos sólo en presencia de fenol.

**Tabla 22:** Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en los ciclos de Krebs, glioxilato, metilcitrato y reacciones del metabolismo energético.

PROTEÍNA	Cód. Acceso	Diferencia de expresión (veces)		
		Fenol/ Control <sup>(a)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Control <sup>(b)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Fenol <sup>(c)</sup>
<b>• Enzimas implicadas en el ciclo de Krebs y del glioxilato</b>				
Isocitrato liasa	gi 490994972	+1,9	SD	-2,8
2-oxoglutarato deshidrogenasa	gi 490855236	-1,4	-2,1	SD
Succinil-CoA ligasa	gi 490855232	-1,5	-1,9	SD
Succinato deshidrogenasa, Sub. Flavina	gi 490855242	SD	+2,4	SD
Aconitato hidratasa	gi 490858864	SD	-1,8	-1,9
Nucleosido difosfato kinasa	gi 497798534	SD	+4	+2,2
Piruvato deshidrogenasa (Sub. E1)	gi 493630557	SD	+2,2	+1,8
<b>• Enzimas implicadas en el ciclo del metilcitrato</b>				
Metilcitrato liasa	gi 490858658	+180	+68	-2,6
2-metilcitrato deshidratasa	gi 490860929	+1,9	SD	-1,9
<b>• Enzimas implicadas en el metabolismo energético y transferencia de electrones</b>				
ATP sintetasa (Sub β)	gi 490861379	+4,0	+3,2	SD
Flavoproteína de transferencia de electrones	gi 490855183	+19,0	+6,8	-2,8

<sup>a</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **fenol** y el control;

<sup>b</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **Cr(VI)+fenol** y el control;

<sup>c</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre **ambos tratamientos**.

(+): sobre-expresión; (-) sub-expresión; SD sin diferencias

#### 11.4.2. Modificación en la expresión de proteínas posiblemente implicadas en la reducción de Cr(VI)

A lo largo de esta tesis doctoral se demostró la capacidad de *A. guillouiae* para reducir Cr(VI) a Cr(III), probablemente a través de mecanismos catalizados por reductasas citosólicas dependientes de NADH. La técnica de 2D permitió identificar a la enzima ferredoxin-NADP reductasa (Tabla 23). Esta enzima pertenece a una familia de flavoproteínas solubles con capacidad para reducir Cr(VI) a Cr(III) generando diferentes concentraciones de flavin semiquinonas y Cr(V) como intermediarios transitorios de reducción, para finalmente formar Cr(III) (Ackerley y col., 2004). Muchas enzimas de este tipo reducen flavinas libres, que luego son las encargadas de transferir electrones al Cr(VI). La riboflavina es un ejemplo de esas flavinas implicadas indirectamente en el proceso de reducción (Suzuki y col., 1992). Esto explicaría el incremento en la expresión de la enzima riboflavina sintasa detectado en presencia del metal.

Además, se ha asociado a la presencia de riboflavina con un aumento en la tolerancia a Cr(VI) en algunas cepas de levaduras. El Cr(VI) induce la formación de riboflavina y aquellas

levaduras flavinogénicas suelen ser más tolerantes al metal que las no productoras, sin embargo no se conoce demasiado de los mecanismos que incrementan la tolerancia y no hay reportes acerca de la sobreproducción de esta vitamina en bacterias ante la exposición a Cr(VI) (Viti y col., 2014).

**Tabla 23:** Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, posiblemente implicadas en la reducción de Cr(VI).

PROTEÍNA	Cód. Acceso	Diferencia de expresión (veces)		
		Fenol/ Control <sup>(a)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Control <sup>(b)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Fenol <sup>(c)</sup>
Ferredoxin-NADP reductasa	gi 490859866	SD	+2,1	+2,5
6,7-dimetil-8-ribitillumazin sintasa	gi 490856707	+4,2	+3,4	SD
Riboflavina sintasa (Sub.α)	gi 490863253	SD	+2,4	+1,7

<sup>a</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **fenol y el control**;

<sup>b</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **Cr(VI)+fenol y el control**;

<sup>c</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre **ambos tratamientos**.

(+): sobre-expresión; (-) sub-expresión; SD sin diferencias

#### 11.4.3. Expresión diferencial de proteínas asociadas al estrés oxidativo y respuesta antioxidante

Si bien las cromato reductasas tienen una importante aplicación biotecnológica, son fuertes inductoras de estrés oxidativo y daño en diferentes componentes celulares, tales como ADN y proteínas. Por lo tanto, el efecto nocivo de la exposición de *A. guillouiae* a Cr(VI) y fenol sobre su proteoma probablemente tenga más relación con la producción de Cr(III) que con la forma hexavalente del ion.

Las EROS generadas a partir de la reducción de Cr(VI) tienen entre sus principales blancos de acción, los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados. En este aspecto, Kumar y col. (2012)<sup>a</sup> demostraron un incremento en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos insaturados como respuesta a la exposición a Cr(VI) y a la generación de EROS en la cianobacteria *Chroococcus* sp. El proceso de  $\beta$ -oxidación ha sido, además, asociado con la síntesis de gránulos de PHB en otros microorganismos creciendo en presencia del metal, como un modo de "ahorro" de energía (Hu y col., 2005). El estudio proteómico de *A. guillouiae* permitió detectar el incremento en la expresión de algunas enzimas involucradas tanto en la  $\beta$  oxidación, como en la síntesis de PHB (tabla 24). Entre ellas se puede mencionar a las enzimas piruvato deshidrogenasa, acil-CoA deshidrogenasa y 3-oxoacil-ACP reductasa. Además, tal

como ocurrió cuando el microorganismo sólo se expuso a fenol, ciertas enzimas que catalizan la degradación de los gránulos de PHB se encontraron sub-expresadas también ante la presencia simultánea de ambos compuestos (succinil-CoA:3-Cetoácido-Co A transferasa y 3-hidroxi-butarato deshidrogenasa). Este mecanismo ha sido descrito como una estrategia para reducir la generación de EROS cuando las bacterias se encuentran en condiciones de estrés. Tanto la  $\beta$ -oxidación como la degradación de PHB producen Acetil-CoA, molécula que al ingresar al ciclo de Krebs genera NADH y FADH<sub>2</sub> y por lo tanto, EROS a partir de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria (Chutoam y col., 2013).

**Tabla 24:** Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en el metabolismo lipídico.

PROTEÍNA	Cód. Acceso	Diferencia de expresión (veces)		
		Fenol/ Control <sup>(a)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Control <sup>(b)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Fenol <sup>(c)</sup>
<b>• Proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos (biosíntesis- oxidación)</b>				
Acetil-CoA carboxilasa	gi 690996038	+1,9	+2,0	SD
Acil-CoA sintetasa	gi 674994296	+2,8	+2,0	SD
Acetato kinasa	gi 736601335	+2,6	+2,7	SD
Acetil-CoA carboxilasa	gi 490857748	SD	-2,8	-2,1
<b>• Proteínas implicadas en la síntesis/degradación de gránulos de PHB</b>				
Piruvato deshidrogenasa	gi 493630557	SD	+2,2	+1,8
Acil-CoA deshidrogenasa	gi 736607308	+1,9	+2,0	SD
3-cetoacil-ACP reductasa	gi 490861494	-2,1	+2,4	+5,2
Succinil-CoA:3-Cetoácido-Co A transferasa (SCOT)	gi 490859391	-6,7	-3,4	SD
3-hidroxi-butarato deshidrogenasa	gi 674995203	-2,9	-2,2	SD

<sup>a</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **fenol** y el control;

<sup>b</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **Cr(VI)+fenol** y el control;

<sup>c</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre **ambos tratamientos**.

(+): sobre-expresión; (-) sub-expresión; SD sin diferencias

La figura 58 demuestra la relación entre los procesos de  $\beta$ -oxidación y biosíntesis de AG con el de producción de PHB, destacándose las enzimas expresadas diferencialmente en *A. guillouiae* en presencia de Cr(VI) y fenol.



el Cr(VI) es sentido por las proteínas presentes en la envoltura celular (Kiliç y col., 2010). Otra proteína de membrana externa sobre-expresada en presencia de Cr(VI) y fenol fue OmpW. Esta porina normalmente se induce en respuesta al estrés, aunque su función ante tales procesos no se conoce con claridad (Asakura y col., 2008).

Es importante destacar que no se detectó ninguna proteína de membrana con homología a transportadores tipo ChrA en el proteoma de *A. guillouiae* creciendo en presencia de Cr(VI). Esto coincide con los resultados negativos obtenidos al intentar amplificar genes codificantes para tal proteína en su genoma. Por lo tanto, se podría suponer que esta bacteria no presenta bombas de eflujo como mecanismo de defensa contra el metal.

**Tabla 25:** Proteínas de membrana o implicadas en el metabolismo de sus componentes, expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes.

PROTEÍNA	Cód. Acceso	Diferencia de expresión (veces)		
		Fenol/ Control <sup>(a)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Control <sup>(b)</sup>	Cr(VI)+Fenol /Fenol <sup>(c)</sup>
• Proteínas implicadas en la síntesis de lipopolisacáridos				
D-arabinosa 5-fosfato isomerasa	gi 490862304	SD	+2,4	+1,5
UDP-glucosa 4-epimerasa	gi 490961831	SD	+3,6	+3,7
• Proteínas transportadoras				
Proteína de membrana externa Omp38	gi 490860976	+2,7	+5,6	+3,5
Proteína de membrana externa OmpW	gi 514347513	SD	+6,3	+4,4
Proteína de unión al ATP	gi 490863632	+2,2	+1,7	-1,3
Porina OprB	gi 490861972	+2,3	SD	-1,8

<sup>a</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con fenol y el control;

<sup>b</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con Cr(VI)+fenol y el control;

<sup>c</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre ambos tratamientos.

(+): sobre-expresión; (-) sub-expresión; SD sin diferencias

Como se mencionó anteriormente, cuando el Cr(III) se compleja con moléculas orgánicas, tales como NAD<sup>+</sup>, tiene capacidad para crear aductos en el ADN y desestabilizarlo. Cuando eso ocurre, suele inhibirse la replicación y acumularse ADN de cadena simple. Esto genera la activación de la respuesta SOS, mediada por la proteína RecA (Courcelle y col., 2001). La sobre-expresión de RecA en *A. guillouiae* (tabla 26), indicaría daño en su ADN y la activación de mecanismos para mitigarlo. Además, la exposición al metal causó la alteración en el contenido celular de proteínas implicadas en procesos de transcripción y traducción (tabla 26). En ese contexto, se observó la expresión diferencial de distintas subunidades de las proteínas ribosomales 50 y 30 S, así como la sub-expresión de la subunidad beta de la enzima ARN

polimerasa y proteínas implicadas en la transcripción. Esto concuerda con estudios previos que relacionaron la exposición bacteriana a Cr(VI) con un inevitable impacto sobre los procesos de transcripción y traducción (Wang y col., 2014).

**Tabla 26:** Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en procesos de replicación, transcripción y traducción.

