



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,

FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctora
en Ciencias Biológicas

**ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES Y EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN
CELULAR EN MICROORGANISMOS EXPUESTOS A CROMO(VI) Y
FENOL, CON POTENCIAL APLICACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE
EFLUENTES**

Mic. Marilina Fernandez

Directora: Dra. Paola Solange González

Codirectora: Dra. Elizabeth Agostini

Río Cuarto, Febrero 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES Y EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN
CELULAR EN MICROORGANISMOS EXPUESTOS A CROMO(VI) Y
FENOL, CON POTENCIAL APLICACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE
EFLUENTES**

Mic. Fernandez Marilina

DIRECTOR: Dra. Paola González

CODIRECTOR: Dra. Elizabeth Agostini

Río Cuarto, Febrero de 2020

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dr. Walter Mac Cormack.....Universidad Nacional de Buenos Aires

Firma:Aclaración:.....

Dra. Ana Laura Villasuso.....Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma:Aclaración:.....

Dr. Gustavo Marcelo Morales.....Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma:Aclaración:.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:

Calificación:

“La verdadera supremacía de un pueblo se basa en la labor obstinada de sus pensadores, artistas y hombres de ciencia”

Bernardo Houssay

Médico y farmacéutico argentino

Premio Nobel en medicina (1947)

Creador del CONICET (1958)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en este proyecto de tesis, a mis Directoras de tesis, a la comisión asesora, a mi amor, a mi familia, amigos y a todas las personas que formaron parte de los laboratorios 8, 9 y 21 y a los técnicos del Departamento de Biología Molecular.

Un agradecimiento especial a los integrantes de la Curtiembre Víctor Manuel Zabala S.A., a los laboratorios 16 y 17 del departamento de Biología Molecular, al Dpto. de Química y al Nanotecnológico, que me permitieron abordar esta tesis de manera exitosa e integral.

Agradezco también a la Universidad Nacional de Río Cuarto y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas	XIII
Índice de Figuras	XV
Abreviaturas	XXI
Resumen en español	XXII
Resumen en inglés	XXIV
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Contaminación ambiental por cromo y fenol	1
1.2. Fuentes de contaminación por cromo y fenol	2
1.3. La industria del curtido de cuero como fuente de contaminación de Cr y fenol	4
1.4. Estrategias de tratamiento de aguas residuales y saneamiento ambiental	6
1.4.1. Tecnologías físico-químicas de remediación	7
1.4.2. Tecnologías biológicas de remediación	8
1.4.2.1. Biorremediación	9
1.4.2.2. Utilización de consorcios bacterianos autóctonos en biorremediación	10
1.6. Hipótesis	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivos generales	14
2.2. Objetivos específicos	14
CAPÍTULO I: Efectos de Cr(VI) y fenol sobre el consorcio SFC 500-1	
3. INTRODUCCIÓN	15
3.1. Mecanismos bacterianos de tolerancia a contaminantes	15
3.1.1. Mecanismos bacterianos de tolerancia a Cr(VI)	15
3.1.2. Mecanismos bacterianos de tolerancia a fenol	17
3.1.3. Mecanismos de tolerancia a Cr(VI) y fenol desarrollados por el consorcio SFC 500-1	19
3.2. Respuesta de las bacterias frente a Cr(VI) y fenol	22
3.2.1. Cambios morfológicos y ultraestructurales	22
3.2.2. Percepción del estrés: rol de la membrana celular	22
3.2.2.1. Estado físico de la membrana: fluidez de la membrana	23

3.2.2.2. Implicancia de los ácidos grasos (AG) en la fluidez de membrana	25
3.2.2.3. Implicancia de los PLs estructurales en la fluidez de membrana	25
3.2.2.4. Participación de otros PLs en mecanismos de señalización celular	26
3.2.2.4.1. Los fosfoinosítidos (PPIIn)	27
3.2.2.4.2. El Ácido fosfatídico (PA)	30
3.2.3. Producción de exopolímeros y formación de biofilm	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1. Material biológico y conservación	33
4.2. Efecto del Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre la morfología y superficie celular de los microorganismos que integran el consorcio SFC 500-1	33
4.2.1. Microscopía Óptica (MO)	33
4.2.2. Microscopía de Fuerza Atómica (<i>AFM</i> , de sus siglas en inglés <i>Atomic Force Microscope</i>)	33
4.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (<i>SEM</i> , de sus siglas en inglés <i>Scanning Electron Microscope</i>)	34
4.3. Efecto del Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre la ultraestructura celular de las bacterias que integran el consorcio SFC 500-1	35
4.3.1. Microscopía electrónica de transmisión (<i>TEM</i> , de sus siglas en inglés <i>Transmission Electron Microscope</i>)	35
4.4. Ensayo de remoción de Cr(VI) por biomasa inactivada y células viables	35
4.5. Efecto del Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre características y composición de la membrana de las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1	36
4.5.1. Determinación de la fluidez de la membrana	36
4.5.2. Extracción de lípidos totales	37
4.5.2.1. Perfil de PLs	37
4.5.2.2. Separación y análisis de PLs marcados con [$1-^{14}\text{C}$]	37
4.5.2.3. Obtención de <i>FAMES</i> (de sus siglas en inglés <i>Fatty Acids Methyl Esters</i>)	38
4.6. Medición de la actividad PLA	38
4.7. Estudio de los mecanismos de señalización celular en las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1 expuestas a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes	39
4.7.1. Medición de las actividades lípido quinasas y fosfolipasa D (PLD)	39
4.7.1.1. Obtención de extractos crudos	39

4.7.1.2. Obtención de membranas	40
4.7.1.3. Determinación de proteínas	40
4.7.1.4. Determinación de la actividad lípido quinasa en <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A	40
4.7.1.5. Medición de la actividad PLD	41
4.7.1.5.1. Amplificación y secuenciación del gen codificante para la PLD en <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A	42
4.7.1.5.2. Extracción de ADN genómico	42
4.7.1.5.3. Amplificación parcial del gen <i>pld</i>	42
4.8. Estudio de otras respuestas adaptativas de los microorganismos que integran el consorcio en respuesta a los contaminantes	43
4.8.1. Evaluación de la producción de exopolímeros en respuesta a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes	43
4.8.1.1. Extracción del exopolímero	43
4.8.1.1.1. Cuantificación de exopolisacáridos (EPS) por el método de Antrona	44
4.8.1.1.2. Determinación de proteínas	44
4.8.1.1.3. Cuantificación del contenido de ADN en el exopolímero	44
4.8.1.2. Estudio del efecto de los contaminantes sobre la formación de biofilm	44
4.8.1.3. Determinación de hidrofobicidad celular	45
4.9. Métodos analíticos	46
4.9.1. Determinación de la concentración de Cr(VI)	46
4.9.2. Determinación de la concentración de fenoles	46
4.10. Análisis estadístico	46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1. Efecto de Cr(VI) y fenol sobre la morfología y superficie celular	48
5.2. Efecto de Cr(VI) y fenol sobre la ultraestructura celular	56
5.3. Remoción de Cr(VI) por células viables y no viables	59
5.4. Efecto de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre características y composición de la membrana de las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1	61
5.4.1. Fluidez de la membrana	61
5.4.2. Composición de PLs de membrana	65
5.4.3. Composición de <i>FAMES</i> de membrana	68
5.5. Implicancia de la actividad PLA en la respuesta a Cr(VI), fenol y ambos	

Contaminantes	74
5.6. Mecanismos de señalización involucrados en la respuesta a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes, en <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A	78
5.6.1. Efecto de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre las actividades lípido quinasas	78
5.6.2. Implicancia de la actividad PLD en la respuesta a Cr(VI), fenol y ambos Contaminantes	81
5.7. Otras respuestas adaptativas de los microorganismos que integran el consorcio a los contaminantes	84
5.7.1. Producción de exopolímeros en respuesta a Cr(VI), fenol y ambos Contaminantes	84
5.7.2. Formación de biofilm en presencia de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes	89
5.7.3. Hidrofobicidad de la superficie celular	90
6. CONCLUSIONES	93

CAPÍTULO II: Aplicación del consorcio SFC 500-1 para el tratamiento de efluentes de curtiembre

7. INTRODUCCIÓN	96
7.1. Los efluentes de curtiembre como fuente de contaminación ambiental	96
7.2. Utilización de diferentes escalas de trabajo para estudiar el tratamiento secundario de efluentes	97
7.3. Aplicación de microorganismos para la biorremediación de efluentes de Curtiembre	99
7.4. Evaluación de la toxicidad de efluentes tratados mediante bioensayos	102
8. MATERIALES Y MÉTODOS	105
8.1. Determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos del efluente de Curtiembre	105
8.2. Evaluación in vitro del potencial del consorcio SFC 500-1 y de las bacterias que lo integran para ser aplicado en biorremediación	105
8.2.1. Ensayo de tolerancia a diferentes metales y compuestos fenólicos	105
8.2.2. Ensayo de remoción de colorantes industriales	106
8.2.3. Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la viabilidad celular	

del consorcio SFC 500-1	106
8.2.4. Ensayo de viabilidad celular del consorcio en efluente de curtiembre	107
8.2.5. Ensayos de sensibilidad bacteriana frente a diferentes antibióticos	107
8.3. Ensayos de biorremediación	108
8.3.1. Ensayos de remoción in vitro de Cr(VI), fenol y materia orgánica de un efluente de curtiembre	108
8.3.2. Ensayos de remediación de efluentes de curtiembre en sistemas de microcosmos desarrollados a campo	109
8.3.2.1. Ensayos de bioaumento y bioestimulación	109
8.3.3. Evaluación de la toxicidad de los efluentes pre- y post- tratamiento utilizando el test de <i>Lactuca sativa</i> L.	110
8.4. Adecuaciones experimentales para la remoción adicional de materia orgánica de efluente de curtiembre	111
8.4.1. Adición de diferentes surfactantes	111
8.4.1.1. Selección de las concentraciones de surfactantes	111
8.4.1.2. Ensayos de remoción de materia orgánica	111
8.4.2. Modificaciones en la relación Demanda Química de Oxígeno-Nitrógeno-Fósforo (DQO:N:P) del efluente	112
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	113
9.1. Características físico-químicas y microbiológicas del efluente de curtiembre	113
9.2. Estudios in vitro del potencial del consorcio SFC 500-1 y de las bacterias que lo integran para ser aplicados en biorremediación	114
9.2.1. Tolerancia a diferentes metales y compuestos fenólicos	114
9.2.2. Remoción de colorantes industriales	117
9.2.3. Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la viabilidad del consorcio SFC 500-1	118
9.2.4. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular del consorcio SFC 500-1 en efluente de curtiembre	120
9.2.5. Ensayos de sensibilidad bacteriana frente a diferentes antibióticos	122
9.3. Estudios de biorremediación	123
9.3.1. Remoción in vitro de Cr(VI), fenol y materia orgánica de un efluente de Curtiembre	123

9.3.2. Estudios de biorremediación utilizando microcosmos a campo como sistema Experimental	125
9.3.3. Evaluación de la toxicidad de los efluentes pre- y post-tratados utilizando el test de <i>Lactuca sativa</i> L.	131
9.4. Adecuaciones experimentales para la remoción adicional de materia orgánica de efluente de curtiembre	136
9.4.1. Efecto de la adición de surfactantes en la remoción de la materia orgánica del efluente de curtiembre	136
9.4.2. Efecto de la relación Demanda Química de Oxígeno:nitrógeno:fósforo (DQO:N:P) sobre la remoción de la materia orgánica de efluente de curtiembre	139
10. CONCLUSIONES	143

CAPÍTULO III: Estudio de las comunidades bacterianas del efluente de curtiembre y del cuerpo de agua receptor

11. INTRODUCCIÓN	145
11.1. Estudio de las comunidades microbianas de efluentes/lodos provenientes de sistemas de tratamientos biológicos	145
11.2. Tecnologías de secuenciación de alto rendimiento	146
11.2.1. Secuenciación de amplicones de la subunidad 16S del gen ARN ribosomal (ARNr 16S)	147
11.2.2. Procesamiento de secuencias	148
11.2.3. Análisis de diversidad	149
11.3. Comunidades bacterianas habitualmente presentes en efluentes/lodos provenientes de sistemas de tratamiento biológicos	151
11.4. Impacto del vertido final de efluentes sobre la comunidad bacteriana de los cuerpos de agua receptores y su toxicidad	153
12. MATERIALES Y MÉTODOS	155
12.1. Secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S de un efluente de curtiembre, efecto del bioaumentación sobre la estructura de la comunidad bacteriana del efluente y efecto del vertido de efluentes tratados sobre la comunidad nativa del arroyo	155
12.1.1. Diseño experimental	155
12.1.2. Muestreo y almacenamiento	156

12.1.3. Determinaciones en muestras de efluente y agua de arroyo	157
12.1.4. Secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S	158
12.1.4.1. Extracción de ADN	158
12.1.4.2. PCR y secuenciación de amplicones	158
12.1.4.3. Análisis de datos de secuenciación de amplicones	159
12.1.5. Bioensayos de toxicidad	162
12.1.5.1. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	162
12.1.5.2. Ensayo de toxicidad aguda con <i>Rhinella arenarum</i> –ANFIAGU-	162
12.1.5.2.1. Recolección de los huevos de <i>Rhinella arenarum</i> (sapo común) y obtención de embriones	162
12.1.5.2.2. Ensayo de toxicidad	162
12.1.6. Análisis estadístico	163
13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	164
13.1. Caracterización físico-química y microbiológica del efluente de curtiembre y del agua del arroyo receptor	164
13.2. Secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S	171
13.2.1. Estructura de la comunidad bacteriana, de muestras de efluente y sedimento de curtiembre, a niveles taxonómicos altos	177
13.2.2. Estructura de la comunidad bacteriana, de muestras de efluente y sedimento de curtiembre, a nivel de género	181
13.2.3. Relación entre los parámetros físico-químico-microbiológicos y la estructura de la comunidad bacteriana en muestras de efluente de curtiembre	187
13.2.4. Estructura de la comunidad bacteriana de muestras de agua de arroyo, a niveles taxonómicos altos	191
13.2.5. Estructura de la comunidad bacteriana de muestras de agua de arroyo, a nivel de Género	195
13.3. Evaluación de la toxicidad aguda de las muestras de agua de arroyo	198
13.3.1. Bioensayo con semillas de <i>Lactuca sativa</i> L.	199
13.3.2. Bioensayo con embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	200
14. CONCLUSIONES	202

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	205
BIBLIOGRAFÍA	208
ANEXO	237

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Mezcla de reacción y condiciones de amplificación del gen <i>pld</i> .	43
Tabla 2: Composición de <i>FAMES</i> de <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A en diferentes condiciones de cultivo.	69
Tabla 3: Composición de <i>FAMES</i> de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E en diferentes condiciones de cultivo.	70
Tabla 4: Características generales de las diferentes etapas de tratamiento de efluentes de curtiembre.	97
Tabla 5: Parámetros físico-químicos y microbiológicos analizados en muestras de efluente de curtiembre	105
Tabla 6: Antibióticos seleccionados para <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A y <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E.	108
Tabla 7: Parámetros físico-químicos y microbiológicos obtenidos de diferentes muestras de efluentes de curtiembre.	113
Tabla 8: Concentración máxima tolerada (CMT) de metales, metaloides y compuestos fenólicos en medio sólido TY, por el consorcio SFC 500-1 y para cada una de las bacterias que lo integran.	116
Tabla 9: Sensibilidad a antibióticos en medio Müeller Hinton de <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A y <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E.	123
Tabla 10: Porcentajes de remoción (expresados en rangos) de Cr(VI), fenol y materia orgánica (DQO) de un efluente de curtiembre, después de 3 d de tratamiento.	124
Tabla 11: Parámetros determinados a partir de los ensayos de toxicidad, con semillas de <i>Lactuca sativa</i> L., de los efluentes post-remoción en condiciones control (sin inocular) e inoculados con el consorcio SFC 500-1 (10%), en época invernal.	134
Tabla 12: Parámetros determinados a partir de los ensayos de toxicidad, con semillas de <i>Lactuca sativa</i> L., de los efluentes post-remoción en condiciones control (sin inocular)	

e inoculados con el consorcio SFC 500-1 (10%), en verano.	135
Tabla 13: Selección de las concentraciones de surfactantes que no afectan la viabilidad del consorcio SFC 500-1.	136
Tabla 14: Resumen de los valores de DQO (mg/L) del efluente de curtiembre en estudio, antes y después de los tratamientos.	142
Tabla 15: Parámetros físico-químicos y microbiológicos de efluente de curtiembre.	168
Tabla 16: Parámetros físico-químicos y microbiológicos de agua de arroyo.	169
Tabla 17: Proporción de secuencias (%) que fueron clasificadas hasta el nivel taxonómico de género.	181
Tabla 18: Proporción de secuencias (%) que fueron clasificadas hasta el nivel taxonómico de género.	195
Tabla 19: Bioensayo de toxicidad, con semillas de <i>Lactuca sativa</i> L., de las muestras de agua de arroyo.	200
Tabla 20: Bioensayo de toxicidad, con embriones de <i>Rhinella arenarum</i> , de las muestras de agua de arroyo.	201

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa global de la producción de cuero de bovino en miles de toneladas por año (A) Mapa de la producción de cuero bovino per cápita para los 10 mayores productores de cuero (B). Datos obtenidos del repositorio (UN-FAO 2013). 5
- Figura 2:** Mecanismos de tolerancia bacteriana a Cr(VI). Imagen extraída de Viti y col. (2014). 17
- Figura 3:** Principales mecanismos de tolerancia bacteriana a fenol. Imagen adaptada de Segura y col. (2012). 19
- Figura 4:** Principales mecanismos de tolerancia a Cr(VI) y fenol detectados en los miembros del consorcio SFC 500-1. A. *guillouiae* SFC500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC500-1E (B). Imagen extraída de Ontañón (2016). 21
- Figura 5:** Vías de fosfolípidos señal en plantas. DAG, diacilglicerol; DGK, diacilglicerol quinasa; DGPP, diacilglicerol pirofosfato; FFA, ácidos grasos libres; IPx, polifosfato de inositol; LysoPA, ácido lisofosfatídico; LysoPL, lisofosfolípidos; LPP, lípido fosfato fosfatasa; NPC, fosfolipasa C no específica; PA, ácido fosfatídico; PAK, ácido fosfatídico quinasa; PAP, ácido fosfatídico fosfatasa; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PI4K, fosfatidilinositol 4-quinasa; PI4P5K, fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa; PI4P, fosfatidilinositol 4-fosfato; PI(4,5)P2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PI-PLC, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol; PLA, fosfolipasa A; PLD, fosfolipasa D. Esquema tomado de Ruelland y col. (2014). 27
- Figura 6:** Morfología de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B), creciendo en condiciones control (I), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (II), 300 mg/L de fenol (III) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (IV). Las imágenes fueron obtenidas con microscopio óptico (coloración de Gram). 49
- Figura 7:** Análisis de morfología, distribución (I y II) y superficie bacteriana (III) de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo en condiciones control (A), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (B), 300 mg/L de fenol (C) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (D). Las imágenes fueron obtenidas con AFM. 50
- Figura 8.** Gráficos de frecuencia, elaborados a partir del análisis de las imágenes obtenidas con AFM, de longitud (A), ancho (B) y altura (C) de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo en condiciones control y expuesto a diferentes contaminantes (25 mg/L Cr(VI), 300 mg/L fenol y ambos contaminantes simultáneamente), durante 16 h ($n=80$). 51
- Figura 9:** Análisis de morfología, distribución (I y II) y superficie bacteriana (III) de *Bacillus* sp. SFC 500-1E creciendo en condiciones control (A), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (B), 300 mg/L de fenol (C) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (D). Las imágenes fueron obtenidas con AFM. 52
- Figura 10.** Gráficos de frecuencia, elaborados a partir del análisis de las imágenes obtenidas con AFM, de longitud (A), ancho (B) y altura (C) de *Bacillus* sp. SFC 500-1E creciendo en condiciones control y expuesto a diferentes contaminantes (25 mg/L Cr(VI), 300 mg/L fenol y ambos contaminantes simultáneamente), durante 16 h ($n=80$). 55

Figura 11: Ultraestructura de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B), creciendo en condiciones control (I), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (II), 300 mg/L de fenol (III) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (IV). Las microfotografías fueron obtenidas con TEM. Ref: PDE: partículas densas a los electrones; FB: fisión binaria; V: vacuola; EB: espora bacteriana; CL: células lisadas. SPE: sustancias poliméricas extracelulares. 57

Figura 12: Eficiencia de remoción de Cr(VI) (25 mg/L) en presencia y ausencia de fenol (300 mg/L), por células viables y no viables de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B), después de 16 h de exposición. 60

Figura 13: Valores de polarización de fluorescencia (Pf) del DPH en células de *A. guillouiae* SFC 500 1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B) después del shock con Cr(VI) (25 mg/L) (I), fenol (300 mg/L) (II) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L) (III) en diferentes momentos (0 min, inmediatamente después del shock con el/los contaminantes, 10, 20, 30 y 60 min). Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. 62

Figura 14: Valores de polarización de fluorescencia (Pf) del DPH en células de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B) después de 16 h de exposición a Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L). Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos. 64

Figura 15: Composición de fosfolípidos (%) de la membrana de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B) creciendo durante 16 h con acetato de sodio [$1\text{-}^{14}\text{C}$: 37 KBq ml/L], en condiciones control (medio TY) y tratadas con Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre PLs iguales en diferentes tratamientos. Testigos de PLs: fosfatidilglicerol (PG); fosfatidiletanolamina (PE); cardiolipina (CL); lisofosfatidiletanolamina (LPE); ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilcolina (PC). 66

Figura 16: Composición de FAMES saturados e insaturados de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B). La proporción Anteiso/Iso se muestra en esta última bacteria (C). Las células crecieron en condiciones control (medio TY) y con Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L) durante 16 h. Ref: UFA: ácidos grasos insaturados; SFA: ácidos grasos saturados; UI: Índice de insaturación (en *A. guillouiae* SFC 500-1A no se muestra ya que este índice coincide con el valor de UFA); UFA/SFA: relación entre ácidos grasos insaturados/saturados. 71

Figura 17: (A) Productos lipídicos formados por actividad PLA₂ de extractos totales de células de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E en condiciones control (2) y tratadas con Cr(VI) (25 mg/L) (3), fenol (300 mg/L) (4) y ambos contaminantes (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L) (5), durante 1 h. La calle 1 corresponde al control negativo. La Figura muestra un experimento representativo de tres repeticiones llevadas a cabo en forma independiente. (B) Actividad PLA₂ de extractos totales de células de *A. guillouiae* SFC 500-1A (I) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E determinada como la formación de ácido graso libre (NBD-FA) (% del control) y cuantificada mediante el análisis de imágenes con el software Gel analyzer. Los datos representan la media \pm EE de tres réplicas biológicas independientes ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos. 75

Figura 18: Productos lipídicos formados en la fosforilación de membranas de células de *A. guillouiae* SFC 500-1A en condiciones control (medio TY) y tratadas con Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L), durante 16 h. Los lípidos radioactivos se separaron por TLC y se detectaron por autorradiografía. PA, ácido fosfatídico; DGPP, diacilglicerol pirofosfato; LPA: ácido lisofosfatídico; PIP, fosfatidilinositol 4-fosfato; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

La Figura muestra un experimento representativo de dos repeticiones llevadas a cabo en forma independiente. 79

Figura 19: Efecto del Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre las actividades lípido quinasa de *A. guillouiae* SFC 500-1A, después de 16 h. Las células fueron tratadas con 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L), durante el tiempo mencionado. La actividad lípido quinasa se analizó mediante la determinación de productos lipídicos fosforilados, y se expresó como veces de cambio respecto del control (control= 1 u.a), mediante el análisis de imágenes con software Gel analyzer. PA, ácido fosfatídico; DGPP, diacilglicerol pirofosfato; LPA: ácido lisofosfatídico; PIP, fosfatidilinositol 4-fosfato; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. Los datos representan la media ± EE de dos réplicas biológicas independientes (n= 2). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre PLs iguales de diferentes tratamientos. 80

Figura 20: Producto de la amplificación parcial del gen *pld* utilizando ADN genómico de *A. guillouiae* SFC 500-1A (calles 2 y 4). En la calle 1 se sembró un marcador de peso molecular (100 pb), mientras que las calles 3 y 5 corresponden a controles negativos. 83

Figura 21: Contenido de EPS (A), proteínas (B) y ADN (C) en el exopolímero de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, creciendo en condiciones control, en presencia de 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes simultáneamente. Los datos representan la media ± SE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey, $p \leq 0,05$). 85

Figura 22: Análisis del biofilm y de la matriz exopolimérica de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo en condiciones control (A), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (B), 300 mg/L de fenol (C) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (D). Las flechas indican posiblemente la unión de iones del metal en la superficie de una matriz amorfa, con características de exopolímero. Las microfotografías fueron obtenidas con SEM. 86

Figura 23: Formación de biofilm por *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B), creciendo en condiciones control, en presencia de 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes simultáneamente. Los datos representan la media ± EE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Test de Tukey, $p \leq 0,05$). 89

Figura 24: Adhesión de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B) a la fase xilénica. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio óptico. La flecha indica la adsorción en monocapa a la superficie de xileno. 91

Figura 25: Esquema representativo que resume los principales efectos del Cr(VI) y fenol sobre *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1 (B) y los mecanismos de respuesta por parte de las mismas, elaborado en base a los resultados del capítulo I (recuadros celestes) y antecedentes previos de nuestro laboratorio (recuadros verdes). 95

Figura 26: Eficiencia de remoción de 10 mg/L (A) y 20 mg/L (B) del colorante Negro Trupocor en medio mínimo por el consorcio SFC 500-1 (▲), *A. guillouiae* SFC 500-1A (◆) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (■). Control sin inocular (x). Los datos representan la media ± EE. 118

Figura 27: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad celular del consorcio SFC 500-1 (◆) y porcentaje de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (■) y de *A. guillouiae* SFC 500-1A (□). Almacenamiento a 5°C (A), 25°C (B) y 30°C (C), durante 1, 2, 4 y 6 meses. 119

Figura 28: Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular del consorcio SFC 500-1 (◆) en efluente de curtiembre y porcentaje de *A. guillouiae* SFC 500-1A (□) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E

(■), creciendo a 5°C (A), 15°C (B) y 25°C (C), durante 15 d. 121

Figura 29: Sistemas experimentales de microcosmos (invierno, 2015). Se puede observar la decoloración a lo largo del tiempo. (A) Tiempo inicial, (B) 7 d y (C) 14 d de tratamiento. 127

Figura 30: Niveles de DQO (A), consumo de nitrógeno (B) y fósforo (C) en muestras de efluente tratadas con el consorcio SFC 500-1 o suplementadas con medio TY, en sistemas de microcosmos. Los valores corresponden al experimento de verano 2016. 129

Figura 31: Viabilidad bacteriana en el efluente (0, 7 y 14 d) (A) y en el sedimento (14 d) (B) correspondiente a ensayos efectuados en microcosmos. Los valores corresponden al experimento de Verano 2016. 130

Figura 32: Efecto de la adición de Tween 20 (T20) y polietilenglicol (PEG), al inicio del experimento, sobre la reducción en los valores de DQO de efluente de curtiembre, después de 7 y 14 d de tratamiento. Concentraciones bajas (% v/v) (A), concentraciones altas (% v/v) (B). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos. 138

Figura 33: Efecto del ajuste de la relación DQO:N:P en efluentes tratados durante 7 días en microcosmos a campo (tiempo inicial), sobre los niveles de DQO luego de 7 más de tratamiento (tiempo final=14 d). Efluente con mayor carga orgánica (A), efluente con menor carga orgánica (B). Los experimentos fueron realizados en condiciones de laboratorio (lab) y/o en microcosmos a campo (microc). Los datos representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos que pertenecen a un determinado efluente tratado. 140

Figura 34: Esquema representativo que resume el potencial del consorcio SFC 500-1 como estrategia de biorremediación (bioaumentación) para ser aplicado al tratamiento de un efluente de curtiembre, elaborado en base a los resultados del Capítulo II. 144

Figura 35: Imagen satelital y fotografías de la curtiembre Víctor Manuel Zabala S.A. y del arroyo el Barreal. En detalle se muestran los sitios de circulación o vertido de los efluentes provenientes de la curtiembre, la cual se ubica geográficamente a 32°34' de latitud Sur y 64°23' de longitud Oeste. Esta industria libera los efluentes de su manufactura en un canal sin revestimiento alguno, que se extiende colindante a un camino rural hasta alcanzar el cauce del arroyo El Barreal (1). 156

Figura 36: Análisis de Componentes Principales (PCA), definido por los dos primeros ejes (90,8%), entre las muestras tomadas de los sistemas de microcosmos y los parámetros físico-químicos y microbiológicos. Se consideró en el análisis pH, sulfato total, oxígeno disuelto (O₂D), conductividad eléctrica, DQO, fosfato total (P), nitrógeno total (N), Cr(VI), fenoles, coliformes totales, bacterias cultivables totales (BCT) y hongos cultivables totales (HCT). Las líneas indican la dirección y la magnitud de la asociación entre los tratamientos y parámetros. Para mayor claridad, se representaron como puntos rojos los tratamientos, las letras indican su nombre (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v) y el tipo de muestra (l: líquido); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno; t=7: día siete). Se consideraron para el análisis los valores promedios de n muestras ($n=4$ para efluente y $n=3$ para agua de arroyo) para cada tratamiento. 171

Figura 37: Curvas de rarefacción para cada muestra en base a OTUs definidas a 97% de similitud entre secuencias. Efluente y sedimento (A), agua de arroyo y cultivos *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B). Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -

atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento; SFC 500-1A: cultivo *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A; SFC 500-1E: cultivo *over night* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno; t=7: día siete). 173

Figura 38: Diversidad alfa (A) y beta (B) de las diferentes muestras de efluentes de curtiembre (I), agua de arroyo y cultivos *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (II). Se utilizó el método promedio para el cálculo del índice de Shannon-Weaver. Se consideraron sólo algunas muestras para realizar los diagramas de Venn. Los números dentro del diagrama representan número de OTUs. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento; SFC 500-1A: cultivo *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A; SFC 500-1E: cultivo *over night* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno; t=7: día siete). 176

Figura 39: Patrones de distribución de filos bacterianos (A) y análisis de conglomerados (B) en muestras de efluentes líquidos y sedimentos de los diferentes microcosmos a campo. Los filos con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “minoritarios”. El análisis de agrupamiento se realizó sobre los 8 filos con mayor representación, sin incluir a las bacterias no clasificadas a éste nivel, utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete). 177

Figura 40: Patrones de distribución de clases bacterianas (A) y análisis de conglomerados (B) en muestras de efluentes líquidos y sedimentos de los diferentes microcosmos a campo. Las clases con abundancias menores a 0,5% fueron agrupadas como “minoritarias”. En la categoría “no clasificadas” se agruparon clases pertenecientes a filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* que no fueron clasificadas. El análisis de agrupamiento se realizó sobre las 16 clases con mayor representación, sin incluir a las bacterias no clasificadas a nivel de clase, utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete). 179

Figura 41: Mapa de calor de taxones bacterianos bajos encontrados en las muestras de efluentes y sedimentos de curtiembre. El análisis de conglomerados se realizó en los 53 taxones más representados (con abundancia >0,5%), incluido los “géneros” y las “familias” no clasificadas hasta el nivel de género, utilizando el índice de similitud Euclidiana y el método de agrupamiento de enlace promedio. Los géneros con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “géneros minoritarios”. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete). 184

Figura 42: Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) basados en parámetros físico-químico-microbiológicos y taxones bacterianos. Los parámetros físico-químicos incluyeron: Cr(VI), fenoles, DQO,

nitrógeno total (N), fosfato total (P), pH y oxígeno disuelto (O₂D) (A), mientras que los parámetros microbiológicos analizados fueron: bacterias cultivables totales (BCT), coliformes totales y hongos cultivables totales (HCT) (B). Además, para el análisis se consideraron los niveles de filos (I), clases (II) y géneros (III) con abundancias superiores a 6, 12 y 11%, respectivamente. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete). 190

Figura 43: Patrones de distribución de filos bacterianos (A) y análisis de conglomerados (B) en muestras de agua de arroyo. Los filos con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “minoritarios”. El análisis de agrupamiento se realizó sobre los 9 filos con mayor representación, sin incluir a las bacterias no clasificadas a este nivel, utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio. Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno). 192

Figura 44: Patrones de distribución de clases bacterianas (A) y análisis de conglomerados (B) en muestras de agua de arroyo. Las clases con abundancias menores a 0,5% fueron agrupadas como “minoritarias”. En la categoría “no clasificadas” se agruparon clases pertenecientes a filos *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* que no fueron clasificadas. El análisis de agrupamiento se realizó sobre las 17 clases con mayor representación, sin incluir a las bacterias no clasificadas a nivel de clase, utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio. Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno). 193

Figura 45: Mapa de calor de taxones bacterianos bajos encontrados en las muestras de agua de arroyo. El análisis de conglomerados se realizó en los 66 taxones más representados (con abundancia > 0,5%), incluido los “géneros” y las “familias” no clasificadas hasta el nivel de género, utilizando el índice de similitud Euclidiana y el método de agrupamiento de enlace promedio. Los géneros con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “géneros minoritarios”. Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno). 197

Figura 46: Esquema representativo que resume las variaciones en las comunidades bacterianas del efluente de curtiembre bioaumentadas con el consorcio SFC 500-1 y atenuadas naturalmente, su relación con variables ambientales y microorganismos cultivables (A), como así también el efecto que genera el vertido de efluentes tratados sobre la flora autóctona y características físico-químicas del arroyo El Barreal (B), elaborado en base a los resultados del Capítulo III. 204

ABREVIATURAS

%G: Porcentaje de germinación	PC: Posfatidilcolina
%IG: Índice de germinación	PCA: Análisis de componentes principales
<i>AFM</i> : Microscopía de fuerza atómica	PDE: Partículas densas a los electrones
AG: Ácidos grasos	PE: Fosfatidiletanolamina
C12:0: Ácido láurico	PEG: Polietilenglicol
C14:0: Ácido mirístico	PG: Fosfatidilglicerol
C16:0: Ácido palmítico	PG: Fosfatidilglicerol
C16:1 Δ9: Ácido palmitoleico	PI(4,5)P ₂ ó PIP ₂ : Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
C17:1: Ácido 10-heptanodecanoico	PI: Fosfatidilinositol
C18:0: Ácido esteárico	PI4-K: Fosfatidilinositol 4-quinasa
C18:1 cis Δ9: Ácido cis-oleico	PI4P ó PIP: Fosfatidilinositol 4-fosfato
BCT: Bacterias cultivables totales	PIP: Fosfatidilinositol fosfato
CE: Conductividad eléctrica	PI-PLC: Fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol
CL: Cardiolipina	PLA: Fosfolipasa A
CL: Células lisadas	PLA ₂ : Fosfolipasa A2
CMT: Concentración máxima tolerada	PLC: Fosfolipasa C
CO ₂ : Dióxido de carbono	PLD: Fosfolipasa D
Cr(III): Cromo trivalente	PLs: Fosfolípidos
Cr(VI): Cromo hexavalente	PPIIn: Fosfoinosítidos
Cr: Cromo	SDS: Dodecilsulfato sódico
DAG: Diacilglicerol	<i>SEM</i> : Microscopía electrónica de barrido
DBO ₅ : Demanda Bioquímica de Oxígeno	SFA: Ácidos grasos saturados
DGK: Diacilglicerol quinasa	SPE: Sustancias poliméricas extracelulares.
DGPP: Diacilglicerol pirofosfato	SS: Sólidos sedimentables
DPH: Sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno	T20: Tween 20
DQO: Demanda Química de Oxígeno	<i>TEM</i> : Microscopía electrónica de transmisión
EB: Espora bacteriana	UFA: Ácidos grasos insaturados
EPS: Exopolisacáridos	<i>UI</i> : Índice de insaturación
EROS: Especies reactivas del oxígeno.	US EPA: Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos.
<i>FAMES</i> : Ésteres metílicos de ácidos grasos	V: Vacuola
FB: Fisión binaria	
FFA: Ácidos grasos libres	
H ₂ O: Agua	
HCT: Levaduras/hongos filamentosos cultivables totales	
ICR: Índice de crecimiento relativo	
LPA: Ácido lisofosfatídico	
LPE: Lisofosfatidiletanolamina	
LPS: Lipopolisacáridos	
LysoPA: Liso ácido fosfatídico	
MO: Microscopía Óptica	
N: Nitrógeno Total	
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido	
NBD-FA: Ácido graso libre con marcaje fluorescente	
NBD-PE: 1-acil-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4yl)amino]dodecanoil}-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	
NBD-PtdBut: Fosfatidilbutanol con marcaje fluorescente	
O ₂ D: Oxígeno disuelto	
OTUs: Unidades taxonómicas operacionales	
P: Fosfato total	
Pf: Polarización de fluorescencia	
PA: Ácido fosfatídico	
PAP: Ácido fosfatídico fosfatasa	

Intervalos de tiempo:

d: Día/s; h: Hora/s; min: Minuto/s; seg: Segundo/s

RESUMEN

Las actividades industriales generan efluentes que generalmente contienen metales y compuestos orgánicos altamente tóxicos para el medioambiente por lo que el empleo de microorganismos autóctonos resulta una estrategia útil para su tratamiento. En esta tesis doctoral se trabajó con un consorcio microbiano denominado SFC 500-1, compuesto por *Acinetobacter guillouiae* SFC500-1A y *Bacillus* sp. SFC500-1E, con capacidad para remover Cr(VI) y fenol simultáneamente de soluciones sintéticas, en un amplio rango de condiciones.

Se estudiaron aspectos básicos relacionados con los posibles cambios en la estructura-ultraestructura celular, así como las respuestas adaptativas producidos en los microorganismos que integran el consorcio SFC 500-1 como consecuencia de la exposición a Cr(VI) y fenol. Se observó que el Cr(VI) y/o el fenol produjeron un incremento en el tamaño, como también alteraciones en la morfología de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Además, en *A. guillouiae* SFC 500-1A se observaron cambios intracelulares en presencia de Cr(VI), agregación celular en presencia de fenol y ambos efectos cuando el Cr(VI) y el fenol estuvieron presentes de manera simultánea. En *Bacillus* sp. SFC 500-1E, en cambio, los contaminantes provocaron cambios a nivel de la superficie celular, así como cambios intracelulares, tales como la presencia de un gran número de partículas densas a los electrones (en presencia del metal) y un gran número de células lisadas (en presencia de fenol). Por otro lado, ambas bacterias aumentaron la producción de exopolisacáridos (EPS) y proteínas extracelulares como respuesta adaptativa frente a la exposición simultánea a los contaminantes, mientras que la formación de biofilm constituiría una estrategia de supervivencia sólo frente a fenol.

Asimismo, los contaminantes produjeron cambios en el estado físico de las membranas de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E. El Cr(VI) y el Cr(VI) y fenol simultáneamente, incrementaron la rigidez de las membranas de ambas bacterias, mientras que el fenol sólo ejerció efecto fluidificante en la membrana de *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Estos cambios desencadenaron modificaciones en la composición de los fosfolípidos (PLs). En presencia de Cr(VI) y Cr(VI) y fenol en simultáneo, se modificó el perfil de ácidos grasos, que forman parte de los PLs de membrana, de *Bacillus* sp. SFC 500-1E, mientras que en *A. guillouiae* SFC 500-1A se modificaron tanto las cabezas polares como los ácidos grasos de los PLs. El fenol en cambio, sólo indujo en *Bacillus* sp. SFC 500-1E una respuesta a nivel de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs). Además, se determinó que la actividad fosfolipasa A2 (PLA₂) podría estar relacionada con el remodelado de los PLs de membrana en las bacterias expuestas a los contaminantes.

Los resultados permiten sugerir que, los fosfoinosítidos (PPIs) estarían fuertemente comprometidos durante la respuesta a Cr(VI) y a Cr(VI) y fenol en simultáneo en *A. guillouiae* SFC 500-1A. El Cr(VI) actuaría a nivel de membrana plasmática como un agonista modulando la vía que conduce a la activación de PLC/DGK generando ácido fosfatídico, el cual podría afectar diferentes vías implicadas en la atenuación de la respuesta al estrés causado por la exposición al metal.

Una vez efectuados los estudios básicos de caracterización del consorcio SFC 500-1, se procedió a evaluar de manera integral su aplicación para el tratamiento de efluentes de curtiembre, los cuales fueron previamente caracterizados. El Cr(VI), los fenoles y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) fueron las variables que excedieron en mayor medida los límites permitidos por Organismos Regulatorios.

El bioaumentado del efluente de curtiembre, con el consorcio SFC 500-1, en condiciones de laboratorio controladas (*in vitro*), permitió una remoción de alrededor del 15% de Cr(VI) (25 mg/L) y 100% de fenol (300 mg/L) añadidos al efluente y una reducción del 55% de la DQO inicial, después de 3 d de tratamiento. En los microcosmos a campo, en cambio, se obtuvo una remoción de Cr(VI) significativa, mientras que los

fenoles fueron removidos en su totalidad. La reducción de la DQO fue alrededor del 60-80% después de 14 d de aplicada la estrategia de bioaumentación con el consorcio SFC 500-1, logrando las mejores eficiencias de remoción en época invernal. En verano, se destacó una contribución significativa de la flora nativa del efluente en la remoción de la DQO.

Finalmente, la secuenciación de amplicones de la subunidad 16S del gen ARN ribosomal mostró que tanto la comunidad bacteriana del efluente de curtiembre como la del agua de arroyo receptor “El Barreal” fueron muy diversas y que la disminución de su diversidad, se debió en gran medida al efecto de la inoculación con el consorcio/vertido de efluentes *per se*, más que a un efecto temporal. La estrategia de bioaumentación con el consorcio SFC 500-1 en particular, generó cambios en la composición del efluente luego de 7 d, pero los mismos no representaron más que un 10% de variación en relación a las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) únicas, indicando cierta autorregulación de las comunidades bacterianas en esta matriz. Por otro lado, la disminución en la diversidad del agua de arroyo por el vertido de estos efluentes tratados, se debió a un incremento en la abundancia de los géneros más representados en los efluentes vertidos. Por último, el vertido de efluentes tratados sobre el agua de arroyo no resultó tóxico para las especies *Lactuca sativa* L. y *Rhinella arenarum*.

En conclusión, en esta tesis doctoral se demostró la capacidad del consorcio SFC 500-1 como un sistema biológico adecuado para ser aplicado en el tratamiento de efluentes de curtiembre y potencialmente inócuo para el medioambiente.

ABSTRACT

The discharge of effluents containing metals and organic compounds derived from industries is considered one of the most polluting activities in the world and the use of native microorganisms is a useful strategy for their treatment. In this doctoral thesis we have worked with a bacterial consortium (SFC 500-1), integrated by *Acinetobacter guillouiae* SFC 500-1A and *Bacillus* sp. SFC 500-1E., with potential for simultaneous Cr(VI) and phenol removal in synthetic media, under a wide range of conditions.

Basic aspects were studied concerning to the possible changes in cell structure and ultrastructure, as well as adaptive responses produced in the microorganisms that integrate the consortium SFC 500-1 as a result of Cr(VI) and phenol exposure. Cr(VI), phenol and both pollutants simultaneously produced an increase in size and alterations in the morphology of *A. guillouiae* SFC 500-1A and *Bacillus* sp. SFC 500-1E. In addition, in *A. guillouiae* SFC 500-1A intracellular changes were observed in presence of Cr(VI), cell aggregation under phenol exposure and both effects when Cr(VI) and phenol were present simultaneously. In *Bacillus* sp. SFC 500-1E, the pollutants caused changes at the cell surface level, as well as intracellular changes, such as the presence of a large number of electron dense particles (in presence of Cr(VI)) and a large number of lysed cells (in presence of phenol). On the other hand, both bacteria increased the production of exopolysaccharides (EPS) and extracellular proteins as an adaptive response to simultaneous exposure to pollutants, while biofilm formation would constitute a survival strategy only against phenol.

On the other hand, the pollutants produced changes in the physical state of *A. guillouiae* SFC 500-1A and *Bacillus* sp. SFC 500-1E membranes. Cr(VI) and Cr(VI) and phenol simultaneously increased the stiffness of the membranes of both bacteria, while phenol only exerted a fluidizing effect on *Bacillus* sp. SFC 500-1E membrane. These changes triggered changes in the phospholipids (PLs) composition. In presence of Cr(VI) and Cr(VI) and phenol simultaneously, the fatty acid profile of *Bacillus* sp. SFC 500-1E changed, while in *A. guillouiae* SFC 500-1A both the polar heads and the fatty acids of the PLs were modified. Phenol induced a response at fatty acid methyl esters (FAMES) level in *Bacillus* sp. SFC 500-1E. In addition, phospholipase A2 (PLA₂) activity could be related to the remodeling of membrane phospholipids (PLs) in bacteria exposed to contaminants.

The results suggest that phosphoinositides (PPIns) would be strongly compromised during the response to Cr(VI) and Cr(VI) and phenol simultaneously in *A. guillouiae* SFC 500-1A. Cr(VI) would act at the plasma membrane level as an agonist modulating the path that leads to the activation of PLC/DGK generating phosphatidic acid, which could affect different pathways involved in attenuating the stress response caused by exposure to metal.

After the basic characterization studies of the consortium SFC 500-1, its application for the treatment of tannery effluents was evaluated, which were previously characterized. Cr(VI), phenols and COD were the variables that exceeded the permitted limits by Regulatory Agencies.

The tannery effluent bioaugmentation with the consortium SFC 500-1 under controlled laboratory conditions produced a removal of about 15% Cr(VI) (25 mg/L) and 100% phenol (300 mg/L) added to the effluent and a 55% reduction of the initial COD, after 3 days of treatment. In the field microcosm systems a significant Cr(VI) removal was obtained, while phenols were completely removed. The COD reduction was around 60-80% after 14 days of applying the bioaugmentation strategy with the consortium SFC 500-1, achieving the best removal efficiencies during the winter season. In summer, a significant contribution of the native flora of the effluents in the removal of organic matter was highlighted in summer season.

Finally, sequencing amplicons of the 16S subunit of the ribosomal RNA gene showed that both the bacterial community structure of the tannery effluent and the "El Barreal" stream water were very diverse and the decrease in their bacterial diversity was largely due to the effect of inoculation with the consortium /effluent discharge. The bioaugmentation strategy with the consortium SFC 500-1 generated changes in the

composition of the effluent after 7 days, but they did not represent more than 10% variation in relation to the unique OTUs, indicating certain self-regulation of bacterial communities in this matrix. On the other hand, the decrease in the bacterial diversity of stream water due to the discharge of these treated effluents was due to an increase in the abundance of the most represented genera in the effluents discharged. Finally, the water stream containing treated effluents were not toxic to the species *Lactuca sativa* L. and *Rhinella arenarum*.

In conclusion, in this doctoral thesis the capacity of the consortium SFC 500-1 was demonstrated as an adequate biological system to be applied in the tannery effluents treatment being potentially harmless to the environment.

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Contaminación ambiental por cromo y fenol

La protección y remediación del medio ambiente es actualmente foco de atención en todo el mundo. El aumento en los volúmenes de producción ha llevado a un incremento continuo en la contaminación de la biósfera con efluentes industriales, domiciliarios y productos derivados de las actividades agrícolas (Azubuike y col., 2016; Martín y col., 2015). Como consecuencia, se ha observado un incremento en la concentración de sustancias tóxicas, poniendo así en peligro la salud humana, la vida animal y vegetal (Yadav y col., 2016).

Los sitios más problemáticos en el mundo en cuanto a su grado de polución y dificultad de saneamiento están por lo general co-contaminados con metales y xenobióticos de naturaleza orgánica (Cheng y col., 2015; Ontañón y col., 2015a). La coexistencia de estos compuestos tóxicos en un mismo ambiente altera su comportamiento individual y modifica su eco-toxicidad debido a efectos de interacción (Cheng y col., 2015). Esa contaminación mixta puede ocurrir por la descarga 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 cromo (Cr(VI)) y compuestos fenólicos en aguas residuales de diversas industrias, es una situación ampliamente reconocida (Saranraj y Sujitha, 2013).

El Cr está clasificado dentro del grupo de los metales pesados, por su densidad superior a 5 g/cm^3 y se considera uno de los compuestos químicos más peligrosos para los seres vivos (Chrysochoou y col., 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 (FeOCr_2O_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 acomplejarse con sustancias orgánicas y precipitar (Cervantes y col., 2006). La forma hexavalente, Cr(VI), es alrededor de 1.000 veces más tóxica que la trivalente y corresponde a la segunda forma más estable del

metal, es un fuerte agente oxidante, que predomina en medio ácido formando cromato y dicromato (Pan y col., 2014). 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 (Fernández y col., 2010). De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), el Cr(VI) se encuentra dentro de los 17 químicos más peligrosos para el hombre, debido a su carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogénesis, pudiendo ingresar al cuerpo por inhalación, contacto o ingestión (Novotnik y col., 2014).

Por otro lado, los fenoles y sus derivados tales como alquilfenoles, nitrofenoles, polifenoles y fenoles halogenados 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 (Anku y col., 2017), siendo el fenol, también llamado ácido carbólico o hidroxibenceno, uno de los miembros más representativos de este grupo. El efecto adverso de los compuestos fenólicos sobre los seres vivos está relacionada con su hidrofobicidad, con la generación de radicales orgánicos y especies reactivas de oxígeno que generan daño sobre las membranas plasmáticas por alteración en sus estructuras lipídicas. Además, los fenoles y catecoles hematotóxicos y hepatotóxicos, provocan mutagénesis y carcinogénesis hacia los humanos y otros organismos vivos (Michałowicz y Duda, 2007). Las principales vías de entrada al organismo son por inhalación y contacto cutáneo. 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).

1.2. Fuentes de contaminación por cromo y fenol

El Cr, como se ha mencionado previamente, es uno de los metales pesados más frecuentemente empleados en diferentes actividades industriales (Chrysochoou y col., 2012). El Cr(III) es utilizado 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), mientras que el Cr(VI) ingresa 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 (Jin y col., 2017; Tekerlekopoulou y col., 2013).

Por otro lado, la existencia de compuestos fenólicos en el ambiente puede atribuirse tanto a factores naturales como antropogénicos (Anku y col., 2017). Las fuentes naturales de compuestos fenólicos incluyen la descomposición de materia orgánica, combustión de la madera, estiércol o alquitrán de hulla, así como la síntesis por microorganismos y plantas (Anku y col., 2017; Max y col., 2012; Ignat y col., 2011). Sin embargo, las actividades industriales, agrícolas y municipales constituyen las fuentes antropogénicas, las cuales son las responsables de la mayor contaminación (Anku y col., 2017). En este sentido, el fenol se usa ampliamente como materia prima en diferentes industrias, como en la industria química para la producción de otros derivados como alquilfenoles, cresoles, anilinas y resinas, en industrias del petróleo, en las industrias de electrodomésticos, madera y construcción (Careghini y col., 2015). La producción de colorantes textiles, surfactantes, fertilizantes y agroquímicos, explosivos y pinturas, también dependen del fenol como materia prima (Basha y col., 2010). Por otro lado, la biodegradación de herbicidas, pesticidas y fungicidas derivados de actividades agrícolas constituye otra fuente de contaminación con compuestos fenólicos tales como 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, catecol y pentaclorofenol (Huang y col., 2018; Arora y Bae, 2014; Ahmed y col., 2011). Por último, la liberación de lixiviados no tratados a partir de vertederos de residuos sólidos municipales, así como la liberación de residuos de incineración y de materiales incombustibles también resultan en este tipo de contaminación (Kurata y col., 2008).

Entre los diferentes sitios de nuestro país donde se ha detectado contaminación mixta por Cr y fenol, se puede mencionar la cuenca del río Bermejo, en la cual se vierten 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 y metaloides (Cr, Cu, Pb, As) y fenoles superiores a las permitidas según la legislación, en las aguas del Río Reconquista. Además, en la provincia de Córdoba, se ha registrado un aumento considerable en los niveles de contaminantes como consecuencia de actividades agropecuarias y principalmente por actividades industriales (curtiembres, industrias químicas y petroquímicas).

Es así que en estudios previos realizados por nuestro laboratorio, se detectaron elevadas concentraciones de fenoles totales (0,14-17,5 mg/L) en los canales de vertido de efluentes provenientes de industrias localizadas en las proximidades de Río Tercero y en el arroyo El Barreal (Elena), donde además se registraron elevados niveles de Cr en sedimentos (2360-6770 ppm) (Ontañón y col., 2015a). Asimismo, en aguas superficiales y subterráneas de dicha zona se informaron niveles de Cr que resultaron superiores a las concentraciones máximas permitidas en nuestro país (Matteoda y col., 2009).

1.3. La industria del curtido de cuero como fuente de contaminación de Cr y fenol

La industria del curtido de cuero está considerada como una de las actividades industriales más contaminantes del mundo (Liang y col., 2017; Yadav y col., 2016).

El proceso de curtido involucra el procesamiento de materias primas, tales como las pieles de animales que derivan de la industria alimentaria. Gran parte de las pieles de animales procesadas en la industria del curtido son de cabra, bovino, cerdo y cordero. Sin embargo, las pieles bovinas son las más comunes en todo el mundo, seguidas de las pieles ovinas y caprinas (UN-FAO 2016).

La Figura 1A muestra la producción mundial de cuero bovino en toneladas por año y la Figura 1B muestra la producción de cuero bovino per cápita (kilogramos por persona), para los mayores productores mundiales de este tipo de cuero. La industria del curtido de cuero constituye un actor regional dominante en ciertas áreas del mundo (Lofrano y col., 2013). Como se muestra en la Figura 1B, los principales productores de cuero son China, seguida de India, Italia, Brasil, Rusia, Argentina, Estados Unidos y Turquía. Entre éstos, Argentina e Italia son los mayores productores de cuero bovino per cápita (Figura 1B).

La producción de cueros se puede representar en tres fases principales: ribera, curtido y acabado (Dargo y Ayalew, 2014). La primera fase comprende aquellos procesos que permiten la eliminación del pelo o lana de la piel, la separación de las grasas y carnazas unidas a la parte interna de la piel (descarne), así como su limpieza y desinfección. La etapa de ribera emplea sulfuro de sodio y cal, representa el mayor consumo de agua de todo el proceso y su efluente generalmente presenta un elevado pH. Por otro lado, la etapa de curtido comprende los procesos que preparan la piel para ser curtida y transformada en cuero. En otras palabras, se estabiliza el colágeno de la piel mediante agentes curtientes minerales o vegetales, siendo las

sales de cromo las más utilizadas. Este comprende además operaciones de desencalado, desengrase y purga que eliminan la cal, el sulfuro y las grasas contenidas en la piel y limpian los poros de la misma. El consumo de agua no es tan alto como en la etapa de ribera y su efluente tiene pH neutro. Por último, la etapa de acabado comprende operaciones, tales como recurtido, teñido y suavizado del producto que le dan al cuero las características finales que requiere para la confección de diferentes artículos (Sungur y Özkan, 2017; Dargo y Ayalew, 2014).

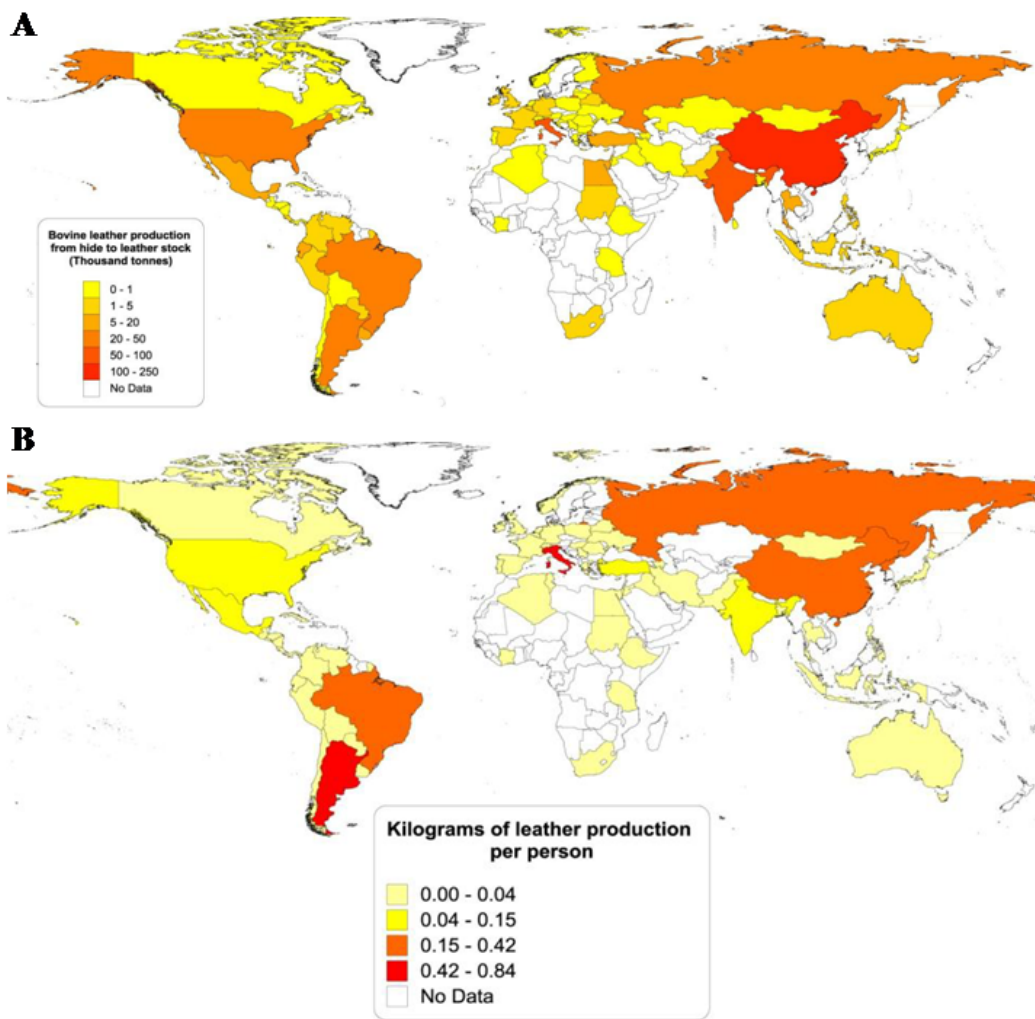


Figura 1: Mapa global de la producción de cuero de bovino en miles de toneladas por año (A) Mapa de la producción de cuero bovino per cápita para los 10 mayores productores de cuero (B). Datos obtenidos del repositorio (UN-FAO 2013).