PROTEÍNA	Cód. Acceso	Diferencia de expresión (veces)		
		Fenol/ Control <sup>(a)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Control <sup>(b)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Fenol <sup>(c)</sup>
• Proteínas implicadas en el sistema de reparación SOS				
Recombinasa A (RecA)	gi 490857713	SD	+3,1	+1,7
• Proteínas implicadas en procesos de transcripción y traducción				
ARN polimerasa (Sub. β)	gi 497799882	SD	---	---
ARN polimerasa (Sub. β)	gi 490856432	+3,8	+2,2	SD
Factor de terminación de la transcripción NusA	gi 490856294	-2,4	-2,7	SD
Regulador transcripcional	gi 490859097	SD	-2,3	-1,9
Proteína accesoria de la transcripción	gi 490863328	SD	-7,0	-8,4
Sub. ribosomal 30S (Prot S1)	gi 490834779	+3,5	+5,1	+1,4
Sub. ribosomal 50S (Prot L9)	gi 490857291	-1,9	-40,9	-21,7
Factor de elongación Tu	gi 490856294	-2,2	-2,6	SD
5'-nucleotidasa surE	gi 490859229	-2,2	-1,9	SD

<sup>a</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con fenol y el control;

<sup>b</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con Cr(VI)+fenol y el control;

<sup>c</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre ambos tratamientos.

(+): sobre-expresión; (-) sub-expresión; SD sin diferencias; (---) represión total

La activación de la respuesta enzimática antioxidante es una de las estrategias celulares más estudiadas, que le permite a las bacterias hacer frente al estrés generado por las EROS formadas a partir de la reducción de Cr(VI) a Cr(III). Entre las enzimas con mayor capacidad antioxidante se encuentran las peroxidasas, catalasa y superóxido-dismutasa (Ramírez-Díaz y col., 2008). En este caso, la exposición de *A. guillouiae* a Cr(VI) y fenol, provocó la sobre-expresión de las enzimas peroxidasa y alquil hidropéroxido reductasa (tabla 27).

**Tabla 27:** Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en la respuesta antioxidante y defensa contra el estrés celular.

PROTEÍNA	Cód. Acceso	Diferencia de expresión (veces)		
		Fenol/ Control <sup>(a)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Control <sup>(b)</sup>	Cr(VI)+Fenol/ Fenol <sup>(c)</sup>
Peroxidasa	gi 736606013	+2,0	+3,0	+1,4
Alquil hidroperóxido reductasa (Sub. C)	gi 490859781	SD	+2,4	+1,5
Piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa	gi 490864439	SD	+2,5	+2,1
Chaperona HscA, de ensamblaje de proteínas con Fe-S	gi 490858594	SD	+2,5	+2,5

<sup>a</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **fenol y el control**;

<sup>b</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con **Cr(VI)+fenol y el control**;

<sup>c</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre **ambos tratamientos**.

(+): sobre-expresión

Además, se registró un incremento en la expresión de una enzima de tipo piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa, familia de flavoproteínas que transfieren electrones entre nucleótidos piridínicos y compuestos tipo tiol. Las enzimas lipoamida deshidrogenasa, glutatión reductasa y tioredoxina reductasa, de crucial importancia en la detoxificación de EROS, se clasifican en dentro de este grupo de flavoproteínas (Lu y Holmgren, 2014). Este resultado sugiere el desarrollo de una respuesta antioxidante dependiente de moléculas tipo tiol en *A.guillouiae* expuesto a Cr(VI) y fenol. El aumento detectado en la concentración de enzimas asociadas con el metabolismo del tiol cisteína y de L-glutamato, ambos componentes del GSH, concuerda con esa suposición (tabla 28).

Las enzimas sobre-expresadas S-adenosilmetionina sintetasa, homocisteína metiltransferasa y metionil-tARN formiltransferasa regulan la concentración intracelular de cisteína y metionina (tabla 28). Se conoce que la presencia de esos aminoácidos impacta positivamente en la tolerancia bacteriana a Cr(VI), no sólo por la capacidad antioxidante de la cisteína, sino también por su actividad como regulador del ingreso de sulfato al interior celular. Según algunos autores, al aumentar la concentración de esos aminoácidos azufrados, se limitaría la incorporación sulfato y, de forma indirecta, el ingreso de Cr(VI) a través de los mismos transportadores (Decorosi, 2010; Viti y col., 2014). Además, la metionina cumple un importante rol en la protección estructural de las proteínas bacterianas ante la presencia de metales pesados (Davies, 2000; Hu y col., 2005). Aquellos residuos de metionina expuestos superficialmente funcionarían como eficientes secuestradores de oxidantes antes que éstos ataquen residuos proteicos críticos para su estructura o función (Levine y col., 1996). Por último, y continuando con el desarrollo de mecanismos de protección celular contra el estrés

causado por Cr(VI), se detectó un incremento significativo en la expresión de la chaperona HscA (tabla 27), que participa en el ensamblaje de proteínas con centros de hierro-azufre, tales como ferredoxinas y metaloproteínas, fuertemente implicadas en procesos de óxido-reducción (Tapley y col., 2004).

**Tabla 28:** Proteínas expresadas diferencialmente entre los tratamientos con y sin los contaminantes, implicadas en el metabolismo de aminoácidos.

PROTEÍNA	Cód. Acceso	Diferencia de expresión (veces)		
		Fenol/ Control <sup>(a)</sup>	Cr(VI)+Feno/ Control <sup>(b)</sup>	Cr(VI)+Feno/ Fenol <sup>(c)</sup>
• Proteínas implicadas en el metabolismo del glutamato				
Glutamina amidotransferasa	gi 736601993	SD	+1,9	+1,8
Glutamina sintetasa	gi 490862518	-5,3	-2,2	-2,0
Glucosamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa	gi 490856717	SD	+3,9	SD
Fosforibosil Formilglicinamidina sintetasa	gi 490960834	SD	-2,4	-1,8
• Proteínas implicadas en el metabolismo de cisteína y metionina				
S-adenosilmetionina sintetasa	gi 497799882	SD	+3,2	+4,0
Metionil-tARN formiltransferasa	gi 490856432	SD	+2,7	SD
Homocisteína metiltransferasa	gi 490856294	SD	+4,0	+2,2
Histidina amonio-liasa	gi 490859097	SD	-4,6	SD
5-Metiltetrahidropteroil triglutamato homocisteína metiltransferasa	gi 490863328	SD	+2,7	+2,0

<sup>a</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con fenol y el control;

<sup>b</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre el tratamiento con Cr(VI)+fenol y el control;

<sup>c</sup> Diferencia en la expresión de cada proteína entre ambos tratamientos.

(+): sobre-expresión; (-) sub-expresión.

# Capítulo IV

Conclusiones y perspectivas.



Los efluentes de una curtiembre local, descargados a un cuerpo de agua natural de la provincia de Córdoba, presentaron elevado contenido de fenoles y materia orgánica degradable, además de alteraciones en algunos parámetros físico-químicos que no se ajustaron a las reglamentaciones vigentes en nuestro país para aguas industriales. Asimismo, los sedimentos del canal de vertido de la curtiembre mostraron concentraciones de Cr que excedieron ampliamente los límites máximos permitidos por la legislación nacional.

A partir de esos sedimentos industriales se aislaron microorganismos tolerantes a Cr(VI) y fenol, entre los que se seleccionó un cultivo mixto denominado SFC 500-1 que presentó, además, elevado potencial para la remoción de esos compuestos. Dicho cultivo bacteriano removió concentraciones de Cr(VI) cercanas a 35 mg/l y creció en presencia de fenol hasta 1000 mg/l, compuesto que degradó completamente a elevada velocidad en medios de crecimiento nutricionalmente diversos.

El empleo de técnicas bioquímicas y moleculares permitió identificar a las cepas que componen el cultivo mixto como *Acinetobacter guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Ambas cepas fueron capaces de remover Cr(VI) y crecer en presencia de fenol, pero sólo *A. guillouiae* degradó fenol, con una eficiencia similar a la del cultivo mixto. Sin embargo, este último tendría mayor capacidad para remover simultáneamente Cr(VI) y fenol que la cepa aislada, motivo por el cual resultó más atractivo para ser empleado en ensayos de co-remediación de esos contaminantes.

El potencial de remoción simultánea de SFC 500-1 dependió fuertemente del medio de cultivo empleado, siendo el Cr(VI) el compuesto limitante en el proceso. En medios nutritivos, la remoción del metal fue elevada, pero disminuyó significativamente cuando el fenol se adicionó como única fuente de carbono. No obstante, es destacable la eficiencia del cultivo mixto para co-remediar ambos contaminantes en un efluente de curtiembre, en presencia de flora nativa y probablemente otros contaminantes generados durante el curtido. Además, en un medio nutritivo óptimo para su desarrollo (TY), SFC 500-1 toleró 12 combinaciones diferentes de ambos contaminantes y redujo hasta 23 mg/l de Cr(VI) durante la degradación total de 750 mg/l de fenol en menos de 120 horas. Esta elevada tolerancia, sumada a su habilidad para remover dichos compuestos en forma simultánea en un amplio rango de pH, temperatura y velocidades de agitación, son características ventajosas del cultivo bacteriano para su futura aplicación en el tratamiento de efluentes industriales, que presentan fluctuaciones periódicas en su composición, carga de contaminantes y propiedades físico-químicas.

Si bien SFC 500-1 demostró una interesante versatilidad frente a diferentes condiciones de cultivo cuando se trabajó con pequeños volúmenes de soluciones

contaminadas, su aplicación a escala piloto requirió una nueva optimización de los parámetros de trabajo. La remoción simultánea de Cr(VI) y fenol en un reactor de tanque agitado dependió significativamente de la velocidad de agitación y la aireación aplicadas al sistema, y fue máxima cuando el reactor se operó a 300 rpm y 1 vvm. Bajo esas condiciones, el cultivo mixto requirió casi el doble de tiempo para alcanzar iguales valores de remoción que en Erlenmeyers. Tanto en el reactor como en Erlenmeyers, el proceso de remoción provocó una alcalinización del medio de reacción, que estaría relacionada con la reducción de Cr(VI) a Cr(III) y su posible interacción con componentes del medio de cultivo. El Cr(III) formado durante la reducción no sólo fue liberado al medio sino que además se asoció a la biomasa bacteriana.

La inmovilización celular en una matriz de Ca-alginato resultó ser una estrategia útil para mejorar la eficiencia de remoción simultánea del cultivo mixto en medios con escaso contenido de nutrientes. Las bacterias inmovilizadas alcanzaron mayores porcentajes de remoción de Cr(VI) y degradaron fenol más rápidamente que las células libres. Además, toleraron hasta 1500 mg/l de fenol y lo removieron completamente en presencia de Cr(VI), mientras que las células libres no se desarrollaron con esa concentración del contaminante. La posibilidad de reutilización durante cinco ciclos de remoción y de almacenamiento prolongado son otras importantes características de SFC 500-1 inmovilizado.

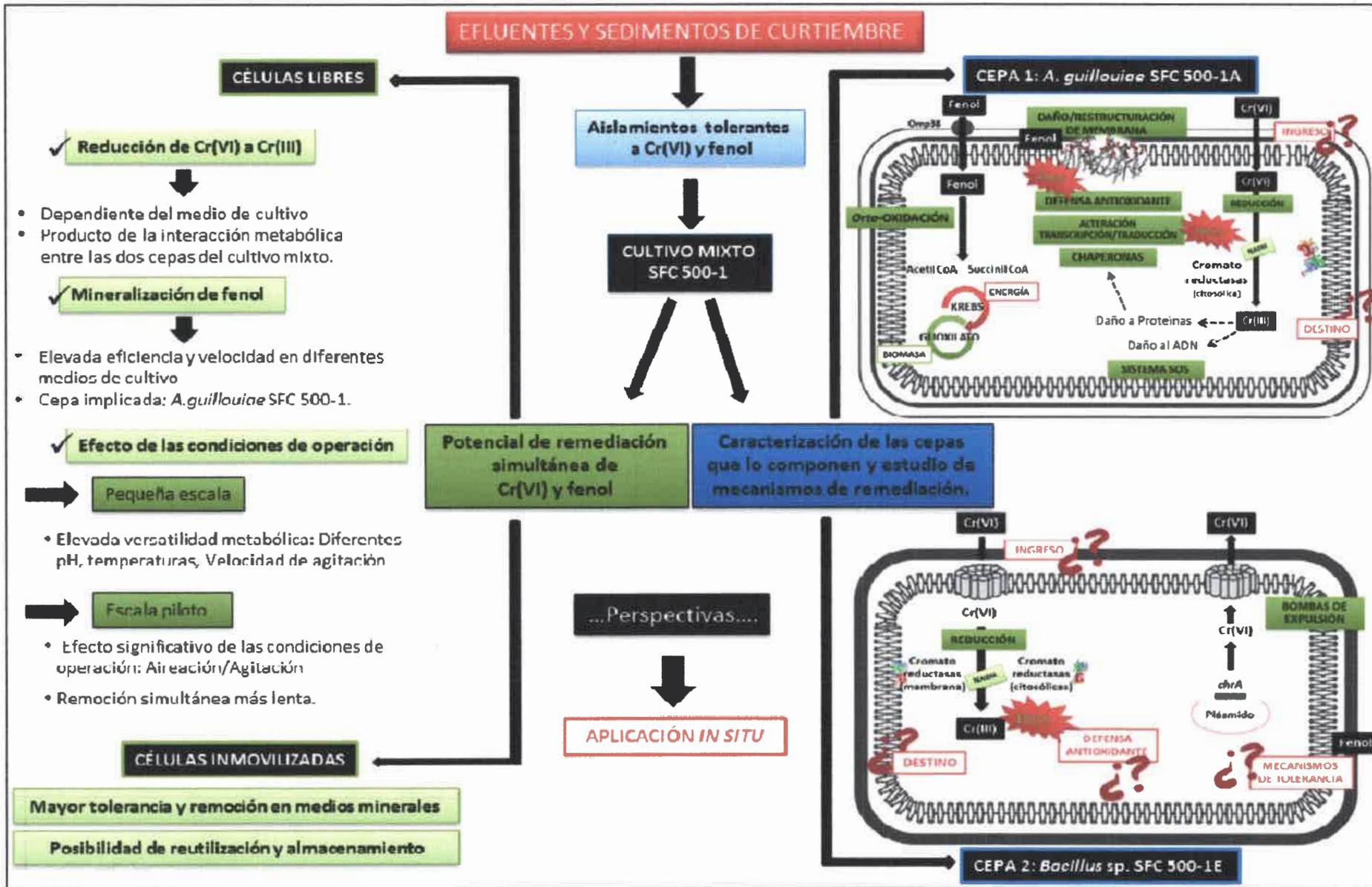
El cultivo mixto encapsulado en Ca-alginato redujo Cr(VI) a Cr(III) y degradó fenol formando como intermediarios catecol y ácido *cis,cis*-mucónico, que se liberaron parcialmente al medio de cultivo, donde permanecieron durante tiempo variable para luego ser re-internalizados o bien degradados extracelularmente.

La presencia de productos de remoción de Cr(VI) y fenol fue una clara evidencia de la capacidad de las bacterias que componen el cultivo mixto, para remediar soluciones contaminadas con esos compuestos. Sin embargo, se desconocían sus mecanismos de tolerancia y detoxificación. Nuestros resultados aportaron nuevos conocimientos sobre dichos mecanismos, los cuales variaron de acuerdo a la cepa en estudio. Mientras que *Bacillus* sp. utilizaría bombas de expulsión tipo ChrA como estrategia para eliminar el Cr(VI) del interior celular, *A. guillouiae* no tendría codificantes genéticos de ese tipo de proteínas transmembrana. En cuanto a la capacidad para reducir Cr(VI), ambas bacterias presentaron cromato reductasas dependientes de NADH. En el caso de *A. guillouiae*, de localización citoplasmática y activadas en presencia de Cr(VI). Las cromato reductasas de *Bacillus* sp., por el contrario, mostraron actividad constitutiva y se encontraron tanto en la fracción de membrana como en citosol.

Se demostró que *A. guillouiae* degradaría fenol mediante fenol hidroxilasas y la orto degradación de catecol, catalizada por enzimas inducibles por dicho contaminante. El

compuesto ingresaría a las células a través de proteínas de membrana externa tipo OmpA y los productos de oxidación serían metabolizados a través del ciclo de Krebs y del glioxilato para producir biomasa y energía. La toxicidad del fenol causaría, además, la reestructuración en las membranas lipídicas, alteración en procesos de transcripción y traducción e inducción de sistemas antioxidantes. La comparación de esta información con la obtenida frente a la presencia adicional de Cr(VI) permitió establecer que dicho metal causaría una disminución en la expresión de enzimas implicadas en la degradación de fenol, así como una activación en la respuesta antioxidante, sistema SOS y mecanismos de protección de proteínas. Tal respuesta sería provocada por el estrés oxidativo generado por la reducción de Cr(VI) (posiblemente catalizada por una ferredoxina NADP reductasa) y el daño celular ocasionado por la presencia de Cr(III).

La siguiente figura resume los principales hallazgos y aportes de esta tesis.



Considerando la hipótesis planteada originalmente y el conjunto de los resultados obtenidos, se propone al cultivo mixto SFC 500-1 como un sistema biológico adecuado para ser aplicado en el tratamiento de soluciones o efluentes contaminados con Cr(VI) y fenol, ya sea utilizando células libres o inmovilizadas. Entre sus principales potenciales se pueden mencionar su importante versatilidad metabólica en diferentes condiciones de cultivo, así como la capacidad de las cepas que lo componen para biotransformar eficientemente esos contaminantes en compuestos menos tóxicos.

Como ocurre en todo trabajo de investigación, a partir de los conocimientos adquiridos se generan nuevos interrogantes y perspectivas futuras, que implican, entre otros aspectos, el estudio de la eficiencia de remediación *in situ* de SFC 500-1, como así también la evaluación integral de los efluentes *pre* y *post* remoción.

En cuanto al análisis molecular, sería interesante profundizar en el conocimiento de los mecanismos que le permiten a *Bacillus* sp. tolerar fenol y detoxificar Cr(VI) y comprender de qué forma el metal interactúa con la biomasa, como método de remediación y apuntando a una posible recuperación del mismo. Por último, la identificación y caracterización de las enzimas implicadas en la remediación de Cr(VI) y fenol resultaría interesante no sólo para su aplicación en la detoxificación de ambos contaminantes, sino también para la producción industrial de metabolitos y el aprovechamiento de su capacidad catalítica en el área de la medicina, frente a sustratos alternativos.

## Bibliografía



- Abu-Reesh I. (2010). Optimal design of multi-stage bioreactors for degradation of phenolic industrial wastewater: theoretical analysis. *J Biochem Technol* 3: 175-181.
- Ackerley D, Gonzalez C, Park C, Li R, Keyhan M, Matin A. (2004). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70: 873-882.
- Agarry S, Solomon B. (2008). Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescens*. *Int J Environ Sci Technol* 5: 223-232.
- Agarry S, Solomon B, Layokun S. (2008). Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous binary mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescence*. *African J Biotechnol* 7: 2417-2423.
- Ahluwalia S. (2014). Microbial removal of hexavalent chromium and scale up potential. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3: 383-398.
- Ahmad S, Shamaan N, Arif N, Koon G, Shukor M, Syed M. (2012). Enhanced phenol degradation by immobilized *Acinetobacter* sp. strain AQ5NOL 1. *World J Microbiol Biotechnol* 28:347-352.
- Ahmad W, Zakaria Z, Khasim A, Alias M. (2010). Pilot-scale removal of chromium from industrial wastewater using the *ChromeBac*<sup>TM</sup> system. *Biores Technol* 101: 4371-4378.
- Akhtar N, Iqbal J, Iqbal M. (2004). Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by Loofa sponge immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana* characterization studies. *J Hazard Mater* 94: 108-185.
- Al-Khalid T, El-Naas MH. (2012). Aerobic biodegradation of phenols: A comprehensive review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 42: 1631-1690.
- Alloway B, Ayres D. (1993). *Chemical principles of environmental pollution*. Londres, Reino Unido: Blackie Academic & Professional.
- Alva V, Peyton B. (2003). Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity. *Environ Sci Technol* 37: 4397-4402.
- Angelim A, Costa S, Farias B, Aquino L, Melo V. (2013). An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. *J Environ Manage* 127: 10-7.
- APHA. (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18<sup>th</sup> edn. APHA, Washington DC.
- Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S. (2008). Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res Microbiol* 159: 709-717.
- Atlas R, Bartha R. (2001). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4<sup>o</sup> Ed. Madrid, España: Wesley.
- Atterby H, Smith N, Chaudhry Q, Stead D. (2002). Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments. *Pestic Outlook* 13: 9-13.
- Bae W, Lee H, Choe Y, Jahng D, Lee S, Kim S y col. (2005). Purification and characterization of NADPH-dependent Cr(VI) reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. *J Microbiol* 43: 21-27.
- Bajaj M, Gallert C, Winter J. (2008). Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. *Biores Technol* 99: 8376-8381.