Como consecuencia de la producción de cueros se generan grandes volúmenes de aguas residuales caracterizadas por una alta carga orgánica en términos de demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno orgánico, sulfuro, cloruro, sodio, detergentes, colorantes, altos niveles de sólidos disueltos y en suspensión y otros contaminantes como el Cr y los compuestos fenólicos (Deghles y Kurt, 2016; Chowdhury y col., 2015).

Existe una diversidad de reglamentaciones nacionales e internacionales que definen los límites permitidos para diferentes sustancias vertidas por establecimientos industriales. La US EPA por ejemplo, establece que los niveles de Cr total y fenoles en aguas residuales no deben exceder los 0.5 mg/L y 500 µg/L. En nuestro país, la ley de vertido de residuos industriales (Ley 24.051, Anexo II) especifica un nivel guía de 2 mg/L de Cr total, 0,2 mg/L de Cr(VI) y 0,1 mg/L de fenoles, para vertidos de establecimientos industriales en aguas superficiales. En la provincia de Córdoba en particular, los límites para efluentes líquidos que se vierten a cuerpos de agua superficiales no deben superar 1 mg/L, 0,1 mg/L y 0,05 mg/L para Cr total, Cr(VI) y compuestos fenólicos, respectivamente (Decreto provincial 847, 2016).

Más allá de los esfuerzos por restringir la eliminación desmedida de estas sustancias al medioambiente, la concentración de las mismas en aguas de uso industrial supera muchas veces los límites establecidos por la reglamentación (Umar y col., 2017; Abdallah y col., 2016; Ahmed y col., 2016; Rajkumar y Palanivelu, 2004).

El vertido de efluentes sin tratar o con tratamientos poco eficientes genera cambios indeseables en las características físico-químicas y biológicas del suelo y del agua, produciendo impactos negativos en el desarrollo económico de la región y alteraciones en los procesos ecológicos que pueden afectar la producción de cultivos, constituyendo además un peligro para los organismos vivos y para la salud humana (Garg y col., 2018; Rangaraj y col., 2014). Esta realidad plantea la necesidad de emplear diversas tecnologías para el tratamiento de efluentes industriales liberados al ambiente y para el saneamiento de sitios que se encuentren contaminados de forma crónica.

1.4. Estrategias de 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 (Lu 2015). 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). Dentro de las tecnologías de tratamiento, podemos detallar dos grandes grupos, las físico-químicas y las biológicas.

1.4.1. 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 (Barakat 2011).

Las principales tecnologías físico-químicas empleadas para la decontaminación de metales pesados se basan en procesos de óxido-reducción, precipitación química, filtración por membranas, tratamientos electroquímicos, evaporación, intercambio iónico, ósmosis inversa, adsorción y nanotecnologías (Azimi y col., 2017). En el caso de los contaminantes orgánicos, se aplican procedimientos como extracción por solventes, métodos de separación basados en el uso de membranas, adsorción e intercambio de iones, oxidación química, incineración, fotocatalisis, ozonización, ultrasonido y estabilización con aditivos inmovilizantes (Anku y col., 2017; Carolin y col., 2017).

A pesar de que las tecnologías físico-químicas se han utilizado durante varias décadas para el tratamiento de grandes extensiones de áreas contaminadas, presentan serias desventajas por requerir una alta inversión de capital y equipos de ingeniería, su baja selectividad, como así también el empleo de reactivos tóxicos o bien la formación de productos secundarios tóxicos después de ciertos procesos (Carolin y col., 2017; Barakat 2011). Estas desventajas pueden ser más pronunciadas, agravando los costos en el caso de aguas subterráneas contaminadas, desechos de minería y otras aguas residuales industriales, o bien cuando los efluentes son voluminosos y contienen combinación de metales pesados y sustancias orgánicas

(McGuinness y Dowling, 2009; Malik 2004). Las desventajas de estos sistemas han planteado la necesidad de buscar 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 (Xu y col., 2018; Vasquez y Fatta-Kassinos, 2013).

1.4.2. 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 (Jacob y col., 2018; Philp 2005).

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 (Endeshaw y col., 2017; Conesa y col., 2012). Además, ha 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, anelidos y sus productos de digestión con la misma finalidad (Sinha y col., 2010).

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 facilitado la comprensión de los mecanismos involucrados en la remoción de contaminantes orgánicos y metales pesados (Ibanez y col., 2015), mientras que el desarrollo de tecnologías “ómicas” ha permitido comprender la dinámica de comunidades microbianas durante los procesos de biorremediación y rizorremediación (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 se trata de tecnologías ambientalmente amigables y poco destructivas (Azubuike y col., 2016; Kumar y col., 2011). 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 la lentitud, características geológicas y climáticas del sitio a tratar, demandas nutricionales específicas y baja predictividad.

1.4.2.1. Biorremediación

La biorremediación microbiana es quizás, la más prometedora de las tecnologías biológicas previamente mencionadas (Endeshaw y col., 2017). 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 (Dixit y col., 2015; Baldwin y col., 2014). 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 CO₂ y H₂O (Krastanov y col., 2013; Diez, 2010). A diferencia de lo que ocurre con los contaminantes orgánicos, los metales no pueden ser degradados (Modoi y col., 2014), por lo que la biorremediación de estos compuestos por microorganismos se basa en la inmovilización o la transformación química, dando lugar a la formación de especies menos tóxicas (Wessels Perelo 2010). Otros fenómenos, como la absorción y adsorción a estructuras celulares de forma pasiva o activa ocurren para ambos tipos de compuestos (Ayangbenro y Babalola, 2017).

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 (Azubuike y col., 2016; 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 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 (Azubuike y col., 2016; 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 técnica prometedora para el tratamiento de efluentes industriales o de sedimentos contaminados (Samantaray y col., 2014). 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 (Endeshaw y col., 2017; Wessels Perelo 2010).

Uno de los sistemas de biorremediación más utilizados 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 (Sheik y col., 2014). Sin embargo, estos sistemas suelen ser sensibles a la presencia de metales pesados, tales como 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).

1.4.2.2. Utilización de consorcios bacterianos autóctonos en biorremediación

Los microorganismos autóctonos (ya sean éstos individuales o formen parte de consorcios microbianos) presentes en ambientes contaminados poseen elevado potencial para adaptarse a las variaciones climáticas propias de esas zonas y son en la actualidad la clave para resolver la mayoría de los desafíos asociados con la biodegradación y biorremediación de sustancias (Verma y Jaiswal, 2016; Angelim y col., 2013).

Por otro lado, 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, 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. Por tal motivo, 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 (Trigo y col., 2009).

A partir de lo mencionado, surge el concepto de consorcio microbiano, definido en general como una asociación natural de dos o más poblaciones de diferentes especies, que actúan como una comunidad, donde todos sus componentes se benefician de las actividades de los demás (metabolismo cooperativo) (Vázquez y col., 2013; Eric Thomassin-Lacroix y col., 2002; Kanaly y col., 2000). De manera similar, otros autores resaltan como característica fundamental en un consorcio microbiano la participación de sus miembros en una determinada función (tolerancia/degradación del contaminante) pero “en asociación”, de manera que el resultado sea más efectivo y eficiente (por la acción sinérgica de las capacidades metabólicas) que en una población individual (Fodelianakis y col., 2015; Silva-Castro y col., 2012). Además, sostienen que dicha cooperación o asociación les permite evolucionar hacia un nivel de estructura más estable como las biopelículas, pero con división de trabajo (Padmaperuma y col., 2018; Zhang y col., 2018; Spribille y col., 2016; Xiaoqiang y col., 2016). Dicha división de trabajo o red de división de recursos sería necesaria para apoyar la producción, transferencia y utilización de recursos (por ejemplo, donantes y aceptores de electrones, metales traza y fuentes de carbono) (Payne y col., 2015). La alimentación cruzada es otra vía posible, en la que los metabolitos producidos por un miembro son utilizados por otro, ya sea a través de estrategias de captación activa o pasiva (Shankar y col., 2014; Morris y col., 2013). Además, el posible intercambio de metabolitos difusibles (por ejemplo, hidrógeno, formiato, metanotiol, aminoácidos o hidratos de carbono) es de gran interés. Dicho proceso puede resultar también en alimentación cruzada, en la que un miembro del consorcio evoluciona para

comenzar a producir cada vez más cantidades de un determinado metabolito en beneficio de otros (Pande y Kost, 2017).

Algunos autores utilizan el término consorcio para definir otras asociaciones entre microorganismos, sean éstas naturales, sintéticas, por la existencia de interacciones (probadas o no), apareciendo términos tales como "consorcios híbridos", "consorcios multiespecíficos", "cultivos mixtos", "consorcios mixtos" y "co-cultivos" (Lindemann y col., 2016; Song y col., 2014). Estos términos son utilizados con bastante ambigüedad, probablemente debido a que sus alcances y limitaciones no están del todo claros. Por tal motivo, creemos de suma importancia enmarcar al sistema biológico en estudio.

Nuestro grupo de trabajo realizó un aislamiento microbiano denominado SFC 500-1, a partir de los canales de descarga de efluentes, conteniendo Cr(VI) y fenol, de una curtiembre situada en la zona de la cuenca del arroyo El Barreal-Elena. Los microorganismos integrantes del mismo fueron identificados como *Acinetobacter guillouiae* SFC500-1A y *Bacillus* sp. SFC500-1E (Ontañón y col., 2015a). Estos microorganismos fueron difíciles de separar uno del otro y si bien pudieron crecer y remover Cr(VI) y/o fenol de soluciones sintéticas en forma independiente, la remoción simultánea de los contaminantes fue más eficiente cuando ambos microorganismos estuvieron presentes (Ontañón y col. 2015a, b, 2017, 2018a, b). Además, es importante notar que la proporción de una bacteria respecto de la otra es una característica que se mantuvo constante (en equilibrio, estable) en el tiempo desde su aislamiento inicial, a pesar de su manipulación y/o sucesivos subcultivos. Por tales motivos, es que se decidió considerar a este sistema biológico como un consorcio bacteriano.

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 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 base a lo expuesto precedentemente, se propuso la siguiente hipótesis de trabajo:

1.6. Hipótesis

El conocimiento de los mecanismos bioquímicos, fisiológicos y moleculares involucrados en la tolerancia y remediación simultánea de Cr(VI) y fenol en medios sintéticos por parte del consorcio microbiano SFC 500-1, así como el conocimiento básico de la estructura de las comunidades bacterianas del efluente a tratar, constituyen elementos claves para el desarrollo de una estrategia de biorremediación efectiva de efluentes industriales.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Profundizar el estudio de los mecanismos relacionados con la remediación de Cr(VI) y fenol utilizando el consorcio microbiano SFC 500-1, que es capaz de tolerar, bioacumular, biotransformar/biodegradar a dichos contaminantes simultáneamente. Además, se propone indagar sobre los mecanismos involucrados en la percepción y respuesta de este sistema biológico a los contaminantes y evaluar la aplicación del consorcio SFC 500-1 a nivel de microcosmos, analizando el efecto del bioaumentación en las comunidades bacterianas del efluente, así como el efecto del vertido de efluentes tratados sobre la comunidad microbiana autóctona de un lecho de agua natural.

2.2. Objetivos específicos

1. Estudio del efecto de Cr(VI) y fenol sobre el consorcio SFC 500-1

Estudiar aspectos básicos relativos a los posibles cambios en la estructura y ultraestructura celular, mecanismos de señalización celular y respuesta adaptativa, producidos como consecuencia de la exposición a Cr(VI) y fenol en los dos microorganismos que integran el consorcio bacteriano (*A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E).

2. Aplicación del consorcio SFC 500-1 para el tratamiento de efluentes de curtiembre

Analizar el potencial del consorcio bacteriano para remediar efluentes de curtiembre, en diferentes escalas de trabajo (en condiciones de laboratorio *-in vitro-* y en microcosmos desarrollados a campo).

3. Estudio de las comunidades bacterianas del efluente de curtiembre y cuerpo de agua receptor

Analizar la estructura de la comunidad bacteriana de un efluente de curtiembre, las posibles variaciones en dichas comunidades después de aplicado el tratamiento con el consorcio SFC 500-1 (bioaumentación), como así también estudiar el efecto que genera el vertido de efluentes tratados sobre la flora autóctona del arroyo El Barreal.

En base a los objetivos específicos expuestos, la tesis se desarrollará en 3 capítulos.

CAPÍTULO I:
*Efectos de Cr(VI) y fenol sobre el
consorcio SFC 500-1*



INTRODUCCIÓN



3. INTRODUCCIÓN

3.1. Mecanismos bacterianos de tolerancia a contaminantes

Una adecuada comprensión de los mecanismos bioquímicos, fisiológicos y moleculares que las bacterias desarrollan en presencia de contaminantes es un requisito previo para su aplicación en ambientes contaminados y en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para el monitoreo ambiental, selección y estudio del potencial biorremediador de ciertas cepas o consorcios.

En general, 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 (Jacob y col., 2018; Rinklebe y col., 2010) o bien la degradación, en el caso de compuestos orgánicos (Krastanov y col., 2013; Diez, 2010). 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., 2013).

3.1.1. Mecanismos bacterianos de tolerancia a Cr(VI)

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 tanto 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) (Fernández y col., 2018). Estos incluyen los siguientes:

- Capacidad de biosorción del metal a la biomasa bacteriana. En este sentido, la pared celular microbiana proporciona una gran cantidad de ligandos aniónicos (como

carboxilatos, hidroxilos, aminos y fosfatos) que puede unir iones de metales pesados (Gadd 2009).

- Capacidad para regular los mecanismos de captación, como el sistema de transporte de sulfato involucrado en la acumulación celular inicial (Ramírez-Díaz y col., 2008).

- Capacidad para reducir Cr(VI) a Cr(III), tanto aeróbica como anaeróbicamente. En presencia de oxígeno el Cr(VI) es reducido mayormente por cromato reductasas, que son flavín mononucleótido reductasas dependientes de NAD(P)H (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). Las reductasas bacterianas pueden localizarse en la fracción de membrana (Tahri Joutey y col., 2014; Mangaiyarkarasi y col., 2011), en el citoplasma (Xu y col., 2011; Thacker y col., 2006), así como en ambas fracciones (Polti y col., 2010; Sau y col., 2010). Las enzimas ubicadas en membrana reducen Cr(VI) extracelularmente empleando agentes reductores de la cadena de transporte de electrones, usualmente precedida por la adsorción del metal a grupos funcionales que se encuentran en la superficie celular bacteriana (Arivalagan y col., 2014; Tahri Joutey y col., 2014). Las enzimas solubles pueden participar en procesos extra e intracelulares dependientes de NADH/NADPH (Thatoi y col., 2014; Ngwenya y Chirwa, 2011). 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).

- Capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo (formación de especies reactivas del oxígeno -EROS) inducido por la reducción de Cr(VI) (Cheung y col., 2006). Para esto se inducirán enzimas involucradas en la eliminación de las EROS (por ejemplo, catalasa, superóxido dismutasa) (Cervantes y Campos-García, 2007; Ackerley y col., 2006). Los antioxidantes no enzimáticos tales como la vitamina C y E, carotenoides, tioles antioxidantes y flavonoides también son conocidos por contrarrestar el efecto de las EROS (Flora 2009).

- Presencia de un sistema de flujo de salida de iones cromato del citoplasma celular mediante bombas de expulsión del tipo ChrA (Viti y col., 2014; Vasconcelos Morais y col., 2011).

- 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 respuestas de defensa celular contra Cr(VI) (Vasconcelos Morais y col., 2011; Cervantes y Campos-García, 2007).

La figura 2 resume los principales mecanismos de tolerancia bacteriana a Cr(VI).

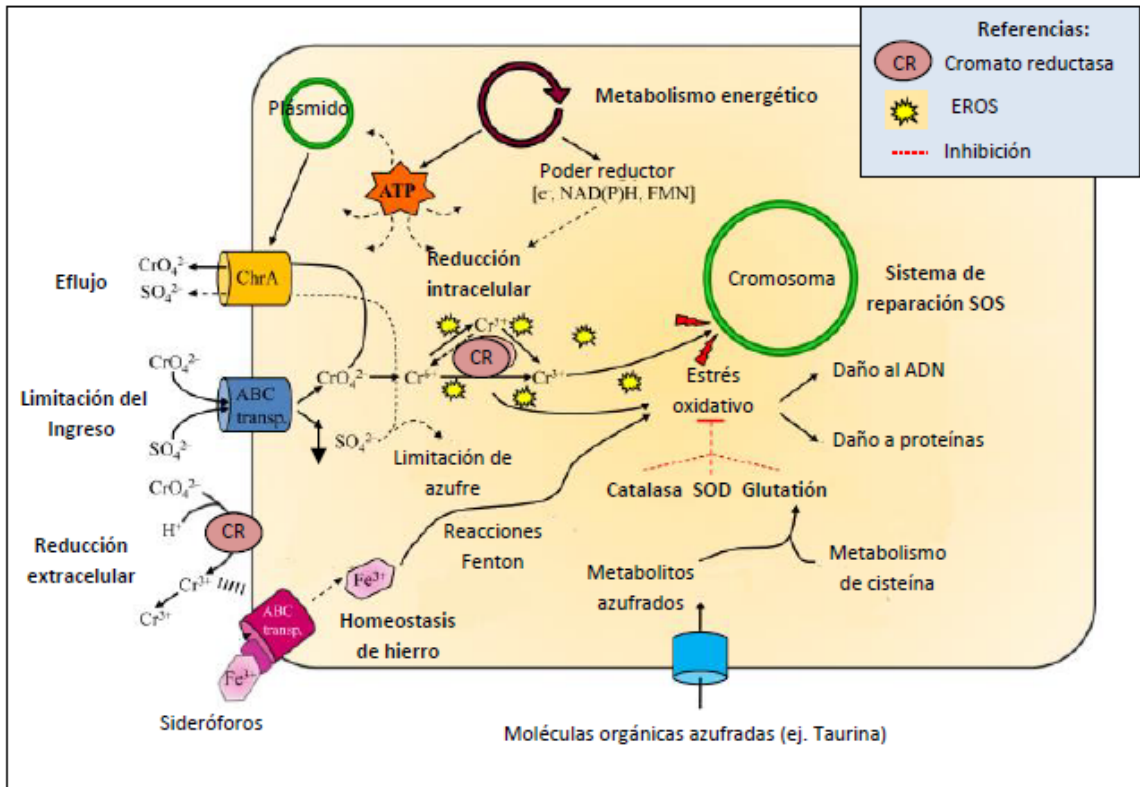


Figura 2: Mecanismos de tolerancia bacteriana a Cr(VI). Imagen extraída de Viti y col. (2014).

3.1.2. 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 provocan 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 (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 (Arora y Bae, 2014; Arora y col., 2014; Al-Khalid y El-Naas, 2012). Dentro de los mecanismos más importantes de tolerancia a fenol, podemos mencionar:

- Reestructuración de las envolturas celulares (Zhang y col., 2011). 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 Bont, 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 (Santos y col., 2007). El rol de los fosfolípidos y ácidos grasos en el mantenimiento del estado físico de las membranas bacterianas, se abordará más adelante.

- Sistemas de expulsión que regulan el movimiento de fenol hacia y desde el interior. Podemos mencionar una proteína monomérica de membrana externa del tipo OmpA (Zhang y col., 2011), las bombas del tipo RND (Resistencia-Nodulación- Protección celular) que se extienden desde la membrana interna a la externa (Roma-Rodrigues y col., 2010) y los miembros de la familia de transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) (Fernández y Hancock, 2012; Segura y col., 2012).

- Capacidad de algunos organismos para biodegradar al fenol, es decir, para emplear este compuesto aromático como fuente de carbono y energía, ya sea en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Nesvera y col., 2015; Basha y col., 2010). 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. 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, ya sea en posición *orto* ó *meta*, catalizada por catecol dioxigenasas (Johnson y Beckham, 2015; Tuan y col., 2011). Los productos finales de estas vías son β -ceto adipato (ácido *cis-cis* mucónico) y semialdehído 2- hidroximucónico, respectivamente (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 acetil-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).

- Desarrollo de sistemas antioxidantes eficientes para combatir las EROS producidas por la presencia del fenol, tales como las enzimas superóxidodismutasa (SOD), catalasa y peroxidasas (Santos y col., 2007).

La Figura 3 resume los principales mecanismos de tolerancia bacteriana a fenol.

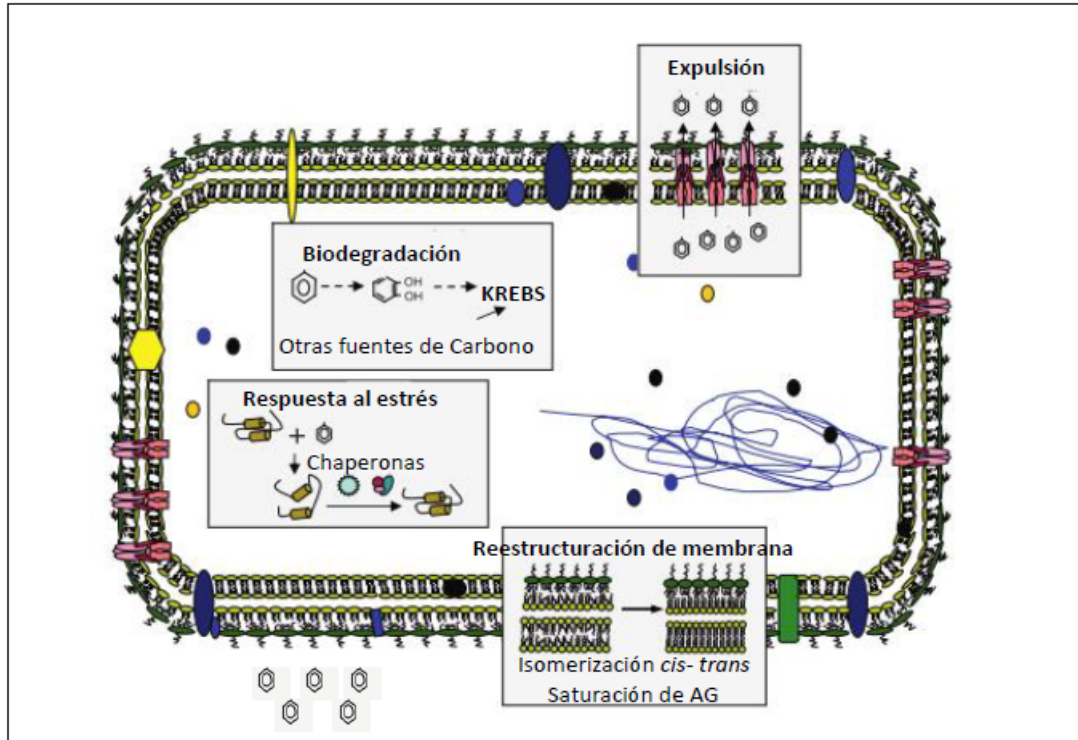


Figura 3: Principales mecanismos de tolerancia bacteriana a fenol. Imagen adaptada de Segura y col. (2012).

3.1.3. Mecanismos de tolerancia a Cr(VI) y fenol desarrollados por el consorcio SFC 500-1

Las cepas integrantes del consorcio SFC 500-1 presentan diferentes mecanismos de tolerancia y detoxificación de Cr(VI) y fenol.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que *Bacillus* sp. SFC500-1E utilizaría bombas de expulsión tipo ChrA como estrategia para eliminar el Cr(VI) del interior celular, mientras que *A. guillouiae* SFC500-1A no tendría codificantes genéticos de ese tipo de proteínas transmembrana (Ontañón y col., 2018a, 2015b). En cuanto a la capacidad para reducir Cr(VI), ambas bacterias presentaron cromato reductasas dependientes de NADH. En el caso de *A. guillouiae* SFC500-1A, de localización citoplasmática y activadas

en presencia de Cr(VI) (Ontañon y col., 2015b), mientras que las cromato reductasas de *Bacillus* sp. SFC500-1E, por el contrario, mostraron actividad constitutiva y se encontraron tanto en la fracción de membrana como en el citosol (Ontañon y col., 2018b).

En relación a los mecanismos de tolerancia a fenol, se demostró que *A. guillouiae* SFC 500-1A 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 (Ontañon y col., 2018a, 2015b). 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). *Bacillus* sp. SFC500-1E en cambio, no tendría la maquinaria metabólica para degradar fenol, a pesar de poder tolerar concentraciones elevadas del mismo (Ontañon y col., 2018b).

La siguiente Figura resume los hallazgos previos.

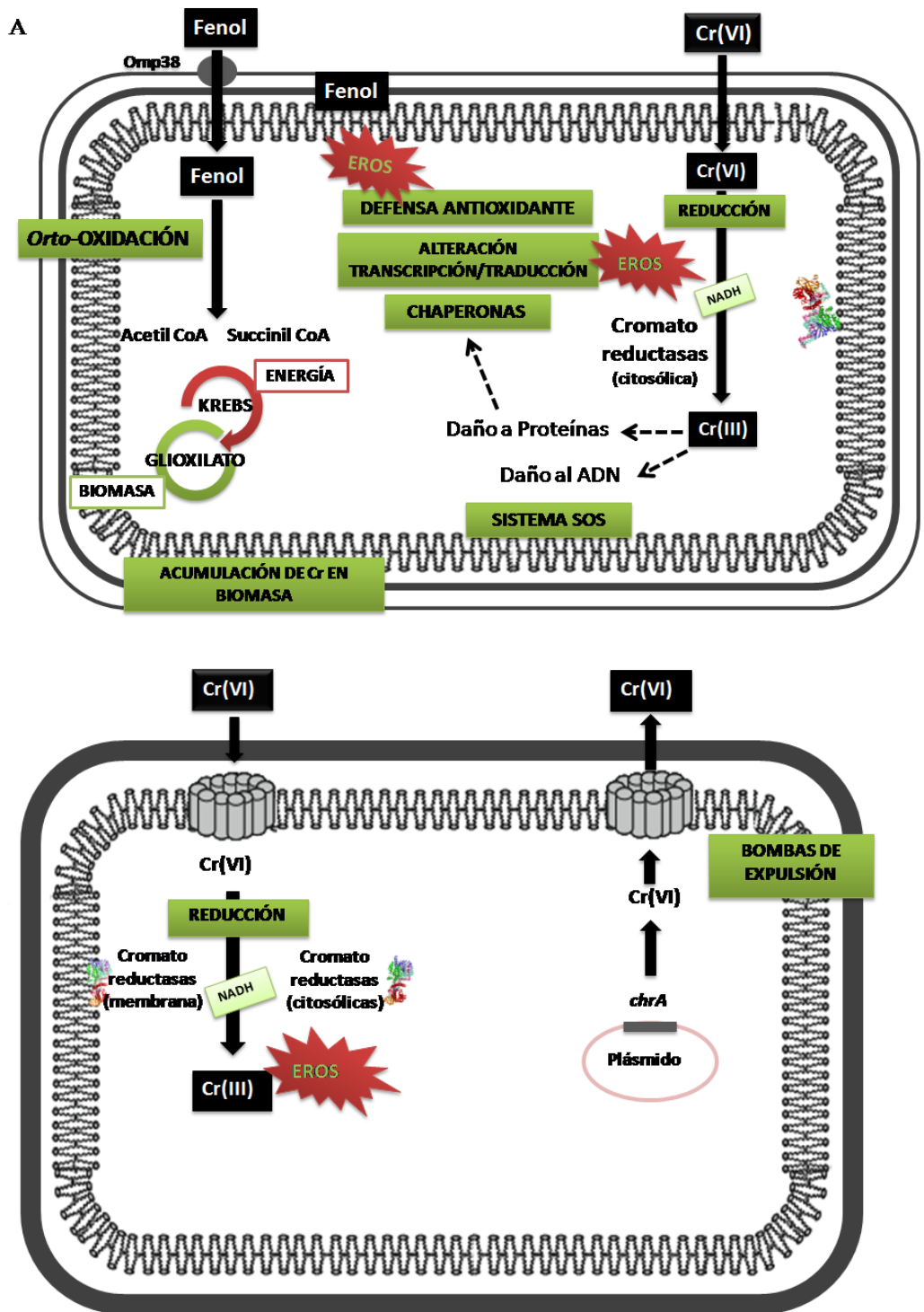


Figura 4: Principales mecanismos de tolerancia a Cr(VI) y fenol detectados en los miembros del consorcio SFC 500-1. A. *guillouiae* SFC500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC500-1E (B). Imagen extraída de Ontañón (2016).

3.2. Respuesta de las bacterias frente a Cr(VI) y fenol

3.2.1. Cambios morfológicos y ultraestructurales

Los cambios morfológicos y ultraestructurales en bacterias expuestas a contaminantes, tales como metales o compuestos orgánicos, son un fenómeno conocido (Samuel y col., 2012; Sidek, 2010). Entre estos cambios, se pueden mencionar incrementos en la longitud celular, alteraciones en las envolturas y/o superficies bacterianas, presencia de precipitados y exopolímeros, aglomeración celular, hasta la lisis celular (Jacob y col., 2018; Batool y col., 2014b; Cheung y col., 2012; Samuel y col., 2012; Sidek 2010). Estas observaciones han sido probadas con la ayuda de diferentes técnicas de microscopía. La microscopía electrónica de transmisión (*TEM*) y la microscopía electrónica de barrido (*SEM*), acoplada con espectroscopía de rayos X de dispersión de energía, permitieron detectar por ejemplo la acumulación de Cr(III) en bacterias tanto intra como extracelularmente (Li y col., 2008; Yang y col., 2007). La microscopía de fuerza atómica (*AFM*) por su parte, es una microscopía en auge y de alta resolución que permite la caracterización de las células microbianas, en términos de tamaño y morfología. Se trata de una técnica de medición a escala nanométrica, que brinda información importante sobre la interacción en tiempo real, tanto en condiciones fisiológicas como también bajo estímulos externos (Dufrêne 2014). En particular, la microscopía de fuerza atómica se ha utilizado principalmente para analizar las respuestas bacterianas a bacteriófagos líticos o antibióticos (Longo y Kasas, 2014; Dubrovin y col., 2012), sin embargo ha sido menos utilizada para estudiar las respuestas bacterianas a contaminantes ambientales (Huang y col., 2014; Yang y col., 2007).

3.2.2. Percepción del estrés: rol de la membrana celular

La membrana citoplasmática es una estructura vital para toda forma de vida celular ya que proporciona una barrera física que separa el citoplasma acuoso del entorno extracelular (Barák y Muchová, 2013).

Las dos clases principales de bacterias, Gram-positivas y Gram-negativas, difieren en la composición de su pared celular y membrana plasmática. La pared celular de bacterias Gram-positivas consiste en una gruesa capa de peptidoglicano y una sola membrana, mientras que dos membranas, una externa y una interna, están presentes en bacterias Gram-negativas

(Barák y Muchová, 2013). Los lípidos y las proteínas son los principales componentes de las membranas biológicas. En la membrana de bacterias Gram-positivas y en la membrana interna de bacterias Gram-negativas, los principales lípidos son los fosfolípidos (PLs) que están dispuestos de manera bastante uniforme, formando una bicapa lipídica simétrica. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas, por el contrario, tiene una disposición asimétrica de los PLs. La mayoría se encuentran en la cara interna de la membrana, mientras que la cara externa contiene algunos PLs, pero también proteínas y lípidos modificados llamados lipopolisacáridos (LPS) (Barák y Muchová, 2013). Además, la membrana contiene proteínas que son responsables del transporte de diferentes moléculas, así como de la señalización y transducción de energía (Siliakus y col., 2017; Strahl y Errington, 2017).

Las bacterias están habitualmente expuestas a una amplia gama de condiciones inductoras de estrés y sus membranas citoplasmáticas constituyen la primera barrera física contra éstas (Heredia y col., 2016; Pini y col., 2009). Las membranas biológicas pueden censar dicho estrés y rápidamente desencadenar múltiples reacciones de defensa para responder a los cambios ambientales y así mantener la homeostasis (Siliakus y col., 2017; Sohlenkamp y Geiger, 2015; Okazaki y Saito, 2014). El ejemplo probablemente mejor conocido de adaptación de la membrana, ocurre cuando las bacterias están creciendo a diferentes temperaturas, pH o en presencia de diferentes nutrientes y disolventes orgánicos (Siliakus y col., 2017; Sohlenkamp y Geiger, 2015; Bernal y col., 2007; Mansilla y col., 2004; Denich y col., 2003) . Sin embargo, hay poca información disponible acerca de los efectos de los metales pesados y los compuestos aromáticos, ya sea de manera independiente o simultánea, sobre las características físicas y la composición de la membrana celular bacteriana.

3.2.2.1. Estado físico de la membrana: fluidez de la membrana

Las membranas celulares son estructuras dinámicas y fluidas, es decir, que la mayoría de sus moléculas son capaces de moverse en el plano de la membrana (Mykytczuk y col., 2011). El estado físico de las membranas o su “fluidez” juega un papel importante en una variedad de funciones fisiológicas y estructurales, tales como el transporte de nutrientes, la unión de proteínas periféricas asociadas en la superficie lipídica, las velocidades de reacción de las enzimas, la protección contra ambientes externos adversos, la morfología celular e incluso en la señalización celular (Yoon y col., 2015; Jiang y col., 2017). En otras palabras, la

fluidez de las membranas se regula para asegurar el estado biológicamente activo de las mismas, lo que permite la supervivencia bacteriana en condiciones que de otro modo serían desfavorables (Murínová y col., 2014).

Se han reportado numerosos estudios sobre la fluidez de la membrana citoplásmica bacteriana en respuesta al estrés ambiental (Mykytczuk y col., 2007). Si bien hay algunas evidencias que sugieren que los metales y solventes orgánicos pueden modificar dicha fluidez (Mykytczuk y col., 2007; García y col., 2005; Ramos y col., 2002), consideramos que la información disponible resulta insuficiente por lo tanto sería necesario realizar investigaciones adicionales bajo diferentes condiciones ambientales, particularmente cuando los microorganismos en estudio son expuestos a Cr(VI) y fenol, ya sea de manera independiente o en simultáneo.

Existen varios métodos analíticos para medir y/o estimar la fluidez de la membrana, tales como difracción de rayos X, calorimetría de barrido diferencial (DSC), resonancia de espín electrónico (ESR), resonancia magnética nuclear (RMN) y polarización de fluorescencia (Mykytczuk y col., 2007). Entre éstos, la polarización de fluorescencia que emplea sondas tales como 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) es sensible, simple y rápida, proporcionando datos reales y en tiempo real sobre la membrana citoplásmica (Trevors 2003). Esta sonda, presenta un cambio significativo en la longitud de onda de excitación desde 358 nm hasta su emisión fluorescente a 428 nm. DPH se caracteriza por ser hidrofóbico y por ende asociarse con las colas lipofílicas de los fosfolípidos en la membrana citoplásmica, sin alterar su estructura. La polarización de fluorescencia se determina por la excitación de la sonda con luz polarizada y la medición de la luz polarizada emitida en el mismo plano que la excitación, y también a 90° en el plano de excitación. Cuanto menos libertad tenga la sonda para rotar, más luz emitirá en el mismo plano que la luz excitada, y menos luz emitirá a 90° en el plano de excitación. Por lo tanto, se puede estimar indirectamente una relación entre la cantidad de luz polarizada emitida y el orden o la fluidez de la membrana (Slavik 1994). En otras palabras, la relación entre la polarización de fluorescencia y la fluidez de la membrana es inversa, donde el aumento de los valores de la relación de polarización corresponde a un entorno de membrana más rígido y viceversa (Mykytczuk y col., 2011). El valor de polarización de fluorescencia obtenido y por ende la fluidez de la membrana se relaciona con el grado de empaquetamiento geométrico de sus PLs, un proceso gobernado por la composición del grupo de cabeza polar y

la fracción de ácido graso (Cesari y col., 2016; Sohlenkamp y Geiger, 2015; Yoon y col., 2015; Sharmila y col., 2013).

3.2.2.2. Implicancia de los ácidos grasos (AG) en la fluidez de membrana

La composición y los niveles de ciertos AG aumentan o disminuyen de acuerdo con el estrés ambiental, como mecanismo adaptativo microbiano. Las membranas citoplasmáticas que contienen ácidos grasos saturados (SFA) y de cadena larga están densamente empaquetadas, por lo que carecen de fluidez, mientras que las que están compuestas por ácidos grasos insaturados (UFA) están dispuestas de forma más laxa y son más fluidas (Sharmila y col., 2013; Moorman y col., 2008). La relación de UFA/SFA (ácidos grasos insaturados/saturados) es el parámetro más importante que afecta la fluidez y la rigidez de las membranas en la mayoría de las bacterias. Sin embargo, hay otros moduladores, que incluyen la presencia de ácidos grasos hidroxilados (HFA), ácidos grasos de ciclopropano (CFA), ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) e isomerización *cis/trans*, así como la relación *anteiso/iso* de los UFA (Cesari y col., 2016; Smulek y col., 2015; Markowicz y col., 2010).

Por otro lado, los lípidos son los principales blancos de las EROS generadas tanto por la reducción de Cr(VI) a Cr(III), como por la exposición a fenol. En este sentido, 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).

3.2.2.3. Implicancia de los PLs estructurales en la fluidez de membrana

Una variedad de diferentes grupos polares de los PLs son sintetizados por las bacterias para generar la carga superficial óptima de la membrana celular (Parsons y Rock, 2014). La mayoría de las membranas bacterianas contienen principalmente PLs aniónicos tales como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y zwitteriónicos como la fosfatidiletanolamina (PE). Otros PLs como por ejemplo fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilcolina (PC), se pueden encontrar en cantidades más pequeñas o en bacterias específicas (Sohlenkamp y Geiger, 2015; Sohlenkamp y col., 2003). Diferentes especies bacterianas muestran diferentes composiciones de membrana, e incluso la composición de la membrana de las células que

pertenecen a una misma especie no es constante, sino que depende de las condiciones ambientales a las que están expuestas dichas células (Sohlenkamp y Geiger, 2015).

Los cambios en los grupos de cabeza de PLs influyen en la fluidez de la membrana, aunque estos cambios son un fenómeno menos estudiado y hay pocos datos publicados (Rowlett y col., 2017; Pini y col., 2009; Bernal y col., 2007). De hecho, las fosfolipasas, entre ellas las fosfolipasas A, D, C, son algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo y recambio de los PLs (Dennis 2015).

Como intermediarios en el metabolismo y el recambio de PLs, los lisofosfolípidos (Lyso-PLs) se producen a través de la hidrólisis mediada por la fosfolipasa A (PLA) de los ácidos grasos en la posición *sn*-1 o *sn*-2 de un PL (generalmente PE, PC) a Lyso-PL y un ácido graso libre (Istivan y Coloe, 2006; Song y Rhee, 2001). La actividad de PLA₂ secretada y unida a membrana ha sido descrita en bacterias, hongos y protozoos (Matoba y col., 2002; Ghannoum 2000). Además, está reportado que la PLA₂ bacteriana se activa bajo diversas condiciones de estrés (Cesari y col., 2018; Zheng y col., 2017; Belosludtsev y col., 2014; Istivan y Coloe, 2006).

3.2.2.4. Participación de otros PLs en mecanismos de señalización celular

Los mecanismos moleculares por los cuales la información extracelular es recibida, transducida y convertida en respuestas intracelulares específicas, son de vital importancia para la célula, sin embargo, en las bacterias estos mecanismos aún son en gran parte desconocidos. Por lo tanto, a continuación nos referiremos a los antecedentes ampliamente descritos para células eucariotas, y realizaremos comparaciones con lo que se conoce hasta el momento en bacterias.

Para sobrevivir frente a condiciones ambientales desfavorables, los organismos vivos deben, en primer lugar, reconocer el estrés y rápidamente desencadenar múltiples reacciones de defensa (Okazaki y Saito, 2014). En los últimos años aumentaron las evidencias indicando que los PLs no solo están involucrados en la iniciación de las reacciones de defensa como mediadores de la señal frente a un estrés, sino que también actuarían en procesos para su mitigación (Yong-Nan y col., 2017; Ruelly y col., 2014; Eyster 2007). En plantas se ha descrito que la producción de lípidos biológicamente activos resulta de la acción de lípido quinasas o fosfolipasas como se esquematiza en la Figura 5.

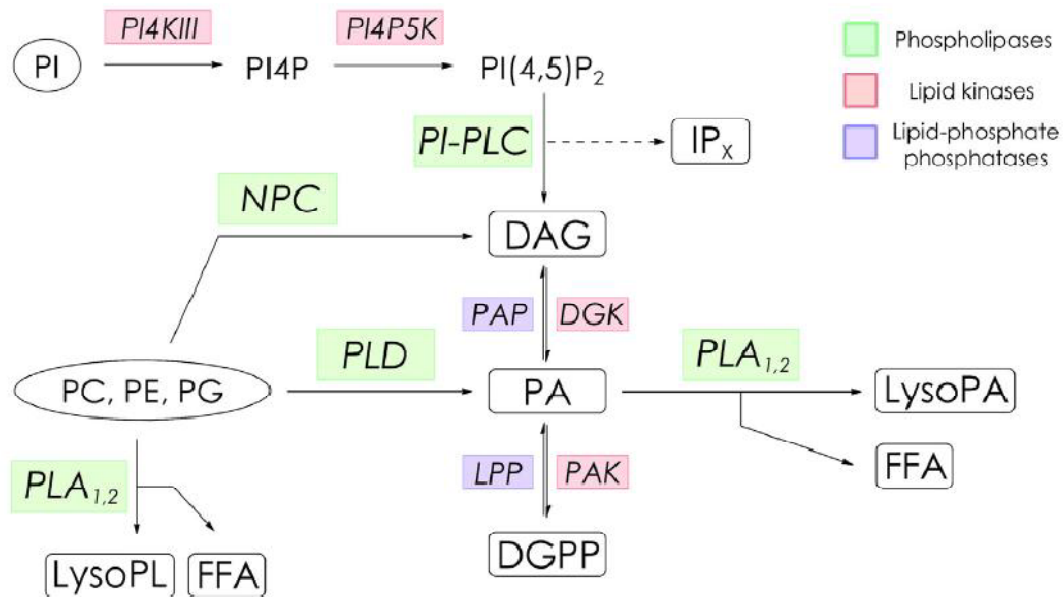


Figura 5: Vías de fosfolípidos señal en plantas. DAG, diacilglicerol; DGK, diacilglicerol quinasa; DGPP, diacilglicerol pirofosfato; FFA, ácidos grasos libres; IP_x, polifosfato de inositol; LysoPA, ácido lisofosfatídico; LysoPL, lisofosfolípidos; LPP, lípido fosfato fosfatasa; NPC, fosfolipasa C no específica; PA, ácido fosfatídico; PAK, ácido fosfatídico quinasa; PAP, ácido fosfatídico fosfatasa; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PI4K, fosfatidilinositol 4-quinasa; PI4P5K, fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa; PI4P, fosfatidilinositol 4-fosfato; PI(4,5)P₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PI-PLC, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol; PLA, fosfolipasa A; PLD, fosfolipasa D. Esquema tomado de Ruelland y col. (2014).

3.2.2.4.1. Los fosfoinosítidos (PPI_n)

Los PPI_n son componentes minoritarios de membranas celulares de eucariotas y representan aproximadamente el 1% de los PLs totales en mamíferos, con fosfatidilinositol como el PPI_n más abundante (Payrastra y col., 2001). Su presencia en una membrana dada y sus niveles están determinados por lípido quinasas, fosfatasa y fosfolipasas (De Craene y col., 2017). En la Figura 5 se observan dos PPI_n, el fosfatidilinositol 4- fosfato (PI4P) y el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂) denominados de esta manera ya que son compuestos que derivan del myo-inositol (Ins) (y más sencillamente denominados PIP y PIP₂). El PI(4,5)P₂ es considerado como uno de los PPIs más estudiados debido a su importancia como molécula señal en células vegetales. Éste se forma por una primera fosforilación llevada a cabo por la fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4-K), la cual permite la formación de PI4-P, que luego es nuevamente fosforilado por la PI5-K, para formar el PI(4,5)P₂. Además de las

funciones en la transducción de señales del PI4-P y PI(4,5)P₂, ambos lípidos presentarían funciones claves en otros procesos celulares en plantas y mamíferos, tales como en la regulación de la arquitectura del citoesqueleto para la endocitosis, modificando la actividad enzimática o actuando durante la fusión vesicular (De Craene y col., 2017; Ruelland y col., 2014; Racagni-Di Palma y col., 2002).

Las vías de señalización basadas en lípidos derivados del inositol, están poco estudiadas en bacterias (Morita y col., 2011). Esto puede deberse probablemente al hecho de que pocas bacterias pueden formar PI. Hasta el momento, sólo se reportó la síntesis de PI en el orden *Actinomycetales*, pero fuera de este orden, solo se ha descrito que unas pocas bacterias como *Myxococcus*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Corynebacterium* formarían PI, mientras que *Mycobacterias* formarían PI3P (Lorenzen y col., 2014; Morita y col., 2011; Nampoothiri y col., 2002; Jackson y col., 2000; Trana y col., 1980). La escasa información disponible se focaliza exclusivamente sobre la implicancia del metabolismo de los PPIIn en la patogenicidad y la virulencia de muchos patógenos humanos, lo que les permite sobrevivir y replicarse en las células del huésped. En otras palabras, los PPIIn son importantes para facilitar la fagocitosis de bacterias patógenas, proceso que está mediado por PI(3)P y PI(3,5)P₂. Las bacterias patógenas han desarrollado estrategias sofisticadas para eludir de la respuesta inmune innata, usando enzimas tales como fosfatasas y quinasas que metabolizan los PPIIn mencionados y así bloquean la maduración del fagosoma (Beresford y col., 2010). En este sentido, se han reportado algunas actividades lípido-quinasas y fosfatasas que si bien son de origen bacteriano, estarían ejerciendo su acción sobre PPIIn de sus células huésped (eucariotas). Tal es el caso de una enzima de *Mycobacterias* (Pips) que cataliza la reacción entre el inositol-1-fosfato y el CDP-DAG, lo que conduce a la formación de fosfatidilinositol fosfato (PIP); en un segundo paso, PIP se defosforila mediante PIP fosfatasa (Pipp) a PI (Morii y col., 2014; Morii y col., 2010). Otra bacteria como *Legionella micdadei* por ejemplo, posee una lípido quinasa que fosforila PI a pesar de carecer de la capacidad de sintetizar PI (probablemente esta quinasa fosforile el PI del huésped) (Saha y col., 1989), mientras que *Rhizobium leguminosarum* posee una actividad fosfotransferasa que puede generar PI4P transfiriendo fosfato del lípido A al PI. Sin embargo, ni el sustrato PI ni el producto PI4P se detectaron en estas membranas bacterianas, lo que llevó a los autores a sugerir que PI4P procedería de las células que infectan. Por otro lado, Hilbi (2006) reportó actividad PI(4)P(5)K, que produciría PI(4,5)P₂ en

el sitio de entrada de *Yersinia* spp., a su célula huésped. Mientras que más recientemente Dong, y col. (2016) identificaron actividad PI4K en *Legionella pneumophila*.

En estrecha relación con los PPIIn, podemos mencionar a la enzima fosfolipasa C (PLC), que conduce a la hidrólisis de PI(4,5)P₂ formando dos segundos mensajeros en plantas, tales como inositolhexafosfato (InsP₆) el cual permite la liberación de calcio de reservorios intracelulares y por otro lado, el ácido fosfatídico (PA) como segundo mensajero lipídico (Munnik 2014) (Figura 5). A diferencia de lo que ocurre en plantas, la actividad de la PLC en mamíferos conduce a la formación de inositoltrifosfato (InsP₃) y diacilglicerol (DAG) (De Craene y col., 2017; Cocco y col., 2015). El InsP₃ también permite la liberación de calcio almacenado en reservorios intracelulares, mientras que el DAG se mantiene anclado a la membrana y activa a miembros de la familia de las proteína quinasa C (PKC). En bacterias por su parte, la acción de la PLC específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) cataliza la escisión de PI o sus derivados fosforilados (PPIs) para producir el myo-inositol fosforilado y DAG. Este último, es convertido rápidamente en ácido fosfatídico (PA) (Griffith y Ryan, 1999). La PLC, a diferencia de las quinasa de PPIIn, es producida por una gran variedad de bacterias, sean estas Gram-positivas aeróbicas o anaeróbicas, patógenas y no patógenas, así como bacterias Gram-negativas anaerobias facultativas (Sohlenkamp y Geiger, 2015; Korbsrisate y col., 2007; Griffith y Ryan, 1999).

En relación a la implicancia de estas vías de señalización en la respuesta a diferentes factores estresantes, podemos mencionar que varios sistemas vegetales han mostrado un incremento relativamente rápido en la síntesis de PIP₂ bajo estrés salino, osmótico o por calor (Horváth y col., 2012; Darwish y col., 2009), mientras que otras plantas han mostrado además de un incremento en la síntesis de PIP₂, un aumento de PIP, ácido lisofosfatídico (LPA), diacilglicerol pirofosfato (DGPP) y PA bajo exposición a metales y metaloides como el aluminio y el arsénico (Armendariz y col., 2016; Martínez-Estévez y col., 2003) y compuestos aromáticos como fenol (Ibañez y col., 2016). El papel preciso que desempeñan por los lípidos biológicamente activos de las membranas bacterianas en la adaptación a estrés abiótico sigue siendo difícil de dilucidar (Rowlett y col., 2017). En términos generales, aunque se investigaron algunas funciones de los fosfolípidos mediante la comparación de cepas mutantes y de tipo salvaje, poco es lo que se sabe sobre su papel como moléculas de señalización en respuesta a los cambios ambientales. De acuerdo a nuestro conocimiento,

hasta el momento existe un sólo trabajo (Morita y col., 2010) donde se describe la síntesis transitoria de un PPIIn bacteriano (PI3P) en respuesta a estrés salino.

3.2.2.4.2. El Ácido fosfatídico (PA)

El PA es el PL más simple de la membrana de células eucariotas y procariotas y constituye un intermediario esencial para la biosíntesis *de novo* de todos los glicerolípidos y por ende en su biogénesis (Dowhan 2013; Yao y Rock, 2013).

En relación al PA como mensajero lipídico intracelular, se han descrito diversos modos de acción de este PL en eucariontes, ya sea interactuando directamente con proteínas o enzimas a través de dominios específicos de unión, regulando su actividad, o alterando la estructura y metabolismo de la membrana, mediante el reclutamiento de moléculas (Testerink y Munnik, 2011; Raghu y col., 2009; Roth 2008; Wang y col., 2006). Más aún, se ha establecido que la señal del PA se puede desencadenar mediante diferentes modos de acción, incluyendo la unión directa a las proteínas o indirectamente mediante efectos biofísicos sobre las membranas. La unión de PA a proteínas tiene dos efectos importantes; secuestro de la molécula blanco en la membrana plasmática o inducción de cambios conformacionales en cooperación con otros lípidos señales, los cuales pueden provocar efectos inhibitorios o modular la actividad de la proteína/enzima (Li y col., 2009). El efecto biofísico sobre las membranas incluye cambios en la curvatura e integridad de las mismas, y/o adicionalmente en la interacción proteína-membrana.

La señal mediada por PA, puede ser producida por múltiples enzimas y la activación de estas enzimas específicas, regularía la duración, localización y especies moleculares de PA. En este sentido, la biosíntesis de PA en plantas puede ser catalizada por varias enzimas (Figura 5), entre ellas: mediante la acción de PLC que actúa de manera inespecífica sobre lípidos estructurales; diacilglicerol quinasa (DGK), mediante fosforilación del DAG; por acción de la fosfolipasa D (PLD) que hidroliza enlaces ésteres de fosfolípidos estructurales de la membrana por ejemplo, fosfatidilcolina (PC); acil transferasas, que actúan adicionando ácidos grasos a moléculas de LPA. Sin embargo, la bibliografía vigente sugiere que la acción dual de la PI-PLC (fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol)/DGK y de la PLD, son las principales vías de producción de PA en eucariotas (Pokotylo y col., 2014; Cai y col., 2013; Peng y Frohman, 2013; Arisz y col., 2009; Wang y col., 2006). Tanto la actividad PLC inespecífica de

fosfolípidos, como la actividad PLD y DGK, han sido identificadas en bacterias tales como *Sinorhizobium meliloti*, *Streptomyces chromofuscus* y *E. coli*, respectivamente (Parsons y Rock, 2014; Zavaleta-Pastor y col., 2010; Yang y Roberts, 2002; Badola y Sanders, 1997).

Por otro lado, existen varias reacciones enzimáticas que promueven la remoción del PA en plantas, tales como: 1) la reacción catalizada por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (PAP), que lo desfosforila para formar DAG; 2) la fosfolipasa A (PLA) selectiva de PA, que lleva a cabo su desacetilación formando LysoPA y ácidos grasos libres (FFA); 3) la fosfatidato quinasa (PAK), que promueve la formación del diacilglicerol pirofosfato (DGPP) (Tang y col., 2015; Kooijman y Testerink, 2010; Wang y col., 2006).

En bacterias, se ha identificado una actividad fosfatasa de PA a partir de la fracción de membrana de *Escherichia coli*, *Streptomyces coelicolor*, *Geobacillus toebii* (Comba y col., 2013; Zhang y col., 2008; Van Den Bosch y Roy Vagelos, 1970). Las vías de remoción del PA permiten la producción de nuevos segundos mensajeros lipídicos, entre ellos DAG, ácidos grasos libres, LysoPA y DGPP. Sin embargo, poco se conoce sobre su rol en bacterias.

En resumen, el PA ha surgido como un importante lípido mediador de diferentes funciones celulares en organismos eucariotas. Se han observado aumentos en la concentración de PA en diversas condiciones de estrés en plantas, tales como frío, congelamiento, heridas, ataque por patógenos, deshidratación, salinidad, falta de nutrientes, inducción de nódulos, estrés oxidativo (Okazaki y Saito, 2014), y frente a calor en hongos (Yong-Nan y col., 2017). En la fisiología bacteriana, en cambio, el rol del PA es poco conocido y hay escasos informes sobre su rol en respuesta a factores estresantes (Yong-Nan y col., 2017). En este sentido, sólo podemos mencionar que la acumulación de PA en *E. coli* confirió aumento de la resistencia al antibiótico vancomicina (Suterlin y col., 2014).

3.2.3. Producción de exopolímeros y formación de biofilm

Frente a compuestos tóxicos, los microorganismos pueden desarrollar otras respuestas adaptativas lo cual les permitiría aumentar la capacidad de remoción, que se basan en la producción de sustancias poliméricas extracelulares y la formación de biofilm (Koechler y col., 2015; More y col., 2014). Las sustancias poliméricas extracelulares son mezclas complejas de biopolímeros microbianos de alto peso molecular, como exopolisacáridos (EPS), proteínas, ácidos nucleicos, ácidos urónicos, sustancias húmicas, lípidos, entre otras (Koechler

y col., 2015). Éstos permiten la captación o la unión de metales y metaloides debido a la presencia de diversos grupos funcionales cargados negativamente, que dan lugar a la formación de complejos, tanto con metales pesados como con contaminantes orgánicos y su posterior eliminación (Gupta y Diwan, 2017; Li y Yu, 2014). Se conoce que las sustancias poliméricas extracelulares unen una gran variedad de metales, incluyendo Pb, Cu, Mn, Mg, Zn, Cd, Fe y Ni (Pal y Paul, 2008). En relación a compuestos orgánicos, Kang y Park (2010), observaron la producción de EPS por *Acinetobacter* sp. DR1 creciendo en presencia de aceite diesel y n-hexadecano, donde los EPS podrían desempeñar un papel protector contra la toxicidad de estos contaminantes, favoreciendo su biodegradación. Con respecto a la producción de biofilm, se conoce que está formado por un conjunto de microorganismos unidos a una superficie biológica o inerte, e inmersos en una matriz de exopolímeros auto-sintetizados. La formación de biofilms es un mecanismo eficiente para la biorremediación, ya que éstos alcanzan una alta densidad microbiana y absorben e inmovilizan diversos contaminantes ambientales. La biorremediación mediada por biofilms representa una alternativa competente y más segura que la desarrollada por microorganismos planctónicos, porque las células en un biofilm tienen más posibilidades de adaptación y supervivencia (especialmente durante los períodos en contacto con los contaminantes), ya que están protegidas dentro de la matriz (Sutherland 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico y conservación

Se utilizó el consorcio bacteriano denominado SFC 500-1 integrado por *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (en una proporción 20:1, respectivamente), microorganismos capaces de remediar eficientemente Cr(VI) y fenol de manera simultánea. Este consorcio fue aislado a partir de sedimento de los canales de descarga de efluentes a cielo abierto de una curtiembre, situada en la cuenca del arroyo El Barreal-Elena (Cba) (Ontañón y col., 2015a).

Las bacterias fueron mantenidas en medio TY sólido (Beringer 1974) (g/L): tripteína (5), extracto de levadura (3), CaCl₂ (0,52) y agar (12), suplementado con 20 mg/L de Cr(VI) [añadido como K₂Cr₂O₇ (Sigma)] y 100 mg/L de fenol (Merck). Las placas fueron incubadas a 28±2°C y sub-cultivadas semanalmente. Además, las cepas fueron conservadas a largo plazo en glicerol a -80°C.

4.2. Efecto del Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre la morfología y superficie celular de los microorganismos que integran el consorcio SFC 500-1

4.2.1. Microscopía Óptica (MO)

La morfología de los microorganismos sometidos a los distintos tratamientos fue analizada por tinción de Gram mediante microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), acoplado a una cámara digital Canon Powershot G6, 7,1 megapíxeles (Canon, Japón).

4.2.2. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, de sus siglas en inglés Atomic Force Microscope)

Para evaluar el efecto de Cr(VI), fenol y de ambos contaminantes simultáneamente en la morfología de cada uno de los microorganismos, éstos fueron observados mediante *AFM*.

El soporte empleado para este análisis fue vidrio de 2,5 x 2,5 cm y 2 mm de espesor que fue lavado en primera instancia, con detergente y colocado en una solución de KOH/etanol (1:3), durante 12 h. Posteriormente, para eliminar restos de la solución anteriormente empleada, se lo enjuagó varias veces con agua Milli-Q. Para la inmovilización de las bacterias

en el soporte, éste fue cargado positivamente mediante un depósito de polietilenimina (PEI), para ello se expuso la superficie del vidrio a una solución de PEI/agua al 0,1% durante 12 h a 4°C y finalmente el soporte fue lavado con agua Milli-Q y secado a 30°C (Braga y Ricci, 2011; Morris y col., 2010).

Posteriormente, cultivos bacterianos de 16 h, creciendo con los contaminantes y en medio TY (control), fueron diluidos hasta obtener una densidad óptica $D.O_{(600)}=0,4$. Se centrifugaron 200 μ L de la suspensión bacteriana a 6.000 rpm durante 2 min, se lavaron tres veces con agua Milli-Q y se resuspendieron en 200 μ L de agua Milli-Q. Luego, 20 μ L de las suspensiones bacterianas fueron inmovilizadas sobre el vidrio a 30°C, durante 30 min. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, Agilent Technologies SPM, modelo 5500), en modo acústico y utilizando una sonda (Micromasch, HQ: XSC11/A1 BS) con una frecuencia de resonancia en voladizo y una constante de fuerza de 155 KHz y 7 N/M, respectivamente. El tamaño del escáner empleado para la visualización de las células fue de 40x40 y 10x10 μ m. La longitud, el ancho y la altura de 80 microorganismos se midieron utilizando un programa de libre acceso, Gwyddion v2.39.

4.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, de sus siglas en inglés Scanning Electron Microscope)

Con el objetivo de observar y caracterizar el biofilm desarrollado por *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo en condiciones control y expuesto a los contaminantes, se utilizó un SEM (JEOL Modelo JSM 6480 LV –Japón-).

El cultivo bacteriano fue expuesto a 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y a ambos contaminantes simultáneamente, durante 16 h. Posteriormente, alícuotas de 2 mL de cada cultivo fueron centrifugadas, los *pellets* se fijaron con glutaraldehído 2,5% durante 12 h a 4°C, seguido de un lavado con agua destilada. Luego, las muestras fueron deshidratadas utilizando soluciones de concentración creciente de etanol y se secaron por punto crítico empleando dióxido de carbono (Denton Vacuum DCP1). Posteriormente se fijaron con cinta bifaz sobre soportes de aluminio, recubiertas con oro, Denton Vacuum DeskIV (22-24 nm de espesor) y se observaron en el microscopio.

4.3. Efecto del Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre la ultraestructura celular de las bacterias que integran el consorcio SFC 500-1

4.3.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM, de sus siglas en inglés Transmission Electron Microscope)

La ultraestructura bacteriana se observó utilizando TEM (JEOL JEM 12EXII, Japan). Para ésto, el cultivo bacteriano fue crecido con 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes simultáneamente, durante 16 h. Posteriormente, alícuotas de 2 mL de cada cultivo fueron centrifugadas y los *pellets* se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en solución tampón *s-collidine* (0,2 M, pH 7,4), durante 3 h a 4°C. Luego se lavaron con la misma solución y se fijaron con tetróxido de osmio al 1%. Las muestras se deshidrataron con acetona, la pre-inclusión se realizó en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100%, y la inclusión con EMBED 812 se realizó a 56°C. Se obtuvieron cortes semifinos utilizando un ultra micrótopo manual (Sorvall MT-1A, DuPont), que fueron teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico para la elección de la zona de interés. Los cortes ultrafinos (20-60 nm) se realizaron con cuchilla de diamante (PelcoR), se colocaron sobre grillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Ackerley y col., 2006; Bencosme y TsutSumi, 1970).

4.4. Ensayo de remoción de Cr(VI) por biomasa inactivada y células viables

Se utilizaron células de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E viables e inactivados por calor para evaluar la capacidad de remoción de Cr(VI) dada por adsorción (en presencia y ausencia de fenol), en medio líquido.

Para ello, se realizaron cultivos de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E en medio TY durante 18-24 h a 28°C, 150 rpm, y la $D.O_{(600\text{ nm})}$ se ajustó a 1,5. Luego, una parte de los cultivos bacterianos se almacenó a 4°C (células viables), mientras que la otra parte de los cultivos se sometió a inactivación por calor (autoclave: 110°C, 0,75 presión atmosférica, 20 min) (biomasa inactivada).

Posteriormente, frascos Erlenmeyers de 50 mL conteniendo 20 mL de los cultivos (bacterias viables e inactivadas) se suplementaron con 25 mg/L de Cr(VI) y Cr(VI)-fenol en simultáneo (25 mg/L -300 mg/L). Se emplearon frascos Erlenmeyers conteniendo la misma

cantidad de medio TY con Cr(VI) y fenol sin inocular, como controles. Todos los cultivos se incubaron a 28°C y 150 rpm, durante un período de 16 h, y luego se cuantificó el contenido de Cr(VI) residual en el medio de cultivo (*sección 4.9.1*).

4.5. Efecto del Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre características y composición de la membrana de las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1

4.5.1. Determinación de la fluidez de la membrana

La fluidez de la membrana se determinó midiendo la polarización de fluorescencia (Pf) de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH, Invitrogen) inserta en las membranas citoplasmáticas. La Pf cuantifica el grado de despolarización de la luz emitida por la sonda de fluorescencia inserta en la membrana y es una medida de su estado (Mykytczuk y col., 2007). La relación de la polarización de la sonda y la fluidez de la membrana citoplasmática está inversamente correlacionada. Cuando la fluidez de la membrana aumenta, la relación de polarización disminuye y viceversa (Litman y Barenholz, 1982).

Células de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E fueron cultivadas durante 16 h en medio TY suplementado con los contaminantes (25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes en simultáneo) o sólo en medio TY (control), cosechadas y lavadas con solución tampón Tris-HCl (15 mM, pH 7) y posteriormente resuspendidas en el mismo buffer hasta una $D.O_{(600\text{ nm})}=0,2$. Los cultivos bacterianos conteniendo los contaminantes, se utilizaron para determinar la Pf luego de 16 h de exposición a éstos (tiempo de exposición prolongada), mientras que los cultivos crecidos sólo en medio TY (controles) fueron utilizados para dos fines:

- Como control sin contaminantes de los ensayos de exposición prolongada (16 h).
- Para realizar determinaciones del grado de polarización a tiempos de exposición cortos (*shock*) a los contaminantes: después de 10, 20, 30 y 60 min de añadidos el Cr(VI), el fenol y ambos.

Las mediciones de polarización de fluorescencia (Pf) se realizaron añadiendo 1 µL de la sonda fluorescente (solución madre diluida a 12 mM en tetrahidrofurano), por cada alícuota de 3 mL de cultivo bacteriano, para obtener una concentración de la sonda de 4 µmol/L. Los

cultivos fueron incubados en un agitador magnético a 200 rpm durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente para permitir la incorporación del DPH en las membranas citoplasmáticas. Se utilizó un espectrofluorómetro Hitachi 2500 (Chiyoda, Tokio, Japón) con un polarizador Glam-Thomson. La longitud de onda de excitación para la sonda DPH fue de 358 nm y la longitud de onda de emisión fue de 428 nm. El ancho de hendidura para los rayos de excitación y emisión fueron 12 y 10 nm respectivamente. El grado de polarización fue calculado a partir de la relación de polarización (Pf) utilizando la expresión $Pf = (IVV - IVHG)/(IVV + IVHG)$, donde IVV e IVH son las intensidades de las componentes polarizadas vertical y horizontalmente de la luz emitida, después de la excitación por luz polarizada verticalmente, y G es el factor de sensibilidad del sistema de detección (Lakowicz 1999).

4.5.2. Extracción de lípidos totales

Cultivos bacterianos de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E 16 h creciendo con los contaminantes (tratados) y en medio TY (control), fueron lavados y la biomasa húmeda obtenida se empleó para la extracción de lípidos totales. Para esto, se utilizó una mezcla cloroformo/metanol/agua, según lo descrito por Bligh y Dyer (1959), luego se agregó una solución 0,1M KCl en 50% de metanol para la obtención de una fase inferior clorofórmica y una fase superior acuosa. La fase inferior conteniendo los lípidos, fue lavada dos veces con la misma solución de KCl, secada bajo flujo de N₂ y resuspendida en un volumen apropiado de cloroformo/metanol 2:1 (v/v).

4.5.2.1. Perfil de PLs

Se determinó el perfil de fosfolípidos de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, previa extracción de lípidos totales (sección 4.5.2) a partir de cultivos bacterianos suplementados con 0,5 µCi de acetato de sodio (1-¹⁴C). Luego, se procedió a la separación y cuantificación de los PLs.

4.5.2.2. Separación y análisis de PLs marcados con [1-¹⁴C]

Alícuotas de los extractos lipídicos totales fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC: gel de sílice HLF, Analtech) usando una mezcla cloroformo/metanol/agua 65:25:2 (v/v/v) como disolvente. Los lípidos se detectaron con vapores de yodo y fueron

identificados por comparación con los estándares purificados comerciales (Sigma). Cada uno de los lípidos fue raspado de las placas de TLC y las fracciones se cuantificaron por mediciones de radiactividad, utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C, Brea, California).

4.5.2.3. Obtención de FAMES (de sus siglas en inglés *Fatty Acids Methyl Esters*)

Con el fin de obtener los ácidos grasos derivatizados para la técnica de Cromatografía Gaseosa (GC) en la forma de FAMES, los ácidos grasos fueron liberados de los PLs y metilados según la técnica de Morrison y Smith (1964), utilizando trifluoruro de boro en metanol. Los FAMES obtenidos, fueron analizados utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 II equipado con una columna altamente polar (HP88) de cianopropilo (longitud 60 m; diámetro interior 0,25 mm; espesor de la película 0,2 μ m) y un detector de ionización de llama. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: temperatura del inyector, 250°C, temperatura del detector, 300°C y nitrógeno como gas transportador. La temperatura de la columna fue programada a 120°C durante 1 min y luego 10°C min⁻¹ hasta 175°C manteniéndose durante 10 min, 5°C min⁻¹ hasta 210°C durante 5 min y 5°C min⁻¹ hasta 230°C durante 5 min. Los picos correspondientes a cada ácido graso fueron identificados usando testigos puros provistos por Sigma-Aldrich Chemical Co (Kates 1972).

4.6. Medición de la actividad PLA

La actividad PLA se midió según Holk y col. (2002) con algunas modificaciones, en las bacterias pertenecientes al consorcio SFC 500-1 expuestas a Cr(VI) (25 mg/L), a fenol (300 mg/L) y a ambos contaminantes (25 mg/L-300 mg/L), después de 1 h de tratamiento.

Se preparó un liposoma de Acyl 12:0 NBD-PE (1-acil-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4yl)amino]dodecanoil}-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) secando un volumen determinado (30 μ L) de sustrato fluorescente Acyl 12:0 NBD-PE bajo atmósfera de N₂ y resuspendiendo en igual volumen de Tris 50 mM pH 8, KCl 100 mM y cremofor 0,1% p/v. Luego, se lo dejó 12 h a 4°C, y posteriormente se preparó el liposoma realizando 6 ciclos de 15 seg c/u de vortex-sonicado-hielo.

Para la mezcla de reacción se usó buffer Mes-KOH pH 6,8 y CaCl₂ 1 mM, 3 μ L del liposoma de NBD-PE anteriormente descrito y 40 μ g de proteínas, hasta un volumen total de

100 μ L. Dicha mezcla de reacción se incubó a 30°C por 30 min. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo por el agregado de 200 μ L de cloroformo/metanol (1:2 v/v), 100 μ L de KCl y luego la mezcla se incubó a -20°C durante 15 min. Posteriormente, fue centrifugada a 6.000 rpm por 2 min. La fase orgánica fue evaporada con N₂ gaseoso y resuspendida en 20 μ L para la siembra en una placa de TLC. El cromatograma fue resuelto con la mezcla de solventes: cloroformo:metanol:agua (14:5,5:1, v/v). Una muestra control para determinar la formación de liso-fosfolípido fue generada a partir de NBD-PE y PLA de Sigma (100 U PLA₂, vf 100 mL). Los lípidos fluorescentes se visualizaron utilizando un analizador de imágenes (Image Station 4000 MM PRO-Carestream Molecular imaging, Ex/Em 460 nm/534 nm) y se cuantificaron con Image J.

4.7. Estudio de los mecanismos de señalización celular en las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1 expuestas a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes

4.7.1. Medición de las actividades lípido quinasas y fosfolipasa D (PLD)

4.7.1.1. Obtención de extractos crudos

Cultivos bacterianos de 200 mL crecidos durante 16 h en medio TY, fueron expuestos durante 1 h a 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y a ambos contaminantes simultáneamente. Además, cultivos sin la adición de los contaminantes fueron usados como control. Éstos fueron cosechados por centrifugación a 9.000 rpm durante 5 min. El pellet obtenido fue resuspendido en 5 mL de buffer H (HEPES 50 mM; KCl 10 mM; EDTA 1 mM; PMSF 0,5 mM; DTT 2 mM; pH 7,4). A esta suspensión se le añadió 5 mL de la solución de *shock* osmótico (Tris-HCl 0,033 M, pH 8; EDTA 1,5 mM, pH 8; sacarosa 40%) y 50 μ L de lizosima (100X). Se agitó en agitador orbital a temperatura ambiente, durante 15 min. Luego de la incubación, esta solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min.

Luego se procedió a la lisis química, que consistió en resuspender el precipitado en 4,5 mL de MgCl₂ 1 mM frío y dejar en hielo durante 10-15 min. Luego se agregó 0,5 mL de la solución de lisis (NaH₂PO₄ 500 mM; NaCl 3000 mM; imidazol 100 mM; pH 8) y se homogeneizó.

Posteriormente, la lisis mecánica se realizó sometiendo a la solución a 3 ciclos de sonicado (2 min; pulso c/5 seg; amplitud 40), congelamiento con N₂ líquido y descongelamiento a temperatura ambiente. Finalmente, el homogenato anterior se centrifugó a 14.000 rpm, durante 30 min y el sobrenadante obtenido fue el extracto crudo que se utilizó como fuente de proteínas para el estudio de la actividad PLD.

4.7.1.2. Obtención de membranas

Para la obtención de las membranas, el extracto crudo obtenido como se detalló en la sección anterior, se centrifugó a 33.000 rpm durante 60 min, a 4°C. El precipitado se resuspendió en un volumen mínimo (40 µL) de solución buffer HEPES 50 mM pH 7,4. Este homogenato constituyó la fracción de membrana y se utilizó como fuente de proteínas para la determinación de la actividad lípido quinasa.

4.7.1.3. Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976). Se realizó una dilución 1/20 del extracto crudo o de la suspensión de membranas, se tomó una alícuota de esta dilución, se llevó a 100 µL con agua bidestilada y se le agregó 1 mL de reactivo de Bradford. La reacción se incubó 5 min a temperatura ambiente y luego se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro *Beckman DU 640*. Para la determinación de la concentración de proteínas de las muestras se utilizó una curva patrón realizada con diferentes concentraciones de albúmina (1, 3, 5, 7 y 10 µg/µL).

4.7.1.4. Determinación de la actividad lípido quinasa en *A. guillouiae* SFC 500-1A

Con el objetivo de evaluar el efecto del Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes (25 mg/L-300 mg/L) sobre las diferentes lípido quinasa de *A. guillouiae* SFC 500-1A luego de 16 h de tratamiento, se determinó la actividad de las mismas en la fracción de membrana obtenida, por incorporación de fosfato marcado a partir de [γ -³²P]ATP al lípido endógeno correspondiente. La fosforilación se llevó a cabo en 100 mL de mezcla de reacción que contuvo: buffer HEPES 50 mM pH 7,4; EDTA 0,1 mM; MgCl₂ 10 mM; Mg-ATP 1 mM; vanadato sódico 0,2 mM; DTE 0,5 mM y [γ -³²P]ATP (450 cpm/pmol), con el agregado de 10 mL de la mezcla de inhibidores de proteasas y 60 µg de proteínas de membranas. Esta

suspensión se incubó 2 min a 30°C y la reacción se detuvo con el agregado de 1,5 mL de cloroformo/metanol frío (1:2 v/v) (Racagni-Di Palma y col., 2002).

Luego de la fosforilación, se realizó la extracción lipídica de acuerdo al método de Stubbs y col. (1988). A cada tubo de fosforilación se le agregó 0,5 mL de HCl 2,4 N y 0,5 mL de cloroformo. La fase inferior se extrajo y la superior se lavó con 1 mL de cloroformo. Ambas fases inferiores se mezclaron con 2 mL de metanol/ HCl 1N (1:1 v/v). Los lípidos contenidos en la fase inferior resultante se secaron bajo atmósfera de N₂ y se resuspendieron en el mínimo volumen posible de cloroformo/metanol (9:1 v/v).

Los lípidos se resolvieron utilizando placas de TLC impregnadas con 1% oxalato de potasio, 2 mM EDTA en metanol/agua (2:3 v/v), activadas a 110°C durante 1 h antes de su utilización. Para el desarrollo de los cromatogramas se empleó el sistema de solventes: cloroformo/metanol/acetona/ácido acético/agua (40:14:15:12:7 v/v). Los PLs fueron visualizados mediante autorradiografía sobre película Kodak y se identificaron por comparación de sus R_f con los correspondientes testigos. Posteriormente, las placas se escanearon y los PLs fueron cuantificados mediante la utilización del software *Gel analyzer*.

4.7.1.5. Medición de la actividad PLD

Las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1 se expusieron a Cr(VI) (25 mg/L), a fenol (300 mg/L) y a ambos contaminantes (25 mg/L-300 mg/L). Luego de 1 y 16 h de tratamiento se midió la actividad PLD según Ritchie y Gilroy (1998) con algunas modificaciones.

Se preparó un liposoma de NBD-PE secando un volumen determinado (30 µL) de sustrato fluorescente Acyl 12:0 NBD-PE (1-acil-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4yl)amino]dodecanoil}-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) bajo atmósfera de N₂ y resuspendiendo en igual volumen de Mes-NaOH 20 mM pH 6,5; CaCl₂ 50 mM; SDS 0,25 mM. Luego, se lo dejó 12 h a 4°C y posteriormente se preparó el liposoma realizando 6 ciclos de 15 seg c/u de vortex-sonicado-hielo.

Para la mezcla de reacción se usó buffer Mes-NaOH 20 mM pH 6,5; CaCl₂ 50 mM; SDS 0,25 mM; 1,5 µL de sustrato fluorescente (Acyl 12:0 NBD-PE) (1/10 v/v); 1-butanol 1% (v/v) y 60-120 µg de proteínas en un volumen total de 40 µL. Dicha mezcla se incubó a 30°C por 30 min con agitación (100 rpm). La reacción se detuvo con el agregado de 150 µL de una

mezcla de cloroformo/metanol (1:2 v/v). Luego se agregó 40 µL de cloroformo y 40 µL de 2 M KCl; la mezcla se agitó y centrifugó a 3.300 g durante 2 min. Las dos fases fueron separadas, se agregó 100 µL de cloroformo a la fase acuosa, se agitó y centrifugó a 3.300 g durante 2 min. La fase clorofórmica se colocó en un tubo limpio, se evaporó con N₂ gaseoso, luego se resuspendió en un volumen mínimo de cloroformo/metanol (95:5, v/v) y se sembró en una placa de TLC (sílica gel G, Fisher Scientific). Para la corrida se utilizó una mezcla de solventes compuesta por 2,2,4-trimetilpentano/ácido acético/H₂O/acetato de etilo (2:3:10:13, v/v). Los lípidos fluorescentes se visualizaron con un analizador de imágenes (Image Station 4000 MM PRO-Carestream Molecular imaging, Ex/Em 460 nm/534 nm) y se cuantificaron con ImageJ.

4.7.1.5.1. Amplificación y secuenciación del gen codificante para la PLD en A. guillouiae SFC 500-1A

4.7.1.5.2. Extracción de ADN genómico

El aislamiento de ADN genómico de *A. guillouiae* SFC 500-1A se realizó mediante el kit comercial Wizard Promega, a partir de 1 mL de cultivo microbiano crecido *over night* en medio TY. El kit se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante.

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.

4.7.1.5.3. Amplificación parcial del gen *pld*

La amplificación parcial del gen *pld* se realizó utilizando cebadores degenerados diseñados a partir de regiones altamente conservadas de secuencias conocidas del gen, en diferentes cepas de *A. guillouiae*. Dichas secuencias se obtuvieron desde la herramienta BLAST y los alineamientos múltiples se realizaron utilizando ClustalW. Los cebadores diseñados se evaluaron mediante el programa “Primer-Blast”, y fueron: **p1d-F:** 5'-TTGCTTAAAGCTGCTGACCG-3' y **p1d-R:** 5'-CTTCATTTGCACGATTGACCG-3' (Tamaño esperado del fragmento a amplificar: 360 pb) y **p2d-F:** 5'-TTGCTTAAAGCTGCTGACCG-3' y **p2d-R:** 5'-TTGGATGTCTCAGCAATGCAC-3'

(tamaño esperado del fragmento a amplificar: 103 pb). La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación utilizadas se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Mezcla de reacción y condiciones de amplificación del gen *pld*.

Mezcla de reacción		Condiciones de amplificación	
Buffer Taq (10 X)	2,5 µL	Desnaturalización inicial	94°C - 5 min
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 µL	35 ciclos:	
dNTP (10 mM)	0,5 µL	Desnaturalización	94°C - 1 min
Cebadores F y R (20 µM)	0,5 µL c/u	Hibridación	60°C - 45 seg
Taq polimerasa	0,2 µL	Elongación	72°C - 35 seg
Agua	16,55 µL	Elongación final	72°C - 7 min
ADN	3 µL		

Los productos obtenidos por PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, se visualizaron mediante Gel Green y se secuenciaron en la Unidad Genómica de INTA Castelar. Las secuencias se analizaron mediante el programa ApE (*A plasmid Editor*) y se compararon con aquellas presentes en la base de datos NCBI- BLAST.

4.8. Estudio de otras respuestas adaptativas de los microorganismos que integran el consorcio en respuesta a los contaminantes

4.8.1. Evaluación de la producción de exopolímeros en respuesta a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes

4.8.1.1. Extracción del exopolímero

La obtención del exopolímero se llevó a cabo utilizando la metodología propuesta por Mueller y González (2011), con algunas modificaciones. Para ello, los microorganismos se inocularon en Erlenmeyers que contenían 20 mL de medio de cultivo TY, con el agregado de 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes simultáneamente. El medio de cultivo sin inocular se utilizó como control, para restar la concentración de glúcidos Antrona positivo presentes en dicho medio.

Una vez alcanzada la fase estacionaria, cada cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C y el *pellet* obtenido se secó en estufa para determinar el peso de la biomasa producida. Los sobrenadantes (10 mL) se resuspendieron en 3 volúmenes de etanol 96° frío y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Las muestras se centrifugaron nuevamente en

iguales condiciones y los *pellet* obtenidos se lavaron 2-3 veces con etanol 96° frío. Finalmente fueron resuspendidos en 1,5 mL de agua para la cuantificación de exopolisacáridos y en 1 mL de solución fisiológica para la cuantificación de proteínas y ADN.

4.8.1.1.1. Cuantificación de exopolisacáridos (EPS) por el método de Antrona

Para la cuantificación de exopolisacáridos se utilizó un reactivo compuesto por 120 mg de Antrona disueltos en 60 mL de una solución de ácido sulfúrico (250 mL de H₂SO₄ en 100 mL de agua destilada) (Dische 1962).

Alícuotas de 500 µL de cada muestra se mezclaron con 2,5 mL de reactivo, se calentaron a 95°C en Baño María durante 10 min y luego se enfriaron para la posterior lectura de la absorbancia a 620 nm. Se realizó, a su vez, una curva de calibración utilizando glucosa como testigo. Los resultados obtenidos se expresaron como g EPS/g de biomasa.

4.8.1.1.2. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas del exopolímero se estimó mediante el método de Bradford (1976), empleando como estándar albúmina sérica bovina, tal como fue descrito previamente (*sección 4.7.1*). Los resultados fueron expresados como µg proteína/µL de exopolímero.

4.8.1.1.3. Cuantificación del contenido de ADN en el exopolímero

El contenido de ADN de cada muestra se cuantificó por espectrofotometría UV a 260 nm. La relación de absorbancia 260/280 nm se utilizó como medida de la pureza de la muestra. Los resultados fueron expresados como µg ADN/mL de exopolímero.

4.8.1.2. Estudio del efecto de los contaminantes sobre la formación de biofilm

La capacidad de formación de biofilm se determinó macroscópicamente según O'Toole y Kolter (1998), con algunas modificaciones. La técnica se fundamenta en la cuantificación de biofilm producido en tubos de vidrio a través de la tinción del mismo con cristal violeta. Se evaluó el efecto de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes simultáneamente en la formación de biofilm de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Para ello, se inocularon tubos de Khan con 400 µL de medio TY estéril y 400 µL de la suspensión bacteriana (tubos control), mientras que los tubos tratados contenían 400 µL de medio TY estéril, 400 µL de la

suspensión bacteriana y contaminantes hasta lograr una concentración de 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos (15 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol). Las suspensiones bacterianas se obtuvieron a partir de un cultivo microbiano crecido en medio TY hasta fase estacionaria, el cual fue diluido en el mismo medio hasta obtener una $D.O_{(600\text{ nm})}=1,0$. Además, tubos conteniendo medio TY (con y sin contaminantes) pero no las suspensiones bacterianas, fueron considerados controles negativos. Los tubos se incubaron a 28°C, durante 72 h en agitador orbital (200 rpm). Luego se tomaron 200 μ L de cada tubo y se colocaron en placas de ELISA para la determinación de la absorbancia a 600 nm en lector de ELISA (MicroELISA AutoReader 700, Switzerland) como medida del crecimiento. El remanente de los cultivos se descartó y se lavó cuidadosamente el interior de cada tubo con solución fisiológica, evitando arrastrar el anillo de sus paredes. Posteriormente, se tiñó con 2 mL de colorante cristal violeta al 0,01% (P/V) durante 15 min, luego se descartó y se lavó 3 veces con solución fisiológica. Se adicionó 1,2 mL de etanol 96° junto con perlas de vidrio y se homogeneizó hasta decolorar totalmente. Por último, se cuantificó el biofilm mediante la determinación de la absorbancia a 570 nm de la solución obtenida en las placas de ELISA.

Además, para examinar el biofilm de *A. guillouiae* SFC 500-1A, en todas las condiciones ensayadas se utilizó SEM (siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2.3).

4.8.1.3. Determinación de hidrofobicidad celular

La capacidad de las células bacterianas de adherirse a hidrocarburos (xileno) se utilizó como medida de su hidrofobicidad (Li y Mclandsborough, 1999).

Los posibles cambios en esta propiedad se analizaron exponiendo a las bacterias a los contaminantes, a diferentes tiempos (5, 10 y 16 h). El cultivo bacteriano (10 mL) se hizo crecer hasta fase estacionaria y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. Luego el *pellet* se lavó 3 veces con solución tampón de fosfato (PBS, pH 7,4) (g/L): NaCl (8), KCl (0,2), Na_2HPO_4 (1,44), KH_2PO_4 (0,24), y se resuspendió en el mismo tampón para obtener una $D.O_{(600\text{ nm})}= 1,0$. A cada suspensión bacteriana (3 mL) se añadió 1 mL de xileno, se mezcló durante 5 min y se midió la $D.O_{(600\text{ nm})}$ de la fase acuosa después de 20 min de incubación a temperatura ambiente. El porcentaje de hidrofobicidad (% h) se determinó usando la siguiente ecuación: $\% h = (A_i - A_f) \times 100 / A_i$. Donde (A_i) corresponde a la absorbancia inicial de las células bacterianas y (A_f) corresponde a la absorbancia de la fase acuosa, después de la mezcla

con xileno. Además, las muestras se observaron mediante microscopio óptico, Axiophot (Carl Zeiss) y las imágenes se obtuvieron mediante cámara digital Power Shot G6, 7.1 megapixel (Cannon INC, Japón).

4.9. Métodos analíticos

4.9.1. Determinación de la concentración de Cr(VI)

Para la determinación de Cr(VI) se empleó el método de la difenilcarbazida (DFC) descrito en APHA (1998) con algunas modificaciones. Para ello, se incorporaron 500 μ L de muestra previamente centrifugada, a 4,5 mL de H₂O deionizada y luego se agregaron H₂SO₄ 0,2 N (500 μ L) y DFC 5 mg/mL acetona (200 μ L).

Los tubos se mezclaron y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó por espectrofotometría a 540 nm y la concentración se determinó utilizando una curva de calibración.

4.9.2. Determinación de la concentración de fenoles

Se realizó por el método colorimétrico de 4-aminoantipirina (4-AAP) descrito por Wagner y Nicell (2002). Para ello, la muestra a analizar se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. Para la cuantificación del contaminante se empleó 100 μ L de sobrenadante de muestra pura o diluída y se agregó 700 μ 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 μ L), seguida de la oxidación con K₃Fe(CN)₆ 83,4 mM (100 μ 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 espectrofotómetro Beckman 640 y la concentración se determinó utilizando una curva de calibración.

4.10. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron independientemente, al menos por triplicado, para establecer la variabilidad de los datos. El análisis estadístico de los datos se efectuó mediante el software R (versión 3.1.1). 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



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Efecto de Cr(VI) y fenol sobre la morfología y superficie celular

Los microorganismos que integran el consorcio denominado SFC 500-1, *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, presentan morfología de cocobacilos Gram-negativos y bacilos Gram-positivos esporulados, respectivamente. En la Figura 6 se muestran las fotografías obtenidas luego de la tinción de Gram de cada cepa por separado, creciendo en condiciones control y con los contaminantes (25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos simultáneamente). En esta Figura se pueden observar algunos cambios en la morfología y tamaño de ambas bacterias cuando fueron expuestas a los contaminantes. Por este motivo se profundizó en el estudio del tamaño, morfología y características de la superficie celular de cada uno de estos microorganismos, mediante un microscopio de alta resolución (AFM).

Las células de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo en condiciones control presentaron características morfológicas típicas del Género (Figura 7AI). Los gráficos de frecuencia que se obtuvieron a partir del análisis de las imágenes, mostraron que la mayoría de las células alcanzaron una longitud entre 0,90 y 1,20 μm , un ancho entre 0,75 y 1,20 μm y una altura entre 0,24 y 0,32 μm (Figura 8). Cuando las bacterias fueron expuestas a 25 mg/L de Cr(VI), las células aumentaron su tamaño en términos de longitud, ancho y alto. La mayoría de las células presentaron longitudes entre 0,90 y 1,80 μm , sin embargo, también se observaron células con una longitud de hasta 3,60 μm . El ancho y la altura celular aumentaron hasta 1,65 y 0,40 μm , respectivamente. Además, en presencia del metal no se observaron cambios significativos en la superficie celular bacteriana (Figura 7BIII). Por otro lado, cuando las bacterias crecieron en medio de cultivo suplementado con fenol, éstas tendieron a formar agregados y su tamaño aumentó en comparación con las células crecidas bajo condiciones control (Figura 7C). El mayor número de células mostró un intervalo de longitud entre 0,90-2,70 μm y un ancho de 0,90 a 1,05 μm . De forma similar, se observó un aumento significativo en la altura celular, hasta 0,52 μm (Figura 8C). El fenol, en contraste con el metal, indujo modificaciones sustanciales a nivel de la superficie celular (Figura 7CIII).

Después de la exposición simultánea a Cr(VI) y fenol (Figura 7D) se observó que las bacterias presentaban cambios en su morfología y estaban auto-agregadas. Además, la longitud, el ancho y la altura celular aumentaron, respecto del tratamiento control (Figura 8).

La mayoría de las bacterias mostraron longitudes comprendidas entre 1,20 y 1,80 μm , así como un ancho y altura entre 1,05 y 1,20 μm y de 0,28 a 0,40 μm , respectivamente (Figura 8). La rugosidad de la superficie celular fue similar a la observada después del tratamiento con fenol (Figura 7DIII).

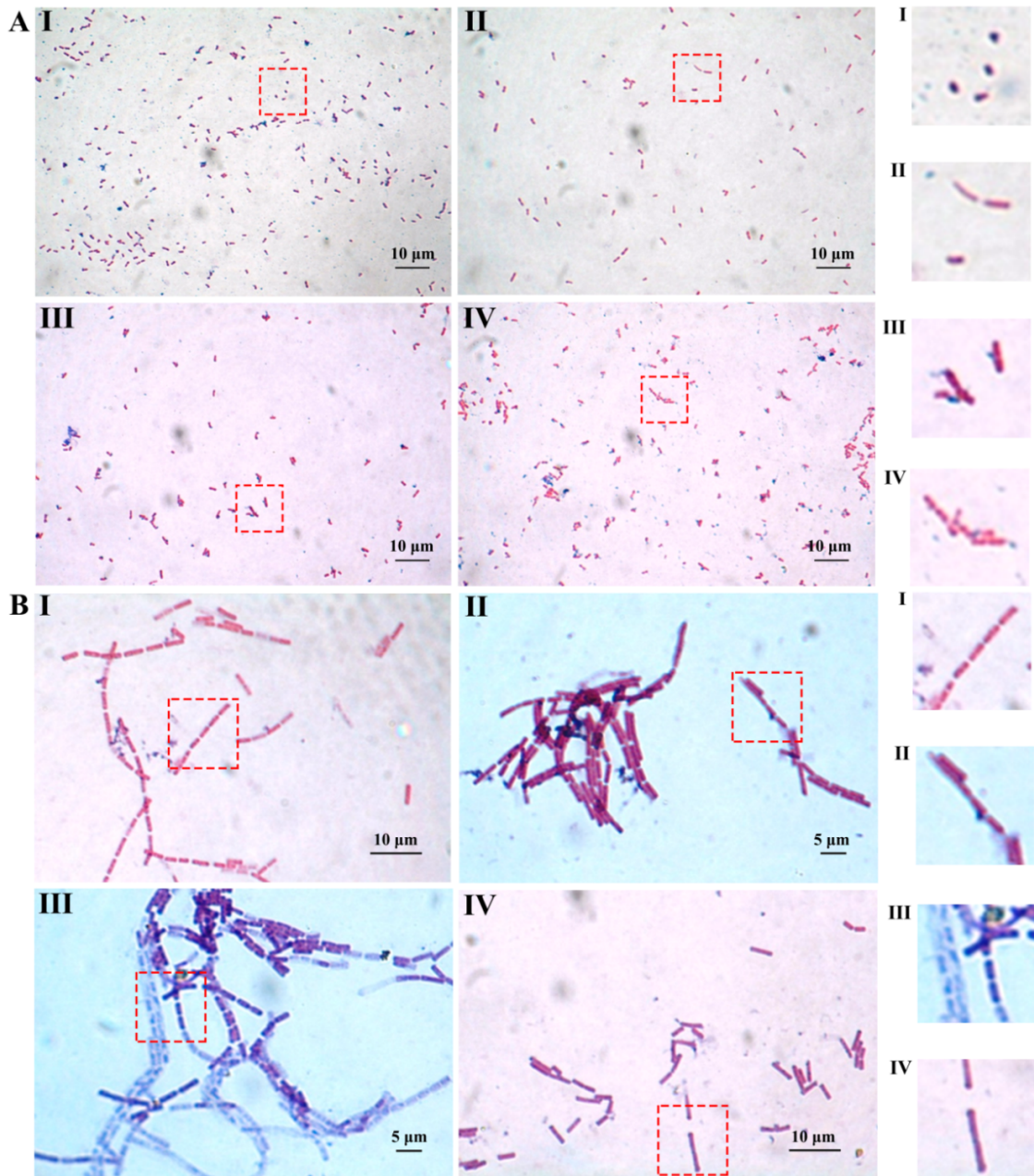


Figura 6: Morfología de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B), creciendo en condiciones control (I), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (II), 300 mg/L de fenol (III) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (IV). Las imágenes fueron obtenidas con microscopio óptico (coloración de Gram).

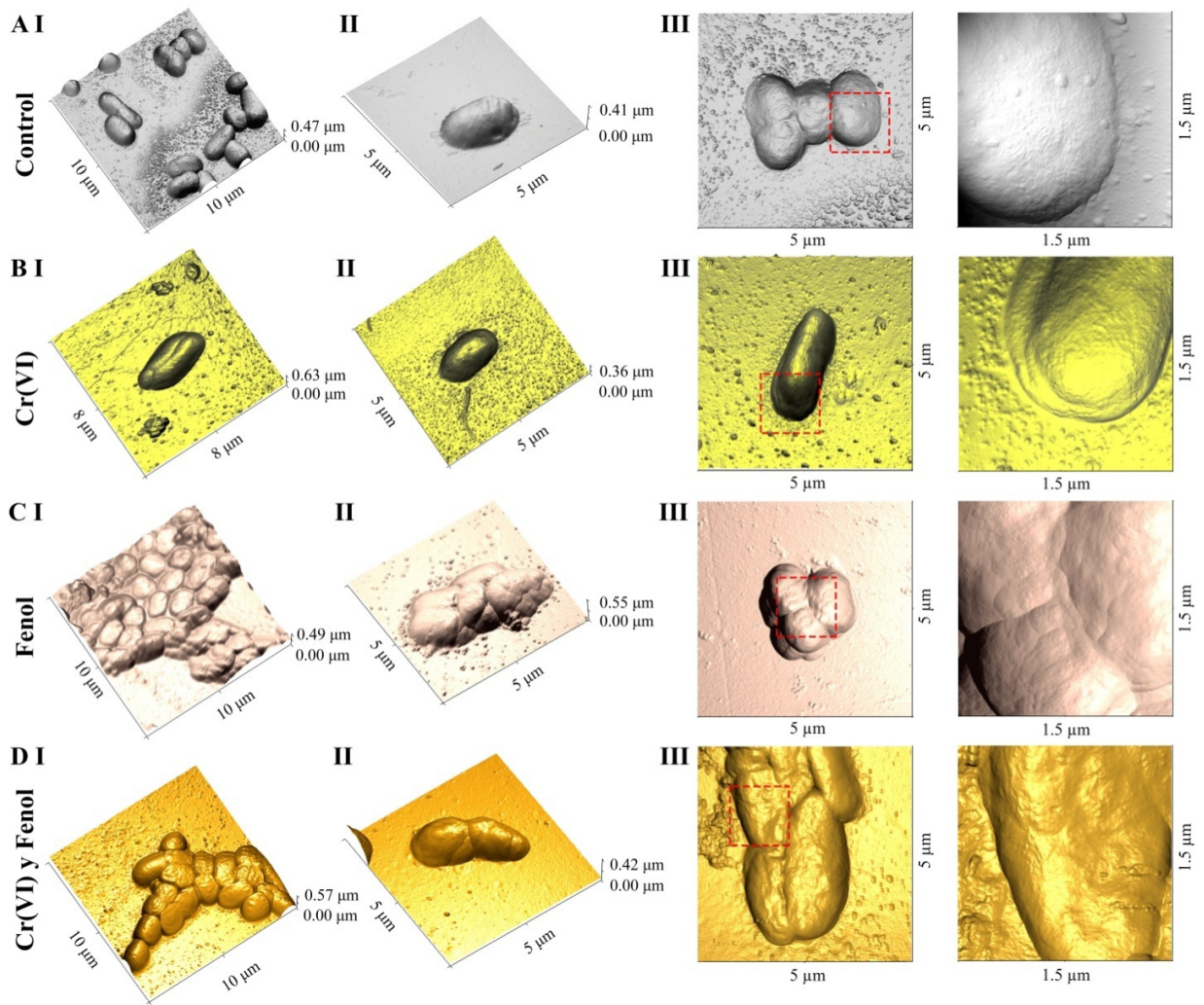


Figura 7: Análisis de morfología, distribución (I y II) y superficie bacteriana (III) de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo en condiciones control (A), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (B), 300 mg/L de fenol (C) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (D). Las imágenes fueron obtenidas con AFM.

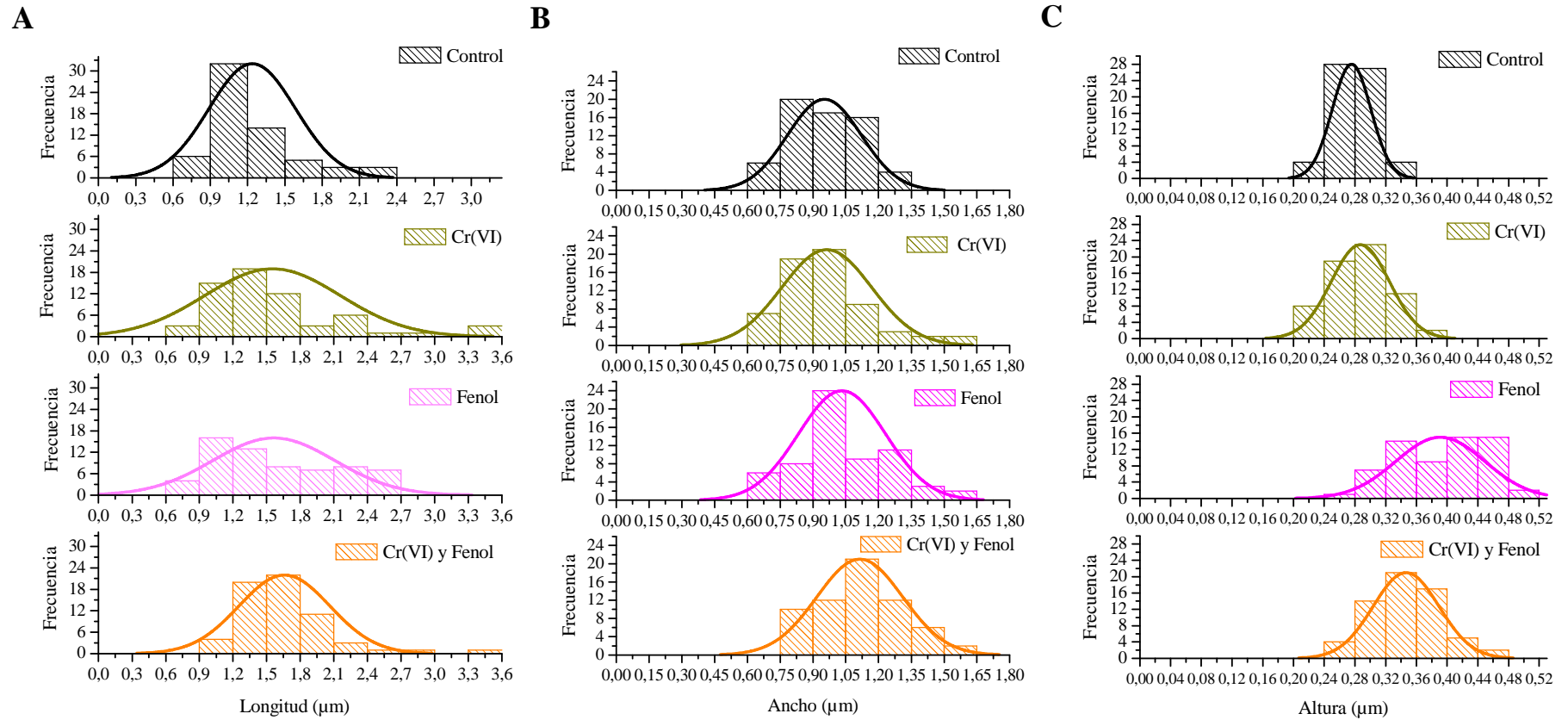


Figura 8. Gráficos de frecuencia, elaborados a partir del análisis de las imágenes obtenidas con *AFM*, de longitud (A), ancho (B) y altura (C) de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo en condiciones control y expuesto a diferentes contaminantes (25 mg/L Cr(VI), 300 mg/L fenol y ambos contaminantes simultáneamente), durante 16 h ($n=80$).

Por otra parte, en la Figura 9 se muestran imágenes obtenidas con *AFM* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E creciendo en condiciones control y con los contaminantes. En condiciones control (medio TY), las bacterias se observaron como típicos bacilos (Figura 9AIII), con una longitud entre 0,75 y 4,5 μm , un ancho entre 0,4 a 1,6 μm y una altura entre 0,35 a 0,63 μm (Figura 10). En presencia de Cr(VI) (25 mg/L), las células aumentaron de tamaño. La longitud bacteriana incrementó hasta 5,25 μm , mientras que el ancho y la altura alcanzaron hasta 2,4 y 0,77 μm , respectivamente (Figura 10). A diferencia de la otra cepa en estudio, se observó un cambio importante en la superficie celular de *Bacillus* sp. SFC 500-1E, cuando se incorporó el metal en el medio de cultivo (Figura 9BIII).

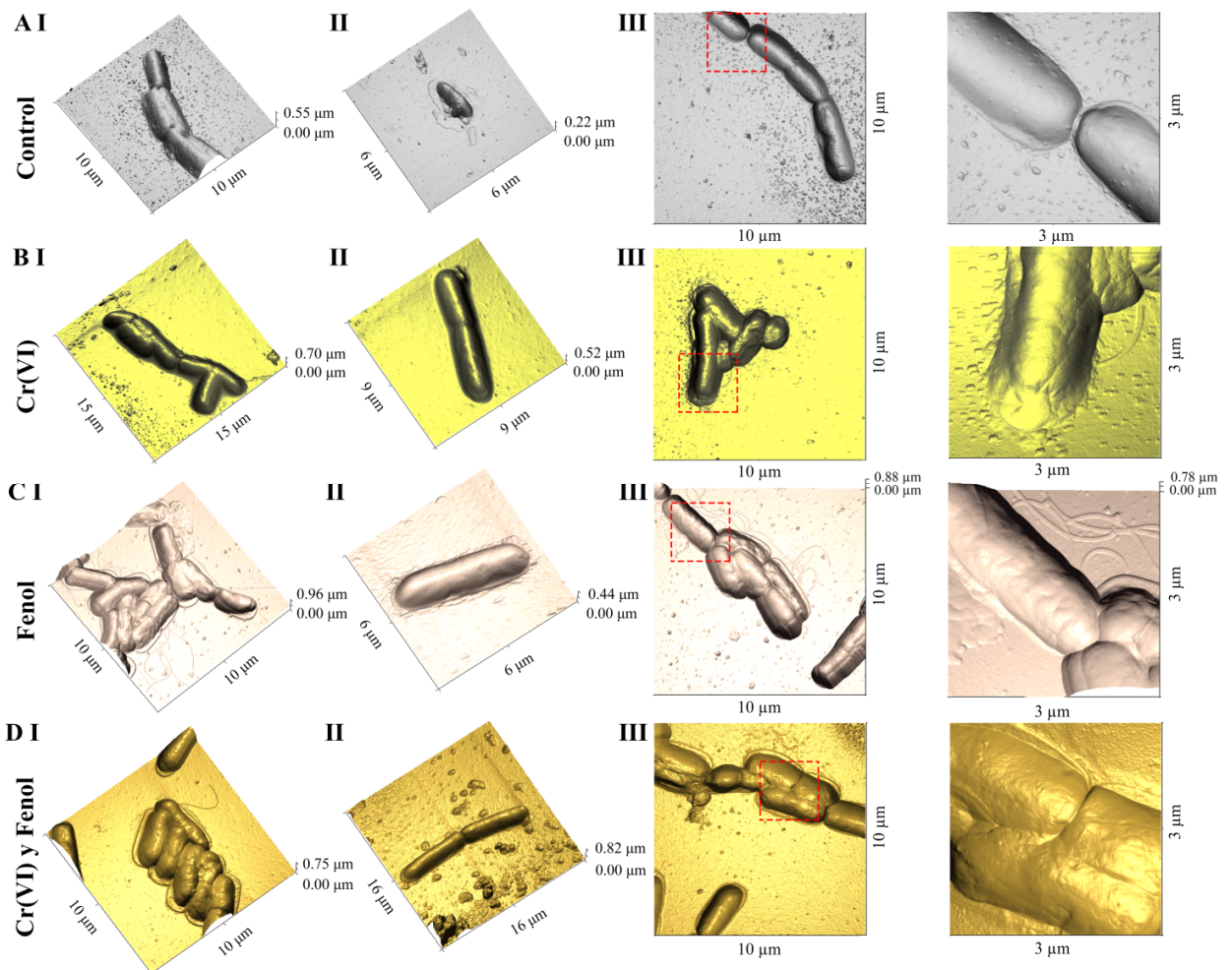


Figura 9: Análisis de morfología, distribución (I y II) y superficie bacteriana (III) de *Bacillus* sp. SFC 500-1E creciendo en condiciones control (A), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (B), 300 mg/L de fenol (C) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (D). Las imágenes fueron obtenidas con *AFM*.

Las células de *Bacillus* sp. SFC 500-1E formaron agregados y aumentaron de tamaño cuando crecieron con fenol y más aún con ambos contaminantes (Figura 9C, D y Figura 10). Dicho aumento fue en términos de longitud (hasta 7,5 μm), ancho (hasta 2,4 μm) y altura celular (hasta 0,77 μm), en presencia únicamente de fenol. Mientras que en presencia de ambos contaminantes el incremento en longitud, ancho y altura bacteriana fue hasta 9; 2,4 y 0,77 μm , respectivamente. También se observaron alteraciones en la superficie celular (Figura 9CIII, DIII).

En resumen, la exposición de ambas bacterias a los contaminantes provocó un incremento tanto en la longitud como en el ancho y la altura celular. Además, se observaron cambios en la superficie celular de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E en presencia de fenol y Cr(VI)-fenol. Se ha descrito que tanto el Cr(VI) como el fenol podrían producir elongación celular en bacterias tales como *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter haemolyticus* y *Escherichia coli* (Samuel y col., 2012; Sidek, 2010; Li y col., 2008). Asimismo, *Acinetobacter haemolyticus* y varias cepas de *Bacillus cereus* mostraron un incremento de rugosidad en la superficie celular cuando crecieron en presencia de K_2CrO_4 (Chen y col., 2012; He y col., 2010; Akmar y col., 2007). También se detectaron dichos cambios en *Acinetobacter haemolyticus* en presencia de fenol (Sidek 2010). Sin embargo, nuestros resultados constituyen un aporte novedoso, dado que si bien existen algunos reportes que muestran los cambios morfológicos y modificaciones en la superficie celular cuando las bacterias crecen con Cr(VI) ó fenol, de acuerdo a nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se describen los cambios morfológicos en los géneros bacterianos *Bacillus* y *Acinetobacter* en términos de longitud, ancho y alto celular en presencia de ambos contaminantes simultáneamente.

Por otra parte, fue común observar en las cepas en estudio la formación de agregados bacterianos cuando crecieron con fenol y con Cr(VI)-fenol, lo cual coincide con lo informado para *P. putida* CP1, durante su crecimiento en presencia de fenoles y mono-clorofenoles (Sidek 2010; Farrell y Quilty, 2002), y para *Bacillus pumilus* cuando creció con arsénico y cobalto (Nithya y col., 2011). Se ha descrito que la formación de agregados celulares y la aparición de rugosidades en las superficies bacterianas, podrían estar relacionadas con la formación de biofilm y producción de exopolímeros, respectivamente (Nithya y col., 2011; Francius y col., 2008). Por esta razón, consideramos importante su posterior análisis.

Estos resultados demuestran que los cambios morfológicos y las alteraciones en la superficie celular como consecuencia de la exposición de los microorganismos a Cr(VI) y fenol podrían estar relacionados con mecanismos o estrategias de adaptación para aumentar la tolerancia frente a estos contaminantes.

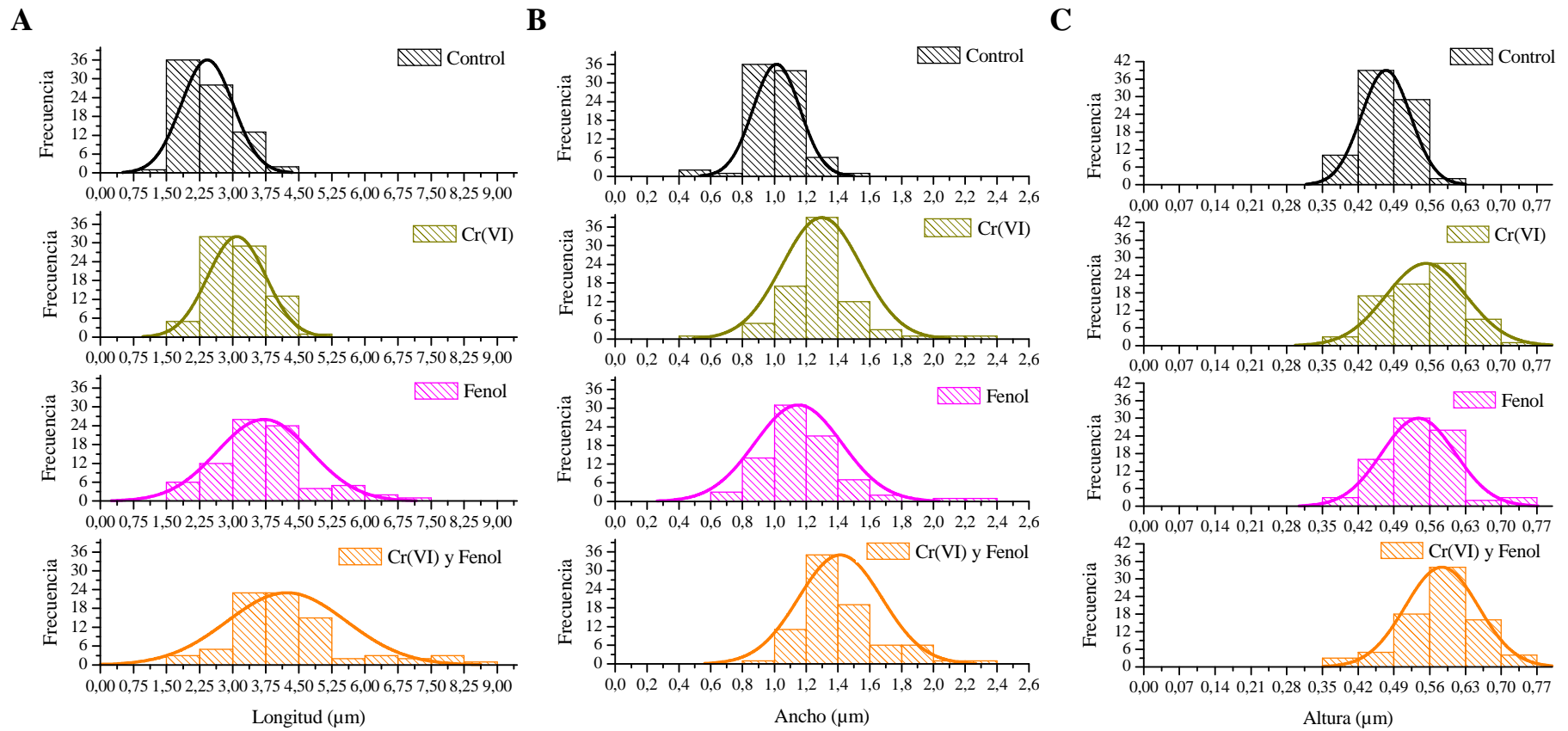


Figura 10. Gráficos de frecuencia, elaborados a partir del análisis de las imágenes obtenidas con *AFM*, de longitud (A), ancho (B) y altura (C) de *Bacillus* sp. SFC 500-1E creciendo en condiciones control y expuesto a diferentes contaminantes (25 mg/L Cr(VI), 300 mg/L fenol y ambos contaminantes simultáneamente), durante 16 h ($n=80$).

5.2. Efecto de Cr(VI) y fenol sobre la ultraestructura celular

Las imágenes obtenidas mediante TEM de las dos cepas en estudio creciendo en condiciones control y después del tratamiento con los contaminantes, brindan la posibilidad de analizar los cambios en la ultraestructura bacteriana, como se muestra en la Figura 11.

Cuando *A. guillouiae* SFC 500-1A creció en condiciones control (medio TY), se observó presencia de algunas partículas densas a los electrones (PDE) (Figura 11A). Por otra parte, cuando *Bacillus* sp. SFC 500-1E creció en medio de cultivo sin contaminantes, se observó la presencia de vacuolas (V) (Figura 11BI). Tras la exposición a Cr(VI) (25 mg/L), ambas cepas mostraron considerables modificaciones en la ultraestructura celular (Figura 11AII y 11BII). En *A. guillouiae* SFC 500-1A se observó un gran aumento del número de PDE, mientras que en *Bacillus* sp. SFC 500-1E se observaron alteraciones en la membrana y también la presencia de PDE. Además, se detectó la presencia de envolturas celulares que perdieron su contenido intracelular (*CL=células lisadas*), de allí el nombre de “cuerpos fantasmas”. La lisis celular también fue informada para células de *P. aeruginosa* Rb-1 y *O. intermedium* Rb-2 expuestas al metal (Batoool y col., 2014a).