- Banerjee A, Ghoshal A. (2011). Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. *Int Biodeterior Biodegradation* 65: 1052-1060.
- Bargagli R. (2008). Environmental contamination in antarctic ecosystems. *Sci Total Environ* 400: 212-226.
- Barragán B, Costa C, Peralta J, Barrera J, Esperanza F, Rodríguez R. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. *Int Biodeterior Biodegradation* 59: 239-244.
- Basha K, Rajendran A, Thangavelu V. (2010). Recent advances in the biodegradation of phenol : A review. *Asian J Exp Biol Sci* 1: 219-234.
- Belitsky B. (2004). Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for *de Novo* pyridoxal 5-phosphate biosynthesis. *J Bacteriol* 186: 1191-1196.
- Benndorf D, Lo N, Babel W. (2008). Protein synthesis patterns in *Acinetobacter calcoaceticus* induced by phenol and catechol show specificities of responses to chemostress. *FEMS Microbiol Lett* 200: 2005-2008.
- Bera D, Chattopadhyay P, Ray L. (2007). Chromium (VI) biosorption by immobilized biomass of *Bacillus cereus* M 116. *J Hazard Subst Res* 6: 1-20.
- Bergero M, Lucchesi G. (2015). Immobilization of *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) cells: A promising tool for effective degradation of quaternary ammonium compounds in industrial effluents. *Int Biodeterior Biodegradation* 100: 38-43.
- Beringer J. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 84: 188-198.
- Bhattacharya A, Gupta A, Kaur A, Malik D. (2014). Efficacy of *Acinetobacter* sp. B9 for simultaneous removal of phenol and hexavalent chromium from co-contaminated system. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 9829-9841.
- Bhattacharya A, Gupta A. (2013). Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr(VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. *Environ Sci Pollut Res Int* 20: 6628-6637.
- Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Biores Technol* 74:63-67.
- Borch T, Kretzschmar R, Kappler A, Van Cappellen P, Ginder-Vogel M, Voegelin A, Campbell K. (2010). Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environ Sci Technol* 44: 15-23.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bravo J, Giraldo S, Centeno A, Páez Mozo E. (1998). Catalizadores para la purificación de aguas industriales que contengan compuestos resistentes a la biodegradación. *III taller Iberoamericano de la red temática VC*. (pp. 259-264). Cartagena de Indias, Colombia..
- Brigden K, Labunska I, Stringer R, Johnston P, Santillo D, Ashton J. (2000). Contaminantes orgánicos y metales pesados en vertidos y sedimentos del Riachuelo, Argentina, 2000. Boletín informativo Greenpeace "Expedición de las Américas 2000": 1-50.
- Brown S, Thompson M, Verberkmoes N, Chourey K, Shah M, Zhou J, Hettich R. (2006). Molecular dynamics of the *Shewanella oneidensis* response to chromate stress. *Mol & Cell Prot* 5: 1054-1071.

- Bulieris P, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt J. (2003). Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 278: 9092-9099.
- Busca G, Berardinelli S, Resini C, Arrighi L. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments. *J Hazard Mater* 160: 265-288.
- Caballero-Flores G, Acosta-Navarrete Y, Ramírez-Díaz M, Silva-Sánchez J, Cervantes C. (2012). Chromate-resistance genes in plasmids from antibiotic-resistant nosocomial enterobacterial isolates. *FEMS Microbiol Lett* 327: 148-154.
- Cabiscol E, Ros J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3: 3-8.
- Camargo F, Okeke B, Bento F, Frankenberger W. (2004). Hexavalent chromium reduction by immobilized cells and the cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29. *Bioremediat J* 8: 23-30.
- CAS (2011). Chemicals Abstract Service. [www.cas.org](http://www.cas.org).
- Cassidy M, Lee H, Trevors J. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells, a review. *J Ind Microbiol* 16: 79-100.
- Castañé P, Rovedatti M, Topalián M, Salibián A. (2006). Spatial and temporal trends of physicochemical parameters in the water of the Reconquista river (Buenos Aires, Argentina). *Environ Monit Assess* 117: 135-144.
- Cervantes C, Campos-García J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. Nies D, Silver S. Eds. *Molecular microbiology of heavy metals*. (pp. 407-419). Berlin, Alemania: Springer-Verlag.
- Cervantes C, Espino-Saldaña A, Acevedo-Aguilar F, León-Rodríguez I, Rivera-Cano M, Avila-Rodríguez M, Kaczmarczyk K y col. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev Latinoam Microbiol* 48: 203-210.
- Cervantes C. (1991). Bacterial interactions with chromate. *J Microbiol Serol* 59: 229-233.
- Chae J, Kim E, Bini E, Zylstra G. (2007). Comparative analysis of the catechol 2,3-dioxygenase gene locus in thermoacidophilic archeon *Sulfolobus solfataricus* strain 98/2. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 815-819.
- Chakraborty B, Indra S, Hazra D, Betai R, Ray L, Basu S. (2013). Performance study of chromium (VI) removal in presence of phenol in a continuous packed bed reactor by *Escherichia coli* isolated from East Calcutta Wetlands. *Biomed Res Int* 2013: 373-412
- Chandra R, Bharagava R, Kapley A, Purohit H. (2011). Bacterial diversity, organic pollutants and their metabolites in two aeration lagoons of common effluent treatment plant (CETP) during the degradation and detoxification of tannery wastewater. *Biores Technol* 102: 2333-2341.
- Chatterjee S, Sau G, Mukherjee S. (2011). Bioremediation of Cr(VI) from chromium-contaminated wastewater by free and immobilized cells of *Cellulosimicrobium cellulans* KUCr3. *Bioremediat J* 15: 173-180.
- Chen H, Xiong L. (2005). Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. *Plant J* 44: 396-408.
- Chen Z, Huang Z, Cheng Y, Pan D, Pan X, Yu M, Pan Z. (2012). Cr(VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus*. *Chemosphere* 87: 211-216.

- Cheng B, Li S, Wang M, Li Y. (2015). Investigation of combined pollution between malathion and a variety of pollutants based on the fractional factorial design (resolution IV). *Polish J Environ Stud* 24: 1939-1947.
- Cheung K, Gu J. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *Int Biodeterior Biodegradation* 59: 8-15.
- Cheung K, Lai H, Gu J. (2006). Membrane-associated hexavalent chromium reductase of *Bacillus megaterium* TKW3 with induced expression. *J Microbiol Biotechnol* 16: 855-862.
- Chirwa E, Smit E. (2010). Simultaneous Cr(VI) reduction and phenol degradation in a trickle bed bioreactor: shock loading response. *Chem Engin Transac* 4-9.
- Chopra S, Ramkissoon K, Anderson D. (2013). A systematic quantitative proteomic examination of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteomics* 84: 17-39.
- Chrysochoou M, Johnston P, Dahal G. (2012). A comparative evaluation of hexavalent chromium treatment in contaminated soil by calcium polysulfide and green-tea nanoscale zero-valent iron. *J Hazard Mater* 201: 33-42.
- Chutoam P, Charoensawan V, Wongtrakoongate P, Kum-Arth A, Buphamalai P, Tungpradabkul S. (2013). RpoS and oxidative stress conditions regulate succinyl-CoA: 3-ketoacid-coenzyme A transferase (SCOT) expression in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol Immunol* 57: 605-615.
- Clares M, Guerrero M, García-González. (2015). Cadmium removal by *Anabaena* sp. ATCC 33047 immobilized in polyurethane foam. *Int J Environ Sci Technol* 12: 1793-1798.
- Clarke K, Williams P, Smit S, Harrison S. (2006). Enhancement and repression of the volumetric oxygen transfer coefficient through hydrocarbon addition and its influence on oxygen transfer rate in stirred tank bioreactors. *Biochem Engin J* 28: 237-242.
- Cohen Y. (2001). Biofiltration, the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Biores Technol* 77: 257-274.
- Cordova-Rosa S, Dams R, Cordova-Rosa E, Radetski M, Correa A, Radetski C. (2009). Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *J Hazard Mater* 164: 61-66.
- Costa C, Olivi P. (2009). Effect of chloride concentration on the electrochemical treatment of a synthetic tannery wastewater. *Electrochim Acta* 54: 2046-2052.
- Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown P, Hanawalt P. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158: 41-64.
- Covarrubias S, de-Bashan L, Moreno M, Bashan Y. (2012). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 2669-2680.
- Cruz I, Bashan Y, Hernández-Carmona G, Bashan L. (2013). Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 9847-9858.
- da Silva J, de Moraes M, Vieira L, Corrêa A, Cass Q, Cardoso C. (2013). Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *J Pharm Biomed Anal* 73: 44-52.

- Davies K. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50:279-289.
- De Bashan L, Bashan Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Biores Technol* 101: 1611-1627.
- Decorosi F. (2010). Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI). Tesis doctoral. Universidad de Florencia, Florencia, Italia.
- Desai C, Jain K, Madamwar D. (2008). Hexavalent chromate reductase activity in cytosolic fractions of *Pseudomonas* sp. G1DM21 isolated from Cr(VI) contaminated industrial landfill. *Process Biochem* 43: 713-721.
- Desai C, Jain K, Patel B, Madamwar D. (2009). Efficacy of bacterial consortium-AIE2 for contemporaneous Cr(VI) and azo dye bioremediation in batch and continuous bioreactor systems, monitoring steady-state bacterial dynamics using qPCR assays. *Biodegradation* 20: 813-826.
- Dey S, Paul A. (2012). Optimization of cultural conditions for growth associated chromate reduction by *Arthrobacter* sp. SUK 1201 isolated from chromite mine overburden. *J Hazard Mater* 214: 200-206.
- Dey S, Paul A. (2014). Reduction of hexavalent chromium by immobilized viable cells of *Arthrobacter* sp. SUK 1201. *Biorem J* 18: 1-11.
- Dhal B, Thatoi H, Das N, Pandey B. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review. *J Hazard Mater* 250: 272-291.
- Dhungana T, Yadav P. (2008). Determination of chromium in tannery effluent and study of adsorption of Cr(VI) on saw dust and charcoal from sugarcane bagasse. *J Nepal Chem Soc* 23: 93-101.
- Díaz-Pérez C, Cervantes C, Campos-García J, Julián-Sánchez A, Riveros-Rosas H. (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J* 274: 6215-6227.
- Dimkpa C, Svatos A, Dabrowska P, Schmidt A, Boland W, Kothe E. (2008). Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* sPp. *Chemosphere* 74: 19-25.
- Divari S, Valetti F, Caposio P, Pessione E, Cavaletto M, Griva E, Gribaudo G. (2003). The oxygenase component of phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Europ J Biochem* 270: 2244-2253.
- Domínguez-Cuevas P, González-Pastor J, Marqués S, Ramos J, de Lorenzo V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J Biol Chem* 281: 11981-11991.
- Dong G, Wang Y, Gong L, Wang M, Wang H, He N y col. (2013). Formation of soluble Cr(III) end-products and nanoparticles during Cr(VI) reduction by *Bacillus cereus* strain XMCr-6. *Biochem Engin J* 70: 166-172.
- Dong X, Hong Q, He L, Jiang X, Li S. (2008). Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil. *Int Biodeterior Biodegradation* 62: 257-262.
- Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 143-152.