Con respecto a las PDE, está reportado que podrían ser atribuibles a complejos de Cr(III)-grupos funcionales y a precipitados de Cr(III) insolubles, formados después de la reducción de Cr(VI) (Pan y col., 2014; Chen y col., 2012). En trabajos previos, realizados en nuestro laboratorio se demostró que *A. guillouiae* SFC 500-1A reduce Cr(VI) a Cr(III), a través de una reacción mediada por actividad cromato reductasa principalmente intracelular y en menor medida localizada en la fracción de membrana, mientras que en *Bacillus* sp. SFC 500-1E dicha reducción también sería catalizada por cromato reductasas localizadas en ambas fracciones celulares (Ontañón y col., 2018b, 2015b). Por lo tanto, dado que ambas cepas disponen de actividad cromato reductasa citosólica, es de esperar que el Cr(III) forme complejos con algunas moléculas. Se ha descrito que el Cr(III) puede asociarse con ácidos nucleicos y proteínas, como así también unirse a compuestos solubles, como el NADH, glutatión y nanopartículas (Thatoi y col., 2014; Dong y col., 2013). Coincidiendo con la localización de dicha actividad, se observaron PDE distribuidas tanto en el citoplasma, así como asociadas a membrana, en ambas cepas (Figura 11AII y 11BII). De igual manera, se ha descrito la presencia de PDE en la fracción citoplasmática (Batoool y col., 2014a; Samuel y

col., 2013), asociadas a membrana (Dhal y col., 2010; Cheung y col., 2006) y en ambas fracciones (Chen y col., 2012; Naik y col., 2012) en otros géneros bacterianos.

En condiciones control, las PDE observadas podrían corresponder a Cr, debido a que las bacterias se mantienen mediante subcultivo en medio sólido TY suplementado con el metal, tal como fue descrito por Batool y col. (2014a) para *P. aeruginosa* Rb-1 y *Ochrobactrum intermedium* Rb-2.

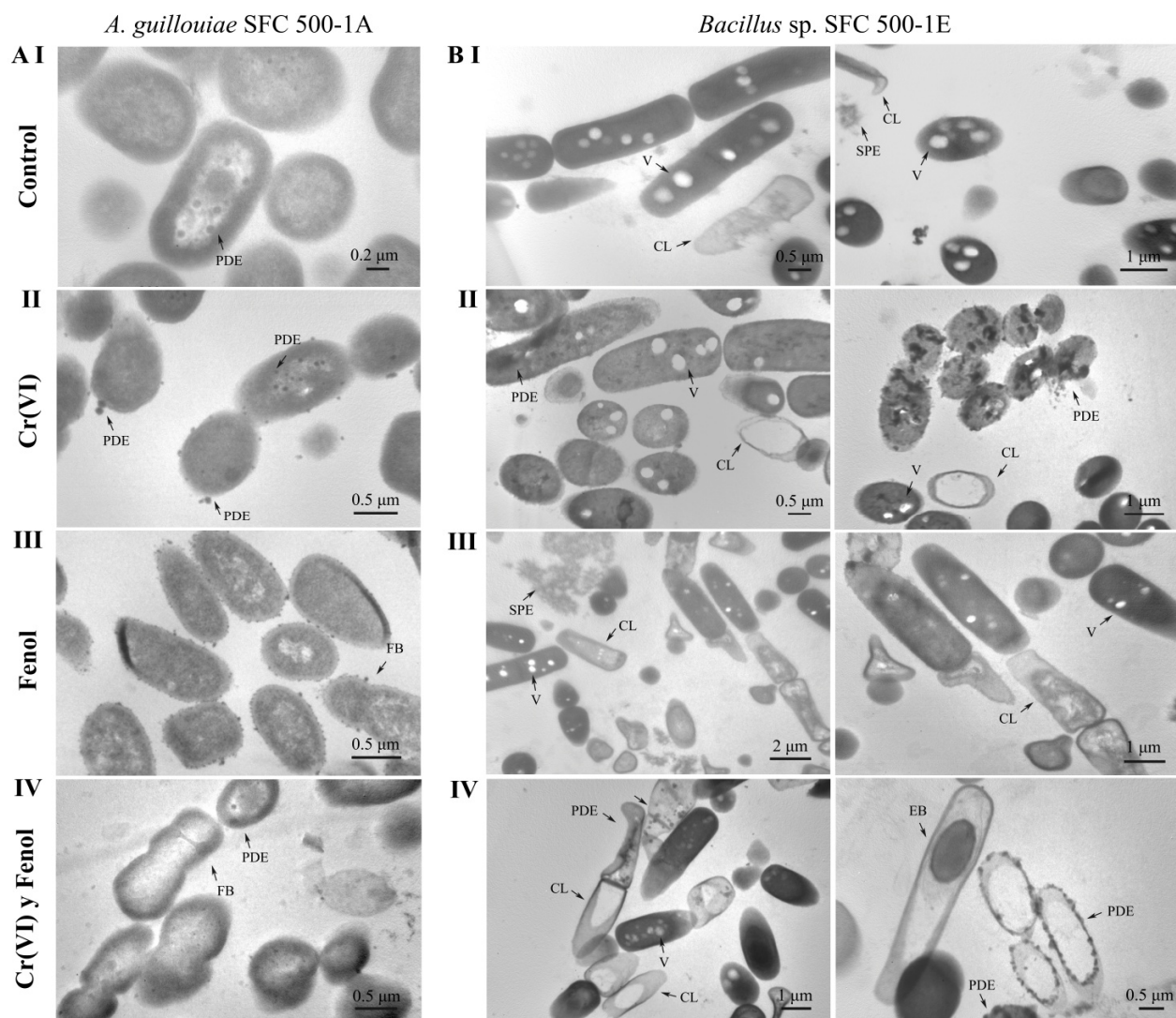


Figura 11: Ultraestructura de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B), creciendo en condiciones control (I), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (II), 300 mg/L de fenol (III) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (IV). Las microfotografías fueron obtenidas con TEM. Ref: PDE: partículas densas a los electrones; FB: fisión binaria; V: vacuola; EB: espora bacteriana; CL: células lisadas. SPE: sustancias poliméricas extracelulares.

En presencia de fenol (300 mg/L) y de ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol), las cepas bacterianas tuvieron un comportamiento diferente. Las células de *A. guillouiae* SFC 500-1A mostraron una organización citoplasmática similar a la de las células control (Figura 11AIII y IV). Sin embargo, en presencia de Cr(VI) y fenol las bacterias se deformaron, lo que coincidió con los cambios morfológicos observados por AFM. En contraste con nuestros resultados, Bhattacharya y col. (2014) informaron formación de polihidroxibutirato (PHB) en *Acinetobacter* sp. B9 y cambios en la membrana plasmática que sugirieron apoptosis celular (protuberancias irregulares) en células de *A. haemolyticus*, creciendo con 100 y 1000 mg/L de fenol. Estas respuestas no se observaron en las células de *A. guillouiae* SFC 500-1A expuestas a fenol y a ambos contaminantes, probablemente debido a que en esta cepa el fenol es completamente metabolizado a través de la vía de clivaje *orto* (Ontañón y col., 2015b). A diferencia de *A. guillouiae* SFC 500-1A, en las células de *Bacillus* sp. SFC 500-1E se observaron modificaciones ultraestructurales, tales como la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y un aumento considerable en el número de células lisadas (CL) en presencia de fenol, en comparación con los tratamientos control y con Cr(VI) (Figura 11BIII). Esto podría estar relacionado con la incapacidad de esta bacteria para metabolizar dicho compuesto, a pesar de tolerarlo. La pérdida de contenido celular y subsecuente formación de células fantasmas, también fue observado en *Bacillus subtilis* creciendo con el desinfectante fenólico clorado, clorhexidina (Cheung y col., 2012).

En presencia de ambos contaminantes, la mayor parte de las células de *Bacillus* sp. SFC 500-1E se observaron lisadas (CL), con PDE distribuidas en el citoplasma y principalmente en las membranas “fantasmas”. Esto último podría deberse a la gran capacidad de sorción de las bacterias Gram positivas, debido al mayor espesor de peptidoglicano (Beveridge y col., 1997).

En conclusión, el estudio de los cambios morfológicos y ultraestructurales nos permitió demostrar que, en ambas cepas, la exposición a los contaminantes afectó el tamaño y la morfología bacteriana. Particularmente, en *A. guillouiae* SFC 500-1A, el Cr(VI) indujo principalmente cambios intracelulares, mientras que el fenol produjo alteraciones en la superficie celular. En las células de *Bacillus* sp. SFC 500-1E, la exposición a Cr(VI), fenol y a ambos contaminantes provocó cambios tanto ultraestructurales, como en la superficie celular. Es importante destacar que estos contaminantes no produjeron lisis celular en *A. guillouiae* SFC 500-1A, pero sí en *Bacillus* sp. SFC 500-1E.

5.3. Remoción de Cr(VI) por células viables y no viables

En la sección anterior, se detalla la obtención de imágenes mediante TEM, que mostraron modificaciones en la ultraestructura celular de *A. guillouiae* SFC 500-1A y principalmente en *Bacillus* sp. SFC 500-1E tras la exposición a Cr(VI) (25 mg/L) y a Cr(VI) y fenol simultáneamente (25 mg/L-300 mg/L). Entre estas modificaciones, se detectó la presencia de un gran aumento de partículas densas a los electrones (PDE) en ambas bacterias, y la lisis celular en *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Las PDE podrían ser atribuibles a complejos de Cr(III)-grupos funcionales y a precipitados de Cr(III) insolubles, formados después de la reducción de Cr(VI) (Pan y col., 2014; Chen y col., 2012). En este sentido, consideramos importante conocer si dichos depósitos podrían ser también Cr(VI) y depositarse aún cuando las células no fueran viables, es decir, si se produciría la sorción del metal directamente, tras la exposición a los contaminantes. Es por esto, que se determinó la remoción de Cr(VI) (en presencia y ausencia de fenol) con biomasa inactivada por calor y se la comparó con la eficiencia de remoción alcanzada por células viables. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

Las células no viables de *A. guillouiae* SFC 500-1A sólo lograron remover hasta un 0,32 y 0,51% del Cr(VI) presente en el medio de cultivo, ya sea sólo o en combinación con fenol, respectivamente, después de 16 h de exposición (Figura 12A). Mientras que células de *Bacillus* sp. SFC 500-1E inactivadas por calor sólo removieron hasta un 0,72% del metal (en presencia y ausencia de fenol) (Figura 12B). Si comparamos estas eficiencias de remoción con las obtenidas por células viables de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (51 y 83% de remoción de Cr(VI) y 65 y 56% de Cr(VI) en presencia de fenol), podemos suponer que la adsorción del metal por biomasa inactivada fue insignificante, después de 16 h de exposición. Estos resultados podrían indicar que se requiere de células viables para la remoción del metal, sugiriendo además la presencia de mecanismos de adsorción/absorción activos. En este sentido, la reducción de Cr(VI) a Cr(III) y absorción de Cr(III) por la biomasa bacteriana viable de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E fue detectada en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Ontañón y col., 2018b, 2015b).

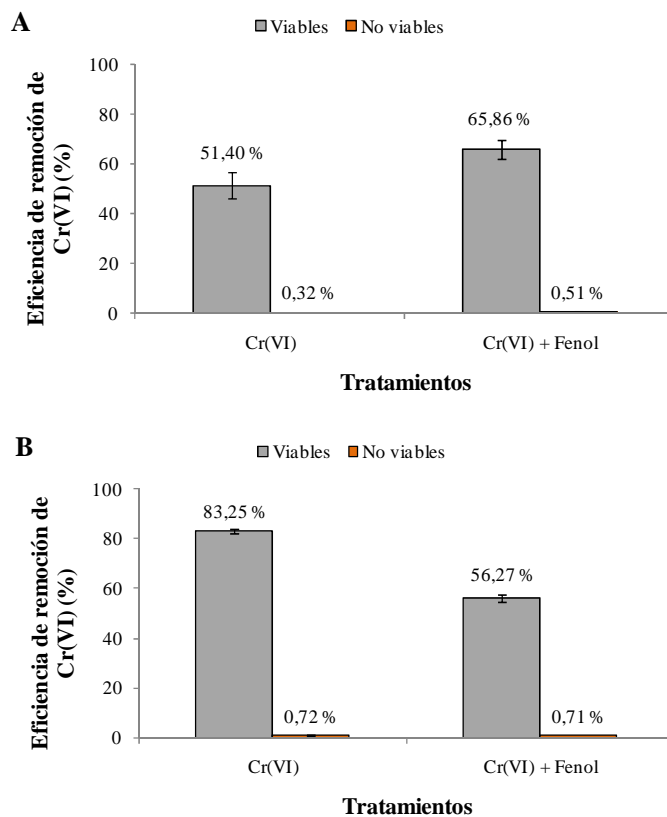


Figura 12: Eficiencia de remoción de Cr(VI) (25 mg/L) en presencia y ausencia de fenol (300 mg/L), por células viables y no viables de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B), después de 16 h de exposición.

A partir de los resultados obtenidos, se sugiere que los depósitos de metal (descritos mediante *TEM* como PDE), no se formarían y/o depositarían después de la muerte de las células, sino que la muerte celular podría deberse a la acumulación de dichos depósitos.

La biosorción por biomasa muerta es un mecanismo alternativo para la biorremediación de metales pesados (Nguema y col., 2015; Pun y col., 2013). Dicho proceso consiste en la inmovilización pasiva de metales por la biomasa y puede depender de diferentes mecanismos fisicoquímicos, como la adsorción, la formación de complejos superficiales, el intercambio iónico o la precipitación superficial (François y col., 2012). La biosorción parece ser un proceso rápido e independiente del metabolismo que permite el uso de biomasa muerta, en contraste con el proceso de acumulación intracelular del metal llamado bioacumulación (François y col., 2012). Se ha demostrado que tanto las sustancias poliméricas extracelulares

secretadas (EPS), como las paredes celulares participan en este proceso (Aguilera y col., 2008). En contraposición con nuestros resultados, varias especies bacterianas han sido estudiadas por sus eficientes capacidades de sorción de mercurio, aluminio y cromo mediante biomasa muerta (Boeris y col., 2016; Dadrasnia y col., 2015; François y col., 2012; Srivastava y Majumder, 2008), logrando incluso mayor eficiencia de biosorción que las células vivas.

5.4. Efecto de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre características y composición de la membrana de las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1

5.4.1. Fluidéz de la membrana

Las funciones de la membrana citoplasmática dependen en gran medida del estado físico “o fluidéz” de las bicapas. Es por esto que se evaluó la fluidéz de las membranas celulares de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E mediante polarización de fluorescencia (Pf) de la sonda DPH después de ser expuestas las bacterias a Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25-300 mg/L), durante tiempos cortos (10, 20, 30 y 60 min) y más prolongados (16 h).

En las células de *A. guillouiae* SFC 500-1A expuestas a los contaminantes durante tiempos cortos (1h), se encontraron valores de Pf incrementados ya sea en presencia de Cr(VI) (de $0,246 \pm 0,003$ a $0,278 \pm 0,004$) como de ambos contaminantes en simultáneo (de $0,185 \pm 0,030$ a $0,269 \pm 0,029$) (Figura 13AI, III). Dichos aumentos en los valores de Pf se obtuvieron inmediatamente después de la adición del/los contaminantes y entre los 10 min posteriores al inicio del tratamiento. Frente a fenol, el valor de Pf permaneció sin variación considerable durante 1 hora de exposición (Figura 13AII). Además, cuando *A. guillouiae* SFC 500-1A creció con los contaminantes durante 16 h, se encontraron valores de Pf incrementados en presencia de Cr(VI) y disminuídos en presencia de fenol, aunque dichos cambios no llegaron a ser significativos respecto del control (Figura 14A). A diferencia de lo anterior, en presencia de ambos contaminantes en simultáneo, la polarización incrementó significativamente respecto del control ($p < 0,05$).

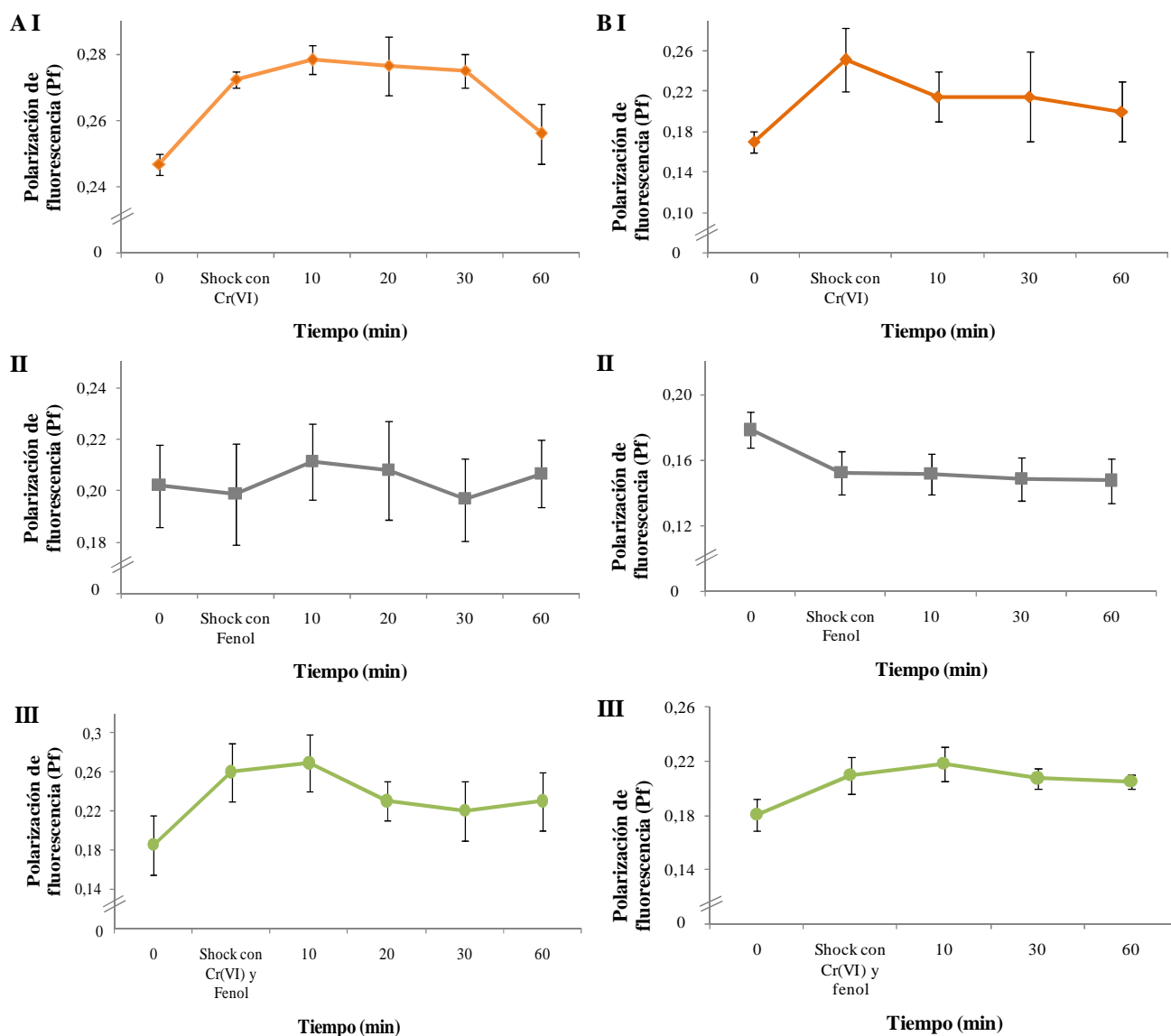


Figura 13: Valores de polarización de fluorescencia (Pf) del DPH en células de *A. guillouiae* SFC 500 1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B) después del *shock* con Cr(VI) (25 mg/L) (I), fenol (300 mg/L) (II) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L) (III) en diferentes momentos (0 min, inmediatamente después del *shock* con el/los contaminantes, 10, 20, 30 y 60 min). Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

La Figura 13B muestra los valores de Pf hallados en células de *Bacillus* sp. SFC 500-1E expuestas a los contaminantes, hasta 1 h. Se puede observar un incremento en el valor de Pf en presencia de Cr(VI) (de $0,17 \pm 0,01$ a $0,25 \pm 0,03$) inmediatamente después del *shock* con el metal y una disminución en presencia de fenol (de $0,17 \pm 0,01$ a $0,15 \pm 0,01$), también inmediata y en este caso sostenida en el tiempo (Figura 13BI, II). En presencia de ambos

contaminantes, la Figura 13BIII muestra valores de Pf levemente incrementados (de $0,18 \pm 0,01$ a $0,21 \pm 0,01$), inmediatamente después de la adición de los contaminantes y entre los 10 min posteriores al inicio del experimento. Este leve aumento en el valor Pf puede deberse probablemente al efecto opuesto que ejercen el Cr(VI) y el fenol en esta bacteria en particular, siendo el efecto del metal el predominante. Por otro lado, al analizar los valores de Pf después de 16 h de exposición a los contaminantes, se observaron valores de Pf significativamente menores en presencia de cualquiera de los contaminantes, respecto del control ($p < 0,05$) (Figura 14B).

Valores de Pf más elevados que el control indican un orden estructural alto en las membranas o membranas más rígidas, mientras que valores más bajos de Pf son indicativos de una membrana más fluida (Mykytczuk y col., 2011). Es importante aclarar que pequeños cambios en los valores de Pf son indicativos de cambios considerables en la fluidez de la membrana. Nuestros resultados muestran que el Cr(VI) y el Cr(VI) y fenol simultáneamente, ejercen un efecto rigidificante rápido sobre las membranas de las células de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (Figura 13A, B: I, III). Este efecto podría ser atribuido al metal, ya que el fenol no provocó cambios en el valor de Pf en *A. guillouiae* SFC 500-1A. Sin embargo, está clara la acción dual del Cr(VI) y el fenol en esta bacteria, lo que incrementa los valores de Pf, en comparación con el metal por sí solo, después de 16 h. En *Bacillus* sp. SFC 500-1E en cambio, si bien el fenol tuvo un efecto fluidificante por sí solo, en presencia de ambos contaminantes prevaleció el efecto rigidificante del Cr(VI). Además, después de 16 h de exposición, la fluidez de la membrana de ambas bacterias en presencia de Cr(VI) y ambos contaminantes en simultáneo fue muy diferente, lo que podría estar relacionado con la respuesta de cada bacteria frente a los contaminantes, como así también a la presencia/ausencia de los mismos, después de 16 h. En relación a esto, podemos mencionar que después de 16 h, parte del Cr(VI) fue removido del medio de cultivo, pero una fracción del mismo siguió estando presente en el medio y por ende continuó ejerciendo efecto sobre la membrana de ambas bacterias, más aún en *A. guillouiae* SFC 500-1A, que remueve menos Cr(VI). En el caso del fenol, éste afectó las membranas de *Bacillus* sp. SFC 500-1E, pero no las membranas de *A. guillouiae* SFC 500-1A, lo cual podría explicarse porque *A. guillouiae* SFC 500-1A tiene la capacidad de metabolizarlo completamente como fuente de carbono después de 16 h, no así *Bacillus* sp. SFC 500-1E.

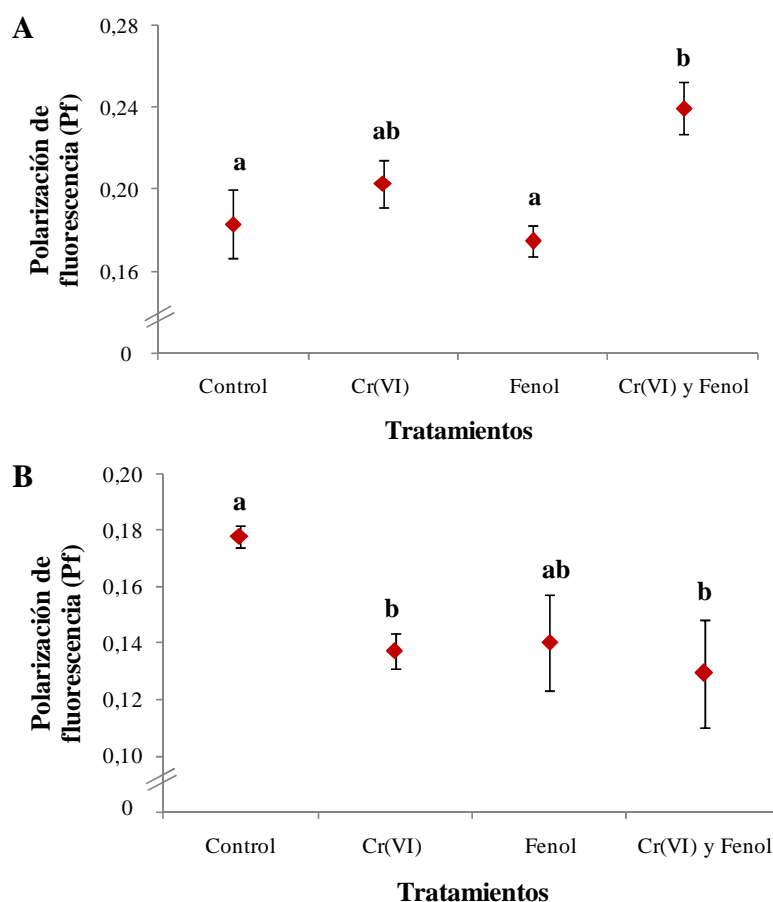


Figura 14: Valores de polarización de fluorescencia (Pf) del DPH en células de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B) después de 16 h de exposición a Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L). Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Varias evidencias sugieren que los metales y solventes orgánicos pueden afectar la fluidez de las membranas celulares (Mykytczuk y col., 2007; García y col., 2005; Ramos y col., 2002), lo cual puede contribuir a explicar, al menos parcialmente, la toxicidad asociada con estos compuestos (García y col., 2005). Tal es el caso del tolueno, del fenol, del benceno y del catecol, que produjeron una disminución en la polarización de fluorescencia en bacterias, lo que supone un incremento en la fluidez de las membranas celulares (Murínová y Dercová, 2014; Bernal y col., 2007). En contraposición, Ramos y col. (2002) y Murínová y col. (2014) reportaron rigidificación de la membrana celular de bacterias Gram-negativas frente a la exposición a hidrocarburos aromáticos y bifenilos policlorados (PCBs). En relación a los metales, poco se conoce respecto de su efecto en membranas bacterianas. Sin embargo, está

descrito que en membranas biológicas eucariotas, metales tales como el hierro, cromo, cadmio, mercurio y plomo, provocan la rigidez de las mismas (Jiang y col., 2017; Ochoa y col., 2003; Karbownik y col., 2001; Boadi y col., 1992; Amoruso y col., 1987). Los resultados obtenidos en este trabajo aportan uno de los primeros valores de polarización de membrana citoplasmática informados para bacterias destinadas a biorremediación, en presencia de Cr(VI) y fenol en simultáneo, a tiempos cortos y prolongados.

La perturbación de la fluidez de la membrana por factores extrínsecos inicia a veces una respuesta activa, que tiende a contrarrestar los efectos causados al provocar cambios químicos intrínsecos (Cesari y col., 2016). Es por esto, que a continuación se plantea el estudio de la composición del grupo de cabeza polar y fracciones de ácidos grasos de los PLs, después de 16 h de exposición a los contaminantes.

5.4.2. Composición de PLs de membrana

Para determinar la razón por la cual se produjeron cambios en la fluidez de la membrana al exponer a las células frente a los contaminantes, investigamos la composición de PLs de las membranas de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E cuando estas cepas crecen en medio TY, con Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol), después de 16 h. Los resultados se muestran en la Figura 15.

En *A. guillouiae* SFC 500-1A, el PL predominante fue el PE, seguido de CL, PG, LPE y PC en orden descendente (Figura 15A). La presencia de Cr(VI) y Cr(VI) y fenol simultáneamente afectó principalmente la biosíntesis de PE y CL, en esta bacteria. Hubo una significativa disminución de PE, del 13%, en presencia de Cr(VI) mientras que fue del 17% cuando las células crecieron con Cr(VI) y fenol, en comparación con el control. En contraste, el aumento de CL fue del 8 y 19% con Cr(VI) y Cr(VI) y fenol respectivamente, en comparación con el control. Debido a estos cambios en los PLs, es que la relación de PLs zwitteriónicos/aniónicos disminuyó de 3,47 en condiciones control a 2,10 y 1,42 en presencia de Cr(VI) y Cr(VI) y fenol, respectivamente. Por otra parte, cuando *A. guillouiae* SFC 500-1A creció en presencia de fenol no se observaron cambios significativos en los PLs, respecto del control y por ende la relación zwitteriónicos/aniónicos tampoco varió considerablemente (3,97). Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos mediante

polarización de fluorescencia de la sonda DPH (sección 5.4.1), los cuales indicaron que no se producirían cambios considerables en la fluidez de la membrana celular.

En *Bacillus* sp. SFC 500-1E creciendo en condiciones control, el PL predominante fue PE, seguido por CL, LPE, PC y PG en orden decreciente (Figura 15B). A diferencia de *A. guillouiae* SFC 500-1A, en esta bacteria no se observaron cambios significativos en los PLs de la membrana en presencia de los contaminantes. Sin embargo, al analizar la relación de PLs zwitteriónicos/aniónicos, se detectó una disminución en dicha relación en los tratamientos con Cr(VI) (3,54) y con Cr(VI) y fenol simultáneamente (2,77), respecto del control (3,98) y del tratamiento con fenol (3,87).

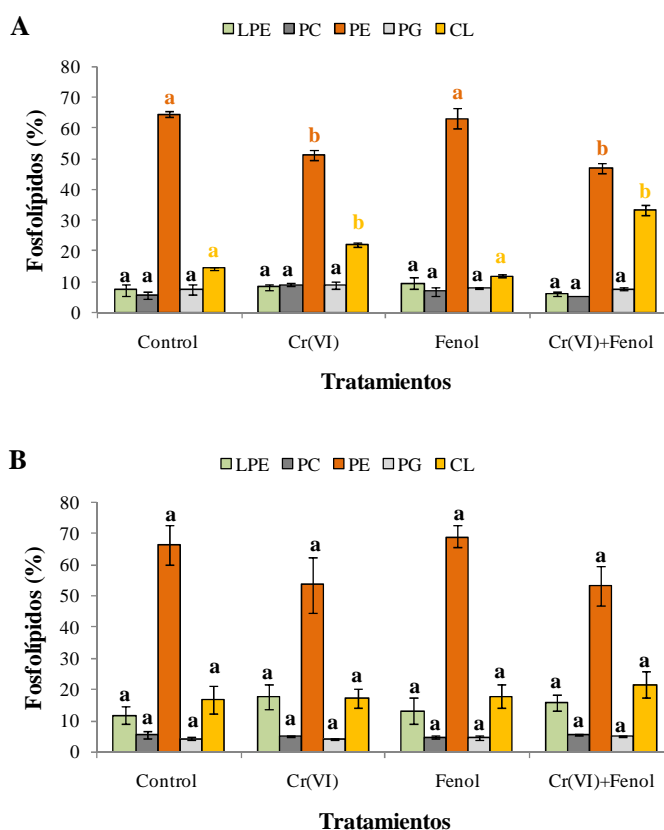


Figura 15: Composición de fosfolípidos (%) de la membrana de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B) creciendo durante 16 h con acetato de sodio [$1\text{-}^{14}\text{C}$: 37 KBq ml/L], en condiciones control (medio TY) y tratadas con Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre PLs iguales en diferentes tratamientos. Testigos de PLs: fosfatidilglicerol (PG); fosfatidiletanolamina (PE); cardiolipina (CL); lisofosfatidiletanolamina (LPE); ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilcolina (PC).

PE es el principal PL zwitteriónico que se encuentra tanto en bacterias Gram (-) como bacterias Gram (+), mientras que los principales PLs aniónicos son fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) (Dowhan 1997). El cambio en los PLs puede tener influencia en la fluidez de membrana (Sohlenkamp y Geiger, 2015). La disminución de PE y el aumento de CL en presencia de Cr(VI) y Cr(VI) y fenol en simultáneo, observada principalmente en *A. guillouiae* SFC 500-1A, tendría un efecto rigidificante sobre la membrana, al igual que lo indicaron los valores de anisotropía (sección 5.4.1). Por otro lado, se ha descrito una enzima bacteriana cuya actividad catalítica permite obtener CL a partir de los precursores PG y PE (Tan y col., 2012), lo que podría explicar los cambios observados en los PLs. Sin embargo, para probar esto serían necesarios estudios complementarios.

Se sabe que las bacterias modulan su composición de PLs de membrana en respuesta a estrés (Sohlenkamp y Geiger, 2015). Sin embargo, hay escasa información acerca del efecto de contaminantes ambientales tales como metales pesados y compuestos aromáticos sobre las membranas bacterianas. En nuestro estudio, se determinó que una disminución en PE y un incremento en CL sería la respuesta resultante de la exposición de las bacterias a Cr(VI) y Cr(VI) y fenol simultáneamente. Resultados similares fueron observados en *Escherichia coli* frente a estrés salino u osmótico (Romantsov y col., 2009; Tsatskis y col., 2005) y en *Pseudomonas putida* expuesta a tolueno (Weber y Bont, 1996). Por otro lado, López y col. (2016) reportaron que CL sería necesaria para la supervivencia de *Pseudomonas putida* en presencia del detergente tetradeciltrimetilamonio.

Por otro lado, se sabe que alteraciones en los PLs de membrana afectan la morfología y el tamaño celular (Rowlett y col., 2017). En este sentido, Dowhan (2013) reportó un fenotipo más filamentososo en bacterias mutantes en la síntesis de PE, mientras que Rowlett y col. (2017) describieron altas proporciones de células alargadas y más cortas (distribución de longitud multimodal) en células de *E. coli* mutantes en la síntesis de CL y PE (y por ende con bajos niveles de estos PLs), respecto de células salvajes. Por el contrario, células de *P. putida* DOT-T1E mutantes en el gen *cls* (cardiolipina sintasa, que cataliza la transferencia de un grupo fosfatidilo de una molécula de PG a otra), que lleva a una disminución en el contenido de CL, resultaron más pequeñas que las células de la cepa salvaje, mientras que el tamaño celular se recuperó e incluso fue mayor cuando el gen *cls* se introdujo en un plásmido en las células mutantes (Bernal y col., 2007). En relación a nuestros resultados, el aumento en la longitud,

ancho y altura celular de las bacterias en estudio en presencia de los contaminantes, descritos previamente, podría ser resultado del cambio en los niveles de los PLs tales como PE y CL.

Estos hallazgos sugieren fuertemente que los cambios en la composición de PLs son respuestas específicas, principalmente de *A. guillouiae* SFC 500-1A, y que se ponen de manifiesto frente a la exposición a Cr(VI) y a éste y fenol simultáneamente.

5.4.3. Composición de FAMES de membrana

Para determinar si el cambio en el estado físico de la membrana de las células en estudio se relaciona con cambios a nivel de los ácidos grasos de los PLs, se investigó la composición de *FAMES* de las membranas de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E crecidas en medio TY y con los contaminantes, después de 16 h.

La composición de ácidos grasos de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo con y sin los contaminantes se muestra en la Tabla 2. Los *FAMES* mayoritarios, independientemente del tratamiento, fueron ácido cis-oleico (C18:1 cis Δ 9), seguido de ácido palmitoleico (C16:1 Δ 9) y ácido palmítico (C16:0). Además, se encontraron ácidos grasos tales como ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido esteárico (C18:0) y ácido 10-heptanodecanoico (C17:1). El crecimiento con Cr(VI) produjo un aumento en C12:0, C16:0 y C18:0 pero una disminución en C16:1 Δ 9 y C17:1. Estos cambios podrían explicar suficientemente la modificación en la relación *UFA/SFA* de $2,52 \pm 0,04$ a $2,08 \pm 0,71$ (Figura 16A). En presencia de fenol, la composición de *FAMES* mayoritarios de *A. guillouiae* SFC 500-1A permaneció semejante al control, por lo tanto la relación *UFA/SFA* se mantuvo casi sin variación, respecto de éste ($2,40 \pm 0,37$ y $2,52 \pm 0,04$, respectivamente). Por último, en presencia de ambos contaminantes, se observó un aumento en C16:0 y no se detectó la presencia de C18:0, mientras que en relación a los *UFA*, se observó una disminución en C16:1 Δ 9 y C17:1 (Tabla 2). Estos cambios, no produjeron una modificación considerable en la relación *UFA/SFA* de *A. guillouiae* SFC 500-1A frente a Cr(VI) y fenol, respecto del control ($2,52 \pm 0,04$ en condiciones control frente a $2,38 \pm 0,00$ en presencia de ambos contaminantes en simultáneo).

Tabla 2: Composición de *FAMES* de *A. guillouiae* SFC 500-1A en diferentes condiciones de cultivo.

<i>FAMES</i> (%)	Condiciones de cultivo (16 h de tratamiento)			
	Control	Cr(VI)	Fenol	Cr(VI)-Fenol
Saturados				
C12:0	3,00 ± 0,51	4,66 ± 0,06*	3,05 ± 0,56	2,71 ± 0,31
C14:0	0,78 ± 0,00	0,82 ± 0,13	0,75 ± 0,04	0,79 ± 0,02
C16:0	23,87 ± 0,74	27,52 ± 3,70	25,67 ± 1,26	26,07 ± 0,32*
C18:0	0,76 ± 0,05	1,23 ± 0,16*	0,30 ± 0,15	n.d
Insaturados				
C16:1Δ9	35,02 ± 0,13	28,64 ± 1,91*	33,22 ± 1,51	32,11 ± 0,20*
C17:1	0,38 ± 0,00	0,14 ± 0,07*	0,31 ± 0,02	0,16 ± 0,08*
C18:1 cis Δ9	36,17 ± 0,04	36,97 ± 2,09	36,64 ± 0,08	38,15 ± 0,12

Los datos representan los promedios ± EE de dos experimentos independientes. En gris se resaltan los *FAMES* mayoritarios. n.d: no determinado. Los (*) indican diferencia estadísticamente significativa, respecto del control.

La Tabla 3 muestra la composición de *FAMES* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E creciendo en presencia y ausencia de los contaminantes. Los *FAMES* mayoritarios correspondieron a *SFA*, tales como iC15:0, C16:0, iC17:0 y aC17:0, en todas las condiciones analizadas. Es importante notar que se detectaron otras configuraciones como iso (i) y anteiso (a). En presencia de Cr(VI), se observó una disminución en C14:0, aC15:0 y C16:0, mientras que un aumento en C17:1. Estos cambios se reflejaron en un incremento en la relación *UFA/SFA* de $0,09 \pm 0,02$, en condiciones control, a $0,16 \pm 0,03$ en presencia del metal (Figura 16B). Cuando la bacteria creció en presencia de fenol, sólo se observó una disminución en C17:1, que se correspondió con una pequeña disminución en la relación *UFA/SFA* de $0,09 \pm 0,02$, en condiciones control, a $0,05 \pm 0,00$ en presencia del compuesto aromático. Por último, en presencia de ambos contaminantes simultáneamente, si bien se detectó una disminución de iC15:0 y C16:0, éstos no tuvieron prácticamente efecto sobre la relación *UFA/SFA* ($0,11 \pm 0,02$). A partir de estos resultados, podemos concluir que los cambios en los *FAMES* se produjeron principalmente sobre los *SFA*, que son los mayoritarios en esta bacteria. Sin embargo, no se observaron cambios significativos respecto de la relación Anteiso/Iso, frente a la exposición a los contaminantes (Figura 16C).

Tabla 3: Composición de *FAMES* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E en diferentes condiciones de cultivo.

<i>FAMES</i> (%)	Condiciones de cultivo (16 h de tratamiento)			
	Control	Cr(VI)	Fenol	Cr(VI)-Fenol
Saturados				
iC13:0	5,84 ± 1,03	6,18 ± 1,58	5,65 ± 1,10	3,82 ± 1,09
iC14:0	4,94 ± 0,24	3,67 ± 0,19	4,46 ± 0,26	3,59 ± 0,17
C14:0	2,97 ± 0,21	1,66 ± 0,07*	2,20 ± 0,01	1,30 ± 0,10*
iC15:0	30,32 ± 5,11	33,54 ± 1,83	28,49 ± 4,88	26,75 ± 4,55*
aC15:0	7,89 ± 1,44	4,93 ± 0,93*	5,97 ± 0,97	6,02 ± 1,01
C15:0	0,84 ± 0,15	0,82 ± 0,16	0,92 ± 0,21	0,67 ± 0,13
iC16:0	6,84 ± 0,43	8,08 ± 0,40	8,42 ± 0,35	9,75 ± 0,48
C16:0	11,90 ± 0,73	5,78 ± 0,16*	11,81 ± 1,16	7,26 ± 0,74*
iC17:0	12,74 ± 0,72	14,06 ± 1,50	11,85 ± 0,67	16,25 ± 1,88
aC17:0	9,15 ± 1,24	10,07 ± 2,03	10,79 ± 1,26	12,82 ± 2,04
C18:0	0,93 ± 0,26	0,76 ± 0,10	0,56 ± 0,20	1,31 ± 0,30
Insaturados				
C16:1	4,30 ± 1,42	4,58 ± 1,45	3,08 ± 1,06	4,77 ± 1,64
C17:1	3,22 ± 0,16	4,39 ± 0,25*	1,31 ± 1,30*	3,90 ± 0,37
C16:2	1,74 ± 0,42	2,22 ± 0,89	1,33 ± 0,49	1,74 ± 0,66

Los datos representan los promedios ± EE de dos experimentos independientes. En gris se resaltan los *FAMES* mayoritarios. Los (*) indican diferencia estadísticamente significativa, respecto del control.

Los fosfolípidos con colas de ácidos grasos insaturados determinan que las membranas sean más fluidas, mientras que los ácidos grasos saturados favorecen que las membranas sean más rígidas (Sharmila y col., 2013; Heřman y col., 1994). En presencia de Cr(VI) y ambos contaminantes en simultáneo, el incremento de *SFA* fue acompañado por una disminución en *UFA* en los PLs de *A. guillouiae* SFC 500-1A luego de 16 h, lo que promueve un estado más ordenado (disminución de la fluidez) en los lípidos de la membrana. Estos resultados están en concordancia con los cambios observados en el perfil de PLs, donde la disminución de PE y aumento de CL tendrían un efecto rigidificante sobre la membrana, así como lo confirmó el estudio de polarización de la sonda DPH que también aportó evidencias de una membrana más rígida, ya sea a tiempos cortos como prolongados de exposición.

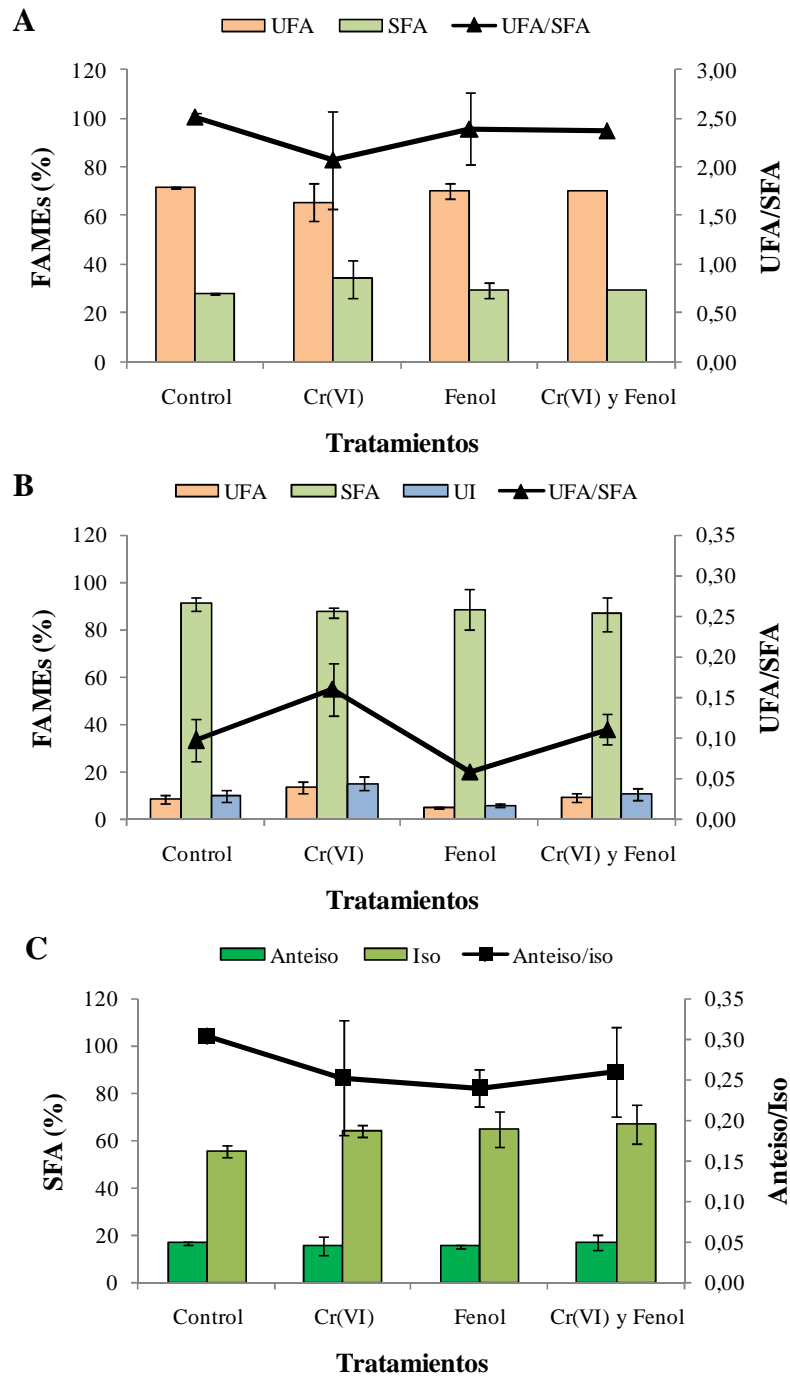


Figura 16: Composición de *FAMES* saturados e insaturados de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B). La proporción Anteiso/Iso se muestra en esta última bacteria (C). Las células crecieron en condiciones control (medio TY) y con Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L) durante 16 h. Ref: *UFA*: ácidos grasos insaturados; *SFA*: ácidos grasos saturados; *UI*: Índice de insaturación (en *A. guillouiae* SFC 500-1A no se muestra ya que este índice coincide con el valor de *UFA*); *UFA/SFA*: relación entre ácidos grasos insaturados/saturados.

De manera similar, se ha descrito una disminución de la relación *UFA/SFA* en las cepas *Enterobacter intermedius* AM15, *Enterobacter intermedius* MH8b, *Klebsiella pneumoniae* AM12 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* creciendo en medios de cultivo con metales pesados tales como Cd, Ni, Cu, ó Zn (Markowicz y col., 2010). En relación al efecto de varios contaminantes simultáneamente sobre las membranas bacterianas, existen muy pocos antecedentes disponibles. Entre éstos, podemos mencionar que la exposición de *Bacillus* sp. ORAs2 y *Pseudomonas* sp. ORA5 a arsénico y tolueno en simultáneo, llevó a un aumento en el grado de saturación, así como en la proporción de ácidos grasos *trans* sobre la configuración *cis* (Pepi y col., 2008). Se sabe que un alto grado de insaturación aumenta la susceptibilidad de los ácidos grasos a los radicales libres (García y col., 2005). Los metales generalmente inducen peroxidación lipídica en una variedad de membranas biológicas (Markowicz y col., 2010). La disminución de la insaturación de ácidos grasos en células expuestas a metales pesados, podría ser parte de un mecanismo de defensa destinado a reducir la capacidad de los metales pesados para generar estrés oxidativo (Howlett y Avery, 1997). En otras palabras, dado que los metales inducen un mayor grado de orden en las membranas, se podría haber esperado que *A. guillouiae* SFC 500-1A hubiera respondido con un aumento adicional de la fluidez de la membrana, como se observó en *Bacillus* sp. SFC 500-1E, donde se registró un aumento de los *UFA*. Sin embargo, aunque una alta proporción de ácidos grasos insaturados teóricamente daría como resultado una membrana más fluida, se sabe que la formación de radicales libres inducida por metales ocurre más fácilmente en membranas que contienen una alta proporción de ácidos grasos insaturados, como es el caso de *A. guillouiae* SFC 500-1A. Esto puede conducir a la peroxidación de lípidos, alterando el orden de la membrana y comprometiendo la integridad de la misma. Por lo tanto, es posible que *A. guillouiae* SFC 500-1A no aumentara los ácidos grasos insaturados de la membrana, como sí lo hizo *Bacillus* sp. SFC 500-1E, como parte de una respuesta adaptativa para evitar la peroxidación lipídica. En este sentido, el análisis del proteoma de *A. guillouiae* SFC 500-1A en presencia del metal, permitió detectar el incremento en la expresión de enzimas involucradas en reacciones de óxido-reducción o en procesos de generación/mitigación de estrés oxidativo, tales como las cromato reductasas (Ontañón y col., 2018a). Éstas son fuertes inductoras de estrés oxidativo y las especies reactivas del oxígeno (EROs) generadas tienen

entre sus principales blancos de acción a los dobles enlaces presentes en los *UFA* (Ontañón y col., 2018a).

Por otro lado, el hecho de que *Bacillus* sp. SFC 500-1E, a diferencia de *A. guillouiae* SFC 500-1A, aumentara el nivel de *UFA* en presencia Cr(VI) fue esperable, ya que, en este caso la peroxidación lipídica mediada por el metal no resultaría tan fácil, debido a que en la membrana de esta bacteria prevalecen los *SFA* sobre los *UFA*. Por ende un aumento adicional de los *UFA* para contrarrestar la rigidez causada por el metal, no tendría efectos significativos en la peroxidación de lípidos. Además, el hecho de que *Bacillus* sp. SFC 500-1E responda fluidificando la membrana y *A. guillouiae* SFC 500-1A rigidificándola, podría estar relacionado con la capacidad de estos microorganismos para remover Cr(VI). *Bacillus* sp. SFC 500-1E remueve más eficientemente Cr(VI) en un período de 16 h, por lo tanto después de este tiempo se encontraría expuesto a concentraciones menores del contaminante y respondería mejor al estrés generado por el metal. *A. guillouiae* SFC 500-1A, en cambio, se encontraría expuesto a concentraciones mayores de Cr(VI) (después de 16 h) ya que es menos eficiente para removerlo, por lo tanto el metal seguiría ejerciendo efecto sobre la membrana y afectaría la respuesta de la bacteria para contrarrestar la rigidez provocada por dicho metal. Este tipo de respuesta adaptativa, que involucra un incremento en *UFA* también fue observado en las cepas *Ochrobactrum* CdSP9 y *Ochrobactrum intermedium* BN3 resistentes a cadmio y a plomo, respectivamente (Waranusantigul y col., 2011).

En relación al fenol, no se observaron cambios en la composición de ácidos grasos de *A. guillouiae* SFC 500-1A, lo cual se correlaciona con el estado físico de las membranas, que permanecieron inalterables respecto del control (sección 5.4.1). Por el contrario, en *Bacillus* sp. SFC 500-1E, la composición de *FAMES* cambió a favor de los *SFA* (ya que se observó disminución en C17:1), como un mecanismo para contrarrestar la fluidez causada por el compuesto aromático.

Está bien documentado el efecto de compuestos orgánicos, como solventes y aromáticos, sobre las membranas plasmáticas bacterianas. Dicho efecto generalmente consiste en aumentar la fluidez de las mismas (Loffhagen y col., 2002). Se han descrito dos mecanismos principales para explicar el cambio en la composición de ácidos grasos, y por lo tanto para contrarrestar los cambios en la fluidez de la membrana: la isomerización *cis-a-trans* de ácidos grasos insaturados, como una respuesta a corto plazo y cambios en el grado de

insaturación/saturación (*UFA/SFA*) como una respuesta a largo plazo (Eberlein y col., 2018; Dulhardt y col., 2010; Segura y col., 2010). En relación al primer mecanismo, los ácidos grasos *trans* insaturados proporcionan más rigidez en comparación con sus isómeros *cis*, esto se debe al comportamiento estérico de los mismos, que coincide con el de los ácidos grasos saturados, ya que ambos poseen una conformación larga y extendida que permite un empaquetamiento más denso de la membrana. En contraste, la configuración *cis* de la cadena de acilo tiene una curvatura no móvil de 30° que causa impedimento estérico y perturba el empaquetamiento de ácidos grasos (Denich y col., 2003). Por otro lado, la disminución en el grado de insaturación ó el incremento de los *SFA* también promueve un estado más ordenado de la membrana (Čertík y col., 2003; Loffhagen y col., 2002). Además de los mecanismos mencionados anteriormente, también se han reportado alteraciones en el contenido de ciclopropano y ácidos grasos hidroxilados en bacterias expuestas a compuestos orgánicos (Dulhardt y col., 2010; Segura y col., 2010). Todas estas modificaciones permiten que las células se adapten inmediatamente a las nuevas condiciones ambientales y ganen tiempo para la biosíntesis *de novo* de los componentes de la membrana, un proceso que permite ajustes más precisos a tensiones específicas (Heipieper y col., 2003). Este tipo de mecanismos adaptativos han sido descritos en algunos géneros bacterianos expuestos a fenol, tales como *Pseudomonas putida* y *E. coli* donde se detectaron cambios en la relación de los ácidos grasos de *cis*-a-*trans* (Heipieper y col., 1992; Keweloh y col., 1990), mientras que en *Yersinia pseudotuberculosis* se registró una disminución de las especies ramificadas (Nina y col., 2013). Así mismo, en *E. coli* se detectó un incremento en el contenido de ácidos grasos saturados en presencia de alcoholes de cadena larga y compuestos aromáticos (Ingram 1977).

En resumen, las modificaciones de los contenidos de *FAMES* podrían ser parte de un mecanismo para contrarrestar los cambios en el estado físico de la membrana, y por ende reducir el daño causado por el estrés provocado por la exposición a contaminantes como Cr(VI) y fenol.

5.5. Implicancia de la actividad PLA en la respuesta a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes

Se ha descrito que la PLA₂ podría activarse bajo diversas condiciones de estrés (Zheng y col., 2017). Ésto, sumado a la disminución encontrada en los niveles de PE en las

bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1 (sección 5.4.2), nos indujo a estudiar esta enzima por su capacidad potencial para utilizar este PL. Es por esto, que se determinó el efecto del Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L) sobre la actividad PLA en extractos crudos de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, luego de 1 h de exposición a los contaminantes. Los resultados se muestran en la Figura 17.

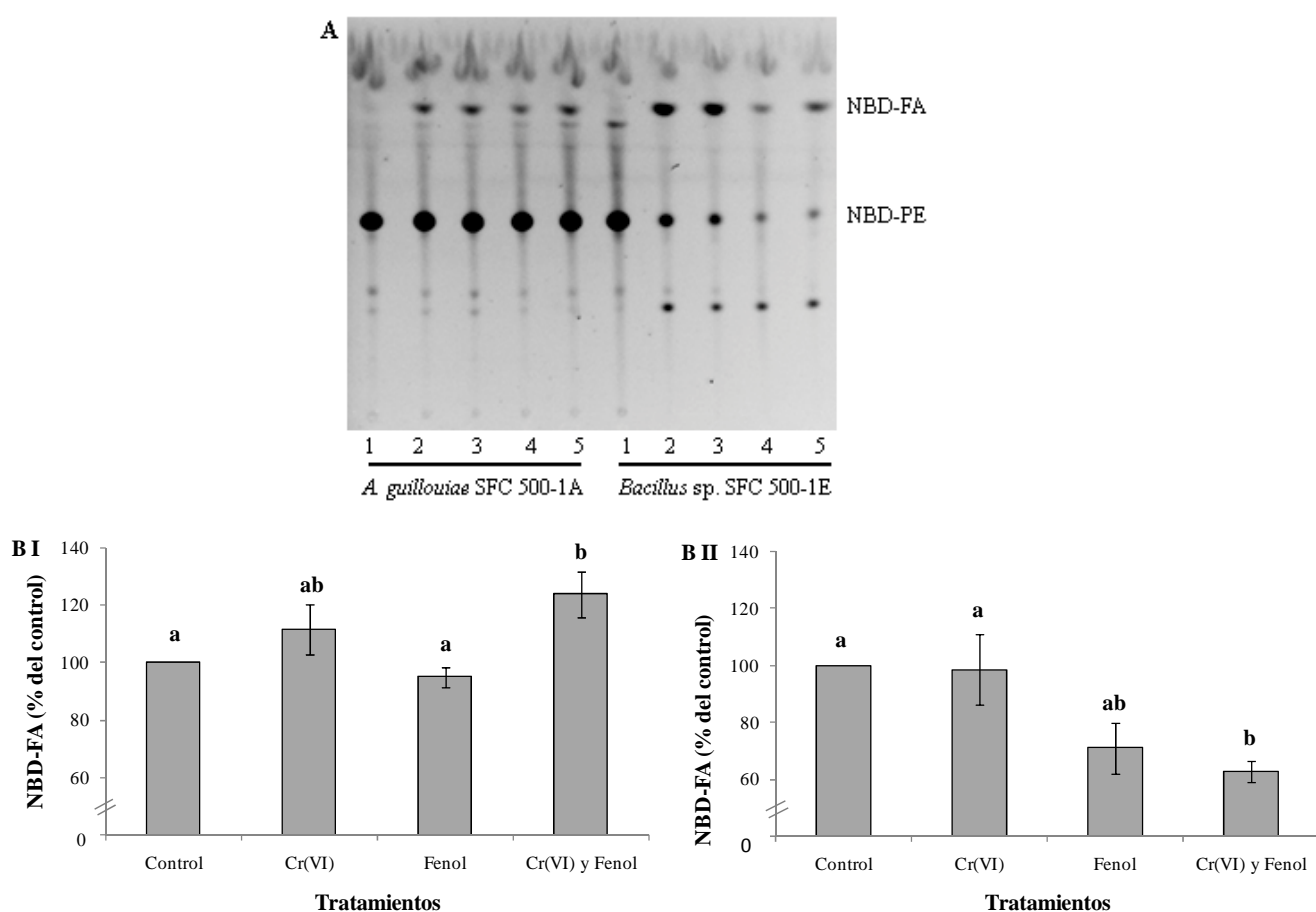


Figura 17: (A) Productos lipídicos formados por actividad PLA₂ de extractos totales de células de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E en condiciones control (2) y tratadas con Cr(VI) (25 mg/L) (3), fenol (300 mg/L) (4) y ambos contaminantes (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L) (5), durante 1 h. La calle 1 corresponde al control negativo. La Figura muestra un experimento representativo de tres repeticiones llevadas a cabo en forma independiente. (B) Actividad PLA₂ de extractos totales de células de *A. guillouiae* SFC 500-1A (I) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E determinada como la formación de ácido graso libre (NBD-FA) (% del control) y cuantificada mediante el análisis de imágenes con el software Gel analyzer. Los datos representan la media ± EE de tres réplicas biológicas independientes ($n= 3$). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

La PLA es una acil-hidrolasa que cliva la unión éster de los ácidos grasos en la posición sn1- ó sn2- de los fosfolípidos (PE en este caso en particular), generando como productos lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. La Figura 17A muestra el ácido graso libre con marcaje fluorescente (NBD-FA) resultante del clivaje catalizado por la enzima PLA₂. Esto se debe a que el compuesto fluorescente estaba unido al ácido graso de la posición sn2- del fosfolípido utilizado (PE), por lo que al liberarse permanece marcado.

El Cr(VI) moduló la actividad PLA₂ en *A. guillouiae* SFC 500-1A, mientras que el fenol en *Bacillus* sp. SFC 500-1E, luego de 1 h (Figura 17B). En *A. guillouiae* SFC 500-1A, la actividad PLA₂ aumentó alrededor de un 11% luego de la exposición a Cr(VI), y un 23% después de la exposición a Cr(VI) y fenol simultáneamente, si se lo compara con el control. En *Bacillus* sp. SFC 500-1E, la actividad PLA₂ disminuyó alrededor de un 29% en presencia de fenol, mientras que un 38% en presencia de Cr(VI) y fenol simultáneamente. A partir de estos resultados, se sugiere que los contaminantes modularían la actividad de la PLA₂ de manera opuesta en las bacterias en estudio, después de 1 h. Además, se podría relacionar la disminución de PE observado en *A. guillouiae* SFC 500-1A expuesto durante 16 h a Cr(VI) y Cr(VI) y fenol simultáneamente (sección 5.4.2), con la actividad de PLA₂ que utiliza dicho PL. Probablemente, el incremento del LPE resultante se hubiese detectado al analizar el perfil de PLs al mismo tiempo en que se determinó la actividad de la enzima PLA₂ (1 h de exposición) y no a las 16 h, como se determinó, o quizá simplemente no se logró observar debido a la baja proporción de este PL en membrana, en comparación con el resto de los PLs. Otra posible explicación podría ser la rápida acción de lisofosfolipasas, que no permitirían el mantenimiento de niveles elevados de LPE, así como también por un efecto de dilución en el nivel de este PL en *A. guillouiae* SFC 500-1A, por trabajar con membrana externa y citoplasmática en conjunto, ya que como es bien sabido el LPE se encuentra principalmente en membrana externa. Además, con la disminución de PE se observó un incremento de CL (sección 5.4.2). Análogamente, Michel (1979) reportó que la acumulación de LPE a menudo va acompañada de un aumento en CL, tal como se observó en *A. guillouiae* SFC 500-1A.

Los lisofosfolípidos generados por clivaje PLA son intermediarios metabólicos en la síntesis y degradación de PLs de membrana. Las funciones de los lisofosfolípidos como factores de crecimiento celular o como potentes mediadores lipídicos se han demostrado

ampliamente en células eucariotas, pero el papel de éstos en bacterias, no ha sido suficientemente estudiado (Zheng y col., 2017).

Se conoce que los lisofosfolípidos pueden modular las propiedades mecánicas de las bicapas lipídicas, en un entorno específico. La presencia de LPE en la membrana reduciría la tensión de curvatura y por lo tanto, relajaría la bicapa debido a su forma geométrica de cono invertido (Ben-Zeev y col., 2010). Esto podría ser una posible respuesta a la rigidez que provoca el Cr(VI) en la membrana de *A. guillouiae* SFC 500-1A. En cambio, en *Bacillus* sp. SFC 500-1E, la disminución de la actividad PLA₂, generaría niveles más bajos de LPE en la membrana para evitar que se fluidifique aún más en presencia de fenol y de ambos contaminantes, condiciones en las cuales la membrana ya se encontraba muy fluida. Sin embargo, no siempre es claro cómo traducir las características polimórficas de los PLs en las funciones biológicas de lípidos individuales o en propiedades físicas de una bicapa lipídica (Dowhan 2009).

Los lisofosfolípidos generalmente están en una pequeña fracción ($\leq 1\%$) de la membrana bacteriana, pero pueden acumularse en bacterias marinas, patógenas y estresadas bajo circunstancias especiales (Giles y col., 2011; Taranto y col., 2003). Muchos eventos de estrés que comprometen la integridad de la membrana externa de las bacterias, como el choque térmico (Davydova y col., 2016; Kern y col., 2001), lisis inducida por fagos T4 (Cronan y Wulff, 1969), tratamiento con EDTA (Hardaway y Buller, 1979), crecimiento en medios acidificados (Tannæs y col., 2001), acción de proteínas bactericidas que incrementan la permeabilidad (BPI) (Wright y col., 1990) y exposición a lipopéptidos antimicrobianos (Weiss y col., 1979), se acompañan de un drástico aumento en el nivel de LPE en bacterias Gram-negativas. En varias bacterias patógenas incluyendo *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pseudotuberculosis* por ejemplo, el LPE se acumula de acuerdo con su potencial patogénico o de supervivencia cuando se enfrentan a condiciones ambientales hostiles (Davydova y col., 2016; Giles y col., 2011). Además, *V. cholerae* remodela su perfil lipídico y acumula LPE después de la exposición a sales biliarias o durante el crecimiento en presencia de sedimentos oceánicos (Oliver y Colwell, 1973). Sin embargo, el papel de los lisofosfolípidos en las bacterias expuestas a metales y compuestos aromáticos no ha sido descrito hasta el momento.

5.6. Mecanismos de señalización involucrados en la respuesta a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes, en A. guillouiae SFC 500-1A

5.6.1. Efecto de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre las actividades lípido quinasas

Para que las bacterias se adapten a los diversos cambios que ocurren en su entorno, las señales que provienen desde el exterior deben atravesar la membrana, a partir de lo cual se desencadenan diversas respuestas de acuerdo al estímulo. Es así que diferentes factores estresantes ambientales provocan cambios rápidos y transitorios en la composición de los PLs de las membranas celulares y otros lípidos, que sólo están presentes en pequeñas cantidades en condiciones normales. Algunos PLs actúan como segundos mensajeros, o bien pueden formar sitios de anclaje para diferentes proteínas y por lo tanto, proporcionar señales espaciales y transitorias necesarias para responder adecuadamente a los agentes externos (Munnik y Vermeer, 2010). En este contexto, se determinaron las actividades de las lípido quinasas de *A. guillouiae* SFC 500-1A, después de 16 h de tratamiento con Cr(VI), fenol y ambos contaminantes. Así, por cromatografía bidimensional se identificaron los siguientes fosfolípidos: PIP₂, PIP, DGPP/LPA y PA que son producto de las actividades de lípido quinasas tales como PIKs (PI4-K y PI5-K), PAK y DGK, respectivamente (Figura 18). Es importante aclarar que DGPP presentó un valor de R_f similar al de LPA. La presencia de ambos fue confirmada mediante una corrida bidimensional (datos no mostrados).

La Figura 19 muestra que después de 16 h el Cr(VI) aumentó la actividad DGK 2,5 veces, mientras que el tratamiento con Cr(VI) y fenol simultáneamente la incrementó 3 veces, respecto del control. En presencia de fenol, la actividad de la enzima fue similar al control. Una característica inherente a los lípidos señales es su acumulación transitoria, dado que sufren un rápido metabolismo. En este punto la actividad PAK desempeña un papel clave regulando los niveles de PA. Sin embargo, este hecho no parece ocurrir en las células de *A. guillouiae* SFC 500-1A expuestas a los contaminantes, ya que la actividad PAK no se vio incrementada significativamente, respecto del control.

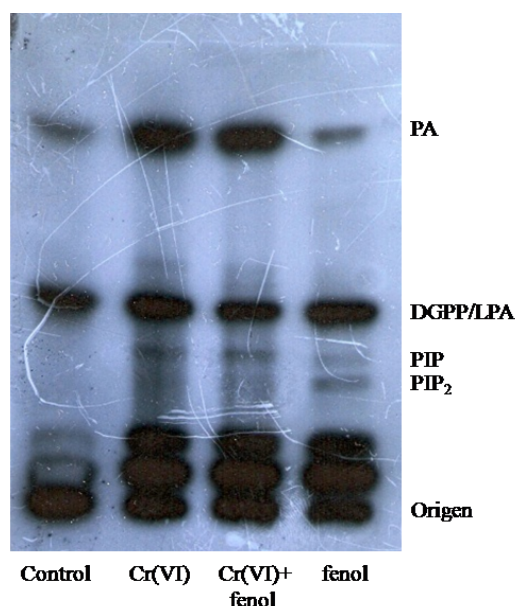


Figura 18: Productos lipídicos formados en la fosforilación de membranas de células de *A. guillouiae* SFC 500-1A en condiciones control (medio TY) y tratadas con Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L), durante 16 h. Los lípidos radioactivos se separaron por TLC y se detectaron por autorradiografía. PA, ácido fosfatídico; DGPP, diacilglicerol pirofosfato; LPA: ácido lisofosfatídico; PIP, fosfatidilinositol 4-fosfato; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. La Figura muestra un experimento representativo de dos repeticiones llevadas a cabo en forma independiente.

Acompañando la fosforilación de DAG por la lípido quinasa DGK, los niveles de PIP y PIP₂ incrementados por los contaminantes fueron el reflejo de un aumento en las actividades PIKs. En particular la actividad PI4-K aumentó 23 veces en presencia de Cr(VI), mientras que 12 y 29 veces en presencia de fenol y ambos contaminantes, respectivamente. La actividad PI5-K por su parte, aumentó 3,5, 6 y 3 veces en presencia de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes, respectivamente. Los incrementos en los PIPs en presencia de los contaminantes se debe a que las especies PIP y PIP₂ están prácticamente ausentes en condiciones control. Además, podemos notar que los niveles de PIP fueron incrementados en mayor medida respecto de PIP₂ en presencia de Cr(VI) y Cr(VI) y fenol simultáneamente. Esto puede deberse probablemente a una diferencia en la velocidad de reacción de la enzima o en la disponibilidad de sustrato durante la reacción ya que se trabajó sólo con sustrato endógeno. En relación a PPI en bacterianos, hasta el momento sólo se reportó síntesis de novo de PI3P y síntesis transitoria en respuesta a estrés salino en *Mycobacteria* (Morita y col., 2011).

Estos resultados inducen a pensar que el incremento en los niveles de PA observado a las 16 h bajo tratamiento con Cr(VI) y Cr(VI) y fenol simultáneamente ocurrió al menos en parte, debido a un incremento de DAG producto de la hidrólisis de PIP₂ en conjunción con la actividad DGK. Además, el efecto observado de estos dos tratamientos sobre los niveles de los PPIIn y ácido fosfatídico, podría ser el reflejo de una actividad PLC estimulada. Consecuentemente, el rápido consumo del “pool” de PPIIn provocaría un incremento en la re-síntesis de los mismos para reponer los niveles basales de estos PLs.

A partir de estos resultados, se sugiere la posibilidad de que el PA juegue un papel en la señalización bacteriana. De hecho, se sabe que PA media la señalización en respuesta a diferentes factores estresantes en células de mamíferos y plantas (Okazaki y Saito, 2014), y tal función de PA podría conservarse en bacterias. En este sentido, hasta el momento no hay estudios semejantes realizados en bacterias.

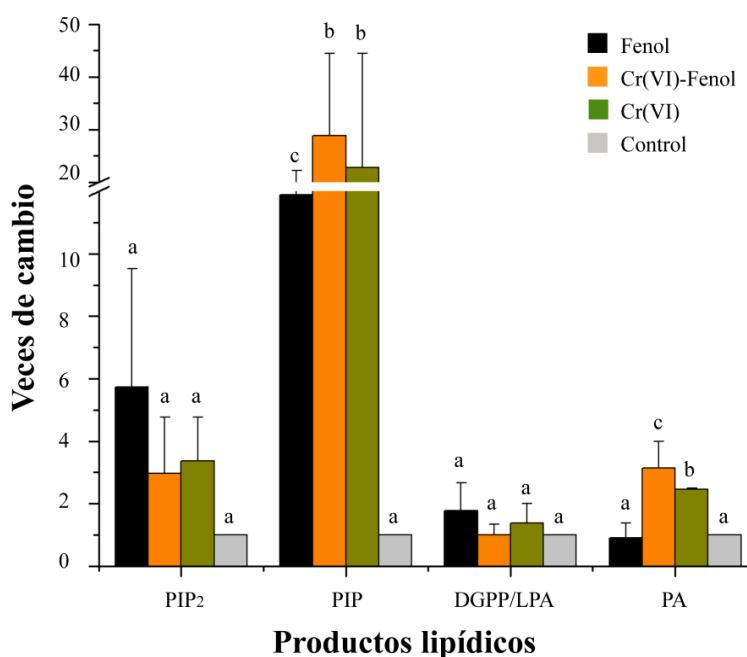


Figura 19: Efecto del Cr(VI), fenol y ambos contaminantes sobre las actividades lípido quinasa de *A. guillouiae* SFC 500-1A, después de 16 h. Las células fueron tratadas con 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes en simultáneo (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L), durante el tiempo mencionado. La actividad lípido quinasa se analizó mediante la determinación de productos lipídicos fosforilados, y se expresó como veces de cambio respecto del control (control= 1 u.a), mediante el análisis de imágenes con software Gel analyzer. PA, ácido fosfatídico; DGPP, diacilglicerol pirofosfato; LPA: ácido lisofosfatídico; PIP, fosfatidilinositol 4-fosfato; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. Los datos representan la media ± EE de dos réplicas biológicas independientes (n= 2). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre PLs iguales de diferentes tratamientos.

El PA como mensajero intracelular ha sido asociado en eucariotas con la inducción de genes que codifican para compuestos antioxidantes, la activación o inactivación de diversas proteínas blanco (proteínas quinasas, fosfatasas, lípido quinasas y lípido fosfatasas, factores de transcripción, NADPH oxidasa, etc.), mediando efectos biofísicos sobre la membrana plasmática como su ensanchamiento durante el ensamblaje de proteínas señal, sirviendo como sustrato de otros lípidos reguladores, o bien regulando el tráfico o biogénesis de membranas (Testerink y Munnik, 2011; Li y col., 2009). Además, el PA es un intermediario esencial para la biosíntesis de *novo* de todos los glicerofosfolípidos. Este PL, por lo general, se mantiene en niveles bajos en bacterias y eucariotas y su acumulación puede ser inducida a través de dos vías principales: la hidrólisis directa de PLs (PC o PE) catalizada por PLD o mediante la acción combinada de la PLC y DGK (Pokotylo y col., 2014; Jinjin Cai y col., 2013; Peng y Frohman, 2013; Arisz y col., 2009; Wang y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, no se puede descartar que parte del PA provenga de la actividad PLC ya que, como se observa, existe un gran incremento en la actividad PIK, el cual se ve reflejado en los aumentos de PIPs. Debido al aumento en los niveles de PIPs y a la disminución de las especies de PIP₂, se infiere que parte del PA encontrado podría provenir principalmente a través de esta vía. Sin embargo, estos incrementos pueden constituir una evidencia de la actividad PLD. Por lo tanto, para dilucidar si dicha enzima estaría involucrada en esta respuesta, se determinó su actividad bajo las mismas condiciones empleadas anteriormente, pero sobre extracto crudo, utilizando como sustrato un PL marcado con fluorocromo (NBD-PE).

5.6.2. Implicancia de la actividad PLD en la respuesta a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes

La actividad PLD en células animales y vegetales ha sido determinada tanto *in vitro* como *in vivo*, basada en su capacidad para usar alcoholes primarios, como n-ButOH, como sustrato de transfosfatidilación, lo que resulta en la formación de PtdBut (Munnik y col., 1995; Moehren y col., 1994). Tal actividad ha demostrado ser una propiedad única de PLD y la formación de PtdBut constituye una evidencia inequívoca de su presencia. A partir de esto y teniendo en cuenta los niveles de PA hallados en *A. guillouiae* SFC 500-1A luego de la exposición a los contaminantes, se procedió a estudiar el efecto del Cr(VI) (25 mg/L), fenol

(300 mg/L) y ambos contaminantes (25 mg/L Cr(VI)-fenol 300 mg/L) sobre la actividad PLD, usando la formación de PtdBut como reportera de su actividad, luego de 1 y 16 h de tratamiento.

Al realizar los experimentos, no se pudo detectar la formación de PA (NBD-PtdOH), ni del producto de transfosfatidilación, fosfatidilbutanol (NBD-PtdBut) en las condiciones ensayadas, en *A. guillouiae* SFC 500-1A. Dicha actividad se evaluó variando la concentración de proteínas, el método de extracción de las mismas, la concentración de butanol en la reacción, el sustrato marcado fluorescente, etc., sin embargo, no se logró detectar actividad PLD. Hasta el momento, no hay trabajos donde cuantifiquen la actividad de la PLD bacteriana *in vivo*. Sin embargo, se ha informado la sobreexpresión del gen codificante de la enzima en *E. coli*, así como la purificación de la misma, para luego realizar la medición de su actividad de manera *in vitro* (Yong-Nan y col., 2017; Uesugi y col., 2007; Renesto y col., 2003; Yang y Roberts, 2002).

Obtenidos estos resultados, se decidió analizar la presencia del gen *pld* en *A. guillouiae* SFC 500-1A. Para ésto, se diseñaron cebadores en base al alineamiento múltiple de secuencias conocidas de *pld* en diferentes cepas de *A. guillouiae*. A partir de las muestras de ADN de *A. guillouiae* SFC 500-1A se amplificaron, mediante dos pares de cebadores diferentes, dos fragmentos de 103 y 360 pb (Figura 20). Se secuenció el fragmento de ADN de mayor tamaño y su secuencia se comparó con las depositadas en la base de datos NCBI- BLAST, obteniendo un 97% de similitud con el gen codificante para una posible PLD de la cepa *A. guillouiae* NBRC 110550.

En resumen, podemos mencionar que si bien están presentes los determinantes genéticos para la enzima PLD en *A. guillouiae* SFC 500-1A, su actividad no pudo ser determinada *in vivo*, mediante el uso de un alcohol reportero como sustrato de transfosfatidilación, como en animales y plantas. Por lo tanto, no descartaríamos dicha actividad como una posible fuente de PA.

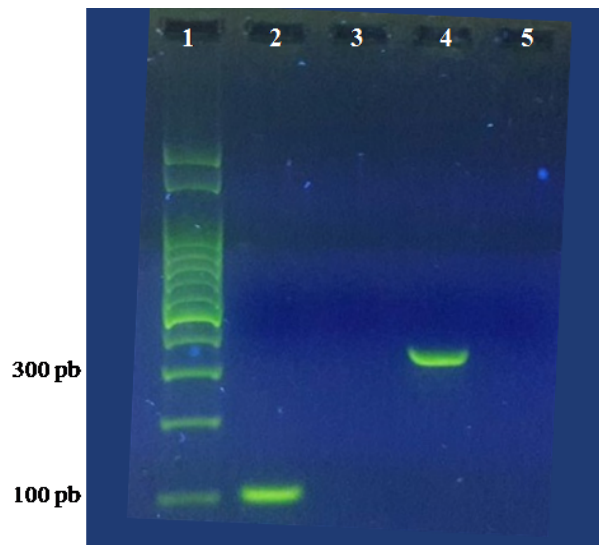


Figura 20: Producto de la amplificación parcial del gen *pld* utilizando ADN genómico de *A. guillouiae* SFC 500-1A (calles 2 y 4). En la calle 1 se sembró un marcador de peso molecular (100 pb), mientras que las calles 3 y 5 corresponden a controles negativos.

Aunque se ha identificado la enzima PLD en bacterias, poco se conoce en relación al efecto de diferentes tipos de estrés sobre su actividad, por lo tanto es un aspecto que requerirá profundización pero que excede a los objetivos de esta tesis. Sin embargo, tanto PLD como PA han sido relacionados con varios procesos celulares en plantas, incluyendo aquellos implicados en estrés abiótico, tales como congelamiento, deshidratación, sequía, estrés salino, limitación de nutrientes, injurias o heridas y EROS (Li y col., 2009). Navari-Izzo y col. (2006) reportaron que plantas de trigo tratadas con Cu^{2+} incrementaron la producción de PA vía PLD de manera dependiente del tiempo, encontrando una activación de la enzima luego de 1 min de exposición al contaminante, seguida de una duplicación en los niveles de PA después de 15 min y una acumulación máxima de este compuesto luego de 2 h, período después del cual sus niveles disminuyeron. En contraposición, Ramos-Díaz y col. (2007) no detectaron efectos sobre la formación de PtdBut en células en suspensión de *Coffea arabica* incubadas con diferentes concentraciones de Al^{3+} y en presencia de n-butanol, sugiriendo que la actividad PLD no se vio afectada por el contaminante. Por otra parte, Yong-Nan y col. (2017) observaron una acumulación significativa de PA dependiente de la actividad PLD, en el hongo *Ganoderma lucidum* expuesto a altas temperaturas.

5.7. Otras respuestas adaptativas de los microorganismos que integran el consorcio a los contaminantes

5.7.1. Producción de exopolímeros en respuesta a Cr(VI), fenol y ambos contaminantes

Se analizó el efecto de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes en simultáneo sobre el contenido de EPS, proteínas y ADN en el exopolímero extraído de las cepas en estudio (Figura 21). Se puede observar que en ambas cepas la producción de EPS aumentó significativamente en los tratamientos con Cr(VI) y fenol simultáneamente (Figura 21A). Además, es importante destacar que en éstas condiciones la producción de EPS por *Bacillus* sp. SFC 500-1E fue considerablemente mayor (5 veces más) que por *A. guillouiae* SFC 500-1A.

En las imágenes obtenidas por SEM de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo con Cr(VI) (Figura 22B), se observaron depósitos blancos a diferencia del control sin contaminantes (Figura 22A), los cuales podrían atribuirse a la unión de iones del metal en la superficie del exopolímero (Quintelas y col., 2011; Sharma y col., 2008). Por otro lado, se observó adhesión entre las células, hasta la formación de un biofilm característico, después del tratamiento con fenol y con ambos contaminantes simultáneamente (Figura 22C, D).

Las sustancias poliméricas extracelulares están compuestas por diferentes macromoléculas, incluyendo no sólo polisacáridos, sino también proteínas y ácidos nucleicos, de ahí la importancia de su determinación. La Figura 21 (B y C) muestra el contenido de proteínas y ADN de la matriz exopolimérica de ambas cepas. En *A. guillouiae* SFC 500-1A, la concentración de proteínas y ADN en el exopolímero aumentó en todos los tratamientos en comparación con el control, siendo más significativo el aumento de proteínas en presencia de Cr(VI) y fenol simultáneamente y de ADN tanto en presencia de fenol como de ambos contaminantes en simultáneo. Además, la concentración de Cr(VI) determinada en el exopolímero, después de tratamientos con Cr(VI) y con Cr(VI) y fenol, fue baja (0,5 y 1 mg/L, respectivamente) en relación al Cr(VI) removido del medio de cultivo (3,75 y 12,5 mg/L, respectivamente). Por otro lado, en el exopolímero de *Bacillus* sp. SFC 500-1E, el contenido de proteínas también aumentó significativamente en presencia de ambos contaminantes, mientras que no se detectó ADN extracelular en ninguno de los tratamientos. En este caso, la concentración de Cr(VI) en el exopolímero después de los tratamientos con el metal y con

ambos contaminantes también fue baja (0,45 y 0,29 mg/L, respectivamente) comparada con la remoción del metal del medio de cultivo (15 y 12,75 mg/L, respectivamente).

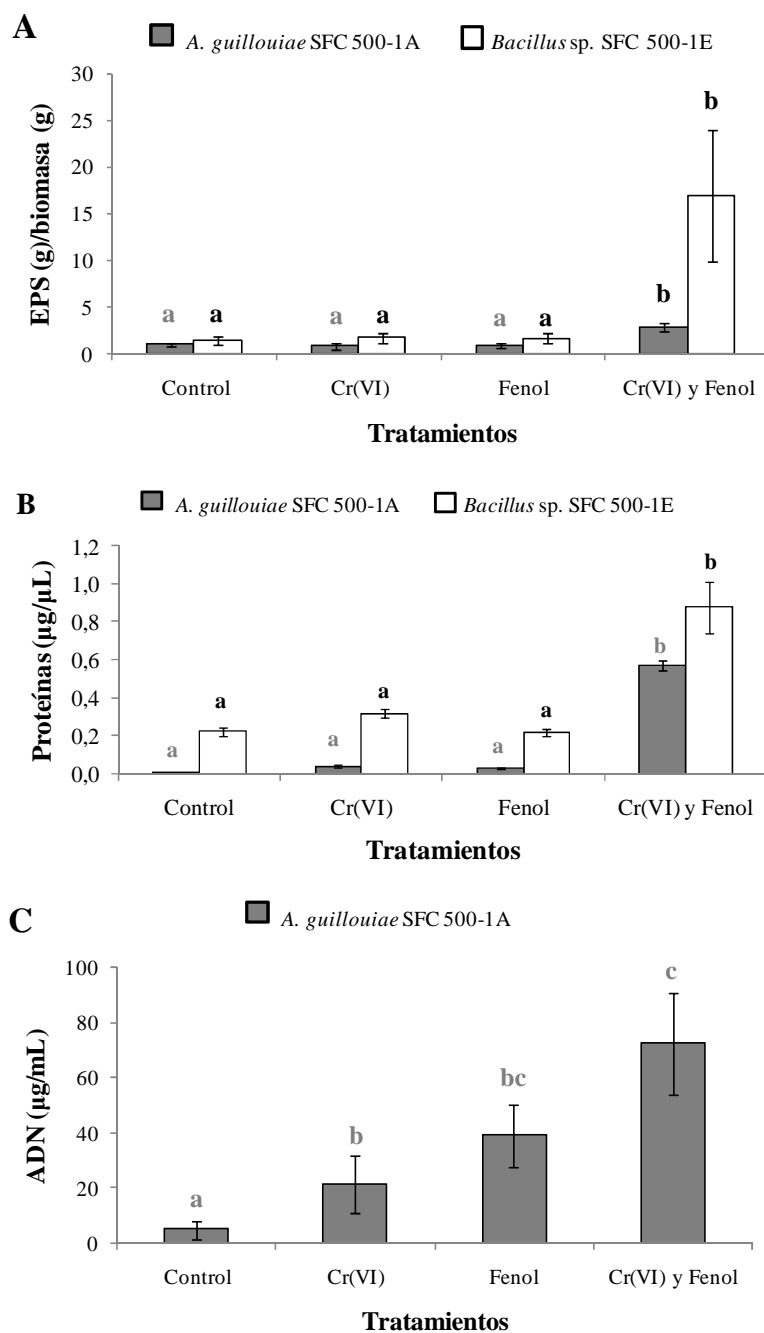


Figura 21: Contenido de EPS (A), proteínas (B) y ADN (C) en el exopolímero de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, creciendo en condiciones control, en presencia de 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes simultáneamente. Los datos representan la media \pm SE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey, $p \leq 0,05$).

En la literatura, existen reportes contradictorios acerca de la producción de EPS en bacterias expuestas a Cr. Ozturk y col. (2009), por ejemplo, mostraron una correlación positiva entre la tolerancia a Cr(VI) y la producción de EPS en *Synechocystis* sp. BASO670. De igual manera, se informó un aumento de EPS en *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* sp., y *Bacillus licheniformis* B22 cuando se añadió al medio de cultivo 25, 53 y 150 mg/L de Cr(VI), respectivamente (Dogan y col., 2015; Kiliç y col., 2015; Prieto Contreras y col., 2015). Así, la producción de EPS podría estar relacionada con la concentración del metal originalmente agregada al medio de cultivo. Frente al ión cromato también se observó sobreproducción de componentes extracelulares en *E. cloacae* CYS-25 y *B. subtilis* (Sundar y col., 2011; Yang y col., 2007). En contraposición, Mary y col. (2008) demostraron disminución significativa (4 veces) en el contenido de EPS con el aumento de la concentración de Cr(VI) en *Bacillus* sp. Por otro lado, Malaviya y Singh (2014) informaron que los polímeros extracelulares no estuvieron implicados en los mecanismos de tolerancia a Cr(VI) en *Corynebacterium hoagii*, de manera similar a lo observado en nuestro trabajo.

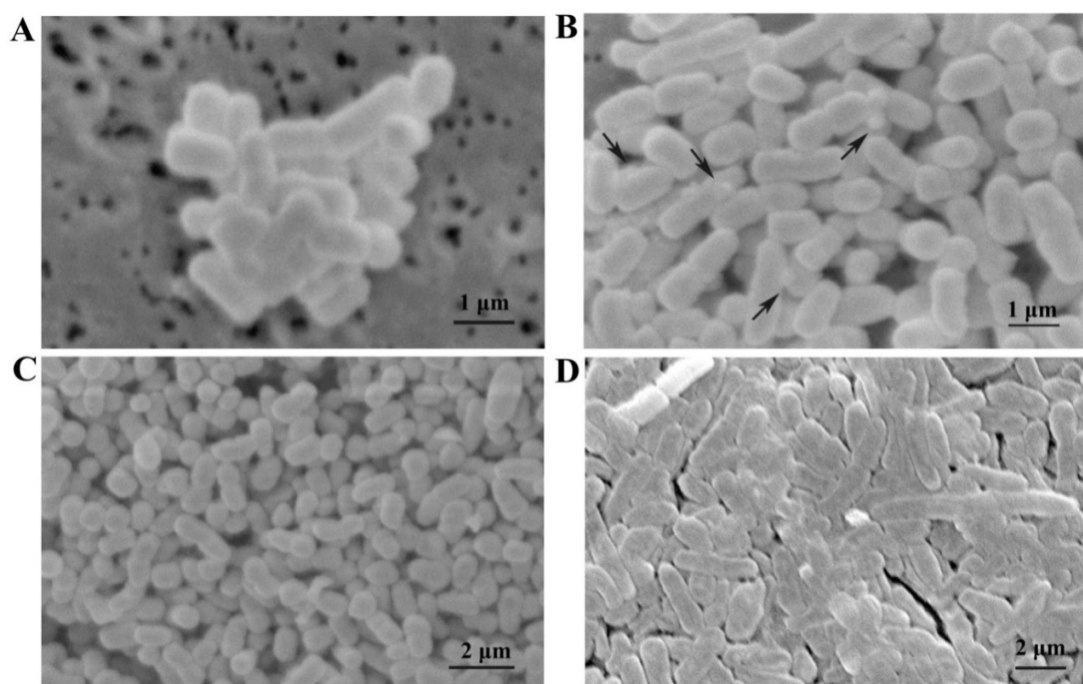


Figura 22: Análisis del biofilm y de la matriz exopolimérica de *A. guillouiae* SFC 500-1A creciendo en condiciones control (A), en presencia de 25 mg/L de Cr(VI) (B), 300 mg/L de fenol (C) y ambos contaminantes simultáneamente (25 mg/L Cr(VI)-300 mg/L fenol) (D). Las flechas indican posiblemente la unión de iones del metal en la superficie de una matriz amorfa, con características de exopolímero. Las microfotografías fueron obtenidas con SEM.

Es importante notar que los EPS pueden adsorber diferentes metales pesados, como se describió para *Bacillus firmus* que fue capaz de unir iones metálicos como Pb, Cu, Zn (Salehizadeh y Shojaosadati, 2003). Por esta razón, los exopolímeros podrían desempeñar un papel crucial en la biosorción/biorremediación de metales pesados, y especialmente de Cr (Harish y col., 2012; Quintelas y col., 2011). Los EPS forman complejos con cationes metálicos que retardan su difusión dentro del biofilm y producen su inmovilización dentro de la matriz exopolimérica (Pal y Paul, 2008). Estos complejos generalmente resultan de interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y complejamiento superficial entre ligandos metálicos catiónicos y componentes cargados negativamente de los biopolímeros (proteínas y carbohidratos), como grupos carboxilos (aminoácidos, ácidos urónicos), fosforilos y sulfatos (Ha y col., 2010).

En las cepas en estudio, si bien se detectó una baja concentración de Cr(VI) en la matriz exopolimérica, el EPS cargado negativamente podría actuar además como quelante de Cr(III) (no cuantificado en la matriz), ya que el Cr añadido en forma de dicromato, podría reducirse a Cr(III). Como se mencionó en la sección anterior, ambas cepas en estudio poseen actividad cromato reductasa capaz de realizar dicha reducción, por lo tanto no podemos descartar la posible captura de Cr(III) en la matriz exopolimérica.

Poco se sabe sobre los mecanismos por los cuales los compuestos orgánicos interactúan con los exopolímeros. Esto podría ser atribuido a la presencia de algunas regiones hidrofóbicas en los EPS (Flemming y Wuertz, 1998). En este sentido, se ha descrito la adsorción de benceno, fenantreno, ácidos húmicos y colorantes a los EPS de diferentes microorganismos (Sheng y col., 2008; Esparza-soto y Westerhoff, 2003; Liu y col., 2001). Además, se informó una sobreproducción de EPS en *Acinetobacter* sp., y varias especies de *Pseudomonas* en presencia de diversos contaminantes orgánicos (2,4-D, benceno, BTX y gasolina) (Kang y Park, 2010; Onbasli y Aslim, 2009) y en *B. thuringiensis* creciendo con fenol (Adav y Lee, 2008).

La combinación de metales con compuestos orgánicos provocó un aumento en la producción de EPS en ambas cepas integrantes del consorcio. Dicha respuesta fue también observada por Fang y col. (2002) en biofilms bacterianos marinos conteniendo metales, glutaraldehído y fenol.

Por otro lado, el exopolímero de ambas cepas bacterianas obtenido después del tratamiento con Cr(VI) y fenol simultáneamente, mostró un contenido de proteínas mayor respecto de los demás tratamientos. El hecho de encontrar en *A. guillouiae* SFC 500-1A un contenido más elevado de proteínas en el tratamiento simultáneo con respecto al tratamiento con Cr(VI), podría explicar la mayor cuantificación del metal en el exopolímero obtenido después del tratamiento con ambos contaminantes. Se ha descrito que las proteínas de la matriz polimérica extracelular serían el principal componente de unión a metales [Cu(II), Cd(II), Cr(VI) y Cr(III)], como se informó en *Rhodopseudomonas acidophila* y *Bacillus licheniformis* (Kavitha y col., 2011; Sheng y col., 2005).

Con respecto a los ácidos nucleicos presentes en la matriz exopolimérica (denominado comúnmente como ADNe -ADN extracelular-) (Steinberger y Holden, 2005), se conoce que tienen varias funciones en la formación y el mantenimiento del biofilm, incluyendo la fijación inicial y la estabilidad estructural (Molin y Tolker-Nielsen, 2003). En *A. guillouiae* SFC 500-1A, se detectaron diferentes concentraciones de ADN en la matriz exopolimérica según el tratamiento aplicado (Figura 21 C). Se ha demostrado que la presencia de moléculas de ADNe en las superficies de las células bacterianas aumenta su hidrofobicidad y ello influye en la adhesión a las superficies del sustrato y entre las bacterias (agregación) (Das y col., 2010; Liu y col., 2008). Esto podría explicar la agregación entre células de *A. guillouiae* SFC 500-1A en tratamientos con fenol y ambos contaminantes (Figura 7C, D), coincidiendo con aquellos tratamientos en los que los contenidos de ADNe fueron mayores. Se ha informado que en presencia de altas concentraciones de ADNe los iones metálicos podrían estar quelados (Mulcahy y col., 2008). Por ejemplo, Priester y col. (2006) observaron elevadas concentraciones de ADNe asociado con Cr(III), en *P. putida*. En nuestro caso, el mayor contenido de ADNe (tratamiento con ambos contaminantes) se correlacionó con un alto porcentaje de remoción de Cr(VI) (50%), que equivale a 12,5 mg/L del metal, pero con una baja concentración del mismo en el exopolímero (1 mg/L). Esto sugiere que la mayor parte del Cr(VI) eliminado del medio líquido podría ser reducido a Cr(III) por cromato reductasas, que posteriormente formaría complejos con el ADNe y EPS, o bien podría ser internalizado en las células.

Los resultados del presente estudio demostraron que los polisacáridos, las proteínas y el ADNe de la matriz exopolimérica de *A. guillouiae* SFC 500-1A estarían implicados en los

mecanismos de tolerancia a Cr(VI) y fenol simultáneamente, mientras que en *Bacillus* sp. SFC 500-1E, sólo los polisacáridos y las proteínas podrían desempeñar un papel importante en la adaptación a estos contaminantes en simultáneo.

5.7.2. Formación de biofilm en presencia de Cr(VI), fenol y ambos contaminantes

Debido a que la producción de los exopolímeros varió cuando los microorganismos fueron expuestos a los contaminantes, se analizó el efecto del Cr(VI), fenol y de ambos contaminantes simultáneamente en la formación de biofilm.

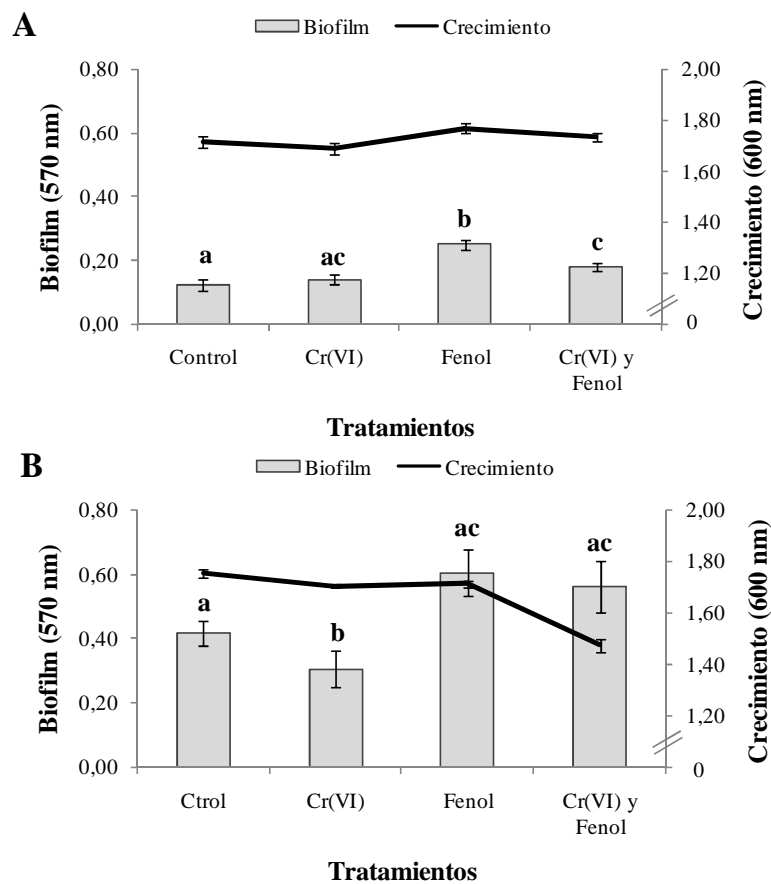


Figura 23: Formación de biofilm por *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B), creciendo en condiciones control, en presencia de 25 mg/L de Cr(VI), 300 mg/L de fenol y ambos contaminantes simultáneamente. Los datos representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Test de Tukey, $p \leq 0,05$).

Como se muestra en la Figura 23 la formación de biofilm aumentó significativamente cuando *A. guillouiae* SFC 500-1A se expuso a fenol, mientras que en el caso de *Bacillus* sp.

SFC 500-1E la formación de biofilm aumentó, aunque no significativamente, en presencia del contaminante orgánico (ya sea sólo o combinado con el metal). Estos resultados fueron consistentes con las imágenes obtenidas mediante *AFM* y *SEM* que mostraron agregación celular y producción de biofilm (Figura 7C, D; 9C, D y 22C, D). Además, se correlacionaron con la producción de EPS y proteínas extracelulares en *Bacillus* sp. SFC 500-1E (sección 5.6.1). Existen algunos trabajos que demuestran la utilización de biofilms bacterianos para el tratamiento de aguas y efluentes contaminados con Cr (Priester y col., 2006; Smith y Gadd, 2000). Con respecto al efecto del fenol, algunos autores observaron una reducción significativa en la formación de biofilm en bacterias expuestas a fenol, catecol y compuestos fenólicos derivados de plantas (Ugurlu y col., 2016; Maisuria y col., 2015), efecto contrario al observado en las bacterias en estudio. La diferencia entre los resultados encontrados, podría deberse a que no existe un patrón general para la formación de biofilm, ya que dicho proceso está influenciado por múltiples factores además del estrés ambiental, como el contenido nutricional del medio, fase de crecimiento bacteriana, hidrofobicidad de la superficie celular, cargas superficiales y presencia de proteínas de adhesión, pili o flagelos, entre otras (Busscher y Mei, 2012; Denkhaus y col., 2007; Kolter y Greenberg, 2006). Por lo tanto, para una comprensión profunda de esta respuesta microbiana, se necesitan más conocimientos sobre los componentes bacterianos necesarios para el desarrollo de biofilm, así como de los mecanismos que regulan su producción y actividad.

5.7.3. Hidrofobicidad de la superficie celular

La afinidad de las células microbianas por las interfases hidrófobas es una propiedad importante que afecta directamente la eficiencia de bioprocesos como la biorremediación (Hori y col., 2008). Además, como se mencionó en la sección anterior, la hidrofobicidad de la superficie celular es un factor que influye en la formación de biofilms, por lo tanto se decidió profundizar su estudio. Para esto, se midió el porcentaje de células de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E adheridas a la fase xilénica (como medida de la hidrofobicidad) después de crecer en presencia de Cr(VI) (25 mg/L), fenol (300 mg/L) y ambos contaminantes simultáneamente durante diferentes tiempos (5, 10 y 16 h).

El porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de *A. guillouiae* SFC 500-1A fue del 60% y para *Bacillus* sp. SFC 500-1E del 20%, independientemente del contaminante y del

tiempo de exposición. Según Tahmourespour y col. (2008) una eliminación de más del 50% de la suspensión celular de la fase acuosa (a la fase orgánica) es indicativa de la presencia de una superficie celular hidrófoba. En este sentido, *A. guillouiae* SFC 500-1A presentaría una superficie celular hidrofóbica, mientras que *Bacillus* sp. SFC 500-1E hidrofílica. La Figura 24A muestra claramente la afinidad de las células de *A. guillouiae* SFC 500-1A por la fase de xileno adherida a éste en forma de monocapa. En contraposición, la Figura 24B muestra a las células de *Bacillus* sp. SFC 500-1E bastante alejadas de la fase xilénica.

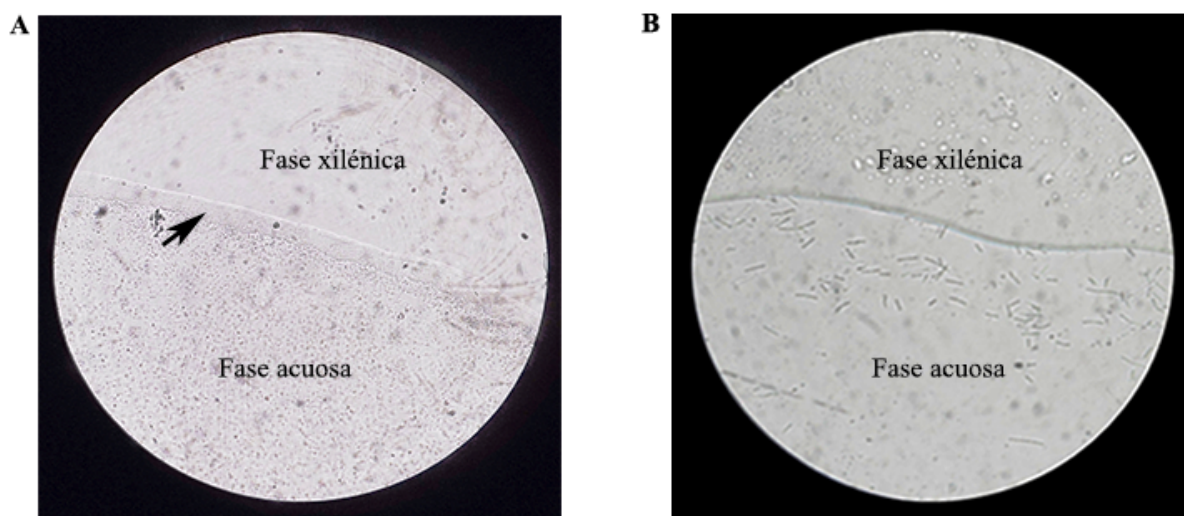


Figura 24: Adhesión de *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B) a la fase xilénica. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio óptico. La flecha indica la adsorción en monocapa a la superficie de xileno.

La capacidad de las células bacterianas de adherirse a los hidrocarburos no se limita a las bacterias degradadoras de éstos, sino que son las interacciones hidrofóbicas las que determinan el contacto directo entre las células y el hidrocarburo (Rosenberg y col., 1980). Si bien la hidrofobicidad celular no varió al exponer a las bacterias a los diferentes contaminantes, probablemente, el contacto entre una superficie bacteriana altamente hidrofóbica como la de *A. guillouiae* SFC 500-1A con un compuesto moderadamente hidrófobo tal como el fenol, favorecería la interacción entre células (coadhesión) y la formación de biopelículas (tal como se observó en la sección anterior). En este sentido, Pompilio y col. (2008) reportaron que las bacterias hidrófobas poseen afinidad entre sí, conduciendo al autoensamblaje de bacterias y con compuestos hidrófobos.

Los resultados obtenidos nos permitieron inferir que la diferencia en la hidrofobicidad celular entre ambas bacterias podría explicar por qué *A guillouiae* SFC 500-1A sería capaz de incorporar y metabolizar el fenol, dado que esta cepa podría adherirse a sustancias hidrofóbicas y la interacción célula-contaminante constituye el primer paso en el proceso de biodegradación. Contrariamente, *Bacillus* sp. SFC 500-1E sería incapaz de hacerlo principalmente por la repulsión que existe entre la superficie celular hidrofílica y el fenol, lo que dificultaría su ingreso al interior celular.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

El Cr(VI) y el fenol, ya sea de manera independiente o simultánea, afectaron la morfología, el tamaño, la superficie celular, así como la ultraestructura de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1, luego de 16 h de exposición. Esto se vio reflejado por un aumento tanto en términos de longitud, ancho y altura celular en ambas bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1. Además, en *A. guillouiae* SFC 500-1A el Cr(VI) produjo principalmente cambios intracelulares dados por la presencia de partículas densas a los electrones (PDE), mientras que el fenol produjo agregación celular. El tratamiento con ambos contaminantes simultáneamente provocó una sumatoria de estos efectos. En *Bacillus* sp. SFC 500-1E por su parte, los contaminantes provocaron principalmente la aparición de una gran cantidad de PDE (en presencia del metal) y un incremento del número de células lisadas (en presencia de fenol), probablemente por la capacidad de *Bacillus* sp. SFC 500-1E para remover el metal del medio de cultivo y a su incapacidad de metabolizar el fenol, respectivamente.

Los cambios a nivel de la superficie celular, así como el fenómeno de auto-agregación celular mencionados anteriormente nos llevaron a realizar otros estudios que permitieron determinar la participación de la membrana celular y de sus componentes en la respuesta al estrés por los contaminantes, así como la implicancia de los exopolímeros y formación de biofilm. En este sentido, se ha podido demostrar que el Cr(VI) y el Cr(VI) y fenol simultáneamente, incrementaron la rigidez de las membranas en ambas bacterias, mientras que el fenol sólo ejerció un efecto fluidificante en la membrana de *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Estos cambios en el estado físico de las membranas bacterianas desencadenaron modificaciones en la composición química de los PLs. En presencia de Cr(VI) y Cr(VI) y fenol en simultáneo, *A. guillouiae* SFC 500-1A respondió disminuyendo los niveles de PE, probablemente vía PLA₂, incrementando los niveles de CL y, en menor medida, modificando la composición de ácidos grasos, mientras que *Bacillus* sp. SFC 500-1E sólo modificó levemente el perfil de ácidos grasos. Estos cambios, incrementaron aún más la rigidez de la membrana en *A. guillouiae* SFC 500-1A, mientras que lograron contrarrestar el efecto en las membranas de *Bacillus* sp. SFC 500-1E, en presencia de ambos contaminantes simultáneamente. Por otro lado, el efecto de fluidez provocado sólo por el fenol en la membrana de *Bacillus* sp. SFC 500-1E indujo una respuesta a nivel de los FAMES. Sin embargo, dicho mecanismo no fue suficiente para restaurar el estado físico de la membrana.

Los estudios bioquímicos permiten sugerir que en *A. guillouiae* SFC 500-1A, los PLs minoritarios tales como PIPs estarían fuertemente comprometidos durante la respuesta a Cr(VI) y a Cr(VI) y fenol en simultáneo. El Cr(VI) actuaría a nivel de membrana plasmática como un inductor primario, activando la ruta de los PPIIn (PLC/DGK) para la producción de un segundo mensajero como el PA. Éste desempeñaría funciones clave en la activación de diferentes componentes de vías de señalización, algunos de los cuales podrían activar a genes que codifican para cromato reductasas u otras enzimas, responsables de la atenuación del estrés o daño causado por la exposición al metal.

Por último, se encontró también que en presencia de Cr(VI) y fenol simultáneamente, la producción de exopolímeros tales como EPS, proteínas y ADN sería un mecanismo de respuesta adaptativa en *A. guillouiae* SFC 500-1A, mientras que en *Bacillus* sp. SFC 500-1E sólo se detectó la producción de EPS y proteínas. Frente a fenol en cambio, la formación de biofilm sería una estrategia de supervivencia importante en ambas bacterias.

Integrando los resultados presentados en este Capítulo con los antecedentes previos en el tema, es posible plantear un modelo que resume los principales efectos del Cr(VI) y fenol sobre las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1, *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1, así como los mecanismos de respuesta al estrés por estos contaminantes (Figura 25).

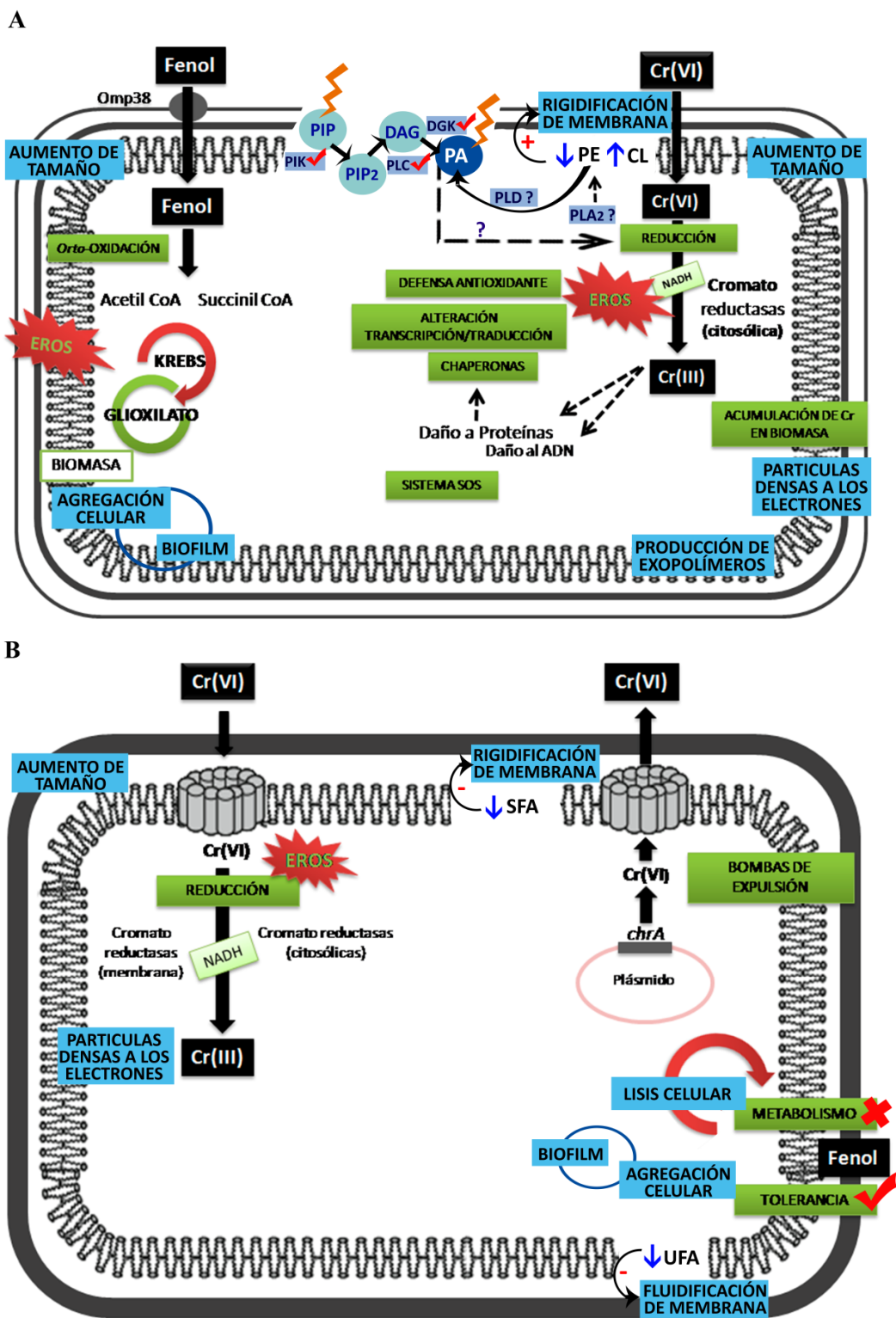


Figura 25: Esquema representativo que resume los principales efectos del Cr(VI) y fenol sobre *A. guillouiae* SFC 500-1A (A) y *Bacillus* sp. SFC 500-1 (B) y los mecanismos de respuesta por parte de las mismas, elaborado en base a los resultados del capítulo I (recuadros celestes) y antecedentes previos de nuestro laboratorio (recuadros verdes).

CAPÍTULO II:
*Aplicación del consorcio SFC 500-1
para el tratamiento de efluentes de
curtiembre*



INTRODUCCIÓN



7. INTRODUCCIÓN

7.1. Los efluentes de curtiembre como fuente de contaminación ambiental

Las curtiembres son industrias importantes en el marco de la producción argentina dado que las materias primas están altamente disponibles en nuestro país y los procesos han sido optimizados a través de la práctica histórica del curtido de pieles (UN-FAO 2013). Sin embargo, los efluentes líquidos generados por esta industria conducen a la contaminación del agua y consecuentemente a una disminución de la calidad de los cuerpos de agua receptores, lo que representa un riesgo ambiental, así como para la salud animal y humana (Amanial 2016; Akhand y Rao, 2013). Por tal motivo, los efluentes de estas industrias no deberían descargarse en ningún punto antes de un tratamiento adecuado.

En general, el tratamiento de efluentes industriales consiste en diferentes etapas: primaria, secundaria y terciaria, con el fin de mejorar la calidad de éstos (Sharma y Goel, 2015; Erijman y col., 2011). En la Tabla 4 se mencionan características generales de las diferentes etapas de tratamiento para efluentes de curtiembre. Es importante mencionar que el tipo de tratamiento requerido por cada planta dependerá de los procesos llevados a cabo por la industria, los insumos utilizados, los volúmenes de producción, las características físico-químicas y microbiológicas de los efluentes generados, etc. (Lofrano y col., 2013). Por otro lado, se ha observado que estos tratamientos frecuentemente son incompletos y por lo tanto no alcanzan a disminuir la toxicidad de los efluentes, de acuerdo con lo requerido por las leyes y estándares ambientales vigentes (Sharma y Goel, 2015). Esta situación ha llevado a la industria y a los investigadores a buscar una mejora en los mismos.

Tabla 4: Características generales de las diferentes etapas de tratamiento de efluentes de curtiembre.