- Ehrt S, Schirmer F, Hillen W, Erlangen U. (1995). Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Mol Microbiol* 18: 13-20.
- El Amrani A, Dumas A, Wick L, Yergeau E, Berthomé R. (2015). "Omics" insights into PAH degradation toward improved green remediation biotechnologies. *Environ Sci Technol* 49: 11281-11291.
- El Azhari N, Devers-Lamrani M, Chatagnier G, Rouard N, Martin-Laurent F. (2010). Molecular analysis of the catechol-degrading bacterial community in a coal wasteland heavily contaminated with PAHs. *J Hazard Mater* 177: 593-601.
- Elangovan R, Philip L, Chandraraj K. (2010). Hexavalent chromium reduction by free and immobilized cell-free extract of *Arthrobacter rhombi* RE. *Appl Biochem Biotechnol* 160: 81-97.
- El-Haleem. (2003). *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *J Biotechnol* 2: 71-74.
- El-Sayed W, Ibrahim M, Abu-Shady M, El-Beih F, Ohmura N, Saiki H, Ando A. (2003). Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 2026-2029.
- Emsley J. (1989). *The Elements*. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press.
- Emptage C, Knox R, Danson M, Hough D. (2009). Nitroreductase from *Bacillus licheniformis*: a stable enzyme for prodrug activation. *Biochem Pharmacol* 77: 21-29.
- Erazo R, Cárdenas J. (2001). Determinación experimental del coeficiente de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ) en un biorreactor *Batch*. *Rev Per Quím Ing Quím* 4: 22-27.
- Erijman L, Figuerola E, Guerrero L, Ayarza J. (2011). Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. *Rev Argent Microbiol* 43: 127-135.
- Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. (2012). Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect* 18: 1097-1103.
- Essahale A, Malki M, Marín I, Moumni M. (2012). Hexavalent chromium reduction and accumulation by *Acinetobacter* AB1 isolated from Fez tanneries in Morocco. *Indian J Microbiol* 52: 48-53.
- Eswaramoorthy S, Poulain S, Hienerwadel R, Bremond N, Sylvester M, Zhang Y, Berthomieu C, Lelie D, Matin A. (2012). Crystal structure of ChrR- a quinone reductase with the capacity to reduce chromate. *PLoS ONE* 7: 1-7.
- Farag S, Zaki S. (2010). Identification of bacterial strains from tannery effluent and reduction of hexavalent chromium. *J Environ Biol* 3: 877-882.
- Fernández L, Hancock R. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 25: 661-681.
- Fernández-Reyes M, Rodríguez-Falcón M, Chiva C, Pachón J, Andreu D, Rivas L. (2009). The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective. *Proteomics* 9: 1632-1645.
- Finkel T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Op Cell Biol* 15: 247-254.

- Focardi S, Pepi M, Focardi S. (2013). Microbial reduction of hexavalent chromium as a mechanism of detoxification and possible bioremediation applications. *Biodegradation, life of science*. (pp. 321-347). InTech, on line publisher.
- Forcillo J. (2002). Planta de tratamiento físico-biológico (anaeróbico-aeróbico) de aguas residuales de tanerías de mediano porte. Tesis de Grado. Universidad de Cádiz, Cádiz, España.
- Futamata H, Harayama S, Watanabe K. (2001). Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Society* 67: 4671-4677.
- Galindo E, Pena C, Serrano C. (2008). Domesticar microorganismos en un biorreactor: Los retos del bioingeniero. *Revista de la Universidad Autónoma de México*: 131- 144.
- García-Ochoa F, Gómez E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Advan* 27: 153-176.
- Garg S, Tripathi M, Singh S, Singh A. (2013). Pentachlorophenol dechlorination and simultaneous Cr<sup>6+</sup> reduction by *Pseudomonas putida* SKG-1 MTCC (10510): characterization of PCP dechlorination products, bacterial structure, and functional groups. *Environ Sci Pollut Res Int* 20: 2288-2304.
- Garzón-Jiménez C, Barragán-Huerta BE. (2008). Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista de Sistemas Ambientales* 2: 23-34.
- Gasic K, Korban S. (2006). Heavy metal stress. Rao M, Raghavendra K. Eds. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. (pp. 219-254). Amsterdam, Países Bajos: Springer Int.
- Gentry T, Rensing C, Pepper I. (2004) New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit Rev Environ Sci Technol* 34: 447-494.
- Gerhardt K, Huang X, Glick B, Greenberg B. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci* 176: 20-30.
- Ghosh A, Dastidar M, Sreekrishnan T, Asce A. (2014). Recent advances in bioremediation of heavy metals and metal complex dyes: review. *ASCE EE* 1943-7870.0000965.
- Giuffrida C, Kuijsten A, Tanenbaum A. (2012). Enhanced operating system security through efficient and fine-grained address space randomization. *21<sup>st</sup> USENIX Security Symposium*. (pp. 475-490). Bellevue, Estados Unidos.
- Glick B. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv* 28: 367-374.
- Gombotz W, Wee S. (2012). Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Del Rev* 31: 267-285.
- González C, Ackerley D, Lynch S, Matin A. (2005). ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 280: 22590-22595.
- González P, Ambrosio L, Paisio C, Talano M, Medina M, Agostini E. (2014). Chromium (VI) remediation by a native strain: effect of environmental conditions and removal mechanisms involved. *Environ Sci Pollut Res Int* 21: 13551-13559.
- González R, García-Balboa C, Rouco M, Lopez-Rodas V, Costas E. (2012). Adaptation of microalgae to lindane: a new approach for bioremediation. *Aquatic Toxicol* 109: 25-32.
- Gould T, van de Langemheen H, Muñoz-Elías E, McKinney J, Sacchetti J. (2006). Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 61: 940-947.

- Gunasundari D, Muthukumar K. (2013). Simultaneous Cr(VI) reduction and phenol degradation using *Stenotrophomonas* sp. isolated from tannery effluent contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res Int* 20: 6563-6573.
- Guo Z, Dong D, Hua X, Zhang L., Zhu S, Lan X, Liang D. (2015). Cr and As decrease lindane sorption on river solids. *Environmen Chem Lett* 13: 111-116.
- Guzik U, Greń I, Hupert-Kocurek K, Wojcieszńska D. (2011). Catechol 1,2-dioxygenase from the new aromatic compounds-degrading *Pseudomonas putida* strain N6. *Int Biodeterior Biodegradation* 65: 504-512.
- Guzik U, Hupert-Kocurek K, Sałek K, Wojcieszńska D. (2012). Influence of metal ions on bioremediation activity of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. *World J Microbiol Biotechnol* 29: 267-273.
- Hays S, Patrick W, Ziesack M, Oxman N, Silver P. (2015). Better together: engineering and application of microbial symbioses. *Curr Opin Biotechnol* 36: 40-49.
- He M, Li X, Guo L, Miller SJ, Rensing C, Wang G. (2010). Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC Microbiol* 10: 221.
- He M, Li X, Liu H, Miller S, Wang G, Rensing C. (2011). Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *J Hazard Mater* 185: 682-688.
- Hemme C, Deng Y, Gentry T, Fields M, Wu L, Barua S, Barry K. (2010). Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *ISME J* 4: 660-672.
- Hidalgo M, Meoni G, Barrionuevo M, Navarro G, Paz R. (2003). Variabilidad de la relación DBO/DQO en ríos de Tucumán, Argentina. *13º Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente*. (pp. 1-11). Buenos Aires, Argentina.
- Hirooka K, Fujita Y. (2010). Excess production of *Bacillus subtilis* quercetin 2,3-dioxygenase affects cell viability in the presence of quercetin. *Biosc Biotechnol Biochem* 74: 1030-1038.
- Hochstrasser D, Harrington M, Hochstrasser A, Miller M, Merrill C. (1988). Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal Biochem* 173: 424-435.
- Hora A, Shetty V. (2015). Kinetics of bioreduction of hexavalent chromium by poly vinyl alcohol-alginate immobilized cells of *Ochrobactrum* sp. Cr-B4 and comparison with free cells. *Desalination Water Treat* 1-9.
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.cecopal.org/derecho/DNacional/DN-831-93.htm>. Ley Nacional Argentina N° 24.051 Decreto 831/93. Reglamentación de Residuos Peligrosos
- <http://www.npi.gov.au>
- <http://www.cecopal.org>
- <http://www.cicplata.org>.
- <http://www.greenpeace.org.ar>. Campaña Riachuelo 2012
- <http://www.holistica2000.com.ar>

- Hu P, Brodie E, Suzuki Y, Mcadams H, Andersen G, Ateriol J. (2005). Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 187: 8437-8449.
- Huang L, Chai X, Chen G, Logan B. (2011). Effect of set potential on hexavalent chromium reduction and electricity generation from biocathode microbial fuel cells. *Environ Sci Technol* 45: 5025-5031
- Humphries A, Nott K, Hall L, Macaskie L. (2005). Reduction of Cr(VI) by immobilized cells of *Desulfovibrio vulgaris* NCIMB 8303 and *Microbacterium* sp. NCIMB 13776. *Biotechnol Bioeng* 90: 589-596.
- Hussain S, Siddique T, Arshad M, Saleem M. (2009). Bioremediation and phytoremediation of pesticides. Recent advances. *Crit Rev Environ Sci Tec* 39: 843-907.
- Ibañez S, Paisio C, Wevar Oller A, Talano M, González P, Medina M, Agostini E. (2014). Overview and new insights of genetically engineered plants for improving phytoremediation. Ansari A, Singh Gill S, Gill R, Lanza G, Newman L. Eds. *Phytoremediation*. (pp. 99-113). Cham, Suiza: Springer Int.
- Iftikhar S, Faisal M, Hasnain S. (2007). Cytosolic reduction of toxic Cr(VI) by indigenous microorganisms. *Res J Environ Sci* 1: 77-81.
- Indu Nair C, Jayachandran K, Shashidhar S. (2008). Biodegradation of phenol. *J Biotech* 7: 4951-4958.
- Isken S, de Bont J. (1998). Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* 2: 229-238.
- Iwagami S, Yang K, Davies J. (2000). Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. strain 2065. *Appl Environ Microbiol* 66: 1499-1508.
- Jiang H, Tay J, Maszenan A, Tay S. (2004). Bacterial diversity and function of aerobic granules engineered in a sequencing batch reactor for phenol degradation. *Appl Environ Microbiol* 70: 6767-6775.
- Jin H, Zhang Y, Buchko G, Varnum S, Robinson H, Squier T, Long P. (2012). Structure determination and functional analysis of a chromate reductase from *Gluconacetobacter hansenii*. *PLoS ONE* 7: 1-12.
- Johnson C, Beckham G. (2015). Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin. *Metab Eng* 28: 240-247.
- Kadakol J, Kamanavalli C, Shouche Y. (2011). Biodegradation of carbofuran phenol by free and immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883T. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 25-29.
- Karigar C, Mahesh A, Nagenahalli M, Yun D. (2006). Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. *Biodegradation* 17: 47-55.
- Kathiravan M, Karthick R, Muthukumar K. (2011). *Ex situ* bioremediation of Cr(VI) contaminated soil by *Bacillus* sp.: Batch and continuous studies. *Chem Eng J* 169: 107-115.
- Kiesel B, Müller R. (2002). The *meta* pathway as a potential energy-generating sequence and its effects on the growth rate during the utilization of aromatics. *Acta Biotechnol* 22: 221-234.
- Kiliç N, Stensballe A, Otzen D, Dönmez G. (2010). Proteomic changes in response to chromium(VI) toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biores Technol* 101: 2134-2140.
- Kim S, Song S, Kim K, Ho E, Oh K. (2003). Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1. *Res Microbiol* 154: 697-703.
- Kornberg H, Madsen N. (1957). Synthesis of C4-dicarboxylic acids from acetate by a "glyoxylate bypass" of the tricarboxylic acid cycle. *Biochim Biophys Acta*. 24: 651-653.
- Kornberg H. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem J* 99: 1-11.

- Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat I, Marchant R, Koutinas A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 21: 377-397.
- Kumar M, Praveenkumar R, Ilavarasi A, Rajeshwari K, Thajuddin N. (2012)a. Oxidative stress response and fatty acid changes associated with bioaccumulation of chromium [Cr(VI)] by a fresh water cyanobacterium *Chroococcus* sp. *Biotechnol Lett* 34: 247-251.
- Kumar S, Kumar S, Siddavattam D, Karegoudar TB. (2012)b. Generation of continuous packed bed reactor with PVA–alginate blend immobilized *Ochrobactrum* sp. DGVK1 cells for effective removal of N, N-dimethylformamide from industrial effluents. *J Hazard Mater* 199: 58-63.
- Kwak Y, Lee D, Kim H. (2003). *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. *Society* 69: 4390-4395.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-684.
- Lai K, Lo I. (2008). Removal of chromium (VI) by acid-washed zero-valent iron under various groundwater geochemistry conditions. *Environ Sci Technol* 42: 1238-1244.
- Levine R, Zervos S. (1996). Stock market development and long-run growth. *World Bank Econ Rev* 10: 323-339.
- Liger D, Graille M, Zhou C, Leulliot N, Quevillon-Cheruel S, Blondeau K, Janin J, Van Tilbeurgh H. (2004). Crystal structure and functional characterization of yeast YLR011wp, an enzyme with NAD(P)H-FMN and ferric iron reductase activities. *J Biol Chem* 279: 34890-34897.
- Lin Y, Wu C, Hsu C, Li H. (2009). Biodegradation of phenol with chromium(VI) reduction in an anaerobic fixed- biofilm process-kinetic model and reactor performance. *J Hazard Mater* 172: 1394-1401
- Liu L, Jiang C, Liu X, Wu J, Han J, Liu S. (2007). Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environ Microbiol* 9: 465-473.
- Liu Y, Pan C, Xia W, Zeng G, Zhou M, Liu Y, Ke J, Huang C. (2008). Simultaneous removal of Cr(VI) and phenol in consortium culture of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* Migula (CCTCC AB92019). *Trans Nonferrous Metals Soc China* 18: 1014-1020.
- Loffhagen N, Härtig C, Benndorf D, Babel W. (2002). Effects of growth temperature and lipophilic carbon sources on the fatty acid composition and membrane lipid fluidity of *Acinetobacter calcoaceticus* 69V. *Acta Biotechnol* 22: 235-243.
- Lu J, Holmgren A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* 66:75-87.
- Lu D, Zhang Y, Niu S, Wang L, Lin S, Wang C y col. (2012). Study of phenol biodegradation using *Bacillus amyloliquefaciens* strain WJDB-1 immobilized in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules by electrochemical method. *Biodegradation* 23: 209-219.
- Lushchak V. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153: 175-190.
- MacGregor E, Greenwood C. (1980). Polymers in Nature. Heinze T. Eds. *Polysaccharides*. (pp. 240-329). Nueva York, Estados Unidos: Wiley.
- Mala S, Sujatha D, Rose C. (2015). Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. *Microbiol Res* 170: 235-41.

- Malik A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int* 30: 261-278.
- Malik R, Mehboob F, Ali U, Katsoyiannis A, Schuster J, Moeckel C, Jones, K. (2014). Organo-halogenated contaminants (OHCs) in the sediments from the Soan River, Pakistan: OHCs (adsorbed TOC) burial flux, status and risk assessment. *Sci Total Environ* 481: 343-351.
- Mangaiyarkarasi M, Rao T, Tata B. (2011). Bioreduction of Cr (VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi J Biol Sci* 18: 157-167.
- Mani D, Kumar C. (2013). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *Int J Environ Sci Technol* 11: 843-872.
- Marcano V, Benitez P, Palacios-Pru E. (2003). Acyclic hydrocarbon environments >n-C18 on the early terrestrial planets. *Planet Space Sci* 51: 159-166.
- Martínez-Trujillo M, García-Rivero M. (2012). Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Rev Mex Ing Química* 11: 55-73.
- Matteoda E, Blarasin M, Damilano G, Cabrera A, Giuliano Albo J. (2009). Cromo en aguas subterráneas y superficiales en el entorno de una curtiembre, relación con valores de fondo natural. Elena, Córdoba, Argentina. *Boletín Geológico y Minero* 120: 617- 630.
- Mazmanci M, Ünyayar A. (2005). Decolourisation of reactive black 5 by *Funalia trogii* immobilised on Luffa cylindrical sponge. *Process Biochem* 40: 337-342.
- Mazoch J, Tesarik R, Sedlacek V, Kucera I, Turanek J. (2004). Isolation and biochemical characterization of two soluble iron (III) reductases from *Paracoccus denitrificans*. *Europ J Biochem* 271: 553-562.
- Mc Lean J, Beveridge TJ. (2001). Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Appl Environ Microbiol* 67: 1076-1084.
- McGuinness M, Dowling D. (2009). Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. *Int J Environ Res Public Health* 6: 2226-2247.
- Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ Int* 37: 1362-1375.
- Michałowicz J, Duda W. (2007). Phenols-sources and toxicity. *Pol J Environ Stud* 16: 347-362.
- Michel-Guillou E, Moser G. (2006) Commitment of farmers to environmental protection: from social pressure to environmental conscience. *J Environ Psychol* 26: 227-235.
- Middleton S, Latmani R, Mackey M, Ellisman M, Tebo B, Criddle C. (2003). Cometabolism of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1 produces cell-associated reduced chromium and inhibits growth. *Biotechnol Bioeng* 83: 627-637.
- Mikesková H, Novotný C, Svobodová K. (2012). Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 95: 861-870.
- Minton N, Aniezark G, Vaughan T. (2004). Nitroreductase enzymes. Patente 777860, Oficina de patentes, Australia.
- Mirzaei H, Pourjafar H, Homayouni A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chem* 132: 1966-1970.

- Mishra S, Doble M. (2008). Novel chromium tolerant microorganisms: isolation, characterization and their biosorption capacity. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:874-879.
- Mita D, Forte M, Mita L. (2015). Bioremediation of waters polluted by endocrine disruptors by means of the process of thermodialysis. *Open Biotechnol J* 9: 1-21.
- Mollaei M, Abdollahpour S, Atashgahi S, Abbasi H, Masoomi F, Rad I y col. (2010). Enhanced phenol degradation by *Pseudomonas* sp. SA01: gaining insight into the novel single and hybrid immobilizations. *J Hazard Mater* 175: 284-292.
- Molokwane P, Meli K, Nkhalambayausi-Chirwa E. (2008). Chromium (VI) reduction in activated sludge bacteria exposed to high chromium loading: Brits culture (South Africa). *Water Res* 242: 4538-4548.
- Moreno M, Sánchez-Porro C, Piubeli F, Frias L, García M, Mellado E. (2011). Cloning, characterization and analysis of *cat* and *ben* genes from the phenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans*. *PLoS One* 6: 21049.
- Moreno-Garrido I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Biores Technol* 99: 3949-3964.
- Morokutti A, Lyskowski A, Sollner S, Pointner E, Fitzpatrick T, Kratky C y col. (2005). Structure and function of YcnD from *Bacillus subtilis*, a flavin-containing oxidoreductase. *Biochemistry* 44: 13724-13733.
- Mukherjee S, Basak B, Bhunia B, Dey A, Mondal B. (2012). Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Rev Environ Sci Biotechnol* 12: 61-73.
- Murugavelh S, Mohanty K. (2012). Bioreduction of hexavalent chromium by free cells and cell free extracts of *Halomonas* sp. *Chem Engin J* 203: 415-422.
- Myers C, Carstens B, Antholine W, Myers J. (2000). Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Appl Microbiol* 88: 98-106.
- Nagamani A, Soligalla R, Lowry M. (2009). Isolation and characterization of phenol degrading *Xanthobacter flavus*. *African J Biotech* 8: 5449-5453.
- Najafpour G. (2015). Biochemical engineering and biotechnology, 2<sup>nd</sup> Ed. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- Namdev P, Dunlop E, Wenger K, Villeneuve P. (1994). Role of turbulence in fermentations. Galindo E, Ramírez O. Eds. *Advances in bioprocesses engineering*. (pp. 149-156). Dordrecht, Países Bajos: Academic Pub.
- Nayak P, Singh B. (2007). Removal of phenol from aqueous solutions by sorption on low cost clay. *Desalination* 207: 71-79.
- Nemec A, Musílek M, Sedo O, De Baere T, Maixnerová M, van der Reijden T y col. (2010). *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 896-903.
- Nepple B, Kessi J, Bachofen R. (2000). Chromate reduction by *Rhodobacter sphaeroides*. *J Ind Microbiol Biotech* 25: 198-203.

- Nešvera J, Rucká L, Pátek M. (2015). Catabolism of phenol and its derivatives in bacteria: genes, their regulation, and use in the biodegradation of toxic pollutants. *Adv Appl Microbiol* 93: 107-160.
- Nishino K, Yamada J, Hirakawa H, Hirata T, Yamaguchi A. (2003). Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3030-3033.
- Oakley B, Kirsch D, Morris N. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105: 361-363.
- Ochsner U, Vasil M, Alsabbagh E, Parvatiyar K, Hassett D. (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR- recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. *J Bacteriol* 182: 4533-4544.
- Ohtake H, Fujii E, Toda K. (1990). Reduction of toxic chromate in an industrial effluent by use of a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Environ Technol* 11: 663-668.
- Ojo O. (2007). Molecular strategies of microbial adaptation to xenobiotics in natural environment. *Mol Biol* 2: 1-13.
- Ortiz-Hernández M, Rodríguez A, Sánchez-Salinas E, Castrejón-Godínez. (2014). Bioremediation of soils contaminated with pesticides: Experiences in Mexico. Alvarez A, Polti M. Eds. *Bioremediation in Latin America*. (pp. 69-99). Londres, Reino Unido: Springer Int.
- Osibanjo O, Rae I, Scheringer M, Have C. (2012). Chemicals and Waste. Barra R, Portas P, Roy V. Eds. *Global Environmental Outlook 5*. (pp. 168-192). Nairobi, Kenia: UNEP.
- Otter J, Vickery K, Walker J, Pulcini E, Stoodley P, Goldenberg S y col. (2015). Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *J Hosp Infect* 89: 16-27.
- Paisio C, Talano M, González P, Busto V, Talou J, Agostini E. (2012). Isolation and characterization of a *Rhodococcus* strain with phenol-degrading ability and its potential use for tannery effluent biotreatment. *Environ Sci Pollut Res Int* 19: 3430-3439.
- Pal A, Datta S, Paul A. (2013). Hexavalent chromium reduction by immobilized cells of *Bacillus sphaericus* AND 303. *Brazilian Arch Biol Technol* 56: 505-512.
- Pal A, Datta S, Paul A. (2005). Reduction of hexavalent chromium by cell-free extract of *Bacillus sphaericus* AND 303 isolated from serpentine soil. *Curr Microbiol* 51: 327-330.
- Pandeeti E, Siddavattam D. (2011). Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. DS002 and cloning, sequencing of partial *catA* gene. *Indian J Microbiol* 51: 312-318.
- Pandey B, Fulekar M. (2012). Bioremediation technology: A new horizon for environmental clean-up. *Biol. Medicine* 4: 51-59.
- Pandi M, Shashirekha V, Swamy M. (2009). Bioabsorption of chromium from retan chrome liquor by cyanobacteria. *Microbiol Res* 164: 420-428.
- Park C, Gonzalez C, Ackerley D, Keyhan M, Matin A. (2002). Molecular engineering of soluble bacterial proteins with chromate reductase activity. 1<sup>st</sup> *International Conference on Remediation of Contaminated Sediments*, Venecia, Italia.