Etapas	Finalidad	Unidades representativas	Tipo de proceso involucrado
Primaria	Remover la mayor parte de los sólidos, grasas, materia orgánica y sustancias tóxicas como los metales, fenoles y sulfatos.	Sedimentación, desbaste de sólidos, coagulación/floculación, oxidación (reacciones Fenton, procesos basados en ozono, fotocátalisis), tratamientos electroquímicos, tecnologías con membranas (ultrafiltración, ósmosis inversa).	Físico-químico
Secundaria	Remover la materia orgánica biodegradable, biotransformar/metabolizar/ acumular contaminantes como metales, compuestos orgánicos.	Procesos anaeróbicos (filtros y/o biorreactores) y/o aeróbicos (biorreactores de membrana, lodos activados).	Biorremediación (generalmente bacterias y hongos)
Terciaria	Eliminar, degradar, transformar o inmovilizar contaminantes remanentes.	Humedales artificiales Ozono	Fitorremediación (plantas terrestres y acuáticas) Físico-químico

Datos obtenidos de Sabumon (2016); Yadav y col. (2016); Truu y col. (2015); Lofrano y col. (2013); Balakrishnan y col. (2002)

7.2. Utilización de diferentes escalas de trabajo para estudiar el tratamiento secundario de efluentes

Cuando se decide abordar el estudio de estrategias de biorremediación, se debe definir el sistema experimental a emplear, principalmente en relación con las condiciones ambientales en las que el mismo se llevará a cabo (controladas o no), así como la escala de trabajo a utilizar (pequeña o gran escala). No resulta una tarea fácil y es un desafío importante cuando se trabaja con efluentes, debido a que ni los contaminantes ni los microorganismos están homogéneamente distribuidos en estas matrices, ni tampoco son sistemas estáticos. A esto se le suma que los resultados obtenidos en el laboratorio no siempre son reproducibles en escalas mayores, tales como en el tratamiento *in situ* de áreas contaminadas.

Una primera aproximación consiste en caracterizar los efluentes, realizar una evaluación de la eficiencia de los microorganismos o aislados a utilizar en cuanto a la remoción de contaminantes en dichos efluentes, pero en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, como se mencionó anteriormente estos estudios no garantizan la obtención de sistemas confiables y predecibles para ser aplicados a campo (Thompson y col., 2005). En ese sentido, existen innumerables factores bióticos y abióticos que influyen directamente en el proceso de biorremediación, tales como la competencia con la flora nativa, infección por bacteriófagos, temperatura, pH, concentración de oxígeno, disponibilidad de dadores y aceptores finales de electrones y presencia de ciertos compuestos tóxicos co-contaminantes, entre otros (Nzila y col., 2016; Pandey y Fulekar, 2012). Esto explica por qué muchas bacterias seleccionadas *in vitro* por su elevado potencial para remover contaminantes, resultaran poco efectivas para el bioaumentación de efluentes contaminados (Tyagi y col., 2011).

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 frasco 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., 2007). Una solución para este tipo de problemas es la realización del escalado gradual del volumen de trabajo hasta alcanzar una escala industrial.

Avanzando a un escenario ambiental más real, los microcosmos a campo han sido propuestos como sistemas experimentales que permiten superar las dificultades que se presentan, al querer transferir los resultados desde las condiciones de laboratorio (perfectamente controladas) y poder acercarse a la aplicación a gran escala (Grenni y col., 2012). Sin embargo, se deben evaluar algunos aspectos críticos sobre el diseño, uso y análisis de esta metodología, así como otras relacionadas con el control de las variables ambientales (Ruberto y col., 2013). Cuando se propone un sistema de biorremediación de estas características, se debe analizar si el tratamiento biológico es capaz de reducir significativamente el nivel de contaminantes del efluente, lo cual representa una de las cuestiones más generales y su respuesta requiere una evaluación cuidadosa que podría

implicar la experimentación en microcosmos. El número de microcosmos y la complejidad del diseño experimental dependerá de cada situación particular, pero sin duda tendrán como objetivo comprender los mecanismos subyacentes y evaluar las principales variables que afectan al proceso (Ruberto y col., 2013; Grenni y col., 2012). En general, son escasos los estudios realizados a nivel de microcosmos. Dentro de éstos, los más frecuentes hasta el momento son aquellos llevados a cabo para estudiar la remediación de diferentes efluentes (provenientes de la industria del acero, curtiembres, lácteas) a escala Erlenmeyers o en reactores pequeños (Porwal y col., 2015; Noorjahan, 2014; Keerthi y col., 2013; Krishnaveni y col., 2013). Porwal y col. (2015) por ejemplo, establecieron un modelo de dos etapas para el tratamiento de efluentes lácteos con recipientes de plástico (1,5 L) y materiales de filtración. Sin embargo, los estudios a campo representan una mejor aproximación del proceso a la realidad, ya que se deben considerar otros factores como los cambios estacionales, que podrían modificar profundamente la tasa de actividad biológica y determinar el éxito o el fracaso de un proyecto (Eller y col., 2005). Pese a esto, actualmente son escasos los antecedentes al respecto.

Por último, es importante destacar tal como lo expresan Ruberto y col. (2013), que los "microcosmos" utilizados en la investigación de biorremediación, no son sólo dispositivos experimentales para efectuar simplemente la observación del comportamiento de los componentes de un ecosistema, sino también para la búsqueda de las condiciones óptimas para un proceso biotecnológico.

7.3. Aplicación de microorganismos para la biorremediación de efluentes de curtiembre

En relación a los tratamientos secundarios, existen varios estudios basados en el uso de microorganismos para la remoción de un contaminante en particular de efluentes de curtiembre. Algunos trabajos evaluaron específicamente la remoción de Cr(VI) (Saranraj y Sujitha, 2013; Garg y col., 2012), de nitrógeno (Leta y col., 2005) a partir de efluentes de curtiembre, mientras que Tripathi y Garg (2013) analizaron la remediación simultánea de Cr(VI) y pentaclorofenol por células de *Bacillus cereus* libres e inmovilizadas. Ashraf y col. (2018) por su parte, estudiaron la efectividad del tratamiento de efluentes de curtiembre mediante la utilización de bacterias tolerantes a Cr y NaCl. Sin embargo, son escasos los

trabajos que abordan la remoción simultánea de varios contaminantes, tales como Cr, fenoles y materia orgánica, presentes en este tipo de efluentes y menos aún por consorcios bacterianos (Bhattacharya y col., 2015; Wong y col., 2015; Gunasundari y Muthukumar, 2013).

Nuestro grupo de trabajo determinó previamente que el consorcio SFC 500-1 reduce Cr(VI) a Cr(III) (35 mg/L) y degrada fenol (1000 mg/L) en medios sintéticos, siendo capaz de remover simultáneamente estos compuestos en un amplio rango de pH, temperaturas y en diferentes medios de cultivo. Además, se demostró que el consorcio remedia simultáneamente hasta 23 mg/L de Cr(VI) y 750 mg/L de fenol en 120 h, bajo condiciones óptimas de operación (Ontañón y col., 2015a), como así también se observó que la eficiencia de remoción mejoró mediante la inmovilización de las bacterias en alginato de calcio (Ontañón y col., 2017).

Si bien el bioaumentación ha sido planteado como una estrategia de gran aceptación, en muchas ocasiones su aplicación no resulta del todo eficiente (Nzila y col., 2016). Entre los factores que podrían estar afectando el proceso de biorremediación, podemos mencionar la falta de disponibilidad de los nutrientes y/o contaminantes para los microorganismos por ser compuestos pocos solubles o altamente recalcitrantes (Laha y col., 2009), desequilibrios en la relación C:N:P del efluente que llevaría a la falta de nutrientes para el crecimiento microbiano (Metcalf y col., 2014; Ammary 2004), etc. A partir de esto es que cobra importancia la utilización de surfactantes, así como también la combinación de la estrategia de bioaumentación con la bioestimulación (adición exógena de nutrientes), ya que se conoce que ambos podrían mejorar los procesos de biorremediación (Dargo y Ayalew, 2014; Laha y col., 2009; Nikolopoulou y Kalogerakis, 2009; Baek y col., 2007).

En los procesos de biorremediación, la biodisponibilidad de los nutrientes es el primer punto a considerar y es aquí es donde entran en juego los surfactantes. Éstos, son compuestos tensoactivos que permiten aumentar la biodisponibilidad (solubilización, desorción) de nutrientes y/o contaminantes que naturalmente no lo están y pueden ser tanto surfactantes sintéticos como naturales (Zhou y col., 2011; Marquez-Rocha, 2001). Los surfactantes naturales (biosurfactantes) son producidos por microorganismos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. Los biosurfactantes pueden competir con los tensoactivos sintéticos en términos de rendimiento, biodegradabilidad, baja toxicidad y estabilidad en una amplia variabilidad de factores medioambientales. Sin embargo, en la

actualidad, los tensioactivos sintéticos son una opción preferida en diferentes áreas industriales, debido a su disponibilidad en cantidades comerciales, a diferencia de los biosurfactantes. De todos modos, el uso de surfactantes sintéticos puede introducir nuevas especies de contaminantes recalcitrantes en el medio ambiente y conducir a resultados no deseados cuando se realiza una selección incorrecta del mismo (Fenibo y col., 2019; Makkar y Rockne, 2003).

El uso de biosurfactantes está ampliamente descrito en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos (fenantreno y pireno), así como en la dispersión, desorción y solubilización de metales en suelos y aguas subterráneas contaminadas (Feng y col., 2019; Shah y col., 2019; Jorfi y col., 2014). Se ha demostrado que los ramnolípidos y las surfactinas son los biosurfactantes populares más utilizados (Patel y col., 2019; Jorfi y col., 2014). Whang y col. (2008) demostraron que la adición de 40 mg/L de surfactina en agua y suelo mejoró el crecimiento de biomasa y logró un 50% de degradación de diesel, mientras que Sarubbo y col., (2018) pudieron lograr eliminar 98.8% de Zn, 89.3% de Fe y 89.1% de Pb, utilizando biosurfactantes producidos por *Candida guilliemondii* UCP 0992. En relación a los de origen sintéticos, varios estudios describen un aumento en la solubilización de contaminantes, en suelo principalmente, cuando se utilizan surfactantes tales como Tween 80 (no aniónico), dodecil sulfato de sodio –SDS- (aniónico), cloruro de alquilbencildimetilamonio (catiónico), Triton X-100, Tween 10, 15, 80 (no iónicos) (Lai y col., 2009; Conte y col., 2005; Sobisch y col., 2000; Tiehm 1994). Sobisch y col. (2000) por ejemplo, observaron un efecto positivo en el grado de solubilización y degradación del hidrocarburo pireno, al agregar combinaciones de los surfactante Tween 10 y Tween 15 en suelo, mientras que Tiehm (1994) obtuvo un incremento en la concentración de hidrocarburos en la fase acuosa utilizando SDS.

Una vez biodisponibles la mayor cantidad de nutrientes gracias al uso de surfactentes, otro factor a considerar es la relación C:N:P de la matriz a tratar. En aguas residuales sujetas a ser tratadas aeróbicamente, es común expresar a la relación C:N:P como DQO:N:P (Maier 1999; Metcalf y Eddy, 1991). Diferentes estudios han informado distintas relaciones de DQO:N:P óptimas para eliminar nutrientes de aguas residuales, dependiendo de sus características iniciales, así como las tecnologías utilizadas para lograrlo (Hamza y col., 2018; Hao y Liao, 2015; Krishnan y col., 2008). Hamza y col. (2019) por ejemplo, obtuvieron las mayores eficiencias de eliminación de nutrientes en aguas residuales con alta carga orgánica

usando las relaciones de DQO:N:P de 100:2,8:0,4 y 100:1,1:0,4 cuando aplicaron la tecnología de lodos granulados aeróbicos.

Otro factor de importancia al momento de liberar al medio ambiente un efluente bioaumentado, es considerar la inocuidad de los microorganismos utilizados en relación a su resistencia/suceptibilidad a los antibióticos. En este sentido, el agua constituye la vía principal por la cual se introducen genes de resistencia bacterianos en los ecosistemas naturales (Storteboom y col., 2010), donde las bacterias no patógenas pueden servir como reservorio de genes de resistencia. Esto, acompañado del uso intensivo de compuestos químicos persistentes (detergentes, desinfectantes, metales pesados, xenobióticos), aumenta la presión selectiva en bacterias, facilitando la transferencia horizontal de resistencia a antibióticos entre las comunidades de bacterias en ambientes acuáticos (Garhwal y col., 2014; Wellington y col., 2013) y con ello las consecuencias negativas bien conocidas en materia de salud humana. Por esta razón, resulta importante evaluar la sensibilidad a diferentes antibióticos de aquellas bacterias biorremediadoras que podrían ser aplicadas en ambientes naturales, con el fin de garantizar la inocuidad de su utilización como estrategias de biorremediación. Se han estudiado los patrones de resistencia a antibióticos en aislados bacterianos capaces de tolerar diferentes contaminantes, tales como metales. Estos estudios revelaron generalmente que la resistencia a los antibióticos está altamente acoplada con la resistencia a los metales (Jardine y col., 2019; Joshi y Modi, 2012; Samanta y col., 2012).

7.4. Evaluación de la toxicidad de efluentes tratados mediante bioensayos

En general, los resultados de un proceso de biorremediación son a menudo controlados evaluando las concentraciones remanentes de los contaminantes mediante análisis químicos. Sin embargo, estos métodos no son suficientes para evaluar la eficacia de las técnicas de remediación en términos de detoxificación. Esto podría deberse a que no siempre la degradación/transformación de un contaminante orgánico ó el cambio de estado de oxidación de un compuesto inorgánico, conlleva la pérdida de sus propiedades tóxicas. Menos aún en matrices tan complejas como los efluentes, donde existe una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos. Por otro lado, es importante mencionar que para ciertos compuestos, los intermediarios de la reacción pueden ser tan tóxicos o más aún que el compuesto original.

Por tal motivo, uno de los aspectos más relevantes a estudiar, como parte de los procesos de biodegradación de los efluentes, es la disminución de su toxicidad luego del tratamiento a fin de establecer la inocuidad de los productos finales y por ende, determinar si el efluente tratado es aceptable o no para su vertido a cuerpos de agua receptores (Gustavson y col., 2000). Para tal fin, los bioensayos de toxicidad proporcionan información útil, confiable, simple y rápida y aprovechan la capacidad que presentan los organismos vivos para responder a cualquier sustancia química o mezcla compleja de tóxicos (Moriarty 1999). De este modo, es posible lograr una integración de los datos analíticos con los toxicológicos para monitorear el progreso y la eficiencia del proceso de biorremediación, así como para evaluar correctamente el riesgo ecológico de las soluciones o efluentes tratados (Connon y col., 2005).

Un bioensayo de toxicidad involucra a un organismo que es expuesto a un agente que, como se mencionó, puede ser un compuesto en particular o una muestra ambiental conteniendo una mezcla de contaminantes químicos, a los fines de evaluar efectos como la muerte, inhibición del crecimiento, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos, mutagenicidad y carcinogenicidad (Cairns y Pratt, 1989). Según Römbke y Moltman (1996), estos efectos dependerán de la duración y de la frecuencia de exposición al agente, por lo tanto, los ensayos se pueden clasificar en: (a) ensayos de toxicidad aguda, cuando el efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos durante un periodo de exposición al tóxico es habitualmente de pocos días; (b) ensayos de toxicidad crónica, cuando el efecto tóxico es a largo plazo, generalmente con un tiempo de exposición de alrededor de la décima parte de la vida media de la especie.

Tanto las especies usadas para los bioensayos como las características de los bioensayos aplicados, deben cumplir con diferentes requisitos establecidos por normas tales como las propuestas por la EPA (1994). En relación a los organismos, éstos deben ser bien conocidos en cuanto a su biología, respuestas fisiológicas y comportamentales, de fácil manejo en el laboratorio y con un ciclo de vida corto. Además, se considera importante que las especies utilizadas en las pruebas de toxicidad sean representativas del área de estudio para aumentar la previsibilidad de los posibles efectos ambientales (Chapman 2000). Entre los organismos frecuentemente empleados se pueden mencionar a plantas, algas, anfibios, bacterias, nemátodos, crustáceos, peces, roedores e insectos.

Una de las pruebas con plantas que más se ha aplicado para la evaluación toxicológica ambiental, a corto plazo, es el ensayo de germinación con semillas de *Lactuca sativa* (Park y col., 2016; Charles y col., 2011). Este bioensayo es de tipo agudo, y evalúa los efectos fitotóxicos de un compuesto puro o de una mezcla compleja sobre la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas durante los primeros días del crecimiento (longitud de la radícula y del hipocótilo) (Sobrero y Ronco, 2004). Esta prueba no sólo se utiliza para la evaluación del riesgo tóxico de diversos compuestos químicos sino también, más recientemente, para analizar el efecto de diversos sistemas de remediación de efluentes industriales (Lyu y col., 2018; Park y col., 2016; Young y col., 2012; Charles y col., 2011; Andrade y col., 2010).

Por otra parte, los anfibios están siendo cada vez más utilizados en la evaluación de toxicidad (pruebas de AMPHITOX). En particular, los embriones de anfibios son indicadores útiles de la contaminación ambiental debido a su alta sensibilidad al estrés físico-químico. Se pueden utilizar diversas especies de anfibios, entre ellas el sapo común sudamericano (*Rhinella arenarum* H.) que ha sido aplicado para la evaluación de efectos agudos o crónicos ya que permite obtener datos de mortalidad, teratogénesis y alteraciones en el comportamiento de los embriones y larvas frente a la exposición a un xenobiótico o mezclas tóxicas (Herkovits y Pérez-Coll, 1999). Entre las diferentes pruebas de AMPHITOX, podemos mencionar un conjunto de cuatro pruebas estandarizadas que se utilizan para evaluar la toxicidad en cuatro niveles diferentes: agudo, crónico a corto plazo, crónico y etapas tempranas de la vida, denominadas AMPHIACUT, AMPHISHORT, AMPHICHRO y AMPHIEMB, respectivamente (Herkovits y Pérez-Coll, 1999). Éstas pruebas han sido ampliamente utilizadas para evaluar la embriotoxicidad de diversos productos químicos tales como solventes, metales y diferentes muestras ambientales, como aguas superficiales y subterráneas, y efluentes industriales (Collins y Russell, 2009; Mann y col., 2009; Herkovits y Pérez-Coll, 2007; Marquis y col., 2006; Herkovits y col., 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos del efluente de curtiembre

Los efluentes fueron provistos por la curtiembre Víctor Manuel Zabala S.A., de la localidad de Elena (Cba). Éstos fueron tomados directamente del canal de salida del tanque de sedimentación primario. Las características físico-químicas y microbiológicas de los efluentes, así como los métodos y equipos utilizados para su determinación, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros físico-químicos y microbiológicos analizados en muestras de efluente de curtiembre.

Parámetro analizado	Método (equipo)
Físico-químicos y microbiológicos	
pH, temperatura, Conductividad eléctrica (CE)	(Waterproof Tester, modelo HI 98129 y HI98130; DDS-11A Conductivity Meter)
Oxígeno disuelto	(Sonda de oxígeno disuelto luminiscente, HQd Portable meter, modelo LDO10130, HACH).
Sólidos sedimentables	Método volumétrico (Ojeda Suárez 2004), (Cono de Imhoff).
Color, olor	Métodos organolépticos.
Demanda Química de Oxígeno (DQO)*	Kit comercial HACH “Digestion Solution for COD HR” (20-1500 mg/L).
Nitrógeno total (N)*	Kit comercial HANNA “Digestion Solution for Total Nitrogen HI 93767AyB” (10-150 mg/L).
Fósforo total (P)*	Kit comercial HANNA “Digestion Solution for Total Phosphorus HI 93758C” (0-3,5 mg/L PO ₄ ⁻³).
Sulfatos	Método turbidimétrico (Ojeda Suárez 2004).
Cr(VI) y Fenoles	Métodos Analíticos (<i>sección 4.8</i>).
Cr(III) y Cr total	(Espectrofotometría de absorción atómica), realizado por servicio, FARESTAIE.
Coliformes totales y termotolerantes	NMP/100 mL y crecimiento a 44°C (Ojeda Suárez 2004).

*Se siguieron los procedimientos sugeridos por los fabricantes y las lecturas se registraron utilizando un Espectrofotómetro multiparamétrico HANNA, modelo HI 83214.

8.2. Evaluación in vitro del potencial del consorcio SFC 500-1 y de las bacterias que lo integran para ser aplicado en biorremediación

8.2.1. Ensayo de tolerancia a diferentes metales y compuestos fenólicos

Se evaluó la tolerancia del consorcio y de las bacterias que lo integran a diferentes metales pesados, metaloides y compuestos fenólicos. Para esto, se determinó la viabilidad

celular de las cepas bacterianas en medio TY sólido suplementado con concentraciones crecientes de metaloides y metales (mM): NaAsO₂ (2; 5; 10; 20); Na₃AsO₄ (20; 40; 60; 100); ZnSO₄ (2; 5; 10); HgCl₂ (0,01; 0,05; 0,1); CdCl₂ (0,1; 0,25; 0,5) o concentraciones crecientes de compuestos fenólicos (mg/L): 2,4 diclorofenol (50; 100; 200); pentaclorofenol (1; 10; 20); guaiacol (500; 1000; 2000).

Las placas fueron sembradas con distintas diluciones de un cultivo bacteriano de 24 h y la viabilidad celular (UFC/mL) se determinó por el método de la microgota según Somasegaran y Hoben (1994).

8.2.2. Ensayo de remoción de colorantes industriales

Se analizó la capacidad tanto del consorcio SFC 500-1, como de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E para remover los colorantes industriales Negro Trupocor TR CONC (Trumpler Argentina S.A.); Rojo Trupocor TNA, Amarillo Trupocor M y Pardo Trupocor NT (Técnica Química Argentina S.A) en medio líquido, compuestos utilizados habitualmente por la curtiembre en estudio. Para ello, se inoculó (10% v/v) con el consorcio y las bacterias que lo integran Erlenmeyers conteniendo 20 mL del medio mínimo MM (Beringer 1974) (g/L): K₂HPO₄ (1,5), KH₂PO₄ (0,5), NaCl (0,5), NH₄Cl (3), MgSO₄ (0,3) y CaCl₂ (0,01) suplementado con 10 y 20 mg/L del colorante a ensayar (10% v/v). Para analizar la remoción debida a procesos físico-químicos (control abiótico) se emplearon medios con el colorante sin inocular. Todos los frascos Erlenmeyers se incubaron a 28±2°C y 200 rpm durante 25 d. Periódicamente se tomaron muestras, se las centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min y se determinó la absorbancia de los colorantes negro, rojo, amarillo y pardo por espectrofotometría a 610, 510, 440 y 450 nm, respectivamente. Los resultados se expresaron como eficiencia de remoción (%).

8.2.3. Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la viabilidad celular del consorcio SFC 500-1

Se evaluó la supervivencia del consorcio SFC 500-1 en medio TY a diferentes temperaturas y tiempos de incubación. Para esto, Erlenmeyers de 1 L conteniendo 400 mL de medio TY fueron inoculados (10% v/v) con el consorcio microbiano crecido previamente en TY durante 18-24 h. Estos Erlenmeyers se incubaron en agitación continua (200 rpm), a

28±2°C, durante 24 h, período en el que se alcanzó la fase de crecimiento estacionaria de las bacterias. Estos cultivos se envasaron en botellas de 300 mL, sin cámara de aire y se almacenaron a 5, 25 y 30 (±2)°C, sin agitación, durante 1, 2, 4 y 6 meses. Al finalizar cada experimento, se tomaron muestras para determinar viabilidad celular (UFC/mL) empleando la técnica de la microgota descrita por Somasegaran y Hoben (1994).

8.2.4. Ensayo de viabilidad celular del consorcio en efluente de curtiembre

Se evaluó la supervivencia del consorcio SFC 500-1 en el efluente de curtiembre, a diferentes temperaturas. Para esto, Erlenmeyers de 100 mL conteniendo 30 mL de efluente (estéril) fueron inoculados (al 10% v/v) con el consorcio microbiano crecido previamente en TY, durante 18-24 h. Estos Erlenmeyers se incubaron en agitación continua (200 rpm), a 5, 15, 25 (±2)°C, durante 15 d. Periódicamente, se tomaron alícuotas para determinar la viabilidad celular (UFC/mL) empleando la técnica de la microgota descrita por Somasegaran y Hoben (1994).

8.2.5. Ensayos de sensibilidad bacteriana frente a diferentes antibióticos

Se determinó la sensibilidad antimicrobiana de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E por el método de difusión en agar, empleando diferentes antibióticos (Tabla 6).

Para ello, se tomaron entre 3 y 5 colonias de cada bacteria y se resuspendieron en solución fisiológica, para la obtención de una suspensión bacteriana con un patrón de turbidez de 0,5 en la escala de McFarland, equivalente a 10⁸ UFC/mL para ambas bacterias. Estas suspensiones se utilizaron para inocular placas de Petri conteniendo medio agar Mueller Hinton (Merck) en las cuales se depositaron los discos de antibióticos. Luego de una incubación de 24 h a 28±2°C, se midió el halo de inhibición del crecimiento de cada bacteria y se determinó su susceptibilidad -sensibilidad (S), sensibilidad intermedia (SI) o resistencia (R)- por comparación con valores estandarizados previamente para el Género *Acinetobacter* y *Staphylococcus* obtenidos de Normas CLSI 2015 (<http://salud.mendoza.gov.ar>).

Tabla 6: Antibióticos seleccionados para *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E.

<i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A	<i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
Ceftazidima (CAZ), 30 µg	Vancomicina (VA), 30 µg
Cefepima (FEP), 30 µg	Clindamicina (DA), 2 µg
Imipenem (IMP), 10 µg	Imipenem (IMP), 10 µg
Meropenem (MEM), 10 µg	Meropenem (MEM), 10 µg
Piperacilina/Tazobactam (TZP), 100/10 µg	Penicilina (PEN), 10 µg
Ciprofloxacina (CIP), 5 µg	Ciprofloxacina (CIP), 5 µg
Amicacina (AK), 30 µg	Amicacina (AK), 30 µg
Gentamicina (GM), 10 µg	Gentamicina (GM), 10 µg
Ampicilina/sulbactam (SAM), 10/10 µg	Oxacilina (OXA), 1 µg
Trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), 1,25/23,75 µg	Eritromicina (E), 15 µg
Minociclina (MIN), 30 µg	

8.3. Ensayos de biorremediación

8.3.1. Ensayos de remoción *in vitro* de Cr(VI), fenol y materia orgánica de un efluente de curtiembre

Se analizó la capacidad del consorcio y de las bacterias que lo integran para remover simultáneamente Cr(VI), fenol y materia orgánica de un efluente de curtiembre en sistemas *in vitro* (en condiciones de laboratorio controladas y a es pequeña escala). Para ello, la remoción se llevó a cabo en frascos Erlenmeyers conteniendo 20 mL de efluente suplementado con 25 mg/L de Cr(VI) y 300 mg/L de fenol utilizando un inóculo bacteriano al 10% v/v. Controles de efluente sin inocular, se emplearon para analizar la remoción debido a la presencia de los microorganismos nativos del efluente (atenuación natural). Todos los frascos Erlenmeyers se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 200 rpm durante 3 d.

Periódicamente se tomaron muestras para determinar la remoción de los contaminantes y de la materia orgánica por métodos espectrofotométricos. La cuantificación de Cr(VI) y fenol se describió en la *sección 4.9.1* y la remoción de materia orgánica se determinó midiendo la DQO mediante un Espectrofotómetro multiparamétrico HANNA, modelo HI 83214, utilizando kits comerciales HACH (descritos en la *sección 8.1*) y siguiendo el método sugerido por la US EPA 410.4, cuyo fundamento se basa en la capacidad de los compuestos orgánicos oxidables, de reducir el ión dicromato a ión crómico, el cual es cuantificado según su absorbancia a 610 nm.

8.3.2. Ensayos de remediación de efluentes de curtiembre en sistemas de microcosmos desarrollados a campo

8.3.2.1. Ensayos de bioaumentación y bioestimulación

Se evaluó la capacidad del consorcio SFC 500-1 para remover Cr(VI), fenol y materia orgánica de un efluente de curtiembre, mediante ensayos de microcosmos a campo (en condiciones ambientales reales y a mayor escala). Éstos se desarrollaron en el predio de la empresa, en contenedores de 15 L (con 11 L de efluente). Los tratamientos realizados (por duplicado) por un período de 14 d, fueron:

1. Efluente sin inocular.
2. Efluente inoculado (10% v/v) con el consorcio SFC 500-1.
3. Efluente inoculado (1% v/v) con el consorcio SFC 500-1.
4. Efluente inoculado (10% v/v) con medio de cultivo TY.
5. Efluente inoculado (1% v/v) con medio de cultivo TY.

El primer tratamiento se realizó para evaluar la posible atenuación natural producida por los microorganismos nativos. Los tratamientos 2 y 3 se realizaron para evaluar el potencial del consorcio SFC 500-1 (bioaumentación) para remediar el efluente de curtiembre, mientras que los tratamientos 4 y 5 (controles de medio TY) nos permitieron evaluar si en los tratamientos 2 y 3 la remoción del efluente se debe solamente a la acción del consorcio o si el medio de cultivo residual puede contribuir a la remoción (bioestimulación). Para la obtención del inóculo bacteriano, frascos Erlenmeyers de 1 L que contenían 400 mL de medio TY fueron inoculados (al 10% v/v) con la cepa bacteriana, previamente crecida en TY durante 18-24 h.

Los contenedores fueron aireados mediante burbujeadores y colocados en áreas de acceso restringido de la empresa, al aire libre y expuestos a las variaciones climáticas imperantes durante el periodo de trabajo. Estos ensayos se realizaron en dos épocas de temperaturas extremas (invierno-verano), durante tres años consecutivos (2015, 2016 y 2017). Se tomaron muestras al inicio, a los 7 d y al finalizar el experimento (14 d). Se determinaron las características físico-químicas del efluente inicial, crecimiento bacteriano en el efluente y en sedimento a los 14 d mediante la técnica de la microgota, DQO, concentración de cromo (total y hexavalente) y fenoles totales. Además, se realizaron controles periódicos de la composición bacteriana del efluente, sembrándolo en medios de cultivos (TY, McConKey),

seguidos de tinción de Gram. También se realizó un registro detallado de las variables meteorológicas, como temperatura ambiental y lluvias.

8.3.3. Evaluación de la toxicidad de los efluentes pre- y post- tratamiento utilizando el test de *Lactuca sativa* L.

Se realizó un bioensayo de toxicidad utilizando semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga), con el objetivo de evaluar el potencial riesgo tóxico de los efluentes tratados. Para ello se emplearon muestras provenientes de los tratamientos 1, 2 y 4 (efluente sin inocular, inoculado con el consorcio al 10% e inoculado con TY al 10%, respectivamente) del experimento en microcosmos.

Se colocaron 4 mL de los efluentes a evaluar en cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro, previamente esterilizadas y conteniendo papel de filtro. Placas con agua destilada fueron utilizadas como control. Luego, en condiciones de esterilidad, se colocaron veinte semillas de lechuga pre-hidratadas en cada placa. Las cápsulas de Petri cerradas fueron incubadas durante 120 h en cámara a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, en oscuridad.

Una vez finalizado el período de exposición, se registró el número de semillas germinadas, la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada una de las plántulas. Los resultados de toxicidad fueron expresados como porcentaje de germinación (%G) e índice de germinación (%IG), este último índice calculado de acuerdo a Zucconi y col. (1985, 1981). Además, se determinó el índice de crecimiento relativo (ICR) de acuerdo a Alvarenga y col. (2007) y Varnero y col. (2007). El cálculo de los porcentajes e índices se muestran a continuación:

1.
$$\%G = \frac{\text{SGM} \times 100}{\text{SP}}$$
2.
$$\text{ICR} = \frac{\text{LRS}}{\text{LRC}}$$
3.
$$\%IG = \frac{\text{LRS} \times \text{SGM} \times 100}{\text{LRC} \times \text{SGC}}$$

Donde: SGM, significa número de semillas germinadas en la muestra; SP, número total de semillas en la placa (20); SGC, número de semillas germinadas en condiciones control

(agua corriente); LRS, longitud radicular promedio de las plántulas en la muestra; LRC, longitud radicular promedio de las plántulas en condiciones control.

Los valores de IG e ICR se diferenciaron en tres categorías cada uno, según los efectos de toxicidad observados:

- Ausencia de compuestos fitotóxicos (AuCF): $GI \geq 80$
- Moderada presencia de compuestos fitotóxicos en la muestra (MoPCF): $50 < GI < 80$
- Elevada concentración de compuestos fitotóxicos en la muestra (EpCF): $GI \leq 50$
- Inhibición de la elongación de la raíz (IER): $0 < ICR < 0,8$
- Sin efectos significativos sobre la raíz (SER): $0,8 \leq ICR \leq 1,2$
- Estimulación de la elongación de la raíz (ELR): $ICR \geq 1,2$

Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado y los resultados mostrados son la media resultante de 3 experimentos independientes.

8.4. Adecuaciones experimentales para la remoción adicional de materia orgánica de efluente de curtiembre

8.4.1. Adición de diferentes surfactantes

8.4.1.1. Selección de las concentraciones de surfactantes

Se determinaron las concentraciones de los surfactantes que no produjeran inhibición del crecimiento del consorcio SFC 500-1. Para ésto, el consorcio SFC 500-1 se hizo crecer en placas con medio TY sólido conteniendo diferentes concentraciones (% v/v) de surfactantes comerciales comúnmente utilizados en una curtiembre TEN-DGM (DGM: 0,5; 0,2 y 0,1), Emulquin 2DG (2DG: 0,5; 0,2 y 0,1) y además Tween 20 (T20: 1, 0,5 y 0,1), dodecilsulfato de sodio (SDS: 0,5 y 0,1) y polietilenglicol (PEG: 1, 0,5 y 0,05).

8.4.1.2. Ensayos de remoción de materia orgánica

Se analizó el efecto de la adición de surfactantes sobre la reducción de la materia orgánica de un efluente de curtiembre. El ensayo se llevó a cabo en frascos Erlenmeyers conteniendo 20 mL de efluente inoculado con el consorcio SFC 500-1 al 10% v/v. La adición de surfactantes se evaluó al inicio del ensayo y luego de 7 d de tratamiento. Controles de

efluente sin inocular, se emplearon para analizar la remoción de materia orgánica producida por los microorganismos nativos del efluente (atenuación natural). Todos los frascos Erlenmeyers se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 200 rpm durante 14 d. Se tomaron alícuotas al inicio del experimento, así como luego de 7 y 14 d de tratamiento para determinar la DQO (*sección 8.1*) y comparar los resultados.

8.4.2. Modificaciones en la relación Demanda Química de Oxígeno-Nitrógeno-Fósforo (DQO:N:P) del efluente

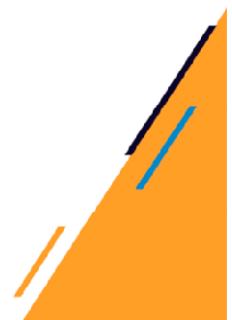
Con el fin de evaluar si la remoción de la materia orgánica del efluente de curtiembre en los ensayos en microcosmos se puede estimular por ajustes en la relación DQO:N:P del efluente, se tomaron alícuotas al día 7 del experimento de microcosmos de los efluentes que correspondieron a los tratamientos 1, 2, 4 (efluente sin inocular, inoculado con el consorcio al 10% e inoculado con TY al 10%, respectivamente) y se los transportó al laboratorio para su evaluación.

En principio, se determinó la relación de DQO:N:P del efluente (día 7), midiendo la DQO, nitrógeno y fósforo mediante un Espectrofotómetro multiparamétrico HANNA, utilizando kits comerciales detallados en la *sección 8.1*. La relación DQO:N:P se ajustó de la siguiente manera: (a) 1:0,6:0,06 (b) 100:13:3. Se utilizó una solución de NH_4Cl (15 g/L) y KH_2PO_4 (4 g/L) como fuente de nitrógeno y fósforo, respectivamente. Además, se realizaron controles que contenían el efluente sin la modificación de su relación DQO:N:P.

El ensayo se realizó en dos oportunidades. En la primera, el ensayo se efectuó sólo en escala Erlenmeyer (en laboratorio), mientras que en la segunda oportunidad se realizó tanto en Erlenmeyer como a campo (en el predio de la curtiembre). Los Erlenmeyers de 50 mL (con 20 mL de efluentes tratados y controles) se incubaron durante 7 d en agitador orbital a 200 rpm y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los ensayos a campo se realizaron en contenedores de 15 L, expuestos a las variaciones climáticas, durante 7 d.

Al final del experimento, es decir después de 14 d (7 d de tratamiento en microcosmos + 7 d de tratamiento con el ajuste en DQO:N:P) se tomaron alícuotas, se midió la DQO (*sección 8.1*) y se compararon los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Características físico-químicas y microbiológicas del efluente de curtiembre

Se realizaron muestreos de efluentes de curtiembre durante el periodo 2015-2017. Éstos permitieron efectuar su caracterización, elaborar un registro anual, como así también comparar los resultados obtenidos con los estándares reglamentarios, con el objetivo de detectar las variables que representan un mayor riesgo para el ambiente. Los datos (expresados en rangos) de la caracterización físico-química y microbiológica de los efluentes, se resumen en la Tabla 7.

En cuanto a las características organolépticas del efluente, podemos mencionar que el color fue grisáceo (muy turbio) en la mayoría de los muestreos, probablemente debido a los insumos utilizados, entre estos colorantes industriales.

Tabla 7: Parámetros físico-químicos y microbiológicos obtenidos de diferentes muestras de efluentes de curtiembre.

Parámetro analizado	Valores obtenidos (rangos)	Valores permitidos*
pH	7,8-9,6	6-9
Color	Grisáceo/verdoso, turbio	N.R
Olor	Pútrido	N.R
Conductividad eléctrica (CE) ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	52,2-111,6	N.R
Sólidos sedimentables (SS) (mL/L)	0,1-5,8	≤ 1
Demanda química de oxígeno (DQO) (mg/L)	1272-3500	< 250
N total (mg/L)	295-367	N.R
P total (mg/L)	25-29	$\leq 0,5$
Sulfatos (mg/L)	2650-3327	≤ 500
Cr total, Cr(III), Cr(VI) (mg/L)	0,2-10,1; 0,2-8,3; 0-1,9	≤ 1 ; N.R; $\leq 0,1$
Fenoles (mg/L)	1-14	$\leq 0,05$
Coliformes totales (NMP/100 mL)	4300-93000	≤ 5000
Coliformes termotolerantes (+/-)	-	≤ 1000

N.R: no reglamentado.

*Según Anexo único de la reglamentación de estándares y normas sobre vertidos para la preservación del recurso hídrico provincial, Provincia de Córdoba, 2016.

Como puede observarse en la Tabla 7, la mayoría de los parámetros analizados como sólidos sedimentables (SS), DQO, coliformes totales, N, P y sulfatos sobrepasaron los límites establecidos para efluentes líquidos que pueden ser vertidos a cuerpos de agua superficiales de la Provincia de Córdoba. La DQO resultó ser la variable que excedió en mayor medida los límites permitidos. Dicha prueba es considerada como uno de los métodos más adecuados para

la estimación de la materia orgánica presente en los efluentes derivados del proceso de curtido (Noorjahan 2014), no así la DBO₅ la cual ha sido reportada como un parámetro muy controversial cuando se la utiliza para evaluar este tipo de efluentes. Esto es debido a la presencia de gran contenido de inhibidores de la DBO₅ y de compuestos cuyo tiempo de degradación es mucho mayor a los 5 d, tiempo requerido para su determinación (Pampín y col., 2007; Ates y col., 1997). 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 en los efluentes analizados se detectó contaminación por Cr y/o fenoles, además de altos los niveles materia orgánica. La concentración de Cr en los efluentes varió de un muestreo a otro, pero en todos los casos excedió los niveles máximos permitidos.

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) detectaron concentraciones de Cr superiores a las permitidas en el humedal, como así también en la vegetación situada en la periferia, donde se descargan los efluentes de esta curtiembre. Estos autores informaron 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 ampliamente los límites permitidos. Cabe aclarar que el fenol y sus derivados se emplean en tratamientos post-curtido y se encuentran entre los principales contaminantes liberados por las curtiembres (Chyra y col., 2011; Costa y Olivi, 2009).

9.2. Estudios in vitro del potencial del consorcio SFC 500-1 y de las bacterias que lo integran para ser aplicados en biorremediación

9.2.1. Tolerancia a diferentes metales y compuestos fenólicos

Los efluentes industriales suelen contener mezclas complejas de contaminantes. Por lo tanto, la caracterización de microorganismos biorremediadores debe incluir el análisis de su tolerancia a diversos compuestos tóxicos, que generalmente están presentes en esos ambientes. Tal estrategia fue seguida en el presente estudio, en el que se evaluó el crecimiento de las bacterias a diferentes concentraciones de metales pesados y metaloides [Cr(VI), Zn, Hg, Cd,

As(III), As(V)] o compuestos aromáticos [fenol, diclorofenol, pentaclorofenol y guaiacol], habitualmente encontrados como co-contaminantes (Tripathi y col., 2011).

Como se puede observar en la Tabla 8, el consorcio SFC 500-1 fue capaz de tolerar todos los metales y metaloides analizados. Cuando se estudió la tolerancia de cada una de las bacterias por separado se observó que *A. guillouiae* SFC 500-1A no creció en presencia de Hg, mientras que *Bacillus* sp. SFC 500-1E no lo hizo en presencia de As(III) y Hg. La incapacidad de las bacterias de crecer frente a As(III) y Hg, se debe probablemente a su alta toxicidad, a concentraciones relativamente bajas (Gadd 1992).

Con respecto a la tolerancia a fenoles, tanto el consorcio SFC 500-1 como las cepas que lo componen toleraron además de fenol, altas concentraciones de guaiacol y diclorofenol (1000 mg/L y 100 mg/L, respectivamente). Sin embargo, en presencia de pentaclorofenol (en concentraciones mucho menores comparado con los otros fenoles), sólo el consorcio SFC 500-1 y *A. guillouiae* SFC 500-1A fueron capaces de crecer. La inhibición del crecimiento por pentaclorofenol (compuesto altamente tóxico usado como biocida en el proceso de curtido de cuero) es común entre los microorganismos tolerantes a fenoles, ya que en general dicha tolerancia varía con el número y posición de sustituyentes en el anillo fenólico. Cuanto mayor sea la cantidad de sustituyentes en la estructura, más tóxico y menos biodegradable se convierte el compuesto (Al-Khalid y El-Naas, 2012).

Existen algunos reportes que muestran múltiples tolerancias a metales pesados y/o a derivados fenólicos, en diferentes especies del género *Acinetobacter* y *Bacillus*. Tales tolerancias se relacionaron directamente con los contaminantes encontrados en la zona de aislamiento y la capacidad de las cepas para adsorberlos, acumularlos e incluso metabolizarlos a compuestos menos tóxicos (Banerjee y col., 2015; Djokic y col., 2013; Tripathi y col., 2011). Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el uso de consorcios bacterianos gracias a la acción sinérgica de las capacidades metabólicas de sus integrantes (Bhattacharya y col., 2015; Wong y col., 2015). 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). En este sentido, el consorcio SFC 500-1, que fue aislado de sedimentos contaminados principalmente con Cr(VI) y fenol, toleró concentraciones de estos contaminantes iguales o mayores, que cada cepa independientemente.

Tabla 8: Concentración máxima tolerada (CMT) de metales, metaloides y compuestos fenólicos en medio sólido TY, por el consorcio SFC 500-1 y para cada una de las bacterias que lo integran.

	Compuestos	Concentraciones analizadas (mM metales; mg/L fenoles)	CMT	Viabilidad (UFC/mL) ± (EE)***
Consortio SFC 500-1	Control	-	-	1,80 ⁹ ± (0,08 ⁹)
	Cr(VI)	0,96; 1,92; 2,88	2,88	2,17 ⁸ ± (0,18 ⁸)
	Zn	2; 5; 10	5	1,58 ⁵ ± (0,23 ⁵)
	Hg	0,01; 0,05; 0,1	0,01	8,75 ⁷ ± (0,75 ⁷)
	Cd	0,1; 0,25; 0,5	0,25	4,50 ⁶ ± (0,50 ⁶)
	As(III)	2; 5; 10; 20	10	5,50 ⁷ ± (0,58 ⁷)
	As(V)	20; 40; 60;100	100*	8,50 ⁸ ± (0,50 ⁸)
	Control	-	-	1,89 ⁹ ± (0,08 ⁹)
	Fenol	1000; 1500; 2000	2000*	9,75 ⁵ ± (1,25 ⁵)
	Guaiacol	500; 1000; 2000	1000	2,00 ⁹ ± (0,30 ⁹)
2,4 Diclorofenol	50; 100; 200	100	1,02 ⁶ ± (0,06 ⁶)	
Pentaclorofenol	1; 10; 20	20*	2,13 ⁷ ± (0,23 ⁷)	
A. guillouiae SFC 500-1A	Control	-	-	1,13 ⁹ ± (0,009 ⁹)
	Cr(VI)	0,96; 1,92; 2,88	2,88	1,63 ⁸ ± (0,07 ⁸)
	Zn	2,5; 10	5	3,58 ⁴ ± (0,19 ⁴)
	Hg	0,01; 0,05; 0,1	**	-
	Cd	0,1; 0,25; 0,5	0,25	2,05 ⁷ ± (0,35 ⁷)
	As(III)	2; 5; 10; 20	5	2,75 ⁸ ± (0,25 ⁸)
	As(V)	20; 40; 60;100	100*	6,17 ⁸ ± (0,60 ⁸)
	Control	-	-	1,13 ⁹ ± (0,11 ⁹)
	Fenol	1000; 1500; 2000	1000	4,48 ⁹ ± (2,10 ⁹)
	Guaiacol	500; 1000; 2000	1000	6,25 ⁸ ± (0,20 ⁸)
2,4 Diclorofenol	50; 100; 200	100	4,00 ⁷ ± (0,29 ⁷)	
Pentaclorofenol	1; 10; 20	20*	2,17 ⁶ ± (0,07 ⁶)	
Bacillus sp. SFC 500-1E	Control	-	-	2,67 ⁷ ± (0,44 ⁷)
	Cr(VI)	0,96; 1,92; 2,88	2,88	1,41 ⁵ ± (0,81 ⁵)
	Zn	2,5; 10	2	3,03 ⁴ ± (0,27 ⁴)
	Hg	0,01; 0,05; 0,1	**	-
	Cd	0,1; 0,25; 0,5	0,25	8,17 ⁶ ± (0,88 ⁶)
	As(III)	2; 5; 10; 20	**	-
	As(V)	20; 40; 60;100	20	5,83 ³ ± (0,33 ³)
	Control	-	-	2,67 ⁷ ± (0,44 ⁷)
	Fenol	1000; 1500; 2000	2000*	5,67 ⁴ ± (0,34 ⁴)
	Guaiacol	500; 1000; 2000	1000	6,00 ⁶ ± (0,56 ⁶)
2,4 Diclorofenol	50; 100; 200	100	6,00 ⁶ ± (0,77 ⁶)	
Pentaclorofenol	1; 10; 20	1	1,07 ⁷ ± (0,04 ⁷)	

Ref.: (*) No se probaron concentraciones superiores. (**) Inhibición del crecimiento bacteriano en la concentración más baja del contaminante ensayado. (***) La viabilidad celular está expresada en notación científica.

9.2.2. Remoción de colorantes industriales

La contaminación ocasionada por curtiembres se asocia, además del empleo de Cr y fenoles, a otras sustancias químicas recalcitrantes como los colorantes azoicos, los cuales se emplean en el tratamiento de teñido del cuero. Éstos no solo representan un problema estético, sino que también interfieren en el proceso fotosintético que realizan algunos organismos (Suteu y col., 2009; Soares y col., 2002). Por este motivo, se evaluó la capacidad del consorcio SFC 500-1 y de cada uno de los microorganismos por separado, para remover concentraciones de 10 y 20 mg/L de colorantes industriales en medio mínimo. Tanto el consorcio SFC 500-1 como los microorganismos que lo integran, no fueron capaces de remover del medio mínimo los colorantes rojo, amarillo y pardo (datos no mostrados). Sin embargo, las bacterias removieron con similar eficiencia el colorante negro Trupocor en las condiciones ensayadas. En la Figura 26 se observa un porcentaje de remoción de alrededor del 65-95% y 55% de soluciones conteniendo inicialmente 10 mg/L y 20 mg/L del colorante respectivamente, a los 25 d de tratamiento.

La principal razón por la que las bacterias no pueden degradar/utilizar algunos colorantes se asocia a las complejas estructuras aromáticas presentes en su composición, a los sustituyentes de los grupos aromáticos (grupos nitro y sulfónico) y a su origen sintético (Dos Santos y col., 2007). Sin embargo, existen varios reportes que muestran la capacidad de diversas bacterias y de consorcios bacterianos involucrados en la sorción y biodegradación de diferentes colorantes en pocos días, incluso en horas (Ekambaram y col., 2016; Lalnunhlmi y Veenagayathri, 2016; Patil 2016; Reddy y Shah, 2016; Hamid y col., 2015; Li y col., 2015;).

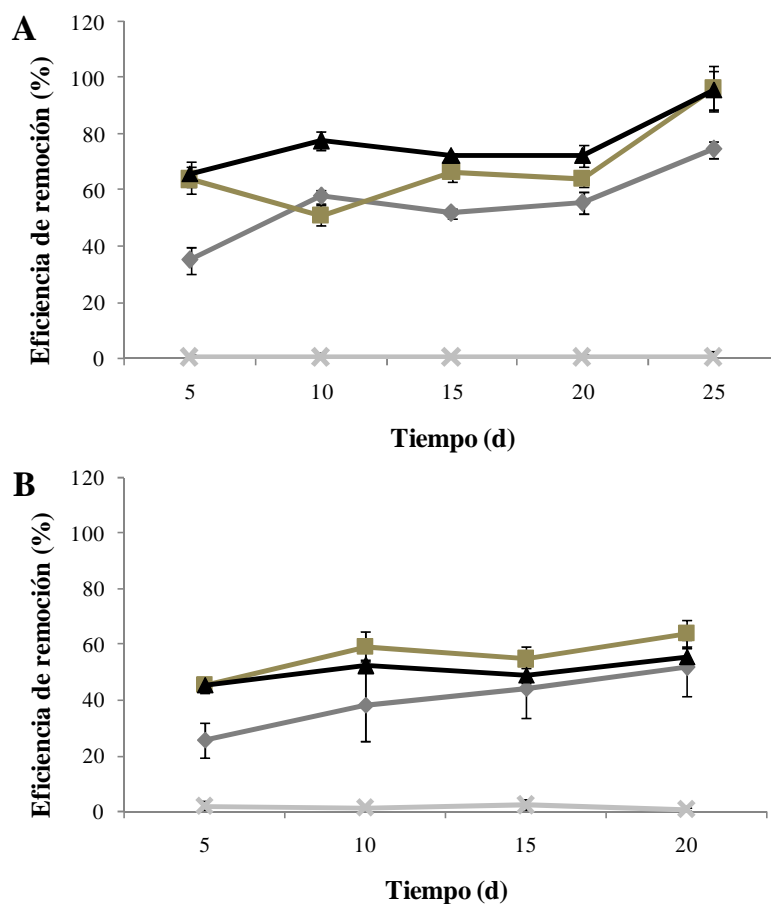


Figura 26: Eficiencia de remoción de 10 mg/L (A) y 20 mg/L (B) del colorante Negro Trupocor en medio mínimo por el consorcio SFC 500-1 (▲), *A. guillouiae* SFC 500-1A (◆) y *Bacillus sp.* SFC 500-1E (■). Control sin inocular (x). Los datos representan la media \pm EE.

9.2.3. Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la viabilidad del consorcio SFC 500-1

Los formulados biológicos para el tratamiento de efluentes industriales suelen comercializarse en medios líquidos o liofilizados, entre otras opciones. Es por esto, que nos pareció importante determinar la viabilidad del consorcio SFC 500-1 cuando se almacenó a 5, 25 y 30 (± 2)°C en medio de cultivo TY. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27.

Cuando el consorcio SFC 500-1 fue almacenado a 5°C (Figura 27A) se observó que después de 2 meses, la viabilidad celular se mantuvo constante, al igual que la proporción de cada bacteria que lo integra (proporción 1:20, *Bacillus sp.* SFC 500-1E: *A. guillouiae* SFC 500-1A, aproximadamente). A partir del cuarto mes de almacenamiento, la viabilidad del consorcio SFC 500-1 descendió progresivamente y la proporción de las bacterias que lo

integran se invirtió notablemente. *Bacillus* sp. SFC 500-1E incrementó su porcentaje (60%) en detrimento de *A. guillouiae* SFC 500-1A (40%), siendo incluso *Bacillus* sp. SFC 500-1E la única bacteria capaz de sobrevivir hasta los 6 meses de almacenamiento.

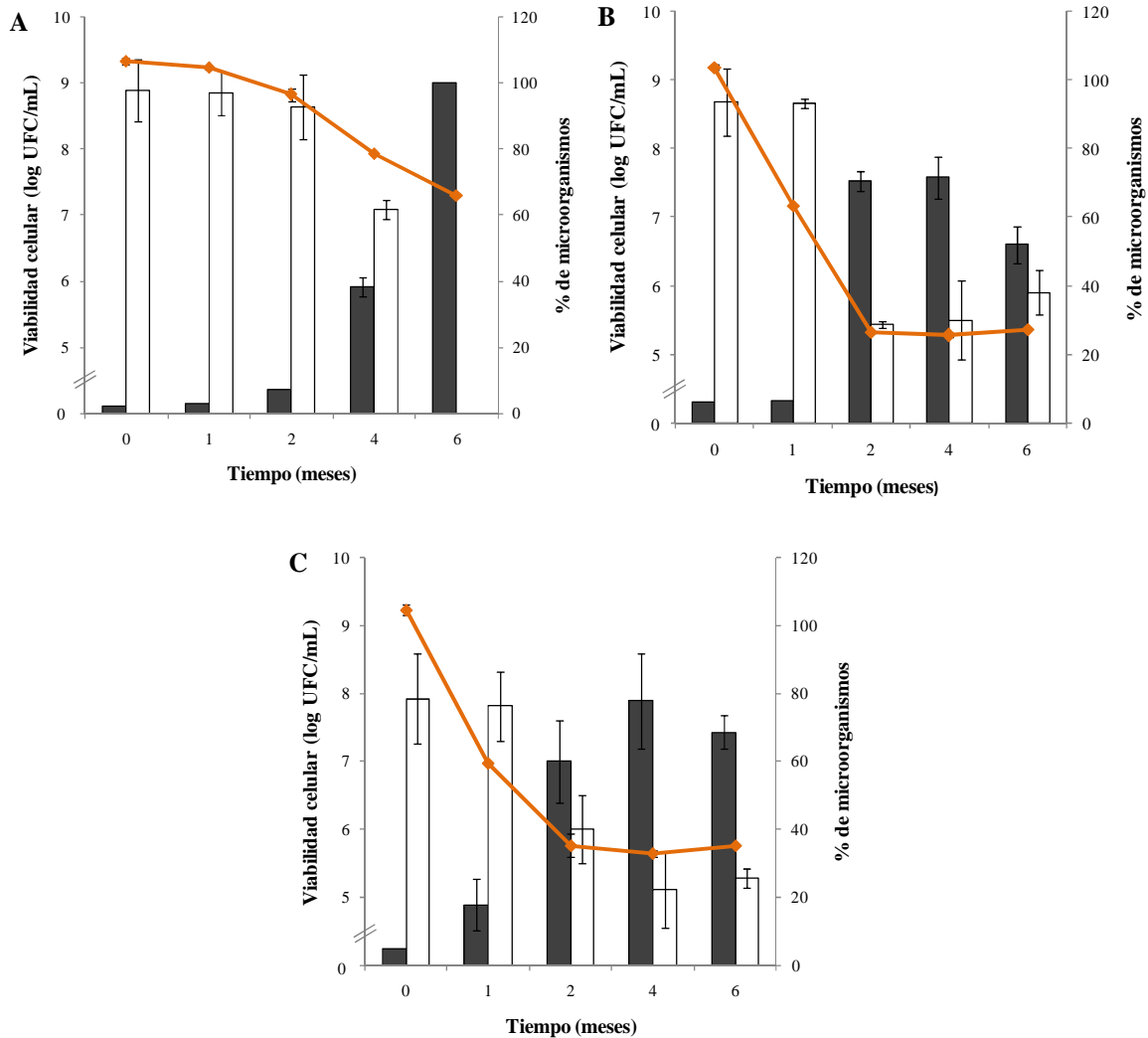


Figura 27: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad celular del consorcio SFC 500-1 (◆) y porcentaje de *Bacillus* sp. SFC 500-1E (■) y de *A. guillouiae* SFC 500-1A (□). Almacenamiento a 5°C (A), 25°C (B) y 30°C (C), durante 1, 2, 4 y 6 meses.

En la Figura 27B y C se observa la viabilidad del consorcio SFC 500-1 y la proporción de las bacterias que lo integran, cuando se almacenó a 25 y 30°C, respectivamente. En ambos casos la tendencia fue similar. La viabilidad celular del consorcio SFC 500-1 disminuyó en gran medida hasta los dos meses de almacenamiento, manteniéndose luego estable hasta el

sexto mes. La proporción de las bacterias que lo integran sólo se mantuvo constante hasta el primer mes de almacenamiento, mientras que a partir del segundo mes, la proporción de *A. guillouiae* SFC 500-1A:*Bacillus* sp. SFC 500-1E se invirtió, pero a diferencia de lo que ocurrió a 5°C, ambas bacterias permanecieron viables hasta los 6 meses de almacenamiento. A partir de estos resultados podemos concluir que las mejores opciones para almacenar al consorcio SFC 500-1 en medio líquido TY corresponden a 5°C durante 2 meses ó a 25-30°C por un período de tiempo no mayor a 1 mes.