- Park C, Keyhan M, Wielinga B, Fendorf S, Matin A. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl Environ Microbiol* 66: 1788-1795.
- Patel Y, Gupta A. (2015). Biological treatment of textile dyes by agar-agar immobilized consortium in a packed bed reactor. *Water Environ Res* 87: 242-251.
- Patra R, Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R. (2010). Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. *Soil Biol Biochem* 42: 1857-1863.
- Paul D, Pandey G, Pandey J, Jain R. (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends Biotechnol* 23: 135-142.
- Pazos A, Valencia A, De Lorenzo V. (2003). The organization of the microbial biodegradation network from a systems-biology perspective. *EMBO Rep* 4: 994-999.
- Pei Q, Shahir S, Raj S, Zakaria Z, Ahmad W. (2009). Chromium (VI) resistance and removal by *Acinetobacter haemolyticus*. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1085-1093.
- Perullini M, Calcabrini M, Jobbágy M, Bilmes S. (2015). Alginate/porous silica matrices for the encapsulation of living organisms: tunable properties for biosensors, modular bioreactors, and bioremediation devices. *Mesoporous Biomater* 2: 3-12.
- Pessione E, Divari S, Griva E, Cavaletto M, Rossi G, Gilardi G, y col. (1999). Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* is a multicomponent enzyme. *Pharmacia* 555: 549-555.
- Pessione E, Giuffrida M, Prunotto L, Barello C, Mazzoli R, Fortunato D, y col. (2003). Membrane proteome of *Acinetobacter radioresistens* S13 during aromatic exposure. *Proteomics* 3: 1070-1076.
- Petroutsos D, Katapodis P, Samiotaki M, Panayotou G, Kekos D. (2008). Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* 69: 707-714.
- Phugare S, Kalyani D, Patil A, Jadhav J. (2011). Textile dye degradation by bacterial consortium and subsequent toxicological analysis of dye and dye metabolites using cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. *J Hazard Mater* 186: 713-723.
- Plesa M, Hernalsteens J, Vandenbussche G, Ruyschaert J, Cornelis P. (2006). The SlyB outer membrane lipoprotein of *Burkholderia multivorans* contributes to membrane integrity. *Res Microbiol* 157: 582-592.
- Polti M, Amoroso M, Abate C. (2007). Chromium(VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. *Chemosphere* 67: 660-667.
- Polti M, Amoroso M, Abate C. (2010)a. Chromate reductase activity in *Streptomyces* sp. MC1. cultures. *J Gen Appl Microbiol* 18: 11-18.
- Polti M, Amoroso M, Abate C. (2010)b. Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces* sp. MC1. *Water Air Soil Poll* 214: 49-57.
- Poopal A, Laxman R. (2008) Hexavalent chromate reduction by immobilized *Streptomyces griseus*. *Biotechnol Lett* 30: 1005-1010.
- Pradhan N, Ingle A. (2007). Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain isolated from sludge sample. *Int Biodeter Biodegradation* 60: 103-108.

- Prosser G, Copp J, Syddall S, Williams E, Smaill J, Wilson W, Patterson A. (2010). Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitro-reductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954. *Biochem Pharmacol* 79: 678-687.
- Puglisi E, Hamon R, Vasileiadis S, Coppolecchia D, Trevisan M. (2012). Adaptation of soil microorganisms to trace element contamination: A review of mechanisms, methodologies, and consequences for risk assessment and remediation. *Crit Rev Environ Sci Technol* 42: 2435-2470.
- Puzon G, Roberts A, Kramer D, Xun L. (2005). Formation of soluble organo-chromium(III) complexes after chromate reduction in the presence of cellular organics. *Environ Sci Technol* 39: 2811-2817.
- Qi S, Chaudhry M, Zhang Y, Meng B, Huang Y, Zhao K y col. (2007). Comparative proteomes of *Corynebacterium glutamicum* grown on aromatic compounds revealed novel proteins involved in aromatic degradation and a clear link between aromatic catabolism and gluconeogenesis via fructose-1,6-bisphosphatase. *Proteomics* 7: 3775-3787.
- Quintelas C, Fonseca B, Silva B, Figueiredo H, Tavares T. (2009). Treatment of chromium(VI) solutions in a pilot-scale bioreactor through a biofilm of *Arthrobacter viscosus* supported on GAC. *Biores Technol* 100: 220-226.
- Ramio-Pujol S, Bañeras L, Artigas J, Romani A. (2012). Changes of the phenol-degrading bacterial community during the decomposition of submersed *Platanus acerifolia* leaves. *FEMS Microbiol Lett* 338: 184-191.
- Ramírez-Díaz M, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21:321-32.
- Ramos J, Duque E, Gallegos M, Godoy P, Ramos-Gonzalez M, Rojas A y col. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56: 743-768.
- Ravichandra P, Gopal M, Annapurna J. (2008). Biological sulfide oxidation using autotrophic *Thiobacillus* sp.: evaluation of different immobilization methods and bioreactors. *J Appl Microbiol* 106: 1280-1291.
- Rees D. (1981). Polysaccharide shapes and their interactions-some recent advances. *Pure Appl Chem* 53: 1-14.
- Ribeiro Bastos E, Henry Moon D, Rossi A, Trevors J, Tsai S. (2000). Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Arch Microbiol* 2008: 346-352.
- Rinklebe J, During A, Overesch M, Du Laing G, Wennrich R, Stark H, Mothes S. (2010). Dynamics of mercury fluxes and their controlling factors in large Hg-polluted floodplain areas. *Environ Pollut* 158: 308-318.
- Robins K, Hooks D, Rehm B, Ackerley D. (2013). *Escherichia coli* NemA is an efficient chromate reductase that can be biologically immobilized to provide a cell free system for remediation of hexavalent chromium. *PLoS ONE* 8: 1-8.
- Rocha-Martin J, Velasco-Lozano S, Guisán J, López-Gallego F. (2014). Oxidation of phenolic compounds catalyzed by immobilized multi-enzyme systems with integrated hydrogen peroxide production. *Green Chem* 16: 303-311.
- Roma-Rodrigues C, Santos P, Benndorf D, Rapp E, Sá-Correia I. (2010). Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. *J Proteomics* 73: 1461-1478.
- Ruck L. (2015). Catabolism of phenol and its derivatives in bacteria : Genes, their regulation and use in the biodegradation of toxic pollutants. *Adv Appl Microbiol*. En prensa.

- Saez, J, Benimeli C, Amoroso MJ. (2014). Cell immobilization technique for the enhanced removal of lindane using *Streptomyces* strains isolated from northwestern Argentina. Villegas L, Polti M. Eds. *Bioremediation in Latin America*. (pp. 289-299). Londres, Reino Unido: Springer Int.
- Sandhu A, Halverson L, Beattie G. (2009). Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial communities. *Microb Ecol* 57: 276-285.
- Sandrin T, Maier R. (2003). Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environ Health Perspect* 111: 1093-1101.
- Santos P, Roma V, Benndorf D, von Bergen M, Harms H, Sá-Correia I. (2007). Mechanistic insights into the global response to phenol in the phenol-biodegrading strain *Pseudomonas* sp. M1 revealed by quantitative proteomics. *OMICS* 11: 233-251.
- Santos V, Linardi V. (2004). Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents-identification and degradation potential. *Process Biochem* 39: 1001-1006.
- Sasaki K, Takeno K, Shinkawa H, Sasaki K, Das N. (2015). Removal of radioactivity and recovery of radioactive Cs from sediment mud and soil in Fukushima, Japan using immobilized photosynthetic bacteria. *Adv Mat Res* 1091: 125-130.
- Sau G, Chatterjee S, Mukherjee S. (2010). Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1. *Pol J Microbiol* 59: 185-190.
- Schwering M, Song J, Louie M, Turner R, Ceri H. (2013). Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling* 29: 917-928.
- Segura A, Molina L, Fillet S, Krell T, Bernal P, Muñoz-Rojas J y col. (2012). Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 23: 415-421.
- Senthilvelan T, Kanagaraj J, Panda R, Mandal B. (2013). Biodegradation of phenol by mixed microbial culture: an eco-friendly approach for the pollution reduction. *Clean Technol Environ Pol* 16: 113-126.
- Shen H, Wang Y. (1993). Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Appl Environ Microbiol* 59: 3771-3777.
- Shen H, Wang Y. (1995). Simultaneous chromium reduction and phenol degradation in a coculture of *Escherichia coli* ATCC 33456 and *Pseudomonas putida* DMP-1. *Appl Environ Microbiol* 61: 2754-2758.
- Shetty V, Namitha L, Rao S, Narayani M. (2012). Experimental investigation and artificial neural network-based modeling of batch reduction of hexavalent chromium by immobilized cells of newly isolated strain of chromium-resistant bacteria. *Water Air Soil Pollut* 223: 1877-1893.
- Shim J, Lim J, Shea P, Oh B. (2014). Simultaneous removal of phenol, Cu and Cd from water with corn cob silica-alginate beads. *J Hazard Mater* 272: 129-136.
- Shourian M, Noghabi K, Zahiri H, Bagheri T, Karballaei G, Mollaei M y col. (2009). Efficient phenol degradation by a newly characterized *Pseudomonas* sp. SA01 isolated from pharmaceutical wastewaters. *Desalination* 246: 577-594.
- Shrivastava R, Basu B, Godbole A, Mathew M, Apte S, Phale P. (2011). Repression of the glucose-inducible outer-membrane protein OprB during utilization of aromatic compounds and organic acids in *Pseudomonas putida* CSV86. *Microbiology* 157: 1531-1540.

- Sies H. (1990). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27: 916-921.
- Sikkema J, de Bont J, Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59: 201-222.
- Silva M, Rigo D, Mossi V, Dallago R, Henrick P, de Oliveira Kuhn G y col. (2013). Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. *Food Bioprod Process* 91: 54-59.
- Singh J, Abhilash P, Singh H, Singh R, Singh D. (2011). Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene* 480: 1-9.
- Sinha A, Khare S. (2012). Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application. *Biodegradation* 23: 25-34.
- Sinha R, Herat S, Bharambe G, Brahabhatt A. (2009). Vermistabilization of sewage sludge (biosolids) by earthworms: converting a potential biohazard destined for landfill disposal into a pathogen free, nutritive & safe bio-fertilizer for farms. *J Waste Manag Res* 28: 872-881.
- Sinha S, Saxena R, Singh S. (2002). Comparative studies on accumulation of Cr from metal solution and tannery effluent under repeated metal exposure by aquatic plants: its toxic effects. *Environ Monitor Assess* 80: 17-31.
- Song H, Ding M, Jia X, Ma Q, Yuan Y. (2014). Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications. *Chem Soc Rev* 43: 6954-6981.
- Soskic V, Grolach M, Poznanovic S, Boehmer F, Godovac-Zimmermann J. (1999). Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor beta receptor. *Biochemistry* 38: 1757-1764.
- Spencer J, Ragout A. (2004). *Environmental Microbiology*. Humana Press, Totowa.
- Srivastava S, Ahmad H, Thakur I. (2007). Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery effluents. *Biores Technol* 98: 1128-1132.
- Srivastava S, Goyal P. (2010). Novel biomaterials: decontamination of toxic metals from wastewater. (pp. 1-190). Londres, Reino Unido: Springer Int.
- Srivastava S, Thakur I. (2007). Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent. *Biores Technol* 97: 1167-1173.
- Stasinakis A, Thomaidis N, Mamais D, Karivali M, Lekkas T. (2003). Chromium species behaviour in the activated sludge process. *Chemosphere* 52: 1059-1067.
- Supaphol S, Panichsakpatana S, Trakulnaleamsai S, Tungkananuruk N, Roughjanajirapa P, Donnell A. (2006). The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: example using petroleum contaminated tropical soils. *J Microbiol Method* 65: 432-441.
- Sutherland I. (1991). Alginates. Byrom D. Eds. *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*. (pp. 309-331). New York, Estados Unidos: Macmillan.
- Suzuki T, Miyata N, Horitsu H, Kawai K, Takamizawa K, Tai Y, Okazaki M. (1992). NAD(P)H-dependent chromium (VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J Bacteriol* 174: 5340-5345.

- Tadesse I, Green F, Puhakka J. (2004). Seasonal and diurnal variations of temperature, pH and dissolved oxygen in advanced integrated wastewater pond system treating tannery effluent. *Water Res* 38: 645-654.
- Tallur P, Megadi V, Ninnekar H. (2009). Biodegradation of *p*-cresol by immobilized cells of *Bacillus* sp. strain PHN 1. *Biodegradation* 20: 79-83.
- Tanokura M, Miyakawa T, Guan L, Hou F. (2015). Structural analysis of enzymes used for bioindustry and bioremediation. *Biosci Biotechnol Biochem* 79: 1391-1401.
- Tapley T, Vickery L. (2004). Preferential substrate binding orientation by the molecular chaperone HscA. *J Biol Chem* 279: 28435-28442.
- Thacker U, Madamwar D. (2005). Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DM1. *J Microbiol* 21: 891-899.
- Thacker U, Parikh R, Shouche Y, Madamwar D. (2006). Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochem* 41: 1332-1337.
- Thatoi H, Das S, Mishra J, Prasad B. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *J Environ Manag* 146: 383-399.
- Thijs S, Vangronsveld J. (2015). Rhizoremediation. Lugtenberg B. Eds. *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 277-286). Cham, Suiza: Springer Int.
- Thompson I, van der Gast C, Ciric L, Singer A. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol* 7: 909-915.
- Tiku D, Kumar A, Chaturvedi R, Dayal S, Manoharan A, Kumar R. (2010). Holistic bioremediation of pulp mill effluents using autochthonous bacteria. *Int Biodeterior Biodegradation* 64: 173-183.
- Trigo A, Valencia A, Cases I. (2009). Systemic approaches to biodegradation. *FEMS Microbiol Rev* 33: 98-108.
- Tripathi M, Garg S. (2013). Co-remediation of pentachlorophenol and Cr<sup>6+</sup> by free and immobilized cells of native *Bacillus cereus* isolate: Spectrometric characterization of PCP dechlorination products, bioreactor trial and chromate reductase activity. *Process Biochem* 48: 496-509.
- Tripathi M, Vikram S, Jain R, Garg S. (2011). Isolation and growth characteristics of chromium(VI) and pentachlorophenol tolerant bacterial isolate from treated tannery effluent for its possible use in simultaneous bioremediation. *Indian J Microbiol* 51: 61-69.
- Tsirogianni I, Aivaliotis M, Karas M, Tsiotis G. (2004). Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad. *Biochim Biophys Acta* 1700: 117-123.
- Tuah P, Rashid N, Salleh M. (2009). Degradation pathway of phenol through *ortho*- cleavage by *Candida tropicalis* RETL-Cr1. *Borneo Sci* 24: 1-8.
- Tuan N, Hsieh H, Lin Y, Huang S. (2011). Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Biores Technol* 102:4232-4240.
- Tyagi M, Fonseca M, Carvalho C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22: 231-241.

- Tziotzios G, Dermou E, Politi D, Vayenas D. (2008). Simultaneous phenol removal and biological reduction of hexavalent chromium in a packed-bed reactor. *J Chem Technol Biotechnol* 83:829-835.
- Ucun H, Yildiz E, Nuhoglu A. (2010). Phenol biodegradation in a batch jet loop bioreactor (JLB): Kinetics study and pH variation. *Biores Technol* 101: 2965-2971.
- US EPA Environmental Protection Agency. (2000). Introduction to phytoremediation. EPA 600/ R 99-107.
- US EPA, Environmental Protection Agency. (1984). Locating and estimating air emission from sources of chromium. EPA 450/4 84: 5-9.
- Vajpayee P, Rai U, Ali M, Tripathi R, Yadav V, Sinha S y col. (2001). Chromium-induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent. *Bull Environ Contam Toxicol* 67: 246-256.
- Vasconcelos Morais P, Branco R, Francisco R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bvl1 a strain highly resistant. *Biometals* 24: 401-410.
- Vila J, Tauler M, Grifoll M. (2015). Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Curr Opin Biotechnol* 33:95-102.
- Villegas L, Martínez M, Rodríguez A, Amoroso M. (2014). Microbial consortia, a viable alternative for cleanup of contaminated soils. Alvarez A, Polti M. Eds. *Bioremediation in Latin America*. (pp. 135-148). Londres, Reino Unido: Springer Int.
- Viti C, Marchi E, Decorosi F, Giovannetti L. (2014). Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Rev* 38: 633-659.
- Volke Sepúlveda T, Velasco Trejo J. (2004). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. *Revista del Instituto Nacional de Ecología* 1-62.
- Vuilleumier S. (1997). Bacterial glutathione S-transferases: What are they good for? *J Bacteriol* 179: 1431-1441.
- Wagner M, Nicell J. (2002). Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res* 36: 4041-4052.
- Wang C, Chen J, Hu W, Liu J, Zheng H, Zhao F. (2014). Comparative proteomics reveal the impact of OmcA/MtrC deletion on *Shewanella oneidensis* MR-1 in response to hexavalent chromium exposure. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 9735-9747.
- Wang J, Chen C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol Adv* 27: 195-226.
- Wang C, Li Y. (2007). Incorporation of granular activated carbon in an immobilized membrane bioreactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Lett* 29: 1353-1356.
- Wang P, Mori T, Toda K, Ohtake H. (1990). Membrane-associated chromate activity from *Enterobacter cloacae*. *J Bacteriol* 172: 1670-1672.
- Wang, L, Zhou, Q, Ren D. (2004). Comprehensive analysis of the variation of Cu<sup>+2</sup> adsorption capacity of *Pseudomonas putida* 5-x cell envelope with cell age. *Enzyme Microbial Technol* 34: 474-481.
- Wang Z, Xu Y, Wang H, Zhao J, Gao D, Li F, Xing B. (2012). Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere* 22: 717-725.

- 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 Pollut* 220: 89-99.
- Watanabe K, Futamata H, Harayama S. (2002). Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 655-663.
- Weber F, Bont J. (1996). Division adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochem Biophys Acta* 1286: 225-245.
- Wenzel W. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil* 321: 385-408.
- Wessels Perelo L. (2010). Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater* 177: 81-89.
- Williams P, Botes E, Maleke M, Ojo A, De Flaun M. (2014). Effective bioreduction of hexavalent chromium-contaminated water in fixed-film bioreactors. *Water SA* 40: 549-554
- Wijte D, van Baar B, Heck A, Altelaar F. (2011). Probing the proteome response to toluene exposure in the solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *J Prot Res* 10: 394-403.
- Williams P, Shaw L. (1997). *mucK*, a gene in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (BD413), encodes the ability to grow on exogenous *cis,cis*-muconate as the sole carbon source. *J Bacteriol* 179: 5935-5942.
- Wojcieszynska D, Hupert-Kocurek K, Jankowska A, Guzik U. (2012). Properties of catechol 2,3-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels. *Biochem Engin J* 66: 1-7.
- Wood T. (2008). Molecular approaches in bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 19: 572-578.
- Wright B, Cave R, Cook J, Khutoryanskiy V, Mi S, Chen B, Connon C. (2012). Enhanced viability of corneal epithelial cells for efficient transport/storage using a structurally modified calcium alginate hydrogel. *Reg Med* 7: 295-307.
- Wylie J, Worobec E. (1995). The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 177: 3021- 3026.
- Xie N, Liang H, Huang R, Xu P. (2014). Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. *Biotechnol Adv* 32: 615-622.
- Xu Y, Chen M, Zhang W, Lin M. (2003). Genetic organization of genes encoding phenol hydroxylase, benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit and its regulatory proteins in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. *Curr Microbiol* 46: 235-240.
- Yadav R, Roy M. (2014). A study to explore the suitability of certain cost-effective substrates for immobilization of white rot. *WJPPS* 3: 673-681.
- Yang C, Cheng Y, Ma X, Zhu Y, Holman H, Lin Z, Wang C. (2007). Surface-mediated chromate-resistant mechanism of *Enterobacter cloacae* bacteria investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 23: 4480- 4485.
- Yang C, Lee C. (2007). Enrichment, isolation, and characterization of phenol degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. strain P-6. *Int Biodeterior Biodegradation* 59: 206-210.

- Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, y col. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299: 700-704.
- Yu X, Belhaj A, Elmerich C, Lin M. (2004). Diversity of degradation pathways of some aromatic compounds by phenotype and genotype testing in *Acinetobacter* strains. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 623-627.
- Yung M, Ma J, Salemi M, Phinney B, Bowman G, Jiao Y. (2014). Shotgun proteomic analysis unveils survival and detoxification strategies by *Caulobacter crescentus* during exposure to uranium, chromium, and cadmium. *J Proteome Res* 13: 1833-1847.
- Zarate J, Viridis L, Orive G, Igartua M, Hernández R, Pedraz J. (2011). Design and characterization of calcium alginate microparticles coated with polycations as protein delivery system. *J Microencap* 28: 614-620.
- Zayed A, Terry N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil* 249: 139-156.
- Zhan Y, Yan Y, Zhang W, Chen M, Lu W, Ping S y col. (2012). Comparative analysis of the complete genome of an *Acinetobacter calcoaceticus* strain adapted to a phenol-polluted environment. *Res Microbiol* 163: 36-43.
- Zhang D, Li H, Lin X, Wang S, Peng X. (2011). Characterization of outer membrane proteins of *Escherichia coli* in response to phenol stress. *Curr Microbiol* 62: 777-783.
- Zhang K, Li F. (2011). Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 1163-1169.
- Ziagova M, Koukkou A, Liakopoulou-Kyriakides M. (2014). Optimization of cultural conditions of *Arthrobacter* sp. Sphe3 for growth-associated chromate(VI) reduction in free and immobilized cell systems. *Chemosphere* 95: 535-540.