9.2.4. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular del consorcio SFC 500-1 en efluente de curtiembre

Con el fin de evaluar si el consorcio SFC 500-1 era capaz de sobrevivir en un efluente de curtiembre en las diferentes épocas del año, se determinó la viabilidad del mismo, durante 15 d a 5, 15, 25°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28.

Cuando el consorcio SFC 500-1 fue sometido a temperaturas de 5 y 15°C (Figura 28A y B) se observó aumento del crecimiento microbiano hasta el día 5, manteniéndose posteriormente constante hasta el día 15. La proporción de cada bacteria que integra el consorcio SFC 500-1 se mantuvo también constante, es decir, prevaleció *A. guillouiae* SFC 500-1A sobre *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Por otra parte, la Figura 28C muestra un aumento en el crecimiento del consorcio SFC 500-1 en el efluente a 25°C en menos tiempo (3 d) y luego una disminución gradual en la viabilidad celular. Sin embargo, dicha reducción en el recuento bacteriano fue sólo de un orden logarítmico, respecto del inicial. Además, se observó que la proporción de las bacterias que integran el consorcio SFC 500-1 comenzó a variar (disminuyó el porcentaje de *A. guillouiae* SFC 500-1A y aumentó el de *Bacillus* sp. SFC 500-1E), lo cual pudo observarse al día 15 con una inversión de la proporción de cada microorganismo integrante del consorcio SFC 500-1. Sin embargo, ambos microorganismos permanecieron viables hasta el final del experimento.

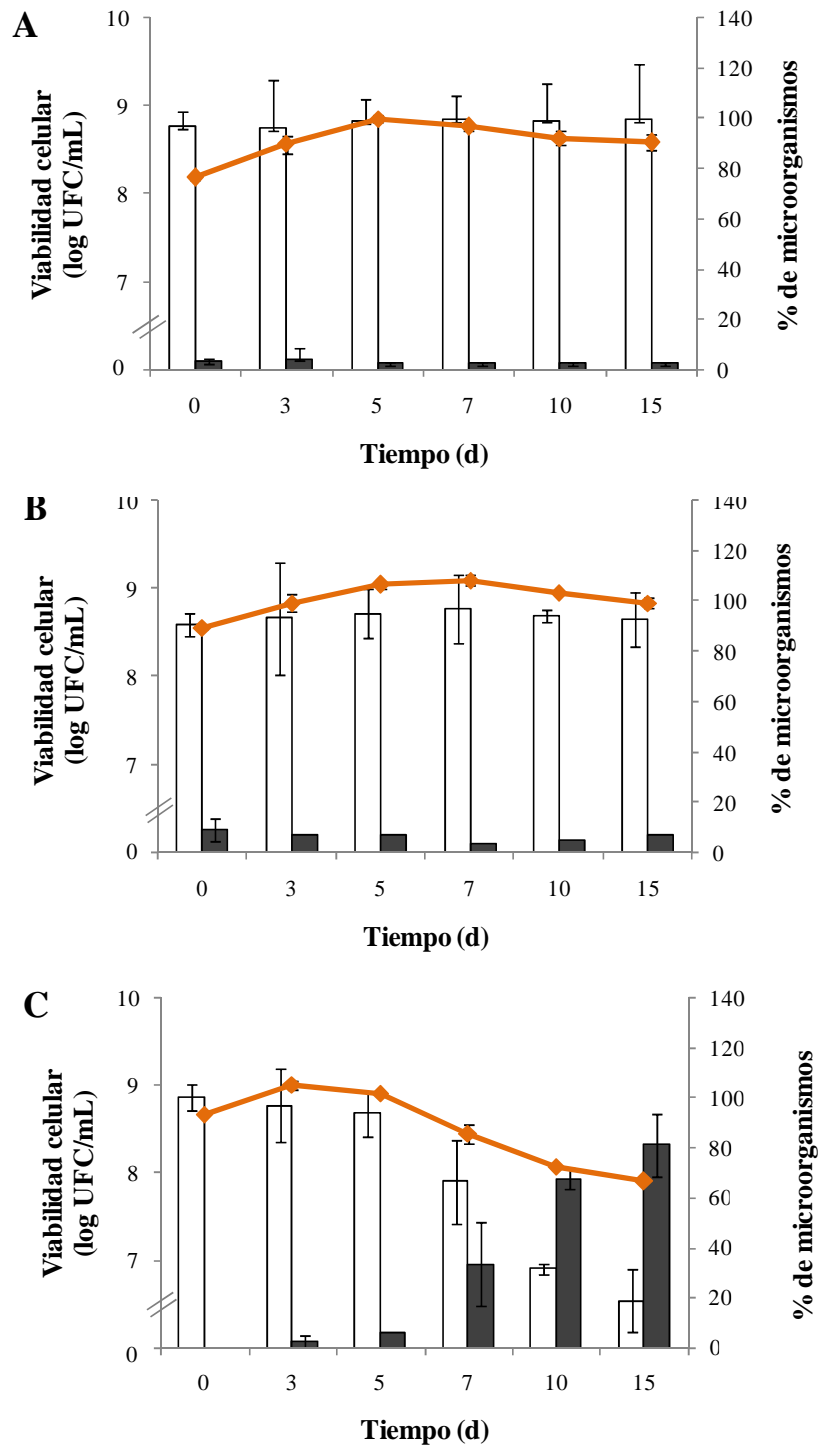


Figura 28: Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular del consorcio SFC 500-1 (◆) en efluente de curtiembre y porcentaje de *A. guillouiae* SFC 500-1A (□) y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (■), creciendo a 5°C (A), 15°C (B) y 25°C (C), durante 15 d.

A partir de estos resultados, se determinó que el consorcio SFC 500-1 no sólo fue capaz de sobrevivir en un efluente de curtiembre a temperaturas variables, sino también de crecer en el mismo. Esto es muy ventajoso al momento de considerarlo para el tratamiento de efluentes de curtiembre en distintas épocas del año. En este sentido, diferentes autores han demostrado que la disminución de temperatura se correlaciona directamente con la inactivación de ciertos microorganismos en un microcosmos acuático, mientras que el mantenimiento de la temperatura en ciertos rangos óptimos podría favorecer su persistencia en estos ambientes (Schulz y Childers, 2011; Okabe y Shimazu, 2007). Es un hecho perfectamente demostrado que, en ocasiones y de acuerdo al sitio a tratar, se requiere efectuar el bioaumentación con microorganismos adaptados a bajas temperaturas, como ocurre en regiones con climas extremos tales como la Antártida (Ruberto y col., 2009; Stallwood y col., 2005). La exposición a la radiación solar también es otro factor a considerar, ya que se ha descrito que podría afectar a algunas bacterias presentes en los efluentes tales como *E. coli* mientras que otras, como las pertenecientes al género *Enterococcus*, no serían afectadas (Rizzo y col., 2012).

Por otro lado, la capacidad por parte del consorcio SFC 500-1 de crecer en este efluente en particular, permite sugerir que utilizaría componentes del efluente como fuentes de carbono, fósforo y nitrógeno.

9.2.5. Ensayos de sensibilidad bacteriana frente a diferentes antibióticos

La Tabla 9 muestra la sensibilidad de las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1 a diferentes antibióticos.

A. guillouiae SFC 500-1A mostró sensibilidad a todos los antibióticos analizados, mientras que *Bacillus* sp. SFC 500-1E fue sensible a IMP, CIP y GM, pero resistente a DA, OXA y E. Estos hallazgos son muy interesantes por tratarse de microorganismos que serían destinados al tratamiento de efluentes contaminados.

A partir de estos resultados se sugiere que ambas cepas no presentarían genes de resistencia a estos antibióticos. De manera similar, Godheja y col. (2017) informaron la ausencia de genes de resistencia a antibióticos en especies de *Bacillus* con tolerancia a metales pesados. Sin embargo, frecuentemente se ha descrito una correlación entre la tolerancia a metales y la resistencia a antibióticos en diferentes bacterias (El-Sayed 2016; Mishra y Mishra,

2015; Aktan y col., 2013), debido a la probabilidad de que los genes de resistencia tanto a metales como a antibióticos pueden localizarse muy próximos en el mismo plásmido, y por lo tanto, las probabilidades de ser transferidos juntos serían mayores (Acevedo Barrios y col., 2015).

Tabla 9: Sensibilidad a antibióticos en medio Müller Hinton de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E.

Susceptibilidad de las cepas a antibióticos		
	<i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A	<i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
Ceftazidima (CAZ)	S (18)	-
Cefepima (FEP)	S (22)	-
Imipenem (IMP)	S (32)	S (34)*
Meropenem (MEM)	S (22)	NR (26)
Piperacilina/Tazobactam (TZP)	S (24)	-
Ciprofloxacina (CIP)	S (28)	S (26)
Amicacina (AK)	S (20)	NR (20)
Gentamicina (GM)	S (20)	S (20)
Ampicilina/sulbactam (SAM)	S (30)	-
Trimetoprima/sulfametoxazol (TMS)	S (22)	-
Minociclina (MIN)	S (28)	-
Vancomicina (VA)	-	NR (16)
Clindamicina (DA)	-	R (14)
Penicilina (PEN)	-	NR (4)
Oxacilina (OXA)	-	R (0)**
Eritromicina (E)	-	R (14)

Ref.: **S:** Sensible, **I:** Sensibilidad intermedia, **R:** Resistente. Entre paréntesis se detalla el diámetro del halo de inhibición en mm. Antibióticos no probados (-). Susceptibilidad para IMP (Singh y col., 2013) (*) y OXA (Weber y col., 1988) (**). Halos de inhibición no reglamentados (NR).

9.3. Estudios de biorremediación

9.3.1. Remoción *in vitro* de Cr(VI), fenol y materia orgánica de un efluente de curtiembre

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se demostró la eficiencia de remoción simultánea de Cr(VI) y fenol por el consorcio SFC 500-1 en medios sintéticos y bajo condiciones controladas (Ontañón y col., 2015a). Esos resultados permitieron proponer al consorcio SFC 500-1 como un sistema biológico adecuado para ser aplicado en el tratamiento de efluentes contaminados con Cr(VI) y fenol. Sin embargo, como se observó en la Tabla 10,

los niveles de estos contaminantes no fueron los únicos que sobrepasaron ampliamente los límites establecidos, sino que la DQO resultó ser otra variable que excedió en gran medida estos límites, lo cual indica que dicho efluente no es apto para ser vertido en cuerpos de aguas receptores. Esto demuestra la necesidad de introducir mejoras en el tratamiento de estos efluentes, por lo que la implementación de un tratamiento secundario basado en el uso de microorganismos, a los fines de alcanzar valores aceptables de ciertos parámetros según la legislación, sería de gran importancia. Debido a esto, se evaluó *in vitro* (en condiciones controladas de laboratorio y a pequeña escala) la capacidad del consorcio SFC 500-1 y de las bacterias que lo integran para remover la materia orgánica del efluente de curtiembre, como así también Cr(VI) y fenol, los cuáles fueron añadidos exógenamente al efluente en una concentración de 25 mg/L para Cr(VI) y 300 mg/L para fenol.

Como se observa en la Tabla 10, tanto el consorcio SFC 500-1 como las bacterias que lo integran fueron capaces de remover como máximo hasta aproximadamente un 15% del Cr(VI) añadido al efluente, lo que indica una remoción promedio de 3,75 mg/L del metal. Además, todas las bacterias en estudio fueron capaces de remover completamente el fenol del efluente (300 mg/L), en 3 d, incluso se observaron buenos porcentajes de remoción (80-100%) al primer día de tratamiento. Con respecto a la materia orgánica, las bacterias removieron un máximo alrededor de 55%, lo que implicó una reducción de 1288 mg/L en el valor de la DQO.

Tabla 10: Porcentajes de remoción (expresados en rangos) de Cr(VI), fenol y materia orgánica (DQO) de un efluente de curtiembre, después de 3 d de tratamiento.

	Cr(VI) (25 mg/L)	Fenol (300 mg/L)	DQO*
<i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A + flora nativa	8,9-18,6	100	33,7-56,4
<i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E + flora nativa	4,2-17,5	100	40,1-54,4
Consorcio SFC 500-1 + flora nativa	9,6-14,1	100	40,2-60,5
Flora nativa del efluente	0-1,6	4,8-12,9	4,6-23,4

*La DQO inicial del efluente (con la adicción de los contaminantes) fue de 1957 ± 25 mg/L, mientras que con la adicción de los contaminantes y del inóculo bacteriano fue de 2343 ± 117 mg/L.

Por otro lado, es importante observar que la contribución de la flora nativa a la remoción de Cr(VI) fue mínima, sin embargo, contribuyó en la remoción de fenol y de materia orgánica. Además, se determinó una remoción del 100% de fenol cuando el efluente fue inoculado con *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Este resultado es particularmente interesante dado que

en estudios previos, efectuados en medios sintéticos, dicha bacteria fue incapaz de metabolizar fenol. Teniendo en cuenta que en el control sin inocular se observó que la flora nativa solo removería alrededor de un 13% de fenol, se podría deducir que existiría una interacción entre *Bacillus* sp. SFC 500-1E y la flora nativa del efluente que favorecería la degradación de este contaminante. En este sentido, está reportado que la detoxificación de contaminantes puede ocurrir como consecuencia de la interacción entre las cepas que coexisten en un determinado ambiente (Trigo y col., 2009). Por otra parte, la reducción en los niveles de DQO por parte de la flora nativa fue de hasta un 23%.

Estos resultados son relevantes ya que hasta el momento, no existen estudios que muestren la remoción conjunta de Cr(VI), fenol y materia orgánica de efluentes de curtiembre. Sin embargo, algunos autores han demostrado la capacidad de algunas bacterias para remover sólo materia orgánica de este tipo de efluentes (Noorjahan 2014; Gidhamaari y Mamidala, 2012) o bien materia orgánica y Cr(VI) simultáneamente (Faouzi y col., 2013; Dermou y col., 2005).

Los resultados obtenidos permiten considerar al consorcio SFC 500-1 como un posible sistema biológico adecuado para el tratamiento de efluentes contaminados con Cr(VI), fenol y materia orgánica, sin descartar el rol de la flora nativa del efluente en dicho proceso.

9.3.2. Estudios de biorremediación utilizando microcosmos a campo como sistema experimental

Una vez determinado *in vitro* el potencial del consorcio SFC 500-1 para ser aplicado en el tratamiento de efluentes de curtiembre, se propuso evaluar el bioaumentación con dicho consorcio bacteriano, pero a una escala mayor y bajo condiciones medioambientales reales, utilizando un sistema de microcosmos a campo, ya que en ocasiones los resultados obtenidos en el laboratorio no son extrapolables a los ambientes naturales.

Los experimentos se realizaron en dos estaciones del año (invierno y verano). Los resultados de los diferentes parámetros evaluados en el efluente (6 ensayos independientes) se muestran en las Tablas A1 y A2 (Anexo). Durante los ensayos en época invernal la temperatura mínima fue de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ y la máxima de $15\pm 4^{\circ}\text{C}$, mientras que en verano la mínima fue de $15\pm 4^{\circ}\text{C}$ y la máxima de $28\pm 4^{\circ}\text{C}$.

La determinación de algunos parámetros y nuevos tratamientos fueron incorporados en el transcurso del período de experimentación (2015-2017), debido a que la empresa implementó algunas modificaciones en el tratamiento primario de los efluentes (malla para filtrar residuos de pelambre y filtros de diferente tamaño de partículas para la retención de sólidos suspendidos). Además se fueron efectuando algunos cambios en el diseño experimental en base a los resultados que se obtuvieron. En este sentido, a partir del año 2016 se añadieron 2 tratamientos que implicaron una reducción del inóculo bacteriano (1%), como así también el agregado de medio de cultivo (1%). Además se evaluaron otros parámetros, tales como la cuantificación de nitrógeno y fósforo, con el fin de analizar la relación de estos nutrientes en el efluente (C:N:P), y el recuento bacteriano en el sedimento a tiempo final de experimentación (día 14).

Se realizaron determinaciones analíticas adicionales, además de las mencionadas en la Tablas A1 y A2 (Anexo), para lograr una integración de los resultados. La conductividad eléctrica osciló entre 80 y 120 $\mu\text{S}/\text{cm}$, los sólidos sedimentables entre 0,1 y 3 mL/L y los coliformes totales entre 4300-93000 NMP/100 mL, mientras que los termotolerantes estuvieron ausentes en el efluente inicial. Otros parámetros como el pH, la oxigenación y la concentración de iones sulfato, se analizaron periódicamente. Todos éstos permanecieron sin variación considerable durante los experimentos, observándose independencia tanto del tratamiento aplicado como del tiempo de exposición y de la época del año. El pH del efluente, por ejemplo, osciló entre 7,63 y 9,64 predominando los valores entre 8 y 9. La oxigenación del efluente (llevada a cabo por medio de burbujeadores de peceras) determinó que los porcentajes de saturación de oxígeno variaron entre un 96 y 99%. Además los valores del ión sulfato en el efluente fueron entre 2650 y 3327 mg/L.

En cuanto a las características organolépticas del efluente inicial, podemos mencionar color grisáceo (muy turbio) en la mayoría de los muestreos, como también un olor pútrido característico. En relación a esto, las bacterias fueron eficientes en lograr su decoloración y desodorización a lo largo del tiempo, observándose totalmente transparente y sin olor al final de los ensayos (Figura 29). La disminución del color y olor de un efluente revela actividad metabólica por parte de los microorganismos presentes, según describe Sukumaran y col. (2008).

Por otro lado, no se observaron cambios significativos, en términos de diversidad y prevalencia, en las bacterias cultivables del efluente antes y después de su tratamiento. La tinción de Gram reveló bacterias con características de cocos y bacilos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos.

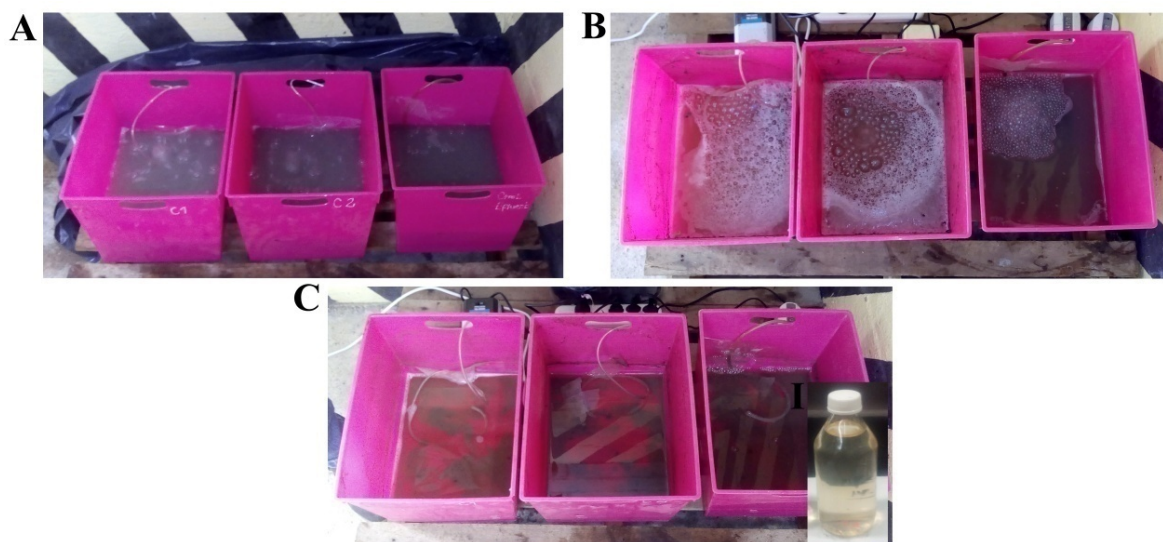


Figura 29: Sistemas experimentales de microcosmos (invierno, 2015). Se puede observar la decoloración a lo largo del tiempo. (A) Tiempo inicial, (B) 7 d y (C) 14 d de tratamiento.

En términos generales, los valores iniciales de DQO fueron superiores a 1500 mg/L, alcanzando en algunas ocasiones niveles tan elevados como 3700 mg/L (Tabla A1 y A2, Anexo). El efluente inoculado con el consorcio SFC 500-1 (al 10%) y el efluente control (sin inocular) fueron los sistemas experimentales que mostraron la mayor eficiencia de reducción en los niveles de DQO (60-80%) a los 14 d de tratamiento. Dichos niveles fueron alrededor de 500 y 800 mg/L, cuando la DQO inicial del efluente fue aproximadamente de 1500 y 3000 mg/L, respectivamente. Es importante destacar entonces que cuando la DQO inicial es más baja, cercana a 1500 mg/L, la reducción de este parámetro fue más cercana a los límites permitidos por la Legislación Provincial (<250 mg/L). La Figura 30A muestra, por ejemplo, la reducción en los niveles de DQO correspondiente al experimento llevado a cabo en verano de 2016. En la mayoría de los ensayos realizados, los mejores resultados de reducción de DQO se obtuvieron a los 14 d de tratamiento y cuando el inóculo bacteriano fue del 10%. Está reportado que la eficiencia en la reducción de DQO se incrementa con el aumento en el tiempo

de retención y tamaño del inóculo, siendo estos factores claves en la factibilidad de los tratamientos en condiciones aeróbicas (Stasinakis y col., 2004). A partir de estos resultados, se podría sugerir la implementación de ajustes en el proceso físico-químico (previo al tratamiento biológico) y por otra parte se deberían efectuar adecuaciones experimentales en los tratamientos de biorremediación (por ej. adición de agentes surfactantes, control en la relación C:N:P, etc.) para incrementar la eficiencia del proceso en cuanto a la reducción de la DQO. En otras palabras, si se realizan algunos cambios tanto en los procedimientos llevados a cabo en la empresa como en el tratamiento propuesto, probablemente se podrían alcanzar los valores permitidos de DQO.

Existen antecedentes de estudios con microcosmos y a campo en los que las inoculaciones con cultivos bacterianos aislados del sitio contaminado o bacterias seleccionadas *in vitro* por su elevado potencial para remover contaminantes, fueron poco efectivas para el bioaumento de sitios/efluentes contaminados (Tyagi y col., 2011; Thomassin-Lacroix y col., 2002). En ese sentido, existen innumerables 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). Es decir, un proceso exitoso en el laboratorio bajo condiciones controladas, no implica un éxito similar en ambientes no controlados (Mueller y col., 1992).

Los niveles de N y P también disminuyeron a lo largo del experimento, independientemente de los tratamientos aplicados. Dicha reducción fue la esperada y se correlacionó directamente con el consumo de nutrientes por las bacterias ($C > N > P$). A modo de ejemplo, en la Figura 30B y C se muestra dicha reducción, correspondiendo los resultados al experimento llevado a cabo en verano de 2016.

Con respecto a la concentración de Cr(VI) y de fenoles totales iniciales en el efluente, éstas no superaron 0,5 y 13,6 mg/L, respectivamente. Después de 14 dde experimentación, el Cr(VI) disminuyó considerablemente, observándose valores por debajo de los límites establecidos e incluso en algunas ocasiones, no fue detectado; mientras que los fenoles fueron removidos en su totalidad. En ambos casos, la reducción de los contaminantes fue independiente del tratamiento aplicado. Es importante destacar que no existen, de acuerdo a

nuestro conocimiento, trabajos que muestren la remoción simultánea de Cr(VI), fenoles y materia orgánica a partir de efluentes de curtiembre en sistemas de microcosmos a campo.

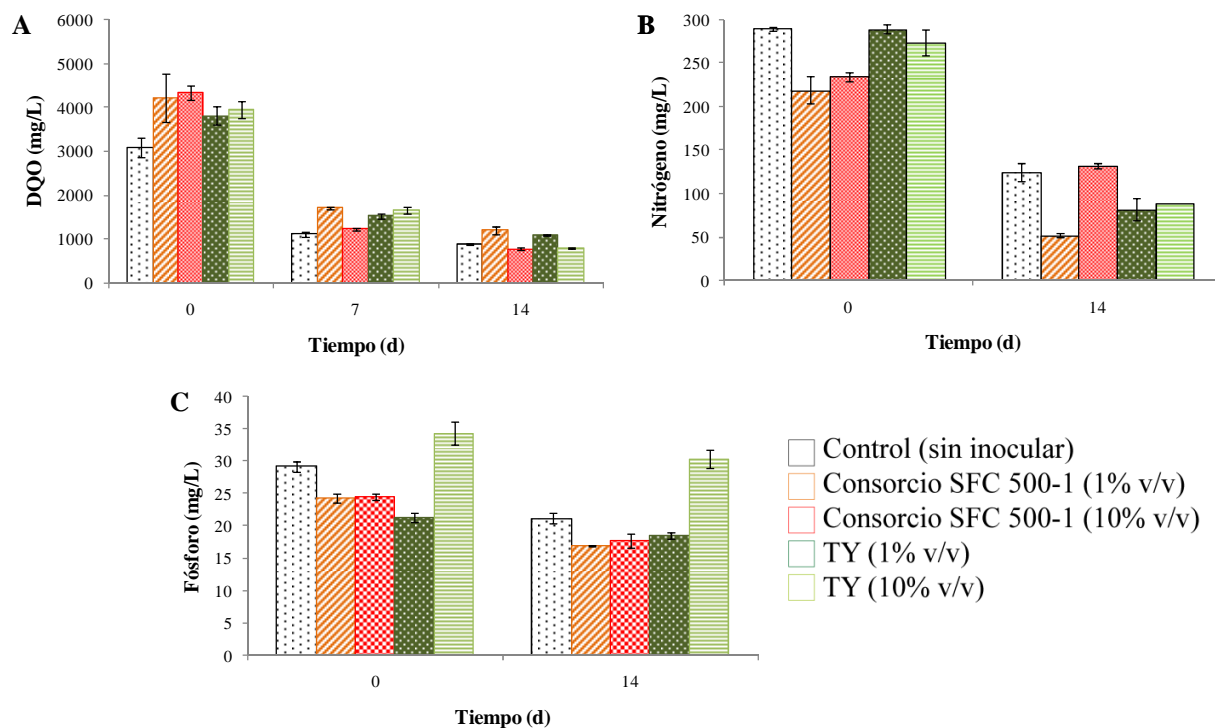


Figura 30: Niveles de DQO (A), consumo de nitrógeno (B) y fósforo (C) en muestras de efluente tratadas con el consorcio SFC 500-1 o suplementadas con medio TY, en sistemas de microcosmos. Los valores corresponden al experimento de verano 2016.

Cuando se analizó la viabilidad bacteriana en el efluente, se observó la misma tendencia en todos los tratamientos ensayados, presentando un incremento del recuento bacteriano al día 7 de experimentación, seguido de una disminución al día 14. A partir de esto, se decidió determinar si dicha reducción se correlacionaría con un aumento en el número de bacterias en el sedimento, comprobándose la hipótesis planteada. En la Figura 31A y B se observan, a modo de ejemplo, la viabilidad celular en el efluente y sedimento del experimento llevado a cabo en verano de 2016. Estos resultados son alentadores, ya que el establecimiento de sedimentos o “lodos activados”, con microorganismos como parte integrante del mismo, es una de las bases principales de los tratamientos biológicos aeróbicos (Fares y col., 2018).

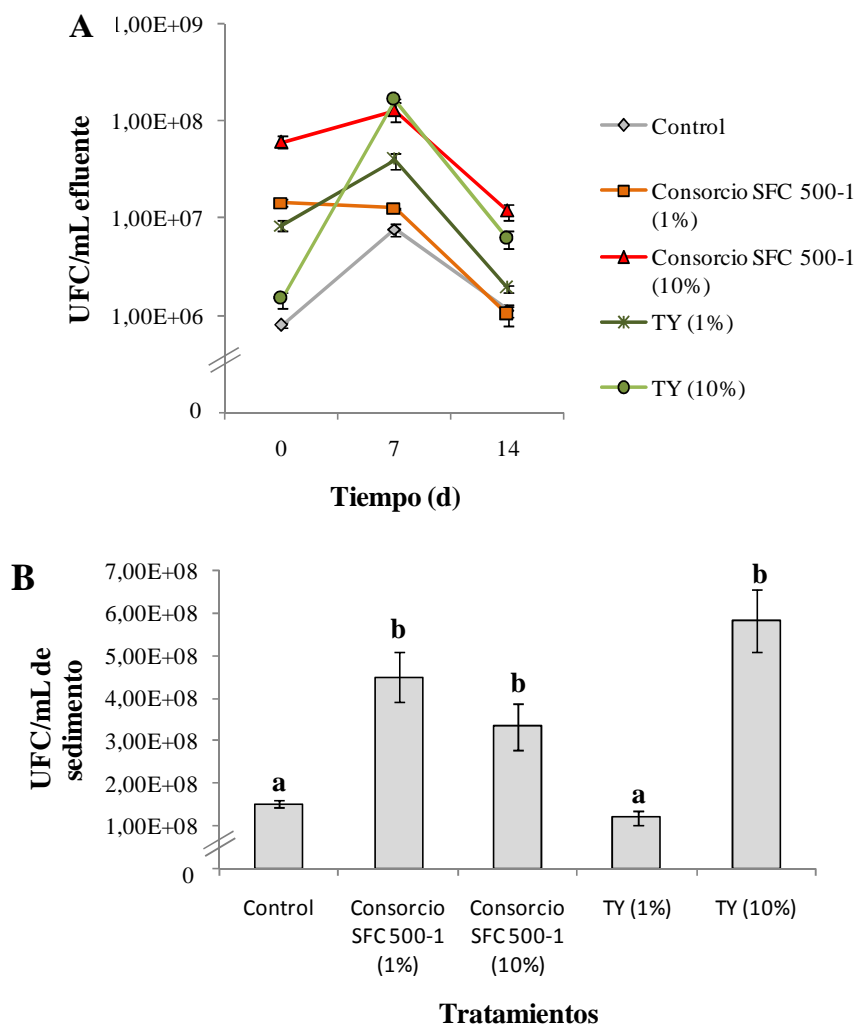


Figura 31: Viabilidad bacteriana en el efluente (0, 7 y 14 d) (A) y en el sedimento (14 d) (B) correspondiente a ensayos efectuados en microcosmos. Los valores corresponden al experimento de Verano 2016.

Si comparamos los resultados obtenidos de los sistemas de microcosmos a campo y los experimentos *in vitro* (secciones 9.3.2 y 9.3.1, respectivamente), se pueden observar diferencias en relación a la eficiencia de remoción de la materia orgánica (DQO) por la flora nativa y el consorcio SFC 500-1. La flora nativa del efluente en los sistemas de microcosmos a campo fue muy eficiente en cuanto a la disminución de la DQO, el cual no había resultado tan significativo en los experimentos *in vitro* (sección 9.3.1). En contraposición, el consorcio SFC 500-1 resultó muy eficiente en la remoción de DQO en condiciones *in vitro*. Probablemente, esto se deba a la diferencia en las concentraciones de Cr(VI) y fenol entre ambos sistemas

experimentales. En condiciones *in vitro*, se habían añadido altas concentraciones de estos contaminantes de manera exógena (25 mg/L Cr(VI) y 300 mg/L fenol), mientras que en los experimentos con microcosmos a campo los valores de Cr(VI) y fenol no superaron los 0,5 mg/L y 13,6 mg/L, respectivamente. Esto demuestra la gran capacidad del consorcio SFC 500-1 para remover materia orgánica en presencia de concentraciones elevadas de Cr(VI) y fenol, no así la flora nativa del efluente. De manera similar, otros autores reportaron que determinadas cepas seleccionadas para el bioaumentación a menudo no muestran en condiciones ambientales naturales las mismas capacidades que muestran en el laboratorio (Herrero y Stuckey, 2015; Boon y col., 2000).

Los microorganismos indígenas (pre-seleccionados para el bioaumentación) son los que podrían sobrevivir y llevar a cabo la remoción de determinados compuestos cuando se reintroducen en el sitio contaminado (Bento y col., 2005; Thompson y col., 2005). Hay que destacar el potencial del consorcio SFC 500-1 en los microcosmos donde se lo inoculó, ya que se observó que el mismo no sólo fue capaz de sobrevivir y crecer en un efluente bajo condiciones medioambientales reales y en un amplio rango de temperaturas, sino que además se mantuvo viable en el sedimento. Frecuentemente la predación, ya sea por protozoos o bacterias propias del efluente, es uno de los primeros inconvenientes que se presentan cuando se realizan tratamientos que involucran el bioaumentación (Alexander y col., 2013; Goldstein y col., 1985). Sin embargo, en las condiciones ensayadas esto no constituyó un problema y nos incentivó a seguir considerando al consorcio SFC 500-1 como un posible candidato para el tratamiento de efluentes de curtiembre.

9.3.3. Evaluación de la toxicidad de los efluentes pre- y post-tratados utilizando el test de *Lactuca sativa* L.

Se evaluó la toxicidad de algunos efluentes obtenidos de los ensayos en microcosmos a campo (sección 9.3.2) mediante el bioensayo de *Lactuca sativa* L. Se analizó la toxicidad de aquellos efluentes correspondientes a los tratamientos de biorremediación que arrojaron los mejores resultados. En este sentido, se trabajó con los efluentes inoculados con el consorcio SFC 500-1 (10% v/v) y los efluentes en condiciones control (sin inocular). Los resultados se muestran en las Tablas 11 y 12, para los efluentes obtenidos después de 14 días de tratamiento en época invernal y de verano, respectivamente.

El efluente sin tratar (tiempo cero) presentó toxicidad (datos no mostrados), siendo el porcentaje de germinación sólo del 20%. Además, se determinó inhibición de la elongación de la raíz y presencia de elevadas concentraciones de compuestos fitotóxicos en la muestra, según los índices de crecimiento relativo (ICR) y de germinación (%IG), respectivamente. También hubo reducción en la longitud de radícula e hipocótilo. De manera similar, otros autores informaron alta toxicidad y mutagenicidad de efluentes de curtiembre sin tratar para especies de prueba pertenecientes a diferentes niveles tróficos, como organismos acuáticos, microorganismos y también células humanas (Nazir y col., 2019; Kumari y col., 2014; Masood y Malik, 2013; Alam y col., 2010). Dicha toxicidad podría deberse a la presencia de múltiples contaminantes (Cr(VI), fenoles, sulfatos) y nutrientes (DQO, N, P), los cuales fueron cuantificados en los efluentes bajo estudio (*sección 9.1*). En las plantas en particular, se sabe que los efectos tóxicos del Cr por ejemplo, están asociados con el aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y el desarrollo de estrés oxidativo, así como con la inhibición de la síntesis de pigmentos fotosintéticos y la modificación de prácticamente todos los componentes celulares. Estos cambios metabólicos provocarían la inhibición de la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas, así como la reducción de la biomasa vegetal (Amin y col., 2019; Stambulska y col., 2018; Ali y col., 2015; Abraham y col., 2013; Panda y Choudhury, 2005). La toxicidad del fenol también está relacionada con la generación de EROs, lo que estaría afectando principalmente las membranas celulares (peroxidación lipídica) (Gami y col., 2014; Michałowicz y col., 2009). Además, está reportado también que los altos contenidos de materia orgánica en efluentes de diferente origen (industria azucarera, destilerías, etc.) son responsables de la reducción de la tasa de germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas (Ali y col., 2015; Narain y col., 2012; Doke y col., 2011; Pandey y col., 2008), mientras que los altos niveles de sólidos sedimentables presentes en los efluentes conducen a un incremento en la turbidez, que podría dar como resultado una actividad fotosintética deficiente en plantas que habitan los cuerpos de agua receptores (Islam y col., 2014; Ates y col., 1997).

Los efluentes inoculados con el consorcio SFC 500-1 y sin inocular (controles), después de 14 d, en general no presentaron toxicidad. Los porcentajes de germinación de las semillas oscilaron entre el 80 y el 95%, valores muy similares a los obtenidos en los controles con agua (90%). Si bien se observaron algunas diferencias entre la longitud de la radícula e hipocótilo

en las plántulas tratadas con los efluentes analizados, respecto del control agua, los índices de germinación y de crecimiento relativo arrojaron buenos resultados. Los valores de los %IG obtenidos, en general, indicarían ausencia de compuestos fitotóxicos en la muestra o su presencia en muy bajas concentraciones ($IG \geq 80\%$), y en algunos casos presencia moderada de compuestos fitotóxicos ($50\% < IG < 80\%$) según las categorías asignadas por Zucconi y col. (1981). Con respecto a los ICR, éstos indicarían ausencia de efectos significativos sobre la elongación de la raíz ($0 < ICR < 0,8$) en algunos efluentes analizados y estimulación de la elongación radical ($ICR > 120$) en otros, de acuerdo a Young y col. (2012).

Los efluentes (inoculados con el consorcio y sin inocular –controles-) correspondientes a los ensayos en microcosmos realizados durante invierno del año 2015 y verano del 2017, a diferencia de los demás efluentes analizados, sí presentaron toxicidad. Se detectó un % de inhibición de la germinación de las semillas de 10 y 40%, así como una disminución significativa en la longitud de la radícula y/o hipocótilo. Además los valores obtenidos correspondientes a los %IG e ICR indicaron la presencia de elevadas concentraciones de compuestos fitotóxicos en la muestra e inhibición en la elongación radical, respectivamente. Con el propósito de reducir el efecto tóxico de estos efluentes, se realizó una dilución, (1/2), de los mismos y se logró revertir el efecto tóxico. La germinación alcanzó valores entre el 85 y 100%, las longitudes de radícula e hipocótilo incrementaron significativamente y los %IG e ICR indicaron ausencia o presencia moderada de compuestos fitotóxicos en la muestra, como así también ausencia de efectos significativos sobre la raíz, incluso estimulación de la elongación, respecto del control con agua. De manera similar a nuestro trabajo, efluentes que habían resultado tóxicos para diferentes especies de plantas dejaron de serlo después de diluídos (Ali y col., 2015; Narain y col., 2012; Doke y col., 2011; Pandey y col., 2008).

En conclusión, la mayoría de los efluentes post-tratados resultaron no tóxicos para la especie vegetal ensayada, lo que podría estar relacionado con la disminución de la concentración de nutrientes (DQO, N, P) y contaminantes (Cr(VI) y fenoles) luego de aplicados los tratamientos de biorremediación.

Tabla 11: Parámetros determinados a partir de los ensayos de toxicidad, con semillas de *Lactuca sativa* L., de los efluentes post-remoción en condiciones control (sin inocular) e inoculados con el consorcio SFC 500-1 (10%), en época invernal.

Parámetros analizados/ tratamientos		Longitud de radícula (x ± EE)	Longitud de hipocótilo (x ± EE)	Germinación (%G)	Índice de Germinación (%IG)	Índice de Crecimiento Relativo (ICR)			
INVIERNO	2015	Control (agua)	1,05 ± 0,06 aa	1,00 ± 0,04 aa	90				
		Efluente puro	Control	0,47 ± 0,04 b	0,70 ± 0,07 b	75	27,30 (EPCF)	1,32 (EER)	
			SFC 500-1 (10%)	0,34 ± 0,06 b	0,26 ± 0,07 b	10	3,60 (EPCF)	0,32 (IER)	
		Efluente 1/2	Control	1,26 ± 0,07 b	1,77 ± 0,09 b	85	113,33 (AuCF)	1,20 (NES)	
			SFC 500-1 (10%)	1,39 ± 0,08 b	1,71 ± 0,08 b	85	125,03 (AuCF)	1,32 (EER)	
		2016 a	Control (agua)	1,05 ± 0,06 a	1,00 ± 0,04 a	90			
	Efluente puro		Control	1,34 ± 0,07 b	1,74 ± 0,07 b	95	134,71 (AuCF)	1,27 (EER)	
			SFC 500-1 (10%)	0,94 ± 0,07 a	1,13 ± 0,08 a	80	79,58 (MoPCF)	0,89 (NES)	
	2016 b		Control (agua)	1,05 ± 0,06 a	1,00 ± 0,04 a	90			
			Efluente puro	Control	1,32 ± 0,08 b	1,63 ± 0,08 b	95	132,70 (AuCF)	1,25 (EER)
				SFC 500-1 (10%)	1,37 ± 0,07 b	1,59 ± 0,06 b	95	137,72 (AuCF)	1,30 (EER)

Los datos representan la media ± EE. Letras diferentes indican DES ($p < 0,05$) entre los diferentes tratamientos.

Ref: Ausencia de compuestos fitotóxicos (AuCF), moderada presencia de compuestos fitotóxicos en la muestra (MoPCF) y elevada concentración de compuestos fitotóxicos (EPCF) en la muestra. Estimulación de la elongación de la raíz (EER), ausencia de efectos significativos (NES) e inhibición de la elongación de la raíz (IER).

Tabla 12: Parámetros determinados a partir de los ensayos de toxicidad, con semillas de *Lactuca sativa* L., de los efluentes post-remoción en condiciones control (sin inocular) e inoculados con el consorcio SFC 500-1 (10%), en verano.

		Parámetros analizados/ tratamientos	Longitud de radícula (x ± EE)	Longitud de hipocótilo (x ± EE)	Germinación (%G)	Índice de Germinación (%IG)	Índice de Crecimiento Relativo (ICR)	
VERANO	2015	Control (agua)	1,05 ± 0,06 a	1,00 ± 0,04 a	90			
		Efluente puro	Control	1,17 ± 0,05 b	1,60 ± 0,06 b	100	123,81 (AuCF)	1,11 (NES)
			SFC 500-1 (10%)	0,92 ± 0,06 a	1,44 ± 0,09 b	85	82,75 (AuCF)	0,87 (NES)
	2016	Control (agua)	1,05 ± 0,06 a	1,00 ± 0,04 a	90			
		Efluente puro	Control	1,24 ± 0,07 b	1,71 ± 0,09 b	90	118,10 (AuCF)	1,18 (NES)
			SFC 500-1 (10%)	1,16 ± 0,06 b	1,87 ± 0,15 b	90	110,48 (AuCF)	1,10 (NES)
	2017	Control (agua)	0,48 ± 0,04 aa	0,73 ± 0,05 aa	90			
		Efluente puro	Control	0,58 ± 0,05 a	0,27 ± 0,05 b	30	40,38 (EPCF)	1,21 (EER)
			SFC 500-1 (10%)	0,49 ± 0,05 a	0,30 ± 0,05 b	40	45,28 (EPCF)	1,01 (NES)
		Efluente 1/2	Control	1,09 ± 0,08 b	1,18 ± 0,09 b	85	215,17 (AuCF)	2,27 (EER)
			SFC 500-1 (10%)	1,17 ± 0,08 b	1,38 ± 0,07 b	90	245,19 (AuCF)	2,45 (EER)

Los datos representan la media ± EE. Letras diferentes indican DES ($p < 0,05$) entre los diferentes tratamientos.

Ref: Ausencia de compuestos fitotóxicos (AuCF), moderada presencia de compuestos fitotóxicos en la muestra (MoPCF) y elevada concentración de compuestos fitotóxicos (EPCF) en la muestra. Estimulación de la elongación de la raíz (EER), ausencia de efectos significativos (NES) e inhibición de la elongación de la raíz (IER).

9.4. Adecuaciones experimentales para la remoción adicional de materia orgánica de efluente de curtiembre

9.4.1. Efecto de la adición de surfactantes en la remoción de la materia orgánica del efluente de curtiembre

Los surfactantes en general permiten aumentar la biodisponibilidad de nutrientes y/o contaminantes que naturalmente no lo están y así mejorar los procesos de biorremediación (Zhou y col., 2011). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó el efecto del agregado de surfactantes sintéticos sobre la capacidad del consorcio SFC 500-1 para degradar materia orgánica del efluente de curtiembre, considerando que en éstos existe materia orgánica que es difícil de remover (sección 9.3.2).

En una primera instancia, se seleccionaron concentraciones de cada surfactante que no produjeran inhibición del crecimiento de las bacterias que conforman el consorcio SFC 500-1 (Tabla 13). Las concentraciones seleccionadas fueron: 0,5% v/v de T20; 0,05 y 0,5% v/v de PEG.

Tabla 13: Selección de las concentraciones de surfactantes que no afectan la viabilidad del consorcio SFC 500-1.

		Concentración (% v/v)	Viabilidad del consorcio SFC 500-1
Surfactantes de uso industrial	DGM	0,5	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
		0,2	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
		0,1	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
	2DG	0,5	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
		0,2	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
		0,1	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
Surfactantes de uso en laboratorio	T20	1	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E
		0,5*	Dentro de los valores normales
		0,1	Dentro de los valores normales
	SDS	0,5	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E y de <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A
		0,1	Inhibición de <i>Bacillus</i> sp. SFC 500-1E y de <i>A. guillouiae</i> SFC 500-1A
	PEG	1	Dentro de los valores normales
		0,5*	Dentro de los valores normales
0,05*		Dentro de los valores normales	

*Concentraciones seleccionadas para los ensayos de remoción de materia orgánica.

Es importante notar que los surfactantes industriales usados por la curtiembre que nos provee de los efluentes, provocaron la inhibición del crecimiento de las bacterias a

concentraciones muy bajas. Por consiguiente, su utilización podría alterar y/o interferir de manera negativa con el tratamiento biológico posterior de los efluentes.

La Figura 32 muestra el efecto de la adición de T20 y PEG (al inicio del experimento) sobre la remoción de materia orgánica del efluente de curtiembre, después de 7 y 14 d. En general, el agregado de estas sustancias no produjo una reducción significativa de los valores de DQO después de 14 d, respecto de los controles sin la adición de surfactantes. Ésto fue observado ya sea cuando se probaron concentraciones bajas (Figura 32A) como altas de surfactantes (Figura 32B). El agregado de estas sustancias también fue evaluado al día 7. De igual manera, no se observaron efectos considerables sobre la remoción de la materia orgánica del efluente de curtiembre (datos no mostrados). Además, se determinó la viabilidad celular, la cual siguió la misma tendencia que en experimentos anteriores de remoción de DQO en efluente de curtiembre, esto es un incremento en la viabilidad celular al día 7, seguido de una disminución al día 14 de tratamiento (datos no mostrados).

Por otro lado, es importante destacar que el agregado de surfactantes como el T20 y PEG aumentaron significativamente el valor de DQO debido a su carácter orgánico, al igual que lo reportó Moazzenipour y col. (2017).

A partir de estos resultados, podemos concluir que la utilización de surfactantes tales como T20 y PEG no produce una reducción adicional en los valores de DQO en este tipo de efluente de curtiembre y en las condiciones analizadas. En contraposición a nuestros resultados, varios investigadores describieron una mejora en la tasa de degradación de sustancias no biodisponibles para las bacterias por el agregado de surfactantes y coagulantes en diferentes tipos de efluentes. En este sentido, Nikolopoulou y Kalogerakis (2009) demostraron que la bioestimulación con un fertilizante rico en N y P, junto con el agregado de surfactantes permitieron alcanzar tasas de degradación más rápidas en sitios contaminados con petróleo. En base a estos resultados y a los antecedentes disponibles, nos parece importante sugerir que la eficiencia de los surfactantes podría depender de varios factores, entre ellos la concentración utilizada (que a su vez depende de los límites establecidos para la descarga), el pH, así como del tipo de efluente y/o agua residual a tratar.

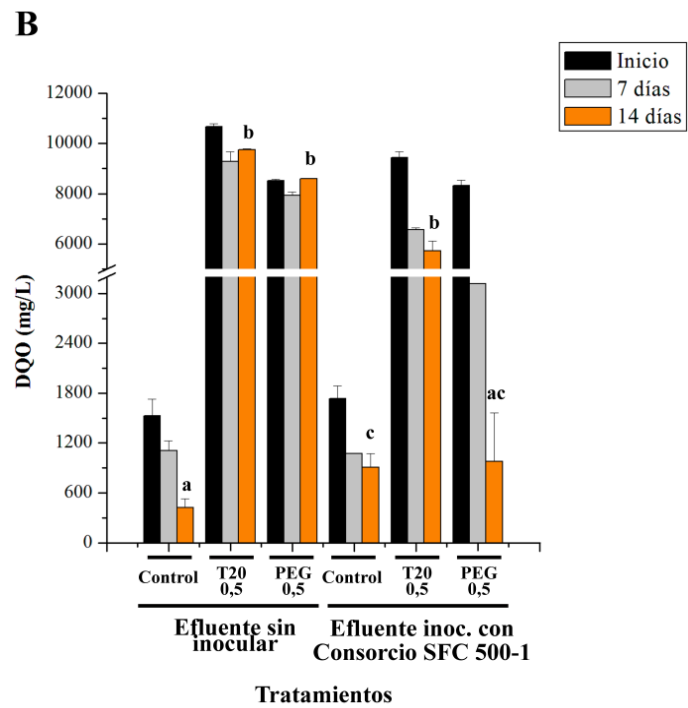
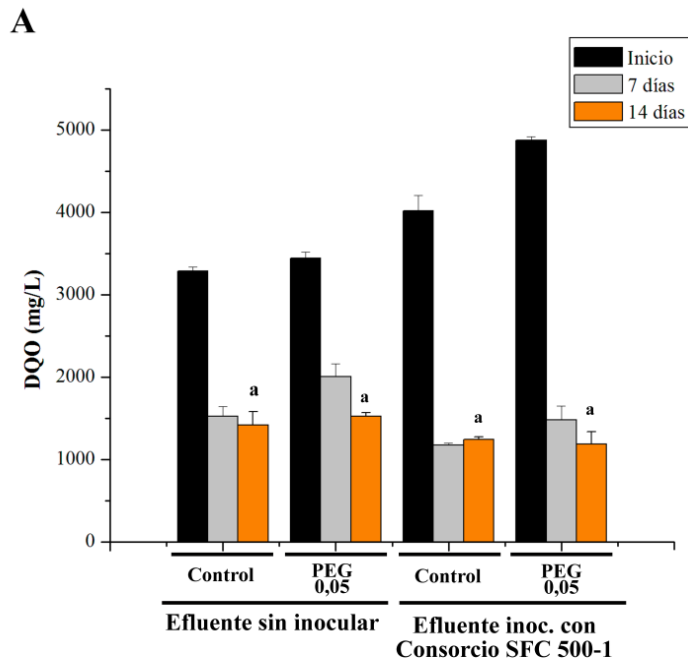


Figura 32: Efecto de la adición de Tween 20 (T20) y polietilenglicol (PEG), al inicio del experimento, sobre la reducción en los valores de DQO de efluente de curtiembre, después de 7 y 14 d de tratamiento. Concentraciones bajas (% v/v) (A), concentraciones altas (% v/v) (B). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

9.4.2. Efecto de la relación Demanda Química de Oxígeno:nitrógeno:fósforo (DQO:N:P) sobre la remoción de la materia orgánica de efluente de curtiembre

Recordemos que los efluentes tratados en sistemas de microcosmos a campo durante 14 d arrojaron en las mejores condiciones valores de DQO de alrededor de 500-800 mg/L (sección 9.3.2). Estos valores si bien se encuentran cercanos a los límites establecidos por la Legislación Provincial (<250 mg/L), en comparación con los valores de DQO inicial (1500-3000 mg/L), siguen estando por encima de la normativa. Es por esta razón, que se propuso determinar la relación DQO:N:P en los efluentes y evaluar si la bioestimulación mediante el agregado de fuentes de N y P podría mejorar la remoción de materia orgánica, ya sea por parte de las bacterias autóctonas o del consorcio SFC 500-1, y así lograr valores de DQO más próximos a los permitidos. Para ello, se realizaron ajustes en la relación DQO:N:P en los efluentes ya tratados (control, inoculado con el consorcio 10% e inoculado con TY 10%) durante 7 d en sistemas de microcosmos a campo. Se decidió realizar los ajustes a este tiempo (7 d) y no a los 14 d donde observamos que el recuento bacteriano en el efluente desciende debido a que las bacterias pasan a formar parte del sedimento (sección 9.3.2).

En un comienzo, efluentes de alta carga orgánica se ajustaron a dos relaciones de DQO:N:P (1:0,6:0,06 y 100:13:3) y los experimentos se desarrollaron sólo en condiciones de laboratorio (Figura 33A). En una segunda oportunidad, sólo fue necesario ajustar la relación de DQO:N:P de efluentes de baja carga orgánica a 1:0,6:0,06 y en este caso los experimentos fueron llevados a cabo tanto en condiciones de laboratorio como en microcosmos a campo (Figura 33B).

En general, se observaron mejores resultados para los tratamientos con efluentes de alta carga orgánica y sin inocular (controles) (Figura 33A). El ajuste al día 7 de la relación DQO:N:P a 1:0,6:0,06 y 100:13:3 permitió una disminución de la DQO al día 14 de alrededor de 300 y 200 mg/L (flechas rojas, Figura 33A), respecto de los tratamientos control sin la adición de surfactantes (flecha celeste, Figura 33A). En los efluentes de alta carga orgánica pero inoculados con el consorcio SFC 500-1 (10%), el ajuste al día 7 de la relación DQO:N:P a 1:0,6:0,06 también provocó una disminución en el valor de la DQO (al día 14), aunque no fue significativa (flecha violeta, Figura 33A). Por otro lado, en los efluentes de alta carga orgánica inoculados con TY (al 10%) (bioestimulación), no hubo reducción significativa en los valores de DQO, cuando se implementaron los ajustes en la relación DQO:N:P.

En la Figura 33B, en cambio, sólo se observó una reducción en el valor de DQO (de alrededor de 400 mg/L) en los efluentes de menor carga orgánica inoculados con el consorcio SFC 500-1 (10%) y cuando la relación DQO:N:P se ajustó a 1:0,6:0,06 (tanto en condiciones de laboratorio, como en microcosmos a campo) (flechas verdes, Figura 33B). Sin embargo, esta reducción implicó sólo llegar a valores de materia orgánica similar a los tratamientos control (sin inocular) e inoculados con TY (bioestimulados) (línea punteada, Figura 33B).

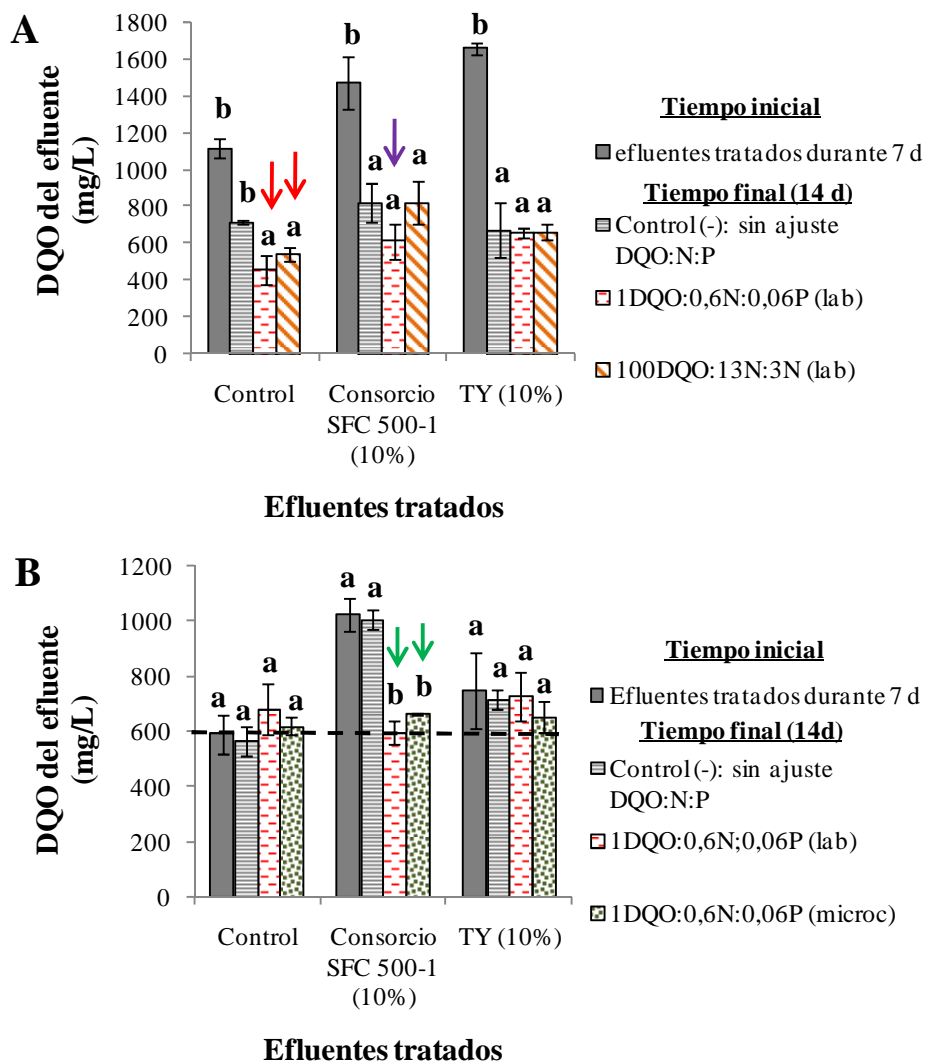


Figura 33: Efecto del ajuste de la relación DQO:N:P en efluentes tratados durante 7 días en microcosmos a campo (tiempo inicial), sobre los niveles de DQO luego de 7 más de tratamiento (tiempo final=14 d). Efluente con mayor carga orgánica (A), efluente con menor carga orgánica (B). Los experimentos fueron realizados en condiciones de laboratorio (lab) y/o en microcosmos a campo (microc). Los datos representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos que pertenecen a un determinado efluente tratado ($p < 0,05$).

A partir de estos resultados, podemos destacar que el ajuste en la relación DQO:N:P sólo introdujo mejoras en la reducción de la materia orgánica (200-300 mg/L aproximadamente) en efluentes de alta carga orgánica. La adición de nitrógeno y fósforo para mejorar el nivel de nutrientes ha sido estudiada también por otros autores. Sarkar y col. (2005) obtuvieron una biodegradación de hidrocarburos del petróleo de hasta un 96% después de la adición de biosólidos (materia orgánica rica en nutrientes resultante del tratamiento de aguas residuales domésticas) y fertilizantes inorgánicos (ricos en N y P) a suelos contaminados con diesel.

En términos generales, podemos concluir que un ajuste en la relación DQO:N:P podría ser útil cuando la curtiembre vierta efluentes con valores de DQO elevados (aprox. 3000 mg/L), pero esta estrategia no sería adecuada cuando los valores de DQO de los efluentes fueran de alrededor de 1500 mg/L (Tabla 14). Como se mencionó en la *sección 9.3.2*, las bacterias (consorcio + flora nativa) fueron capaces de reducir la DQO de los efluentes de curtiembre desde valores iniciales alrededor de 3000 mg/L a valores entre 1000-1500 mg/L después de 7 d y entre 600-1000 mg/L después de 14 d. En esta situación, un ajuste en la relación DQO:N:P del efluente al día 7, permitiría una reducción adicional de la DQO, obteniendo así valores entre 400-600 mg/L al día 14. En contraposición, cuando la curtiembre genera efluentes con una DQO inicial alrededor de 1500 mg/L, las bacterias (consorcio + flora nativa) lograron una reducción de la DQO a valores comprendidos entre 600-1000 mg/L después de 7 d y entre 600-800 mg/L después de 14 d (*sección 9.3.2*). En esta otra situación, el ajuste en la relación DQO:N:P al día 7 no sería útil, bajo ningún tratamiento (control, bioaumentado o bioestimulado). Estos resultados sugieren que la materia orgánica residual que no logra ser removida (en ninguno de los dos casos) podría corresponderse con materia altamente recalcitrante y persistente, que probablemente no se encuentre biodisponible para ser utilizada por las bacterias (Liu y Zhu, 2017). En este sentido, la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUUDI) reporta que a pesar de la gran cantidad de tratamientos físico-químicos y biológicos diseñados para tratar los efluentes de la industria del curtido, muchas veces, la calidad del efluente final no cumple con los límites de descarga permitidos, debido a la presencia de una DQO recalcitrante que es atribuida a los compuestos que los microorganismos no son capaces de descomponer. Por otra parte, las altas concentraciones de Cr (>5 mg/L), sulfatos y salinidad (1-10% p/v) también pueden tener

impactos negativos en la reducción de los niveles de DQO en los sistemas de tratamiento biológico aeróbico (Sivaprakasam y col., 2008). En tales casos, se plantea la necesidad de recurrir a procedimientos adicionales, por lo general tratamientos más sofisticados y bastante caros como la mineralización de compuestos orgánicos por oxidación con H₂O₂ en presencia de sulfato ferroso (proceso de Fenton y sus derivados) (Emami y col., 2010; Azbar y col., 2004), tratamientos con ozono (Balakrishnan y col., 2002), etc. En este contexto, varios autores demostraron que la combinación entre los métodos físico-químicos y biológicos sería muy eficiente en el tratamiento de las aguas residuales de curtiembres reduciendo tanto los niveles de DQO, como las concentraciones de Cr y otros metales pesados (Ahmed y col., 2016; Sharma y Malaviya, 2016; Goswami y Mazumder, 2014; Abdulla y col., 2011; Abdulla y col., 2010).

Tabla 14: Resumen de los valores de DQO (mg/L) del efluente de curtiembre en estudio, antes y después de los tratamientos.

DQO inicial	3000	1500
Después de 7 d de tratamiento*	1000-1500	600-1000
Después de 14 d de tratamiento*	600-1000	600-800
Después de 14 d de tratamiento*, pero con ajuste en la DQO:N:P al día 7	400-600 (✓)	600-800 (X)

Se muestran valores de DQO aproximados.

*Tratamiento: se refiere en general tanto al bioaumentación con el consorcio como al proceso de atenuación natural (controles sin inocular).

CONCLUSIONES



10. CONCLUSIONES

La caracterización físico-química del efluente de curtiembre mostró que la mayoría de los parámetros evaluados sobrepasaron los valores límites sugeridos por Organismos Regulatorios para la descarga de efluentes en cuerpos de agua superficiales, siendo el Cr(VI), los fenoles y la DQO las variables que excedieron en mayor medida dichos límites.

Tanto el consorcio SFC 500-1, como las bacterias que lo integran, toleraron diferentes metales (As(III), As(V), Zn, Hg, Cd), fenoles (diclorofenol, pentaclorofenol y guaiacol) que podrían estar presentes en efluentes de curtiembre y removieron el colorante Negro Trupocor, comúnmente utilizado en la industria del curtido de cueros. Además, el consorcio SFC 500-1 fue capaz de sobrevivir y crecer en este efluente en un amplio rango de temperaturas, lo que sugiere un metabolismo activo por parte de sus integrantes.

El bioaumento del efluente de curtiembre con el consorcio SFC 500-1 en sistemas *in vitro* (en condiciones de laboratorio controladas y a pequeña escala), permitió una remoción de alrededor del 15% de Cr(VI) (25 mg/L) y 100% de fenol (300 mg/L) añadido al efluente y una reducción del 55% de la DQO inicial, después de 3 d de tratamiento. En los sistemas de microcosmos a campo por su parte, se obtuvo una remoción de Cr(VI) significativa, mientras que el fenol fue removido en su totalidad. La reducción de la DQO fue alrededor del 60-80%, después de 14 d de tratamiento, con una contribución significativa por parte de la flora nativa del efluente. A partir de esto, destacamos la importancia de complementar los estudios en laboratorio con experimentos bajo condiciones medioambientales reales y a mayor escala como los microcosmos a campo, así como también evaluar en un futuro la probable aplicación de una estrategia de bioestimulación. Los efluentes tratados en general, no presentaron toxicidad y los integrantes del consorcio SFC 500-1 resultaron sensibles a una gran variedad de antibióticos, hallazgo importante por tratarse de microorganismos que serían aplicados al tratamiento de ambientes naturales contaminados.

Finalmente, se realizaron adecuaciones experimentales con el fin de obtener mejoras en la reducción de la materia orgánica. En este sentido, un ajuste en la relación DQO:N:P podría ser útil cuando el efluente inicial contiene alta carga orgánica (3000 mg/L). La adición de los surfactantes analizados, en cambio, no resultó útil en cuanto a la disminución de los valores de DQO en este tipo de efluente y bajo las condiciones experimentales utilizadas. A continuación, se muestra un esquema integrador de los resultados obtenidos en este Capítulo.

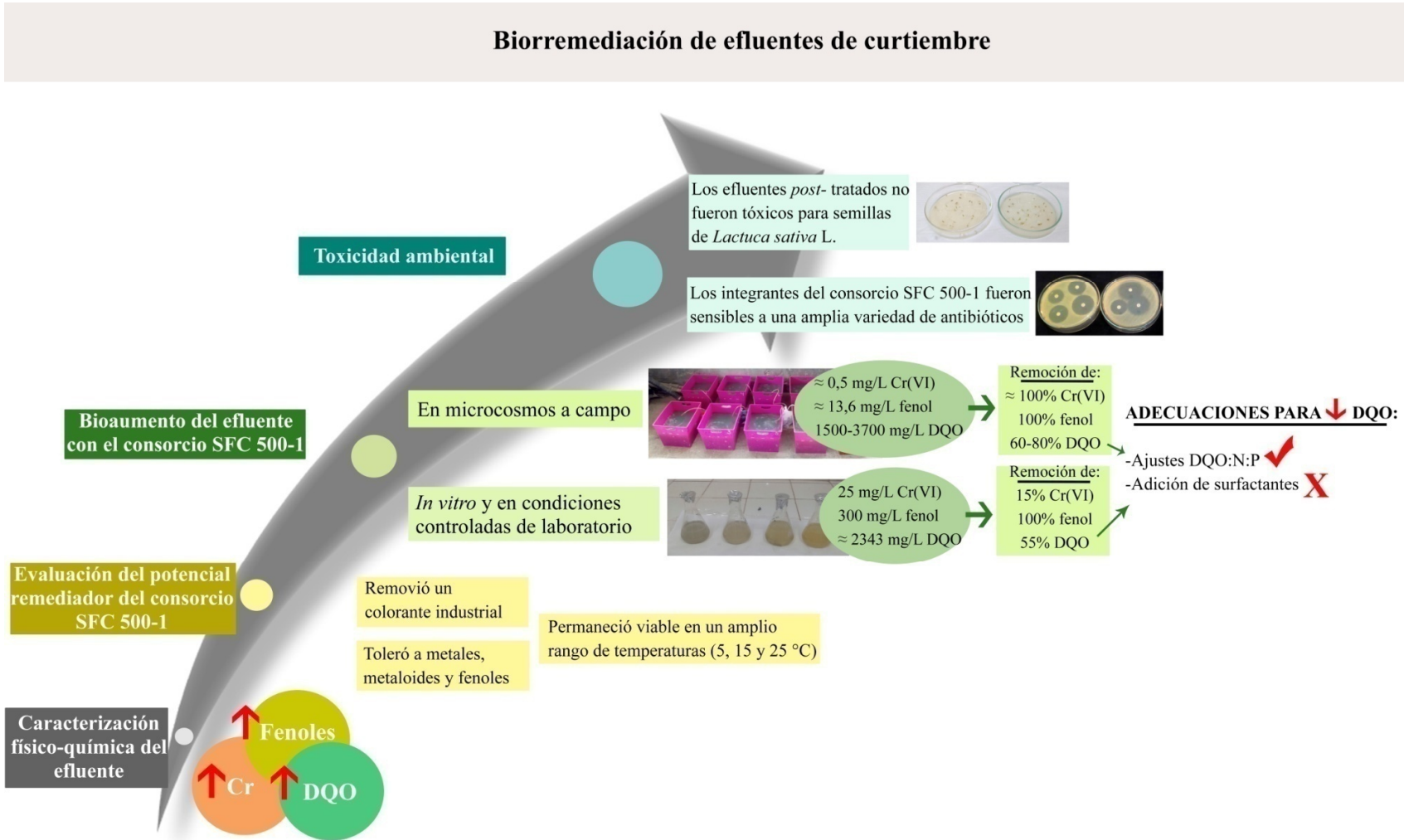


Figura 34: Esquema representativo que resume el potencial del consorcio SFC 500-1 como estrategia de biorremediación (bioaumentación) para ser aplicado al tratamiento de un efluente de curtiembre, elaborado en base a los resultados del Capítulo II.

CAPÍTULO III:
*Estudio de las comunidades
bacterianas del efluente de
curtiembre y del cuerpo de agua
receptor*



INTRODUCCIÓN



11. INTRODUCCIÓN

11.1. Estudio de las comunidades microbianas de efluentes/lodos provenientes de sistemas de tratamientos biológicos

El rendimiento y la estabilización de los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales están estrechamente relacionados con la estructura y dinámica de las comunidades microbianas que los forman (Chen y col., 2017; Mielczarek y col., 2013; Wang y col., 2013). Por lo tanto, obtener información precisa sobre la composición y el estado de las comunidades nativas dentro de estas matrices, su función y sus interacciones, así como su respuesta frente a un estrés, podría proporcionar nuevas perspectivas en el control del proceso de tratamiento biológico y contribuir a mejorar la eficiencia de eliminación, en términos de ingeniería del proceso y recursos energéticos (Günther y col., 2012).

En este sentido, la ecología microbiana intenta explicar y predecir fenómenos tales como los patrones de diversidad temporal y espacial de los organismos vivos y sus interacciones tróficas (Rittmann y col., 2006). Además, estudia el ensamblado de las comunidades, su origen, así como los factores y las condiciones que definen dicho ensamblado (Prosser y col., 2007). Conocer los principios del ensamblado de la comunidad microbiana puede ser clave en la comprensión de los factores que determinan la estructura de la comunidad y en la predicción de respuestas frente a cambios o perturbaciones externas, escenarios frecuentes en plantas de tratamiento de efluentes (Ramette y Tiedje, 2007). Sin embargo, aún no se ha alcanzado un grado suficiente de comprensión y predicción que permitan el control absoluto del proceso de los lodos activados por ejemplo, que consisten en el autoensamblado de una comunidad microbiana activa con capacidad de formar agregados floculentos, ni de ningún otro sistema biotecnológico basado en comunidades complejas.

La interacción entre la biotecnología ambiental, la ecología microbiana y la biología molecular, han generado un nuevo campo de investigación que todavía se encuentra en proceso de maduración, cuyo desafío consiste en superar los estudios meramente descriptivos, para comenzar a comprender en profundidad la ecología de la microbiota de los ecosistemas biotecnológicos.

11.2. Tecnologías de secuenciación de alto rendimiento

Tradicionalmente, las técnicas dependientes del cultivo a nivel de laboratorio fueron las utilizadas para caracterizar a los microorganismos de diferentes ambientes. Los análisis biológicos de la diversidad de especies en muestras ambientales consistían, por lo tanto, en intentar crecer en forma aislada tantos organismos como fuese posible. Mediante estas metodologías se descubrió y caracterizó a la gran mayoría de los microorganismos que se conocen hasta el momento y a partir de ellas se han podido realizar las primeras determinaciones de la composición de las comunidades microbianas en diferentes ambientes (Zhang y col., 2015; Zhao y col., 2013). Sin embargo, este enfoque tiene una importante limitación, que se desconoció hasta la popularización de las tecnologías de secuenciación de ADN. Entre el 90 y el 99% de los microorganismos ambientales no han podido ser cultivados en el laboratorio (Quince y col., 2008; Rappé y Giovannoni, 2003; Whitman y col., 1998). En las últimas décadas se han utilizado ampliamente técnicas independientes del cultivo, como la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización por PCR (PCR-DGGE), hibridación fluorescente *in situ* y PCR cuantitativa (qPCR) para estudiar las comunidades microbianas (Zhao y col., 2013; Sauder y col., 2012; Ye y col., 2012). Actualmente, el surgimiento de tecnologías de secuenciación masiva, denominadas también de alto rendimiento (por ejemplo, 454 e Illumina), constituyó una revolución para el campo de la genómica y la bioinformática, puesto que cada una de ellas permite realizar en una única corrida el trabajo que antes hubiese llevado meses o incluso años y costos cientos de veces mayores (Vanwonderghem y col., 2014; Caporaso y col., 2012; Zhang y col., 2012c; Claesson y col., 2010). Es por eso que fueron muy rápidamente adoptadas por la comunidad científica que comenzó a emplearlas para una gran diversidad de aplicaciones. Entre las diferentes plataformas disponibles, Illumina MiSeqPE300 permite la obtención de datos de secuenciación de alta precisión, a un bajo costo y con un rendimiento superior que la plataforma 454 (Ma y col., 2018; Rincon-Florez y col., 2013; Glenn 2011). Varios reportes han demostrado que la plataforma Illumina puede proporcionar nuevos conocimientos para el estudio de las comunidades microbianas ambientales (Ma y col., 2015; Yang y col., 2015; Zhang y col., 2015b).

Existen dos alternativas que pueden ser utilizadas en metagenómica: secuenciar todos los genomas completos al azar (cadenas largas de ADN), mediante secuenciación de escopeta (*shotgun-sequencing*, en inglés) (Motahari y Bresler, 2012), o secuenciar de todos ellos,

únicamente un gen o región acotada mediante secuenciación de amplicones (*amplicon-sequencing*, en inglés) (Quince y col., 2015).

11.2.1. Secuenciación de amplicones de la subunidad 16S del gen ARN ribosomal (ARNr 16S)

La secuenciación mediante *amplicon-sequencing* es un método más simple que *shotgun-sequencing*, pero que puede ser de gran utilidad para ciertas aplicaciones. Su fundamento consiste en amplificar por PCR un gen o secuencia en particular que resulte de interés a partir de una muestra de ADN metagenómico y luego secuenciar el producto de esta amplificación. Para ello se deben diseñar previamente oligonucleótidos (cebadores o *primers*) degenerados que se apareen con regiones conservadas de las secuencias de interés y que sean comunes a todos los organismos que se pretende analizar. El gen más utilizado con este fin suele ser el de la subunidad pequeña de ARN ribosomal, que en el caso de los organismos procariotas se denomina ARNr 16S y en los eucariotas ARNr 18S debido a su diferencia de tamaño (Case y col., 2007; Woese y Fox, 1977). Este gen se encuentra conservado en todos los organismos vivos y debido a su tasa de mutación relativamente constante entre linajes, puede ser utilizado como un indicador taxonómico y filogenético confiable (Ward y col., 1990). El gen del ARNr 16S tiene un largo promedio de 1550 pb y contiene en su interior nueve regiones hipervariables que suelen ser los fragmentos informativos a nivel taxonómico (Cardenas y Tiedje, 2008). Debido a que las tecnologías de secuenciación de segunda generación producen secuencias más cortas que el largo de este gen, se suele elegir una o a lo sumo dos regiones hipervariables del gen para amplificar por PCR y luego secuenciar. Existen numerosas discusiones respecto a cuál es la región que resulta más precisa para las asignaciones taxonómicas y que reproduce a su vez en mejor medida las mutaciones acumuladas a lo largo del gen entero en relación a los demás organismos (Ibarbalz y col., 2014; Fredriksson y col., 2013; Klindworth y col., 2012). Actualmente, se ha popularizado el uso de la región V4 (*primers* 515F/806R) para el caso de procariotas (Parada y col., 2016). Sin embargo, se ha descrito que este par de cebadores podría sobreestimar taxones marinos pertenecientes al filo *Gammaproteobacteria* (Parada y col., 2016).

11.2.2. *Procesamiento de secuencias*

En los análisis metagenómicos de comunidades microbianas mediante *amplicon-sequencing* suelen estudiarse y compararse varias muestras a la vez. Como sólo se analiza un único gen, unos cuantos cientos o miles de secuencias pueden ser suficientes para caracterizar cada muestra ambiental. Los secuenciadores de segunda generación generan cientos de miles (454) e incluso millones (Illumina) de secuencias por corrida y por lo tanto es posible la multiplexación de muestras. Para poder procesarlas por separado, a los *primers* suele adicionárseles en el extremo 5' una secuencia específica identificadora por muestra llamada *barcode* (código de barras, en inglés) (Shokralla y col., 2014). La amplificación de cada muestra es independiente, y requiere el uso de pares de *primers* conteniendo un *barcode* específico y diferente al del resto de las muestras.

El primer paso del procesamiento de secuencias obtenidas por *amplicon-sequencing* es el demultiplexado, que consiste en identificar el *barcode* de cada secuencia obtenida y agruparlas por muestra. El segundo paso necesario es la agrupación de secuencias según diferentes porcentajes de similitud. Se asume que secuencias que se parecen más de un 97% corresponden a una misma especie o género, en más del 90% al mismo orden o familia y por encima del 80% a nivel de phylum o clase (Schloss y Handelsman, 2005) y por lo tanto suelen ser estos porcentajes los elegidos en este paso. A los grupos o *clústeres* generados se los denomina unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Existen diferentes algoritmos desarrollados para agrupar las secuencias por similitud, entre los cuales los más conocidos y utilizados son Uclust (Edgar 2010), Mothur (Schloss y col., 2009) y CD-HIT (Fu y col., 2012), a pesar de que todos ellos suelen sobreestimar la abundancia de OTUs de cada muestra.

Luego, de cada *clúster* generado, se debe elegir una secuencia representante. Las mismas pueden ser utilizadas principalmente para dos funciones. En primer lugar, para darle una asignación taxonómica a cada OTU a partir de la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos. En segundo lugar para analizar las relaciones filogenéticas de los OTUs a partir del alineamiento global de todas las secuencias y posterior construcción de árboles filogenéticos. En el caso de los amplicones para el gen del ARNr 16S, las bases de datos utilizadas suelen ser RDP, GreenGenes y Silva, que se encuentran curadas manualmente (corregidas, revisadas) y la mayoría de las secuencias corresponden al gen del ARNr 16S completo y anotado a todos los niveles taxonómicos. Los algoritmos usados para la búsqueda

en estas bases suelen ser el BLAST y el RDP Classifier (Wang y col., 2007). El primero resulta en muchos casos impreciso, porque si bien se asigna un *e-value*, *score* y porcentaje de identidad en cada resultado, toma la asignación taxonómica completa del mejor *hit* independientemente de cuán parecida sea la secuencia. Es entonces el usuario quien debe decidir hasta qué nivel taxonómico confiar. El RDP *classifier*, por otro lado, es un clasificador Bayesiano ingenuo, que clasifica las secuencias a todos los niveles taxonómicos, de dominio a género, aportando una estimación de confianza a cada nivel. El usuario puede definir un valor umbral para la confianza, obteniéndose la clasificación únicamente hasta aquel nivel que se encuentre por encima de ese valor. Este algoritmo suele ser el más utilizado para las asignaciones taxonómicas.

Existen dos estrategias posibles para alinear las secuencias representantes de OTUs. La primera consiste en alineamientos *de novo*, es decir, sin una referencia previa sobre la cual basarse para ordenar las secuencias. Los algoritmos más utilizados para este fin son el Clustal (Higgins y col., 1996) y el Muscle (Edgar 2004). La segunda estrategia consiste en alinear las secuencias en base a un alineamiento previo de referencia (que por lo general ha sido corregido manualmente). Los algoritmos más populares que utilizan este tipo de enfoque son el PyNAST (Caporaso y col., 2010) y el SINA (Pruesse y col., 2012). Una vez alineadas las secuencias es posible realizar análisis filogenéticos con ellas.

Mothur, es una de las herramientas más completas y amigables para el procesamiento de secuencias. Tiene un procedimiento estandarizado que permite reducir los errores de secuenciación (tanto usando diagramas de flujo como los valores de calidad), remover secuencias quimera y contaminantes, hacer análisis de tasa de error, clusterizar en OTUs y filotipos (similar a OTU pero considerando relaciones filogenéticas además de similitud de secuencia), construir árboles filogenéticos, hacer análisis de diversidad alfa, beta y poblacionales (Schloss y col., 2011, Schloss y col., 2009).

11.2.3. Análisis de diversidad

Los análisis de comunidades microbianas por *amplicon-sequencing* suelen utilizar enfoques propios del campo de la ecología de comunidades. El objetivo que persigue este tipo de estudios es caracterizar la diversidad de las comunidades. Los análisis de diversidad alfa determinan parámetros intrínsecos de una única comunidad como por ejemplo, la riqueza

(cantidad de especies), equitatividad (evalúa la distribución de abundancias relativas de las especies encontradas) y la diversidad (tiene en cuenta los dos anteriores, es decir, la cantidad de especies y cómo están distribuidas) (Jost 2007; Kindt 2005). La riqueza de especies se evalúa por ejemplo con el estimador de riqueza de Chao1 (Chao 1984) y el estimador de cobertura basado en la abundancia ACE (Chao y Lee, 1992), la equitatividad con el índice de Heip (Heip 1974), mientras que los estimadores más populares de diversidad son el índice de Shannon (Chao y Shen, 2003) e inverso Simpson (Hunter y Gaston, 1988).

Para que los valores de las métricas de diversidad alfa sean comparables entre muestras, es necesario que el esfuerzo de muestreo (en este caso, la cantidad de secuencias generadas o analizadas) haya sido similar para cada una de ellas. Una forma de visualizar los resultados de diversidad alfa, suelen ser las curvas de rarefacción (Siegel 2006; Gotelli y Colwell, 2001). Las mismas se construyen a partir de establecer el valor que adopta una determinada métrica ecológica a diferentes esfuerzos de muestreo o cantidad de secuencias. Este tipo de curvas de acumulación, parten del origen, mostrando un crecimiento exponencial al principio y tendiendo finalmente a un valor asintótico. Esto se debe a que cualquier métrica de diversidad alfa tiene un valor de cero cuando no se analiza ninguna secuencia y eventualmente, cuando una comunidad ha sido completamente muestreada, por más que se sigan agregando secuencias al análisis, éstas repiten otras anteriores, obteniéndose un valor constante en la métrica. Aún cuando el esfuerzo de muestreo total haya sido desparejo entre diferentes muestras, las curvas de rarefacción son comparables para cada punto en el cual haya suficiente cantidad de secuencias de cada muestra en la comparación (Siegel 2006; Gotelli y Colwell, 2001).

Los análisis de diversidad beta, por el contrario, se utilizan para explicar la diversidad entre comunidades y ayudan a encontrar los factores que la determinan. Existe un gran número de métricas ecológicas utilizadas para este tipo de análisis. El objetivo de todas ellas es, en última instancia, construir matrices de distancias donde se comparan todas las muestras entre sí en función de la composición de especies (o cualquier otra variable que se haya medido) (Jost 2007; Kindt 2005). Las métricas más utilizadas en ecología microbiana son Bray Curtis, Weighted Unifrac y Unweighted Unifrac (Lozupone y col., 2011). Bray Curtis tiene en cuenta la presencia y abundancia de especies. Unifrac, en cambio, tiene en cuenta además la relación filogenética entre organismos (OTUs en este caso) y mide la cantidad de historia evolutiva que

es única para cada muestra del par comparado. La métrica de Weighted Unifrac tiene en cuenta, además, las abundancias relativas de cada linaje u OTU para dar un peso a cada rama del árbol. Se utiliza por lo tanto para comparar las estructuras de las comunidades. La métrica de Unweighted Unifrac sólo tiene en cuenta la presencia o ausencia de cada OTU en cada muestra y por lo tanto evalúa la composición de la comunidad. Al dar igual peso a las especies muy abundantes y poco abundantes, permite dar un peso considerable a las especies raras (poco frecuentes) de una comunidad. Una vez construidas las matrices de distancias, los datos pueden ser visualizados mediante diferentes métodos. Los más utilizados en ecología microbiana son el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de coordenadas principales (PCoA) y el UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Los dos primeros son análisis numéricos multivariados que permiten ordenar las muestras en un espacio multidimensional (del cual se suelen graficar únicamente las dimensiones que explican la mayor parte de la variabilidad entre muestras). Ambos métodos son muy parecidos, con la única diferencia de que el PCA sólo permite graficar las distancias euclidianas entre muestras mientras que el PCoA puede ser utilizado para cualquier métrica ecológica de distancias. El método de UPGMA permite construir clusterizaciones jerárquicas entre muestras en base a las similitudes entre muestras apareadas. En base a esta clusterización se pueden construir fenogramas (diagramas con forma de árbol) que reflejan la relación entre muestras.

11.3. Comunidades bacterianas habitualmente presentes en efluentes/lodos provenientes de sistemas de tratamiento biológicos

Es válido preguntarse cuán relevante es conocer “quiénes están” para poder entender “qué están haciendo”. Estudios recientes indican que la composición de las comunidades influye sobre la función en un variado conjunto de ecosistemas (Nemergut y col., 2013; Lozupone y Knight, 2007). En lodos activados por ejemplo, donde la función de los microorganismos está definida principalmente por la degradación de materia orgánica y nutrientes contenidos en el efluente, es decisivo comprender estas relaciones.

La aplicación de las tecnologías de secuenciación masiva permitió explorar la diversidad microbiana en lodos activados de una forma sin precedentes, y colaboró en profundizar el estudio del ensamblado de las comunidades. Trabajos publicados en los últimos

años, basados en la secuenciación de amplicones correspondientes a fragmentos del gen de la subunidad 16S de ARN ribosomal (ARNr 16S), mostraron que las comunidades de reactores que tratan efluentes domiciliarios, aún con diferencias en su ubicación geográfica y en la configuración de sus instalaciones, son notoriamente similares a nivel de filo bacteriano (Wang y col., 2012; Zhang y col., 2012), sugiriendo una consistencia con lo propuesto por Philipotts y colaboradores en cuanto a una coherencia a rangos taxonómicos altos (filo) (Philipot y col., 2010). En particular, los relevamientos en lodos activados de plantas de tratamiento municipales destacaron la dominancia del filo *Proteobacteria*, con sus clases *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*, seguido de grupos tales como *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Wang y col., 2012; Zhang y col., 2012). De manera similar, estudios realizados en plantas de tratamiento de efluentes industriales a escala real y a escala de laboratorio indicaron que las comunidades bacterianas de lodos activados estaban dominadas por los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, seguidos de *Actinobacteria* y *Firmicutes* (Valentín-Vargas y col., 2012; Wang y col., 2012; Degenaar y col., 2008; Figuerola y Erijman, 2007; Bramucci y Nagarajan, 2006; Juretschko y col., 2002). Sin embargo, estos estudios han estado limitados al análisis de tan sólo unas centenas de clones del gen ARNr 16S, y además no relacionaron la estructura de la comunidad bacteriana con las características del efluente. Por otro lado, se han realizado muchas investigaciones dedicadas al análisis de la estructura de la comunidad microbiana en aguas residuales de curtiembre (Ma y col., 2018; Liang y col., 2016; Desta y col., 2014; Chen y col., 2012; Lefebvre y col., 2006). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han centrado en la estructura de la comunidad bacteriana propia del efluente y solo unos pocos han evaluado el efecto del bioaumentación sobre la estructura de la comunidad microbiana procariótica (Sul y col., 2016).

Los factores ambientales, la composición del efluente y los parámetros operativos deben ser tenidos en consideración a la hora de evaluar las reglas de ensamblado de la comunidad microbiana de los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Chen y col., 2017; Gao y col., 2016; Niu y col., 2016). Entre estas variables podemos mencionar a los niveles de DBO, DQO, concentración de oxígeno disuelto, temperatura, pH, salinidad, los sólidos totales en suspensión, así como las fuentes de N y P, las cuales varían según el agua residual a tratar y determinan directamente el grado de biodegradabilidad de esos efluentes y su diversidad. En otras palabras, todas estas variables, individualmente y de forma combinada, ejercen una

selección ecológica abiótica que afecta la estructura y la dinámica de la comunidad microbiana (Valentín-Vargas y col., 2012; Çığgın y col., 2011; Paul y col., 1998). Por tal motivo, es posible hallar asociaciones entre parámetros de operación, características físico-químicas del efluente y perfiles moleculares de comunidades bacterianas, a partir del estudio de estos sistemas (Wang y col., 2012; Wells y col., 2011).

11.4. Impacto del vertido final de efluentes sobre la comunidad bacteriana de los cuerpos de agua receptores y su toxicidad

Los sistemas fluviales son frecuentemente el principal medio para la recepción de vertidos de efluentes, tratados y no tratados o parcialmente tratados, de las industrias que se encuentran en las proximidades (Cai y col., 2018; Huo y col., 2017; Siddiquee y col., 2013; Kanu y Achi, 2011). Este hecho, sumado a que las estrategias utilizadas para el tratamiento de efluentes no siempre son completamente efectivas, puede llevar a que éstos tengan un impacto adverso en la calidad del agua y en los ecosistemas de los cuerpos de agua receptores (Martínez-Santos y col., 2018; Ibekwe y col., 2012). En consecuencia, es esencial proteger los sistemas fluviales, lo que requiere comprender el efecto que pueden llegar a tener los vertidos sobre la calidad del agua, así como en la composición y funciones ecológicas de los organismos que allí habitan (Jennerjahn 2012). En particular, las comunidades bacterianas en los cuerpos de agua permanecen en gran parte inexploradas debido a su gran diversidad regional y a las condiciones ambientales variables a las que se encuentran expuestas (Li y col., 2016). Estos organismos desempeñan un papel esencial en la transformación y mineralización de los nutrientes y en la biodegradación de sustancias alóctonas, como los contaminantes derivados de las actividades humanas (Kanu y Achi, 2011). Además, cualquier cambio en los perfiles de nutrientes, medio ambiente y contaminación en éstos ecosistemas influirá directamente en las comunidades bacterianas y eso a su vez afectará aún más el ciclo de nutrientes y otras comunidades relacionadas (Ibekwe y col., 2016). En este sentido, varios estudios han explorado el efecto del vertido de efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales sobre los parámetros físico-químicos y en la composición y función de las comunidades microbianas en el agua o los sedimentos de los cuerpos de agua receptores (Wang y col., 2019; Martínez-Santos y col., 2018; Aristi y col., 2015; Marti y Balcázar, 2014; Drury y col., 2013; Grant y col., 2012; Ibekwe y col., 2012; Wakelin y col., 2008). Otros

estudios se han centrado específicamente en determinar cómo varían las comunidades microbianas en función de diferentes fuentes de contaminación (Ibekwe y col., 2016; Siddiquee y col., 2013). Sin embargo, todos estos estudios evalúan el impacto en los cuerpos de agua después de la descarga real de los efluentes, ya sea tratados y no tratados o parcialmente tratados, como un seguimiento o “monitoreo” posterior a la liberación final, pero no como un procedimiento preventivo para cuestionar o poner en consideración la descarga de los mismos. Un aspecto clave es obtener información precisa sobre la estructura de la comunidad microbiana y la dinámica de los cuerpos de agua receptores, los posibles cambios en estas comunidades en respuesta a la descarga de efluentes tratados, así como evaluar la toxicidad para los ecosistemas circundantes.

MATERIALES Y MÉTODOS



12. MATERIALES Y MÉTODOS

12.1. Secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S de un efluente de curtiembre, efecto del bioaumentación sobre la estructura de la comunidad bacteriana del efluente y efecto del vertido de efluentes tratados sobre la comunidad nativa del arroyo

12.1.1. Diseño experimental

El ensayo constó de dos etapas. En una primera instancia se evaluó la estructura de la comunidad bacteriana del efluente, cuya muestra se tomó directamente del canal de salida del tanque de sedimentación primario, de la curtiembre Víctor Manuel Zabala S.A. (Elena-Córdoba) (Figura 35) y también se analizó el efecto del bioaumentación con el consorcio SFC 500-1 sobre la comunidad original del mismo. En segundo lugar, se simuló el vertido de efluentes tratados sobre agua proveniente del arroyo El Barreal, afluente situado en las cercanías (Figura 35), a fines de evaluar el impacto sobre las comunidades bacterianas del arroyo, donde comúnmente son vertidos los efluentes de esta empresa.

Para esto, se utilizaron sistemas de microcosmos a campo que constaron de contenedores de plástico de 15 L de capacidad, conteniendo 11 L de efluente y/o agua de arroyo (los tratamientos se describen más adelante). Los contenedores fueron aireados mediante burbujeadores (con porcentajes de saturación de oxígeno entre 60 y 90%) y colocados en áreas de acceso restringido de la empresa, al aire libre y expuestos a las variaciones climáticas imperantes durante el período de experimentación (temperatura mínima promedio de $16\pm 3^{\circ}\text{C}$ y máxima de $29\pm 2^{\circ}\text{C}$) (ver Anexo, Fig. A1).

Los primeros tratamientos a evaluar (por cuadruplicado) fueron: (E) efluente (sin inocular) como estrategia de atenuación natural y (EC) efluente inoculado (10% v/v) con el consorcio SFC 500-1 como una estrategia de bioaumentación, tanto a tiempo inicial como después de 7 d. El inóculo bacteriano se obtuvo de un cultivo *over-night* creciendo en medio líquido TY (Beringer 1974) e incubado a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación a 150 rpm, $\text{D.O}_{(600\text{ nm})}=1,7$.

Por otro lado, para evaluar el efecto de efluentes de curtiembre tratados, después de 7 d, sobre la comunidad bacteriana del agua de arroyo, tanto al inicio del vertido como después de 1 d, los tratamientos (por triplicado, excepto el último tratamiento que se realizó por duplicado) fueron: (A) agua de arroyo; (AE) agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural (E), (10% v/v); (AEC) agua de arroyo + efluente tratado por bioaumentación con el

consorcio SFC 500-1(EC), (10% v/v); (AC) agua de arroyo + inóculo del consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY (C), (10% v/v). El primer tratamiento (A) se realizó para conocer la estructura de la comunidad del agua de arroyo El Barreal (control). Los tratamientos AE y AEC se realizaron para analizar el efecto del vertido de efluentes tratados durante 7 d por atenuación natural y bioaumentación, respectivamente; sobre las comunidades bacterianas del agua de arroyo. Por último, el tratamiento AC se efectuó para evaluar directamente el efecto del consorcio SFC 500-1 sobre las comunidades del arroyo. Sin embargo, es importante aclarar que este tratamiento no sería probable de que ocurra en la realidad.



Figura 35: Imagen satelital y fotografías de la curtiembre Víctor Manuel Zabala S.A. y del arroyo el Barreal. En detalle se muestran los sitios de circulación o vertido de los efluentes provenientes de la curtiembre, la cual se ubica geográficamente a 32°34' de latitud Sur y 64°23' de longitud Oeste. Esta industria libera los efluentes de su manufactura en un canal sin revestimiento alguno, que se extiende colindante a un camino rural hasta alcanzar el cauce del arroyo El Barreal (1).

12.1.2. Muestreo y almacenamiento

Se recolectaron muestras líquidas de efluente (l), semi-sólidas de sedimento (s) y agua de arroyo de los sistemas experimentales detallados anteriormente para la determinación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos, secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S y bioensayos de toxicidad, éste último exclusivamente para los tratamientos con agua de arroyo.

Se tomaron muestras de efluente líquido al inicio del experimento (tiempo cero, $t=0$) y después de 7 d de tratamiento (final del experimento, $t=7$), mientras que las muestras de

sedimento sólo se tomaron del lodo precipitado, formado al final del experimento (7 d). Las muestras de arroyo se recolectaron al inicio (tiempo cero, $t=0$) y luego de 1 d posterior a la mezcla con los efluentes tratados (final del ensayo, $t=1$).

Para la recolección del efluente y sedimento, se utilizaron tubos Falcon estériles de 50 mL (8 tubos por microcosmo), mientras que las muestras de arroyo se recolectaron en contenedores plásticos estériles (2,5 L) (1 por microcosmo). Además, frascos de 250 mL (1 por microcosmo) se utilizaron para recolectar agua de arroyo, destinados a los bioensayos de toxicidad. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio dentro de las 2 h, con refrigeración. Una vez en el laboratorio, se procedió de inmediato a la determinación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos de las muestras. En relación a las muestras destinadas a secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S, éstas fueron centrifugadas a 17.000 rpm, durante 10 min a 4°C y los pellets resultantes fueron almacenados a -20°C, hasta la extracción de ADN. Las muestras para los bioensayos de toxicidad fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

12.1.3. Determinaciones en muestras de efluente y agua de arroyo

Los parámetros físico-químicos tales como pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE), oxígeno disuelto (O_2D), sulfato total, sólidos sedimentables, color, olor, DQO, P, N, Cr(VI) y fenoles se determinaron siguiendo las metodologías descritas en la *sección 8.1*. Además, se determinó la demanda biológica de oxígeno (DBO_5) en las muestras de efluentes, a través de la medición del oxígeno consumido por una población microbiana, de acuerdo a lo descrito por Ojeda Suárez (2004). En relación a parámetros microbiológicos, los coliformes totales y termotolerantes se determinaron siguiendo la metodología descrita en la *sección 8.1*, mientras que las bacterias cultivables totales (BCT) y las levaduras/hongos filamentosos cultivables totales (HCT) mediante recuento bacteriano en agar *Luria Bertani* (UFC/mL) y recuento total de hongos en agar selectivo Dicloran rosa de Bengala clortetraciclina (UFC/mL), respectivamente.

12.1.4. Secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S

12.1.4.1. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN (por duplicado) se realizaron utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trabajó con los pellets obtenidos después de centrifugar (17.000 rpm, durante 10 min a 4°C) 80 mL de efluente, 40 mL de sedimento, mientras que fue necesario centrifugar 1,5 L de agua de arroyo para concentrar y asegurar la extracción de ADN a partir de esta matriz. Se incluyó una muestra de agua de arroyo tomada un día diferente al del inicio del experimento (denominada Aad), como un control de la muestra inicial. Además, se realizó la extracción de ADN a partir de cultivos *over night* de las bacterias que conforman el consorcio SFC 500-1 (*A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E). Luego, el ADN extraído se sometió a una purificación utilizando columnas con polivinil-polipirrolidona (PVPP), previamente lavadas con NaOH (2 M) y agua MiliQ estéril (Petric y col., 2011). Como control interno del laboratorio, la calidad del ADN extraído se evaluó a través de espectrofotometría UV-visible (relación A260:A280) y por amplificación de la región variable V1-V9 del gen ARNr 16S usando los cebadores 27F (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') y 1492R (5' -TACGGTTACCTTGTTACGACTT -3') (Frank y col., 2008). El programa de amplificación constó de: 94°C durante 3 min, seguido de 33 ciclos de 94°C durante 45 seg, 60°C durante 1 min y 72°C durante 2 min, después de lo cual se realizó un paso de elongación final a 72°C durante 5 min. Los productos de PCR teñidos previamente con Gel Red (0,002% v/v, Biotium Inc) se visualizaron en gel de agarosa (1,5%), utilizando tampón TAE (1X). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 30 min.

12.1.4.2. PCR y secuenciación de amplicones

Se utilizaron los cebadores universales para bacterias 515F 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' y 806R 5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT -3' con el fin de amplificar la región hipervariable V4 del gen ARNr 16S (Parada y col., 2016).

La técnica de PCR consistió de 28 ciclos (5 ciclos utilizados en productos de PCR) usando el Kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, USA). El programa de amplificación constó de: 94°C durante 3 min, seguido de 28 ciclos de 94°C durante 30 seg, 53°C durante 40

seg y 72°C durante 1 min, después de lo cual se realizó un paso de elongación final a 72°C durante 5 min. Las etiquetas de 8 pb “barcode”, ubicadas en el extremo 5' de los cebadores, permitieron asociar productos individuales de PCR con cada muestra. Después de la amplificación, los productos de PCR se verificaron en gel de agarosa al 2% para determinar el éxito de la amplificación y la intensidad relativa de las bandas. Se agruparon múltiples muestras (por ejemplo, 100 muestras) en proporciones iguales en función de su peso molecular y las concentraciones de ADN. Las muestras agrupadas se purificaron utilizando perlas Ampure XP calibradas. Luego, el producto de PCR agrupado y purificado se usó para preparar la biblioteca de ADN Illumina. La secuenciación se realizó en Molecular Research Laboratory -MR DNA- (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA) mediante un MiSeq siguiendo las directrices del fabricante. Las secuencias sin procesar asociadas con este estudio se depositaron en la base de datos GenBank SRA con el número de acceso de BioProject PRJNA520999 y PRJNA531883.

12.1.4.3. Análisis de datos de secuenciación de amplicones

El control de calidad de todas las secuencias obtenidas de MiSeq se realizó con FastQC (Andrews 2010). Este programa permite extraer información básica sobre la calidad de la corrida a partir de archivos primarios en formato FASTQ, reportando medidas de resumen y gráficos descriptivos del conjunto de secuencias, relacionados con el número, la calidad y el largo de las secuencias, el contenido de indeterminaciones y de cada nucleótido, entre otras medidas relevantes. Tras la revisión de dichos parámetros, se estableció que el desempeño del ensayo ejecutado había sido satisfactorio y coincidía con lo esperado para la tecnología MiSeq (ver Anexo, Fig. A2, A3, A4, A5 y A6).

Se utilizó el programa “Mothur” (versión 1.39.5) para el procesamiento de los datos de secuenciación (Schloss y col., 2009), utilizando como guía el Procedimiento Operativo Estandarizado (SOP) sugerido por el autor. Se trata de un programa de uso libre y código abierto, que agrupa numerosas funciones ejecutables por línea de comando, destinadas a la manipulación de archivos primarios, su procesamiento completo y múltiples herramientas de análisis estadístico. El trabajo sobre las secuencias propiamente dichas fue llevado a cabo localmente en un servidor de 8 núcleos y 64 GB de memoria RAM, lo que permitió aprovechar la posibilidad que ofrece el programa “Mothur” de dividir tareas intensas en

múltiples procesadores. Salvo que se indique, se utilizaron los parámetros predeterminados de cada comando.

La finalidad de ahora en adelante fue reducir el conjunto de datos. Para ésto, se armaron secuencias únicas o *contigs* de igual tamaño, las cuales se deberían corresponder con la longitud amplificada por los *primers*. Se identificaron las muestras por medio de los *barcode* y se generaron archivos de grupos a partir de secuencias iguales. A continuación, se procedió a adecuar una base de datos de referencia, en nuestro caso SILVA ngs (Quast y col., 2013), una base de datos de genes ARNr 16S curada, para luego proceder al alineamiento de nuestras secuencias con las de referencia. El alineamiento finalizado permitió mejorar la detección de secuencias erróneas. Por un lado, fue posible detectar a las que se encontraban fuera del espacio de alineamiento principal y descartarlas, porque eran candidatas a ser contaminaciones, es decir, externas al amplicón seleccionado. Por otro lado, por medio del algoritmo “*uchime*” implementado en el programa “Mothur”, se identificaron las potenciales secuencias quiméricas que se originan en el proceso de amplificación por PCR. Como último paso del procesamiento básico, se redujo una vez más el error de secuenciación por medio de la vinculación de secuencias poco abundantes con secuencias altamente similares pero abundantes, por medio del comando “*pre.cluster*” (discrepancia de 2 pb).

En este punto se avanzó a realizar la clasificación taxonómica utilizando la base de “*greengenes*” (versión agosto 2013, que contiene 202.421 secuencias de bacterias y archaeas) (DeSantis y col., 2006), esto implicó distribuir las secuencias en grupos que representarían a los diferentes taxones bacterianos. Se agruparon las secuencias según un umbral de similitud (97%), a través del agrupamiento de enlace promedio. Es decir, todas aquellas lecturas que eran similares en un 97% de secuencia, conformaban una Unidad Taxonómica Operacional (OTU, del inglés, *Operational Taxonomic Unit*). Se considera que la similitud del 97% es una aproximación al nivel taxonómico de especie. Para esta vía es condición necesaria que las secuencias estén alineadas. En este trabajo, las discrepancias por largo y por omisión de nucleótidos (*gaps*) fueron tratadas con los parámetros propuestos por el autor del programa. Con esta vía se logró obtener una tabla de abundancias de secuencias, lo que conforma la base de gran parte de los análisis estadísticos posteriores. En este caso, por medio de un submuestreo realizado con la función “*sub.sample*” de “Mothur”, la tabla fue normalizada

respecto a un número mínimo de secuencias por muestra (7347). La página web del programa cuenta con la explicación detallada de cada función (<http://www.mothur.org/wiki>).

En ecología, la diversidad alfa describe la diversidad presente en una muestra. Se visualizaron la riqueza y la cobertura por medio de curvas de rarefacción con 4000-10000 iteraciones de muestreo. Con las OTUs definidas al 97% de similitud se observó el número de especies y se calcularon los índices de Good, Chao1, Heip, Berger Parker, inversa de Simpson y Shannon. El índice de Good estima la cobertura obtenida en un muestreo, y toma valores entre 0 y 1, siendo 1 la cobertura máxima. El número de especies observadas y el índice de Chao1 son estimadores de la riqueza, mientras que el índice de Heip de la equitatividad, o sea la abundancia de especie. El índice de Berger Parker por su parte, da idea de la dominancia de especies y por último los índices de Simpson (inversa) y Shannon son estimadores de diversidad.

Se determinó el patrón de distribución de diferentes taxones bacterianos (filo, clase, género) en las diferentes muestras tomadas de los sistemas de microcosmos. Para esto, se realizó el análisis de agrupamiento en base al índice de disimilitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio, mediante el programa InfoStat (Di Rienzo y col., 2013). Además, se realizó un mapa de calor combinado con dendogramas para mostrar la abundancia de los géneros bacterianos presentes en cada muestra obtenida de los sistemas de microcosmos y la distribución de las muestras en función de las comunidades bacterianas presentes, respectivamente. Este análisis fue realizado utilizando el índice de similitud Euclidiana y el método de agrupamiento de enlace promedio a través del programa NCSS (Kaysville, UT, USA).

El análisis de componentes principales (*PCA*, en inglés) obtenido con el programa OriginPro (2017), permitió describir a través de gráficos “biplot” la correlación entre las muestras (de los diferentes tratamientos aplicados en microcosmos) y los parámetros físico-químicos y microbiológicos. El análisis de correspondencia canónica (abreviado en inglés como *CCA*) por su parte, permitió visualizar las correlaciones entre los parámetros físico-químico-microbiológicos y los taxones bacterianos presentes en las diferentes muestras. Se crearon gráficos “triplot” para facilitar la visualización de los resultados mediante el programa InfoStat.

12.1.5. Bioensayos de toxicidad

12.1.5.1. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Se realizó un bioensayo de toxicidad utilizando semillas de *Lactuca sativa* L., con el objetivo de evaluar el potencial riesgo de verter efluentes tratados y el consorcio SFC 500-1 a un curso de agua natural. Para ello, se empleó un *pool* de muestras de cada tratamiento aplicado en microcosmos con agua de arroyo (A, AE, AEC, AC) y la toxicidad se evaluó tanto al inicio (día 0) como al final del experimento (después de 1 d), siguiendo la metodología descrita previamente en la *sección* 8.3.3.

12.1.5.2. Ensayo de toxicidad aguda con *Rhinella arenarum* –ANFIAGU-

12.1.5.2.1. Recolección de los huevos de *Rhinella arenarum* (sapo común) y obtención de embriones

Se colectaron las ristras de *R. arenarum*, con la ayuda de redes, de los márgenes del Río Cuarto ubicado en nuestra ciudad. Las ristras se mantuvieron en agua de origen y luego se procedió al recambio de la misma por agua libre de cloro. Una vez eclosionados los huevos, se mantuvieron en agua libre de cloro, con aireación constante hasta observar el desarrollo de los embriones (entre el estadio 23 y 25), los cuales fueron alimentados con hojas de achicoria hervida y alimento para peces.

12.1.5.2.2. Ensayo de toxicidad

El ensayo de toxicidad aguda con *R. arenarum* se realizó exponiendo embriones en los estadios 23, 24 ó 25 a muestras provenientes de los diferentes tratamientos aplicados en microcosmos con agua de arroyo (A, AE, AEC, AC). Para ello, se empleó un *pool* de muestras de cada tratamiento y la toxicidad se evaluó tanto al inicio (día 0) como al final de cada experimento (después del 1 d).

En cápsulas de Petri conteniendo 10 mL de cada muestra de agua de arroyo a evaluar, se colocaron 10 renacuajos en los estadios previamente descritos. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se utilizaron placas con agua corriente como control. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 120 h (5 d), bajo condiciones de luz y fotoperiodo

normal; realizando la renovación total del medio cada 24 h. La cuantificación de la mortandad también se realizó cada 24 hs.

12.1.6. Análisis estadístico

Los datos relacionados con el recuento total de bacterias y hongos obtenidos en los diferentes tratamientos, así como el recuento de coliformes totales y termotolerantes, se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), utilizando SYSTAT-SigmaStat para Windows versión 3.1 (SPSS, Chicago, IL, ESTADOS UNIDOS). Se utilizó un nivel de significación de $p < 0,05$ en todo el proceso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

13.1. Caracterización físico-química y microbiológica del efluente de curtiembre y del agua del arroyo receptor

A partir del muestreo de efluente de curtiembre y agua del arroyo de los sistemas de microcosmos a campo, se realizó su correspondiente caracterización físico-química y microbiológica, tanto a tiempo inicial como después de la aplicación de los tratamientos a evaluar (7 d para efluente y 1 d para agua de arroyo). Además, se compararon los valores obtenidos de efluentes con los estándares reglamentarios, con el objetivo de detectar las variables que representan un mayor riesgo para el ambiente. Los valores promedio de los parámetros físico-químicos y microbiológicos del efluente y agua de arroyo, se resumen en las Tablas 15 y 16, respectivamente.

Como puede observarse en la Tabla 15 y en muestreos previos (ver *sección 9.1*), la mayoría de los parámetros analizados en el efluente inicial, como sulfatos, conductividad eléctrica, DQO, DBO₅, P, N, Cr(VI), fenoles y coliformes totales sobrepasaron los límites establecidos para efluentes líquidos que pueden ser vertidos a cuerpos de agua superficiales de la Provincia de Córdoba. Luego de aplicados los tratamientos de atenuación natural (E) durante 7 d, para evaluar la actividad propia de la flora microbiana del efluente, y el bioaumentación con el consorcio SFC 500-1 (10% v/v) (EC), las características del efluente cambiaron. El pH incrementó ligeramente después de los procesos de biorremediación. Por el contrario, el contenido de sulfatos disminuyó en ambos tratamientos, pero estos valores permanecieron muy por encima de lo reglamentado por la legislación, mientras que la conductividad eléctrica no varió considerablemente, después de 7 d. Por otro lado, es importante notar el bajo porcentaje de saturación de oxígeno de los efluentes al inicio del experimento, respecto del día 7. Esto se debe a que los efluentes provinieron del canal de salida del tanque de sedimentación primario, el cual no tiene aireación; en contraste, la oxigenación provista por los burbujeadores permitió una aireación adecuada de los microcosmos durante los 7 d de tratamiento.

En cuanto a las características organolépticas del efluente, podemos mencionar que las bacterias, ya sea en los tratamientos de atenuación natural (E) o bioaumentación (EC), fueron eficientes en lograr su decoloración así como la eliminación de su olor, observándose

totalmente incoloro e inodoro después de 7 d. La disminución del color y olor de un efluente revela actividad metabólica por parte de los microorganismos presentes, según menciona Sukumaran y col. (2008).

Además, se observó que la DQO se redujo alrededor de un 52 y 66% mediante las estrategias de atenuación natural (E) y bioaumentación con el consorcio SFC 500-1 (EC), respectivamente. Sin embargo, esto no alcanzó para que dichos valores se encuentren dentro de los límites reglamentados (<250 mg/L). Con respecto a la materia orgánica susceptible de ser degradada por microorganismos (DBO_5), ésta disminuyó alrededor de un 18 y 50% en los tratamientos E y EC, respectivamente. Si comparamos estos valores con los de DQO mostrados anteriormente, podemos observar que la disminución fue menor en términos de DBO_5 y principalmente para el tratamiento de atenuación natural. En relación a esto, cabe destacar que la determinación de la DQO es considerada como uno de los métodos más adecuados para la estimación de la materia orgánica presente en los efluentes derivados del proceso de curtido (Noorjahan 2014), no así la DBO_5 la cual ha sido descrita como un parámetro muy controversial cuando se lo utiliza para evaluar este tipo de efluentes. Esto se debe a la presencia de gran contenido de inhibidores de la DBO_5 y de compuestos cuyo tiempo de degradación es mucho mayor a 5 d (Pampín y col., 2007; Ates y col., 1997). Los niveles de N y P en ambos tratamientos también disminuyeron después de 7 d y se correlacionaron directamente con el consumo de nutrientes mencionado previamente ($DQO > N > P$).

Por otro lado, los niveles de Cr(VI) en todos los efluentes tratados disminuyeron hasta valores no detectables por la técnica empleada (método de la difenilcarbazida), mientras que los fenoles disminuyeron entre un 87 y 89%, después de 7 d.

En relación a los parámetros microbiológicos, se observó un aumento en el recuento de coliformes totales y termotolerantes en los efluentes luego de 7 d. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias en estos parámetros microbiológicos entre los efluentes tratados por atenuación natural (E) y los provenientes de microcosmos inoculados con el consorcio SFC 500-1 (EC). Estos resultados, sugieren principalmente un efecto temporal ($t=0$ vs. $t=7$), más que a un efecto del tratamiento (E=atenuación natural vs. EC=bioaumentación). El elevado número de coliformes encontrados probablemente esté relacionado con el origen del efluente utilizado para el ensayo de microcosmos, ya que éste se obtuvo del canal de salida de un tanque de sedimentación primario (sin tratamiento secundario), o simplemente podría

deberse a una “magnificación” de este grupo por el medio de cultivo utilizado para su selección, el cual puede no correlacionarse directamente con el número real de este grupo de bacterias en el efluente. Otros autores han encontrado valores más altos para coliformes termotolerantes, incluso en los canales de descarga final de curtiembres. Umar y col. (2017) informaron un máximo de $1,26 \times 10^6$ NMP/100 mL, con *Escherichia* y *Klebsiella* como los principales géneros bacterianos identificados dentro del grupo de coliformes.

Las bacterias cultivables totales (BCT) en el efluente de curtiembre, aumentaron significativamente después de la inoculación con el consorcio bacteriano SFC 500-1 al comienzo del experimento (EC, t=0), mientras que estos cambios no fueron evidentes al día 7, si se compara el efluente sin inocular (E) con el inoculado (EC) (Tabla 15).

Las poblaciones de hongos cultivables totales (HCT) analizadas en el día 7 estuvieron claramente dominadas por levaduras en detrimento del número total de hongos filamentosos, tanto en el efluente sin inocular (E) como en los microcosmos bioaumentados (EC). Se proporciona material fotográfico ilustrativo junto con datos complementarios (Figura A7, Anexo). Estos resultados reflejan una evolución natural de la población de hongos en lugar de un efecto del tratamiento. Se dispone de escasa información referida a las poblaciones de hongos en los efluentes de curtiembre. Wang y col. (2014) encontraron a *Ascomycota* como el filo fúngico más abundante, constituyendo sólo el 6,3-7,4% del total de microorganismos en lodos activados de diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales. Rozitis y Strade (2015) también encontraron que el grupo de hongos estaba representado fundamentalmente por las levaduras, seguidas por los hongos filamentosos en las estaciones depuradoras de aguas residuales provenientes de industrias farmacéuticas.

La Tabla 16 muestra la caracterización físico-química y microbiológica del agua de arroyo antes y después del vertido de los efluentes tratados. En primer lugar, es importante mencionar que el agua de este arroyo (El Barreal) es usada en algunas ocasiones para riego agrícola, pero no como agua de consumo humano ni para recreación. Se consideró como normativa para la comparación, lo que establece la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2012) para aguas residuales tratadas destinadas a riego en agricultura. Ésta guía establece límites permitidos de pH, DBO₅, coliformes totales y Cr(VI) de 6-9, ≤ 30 mg/L, ≤ 200 NMP/100 mL y 0,1 mg/L, respectivamente. En relación a esto, el agua de arroyo (A, t=0) superó el valor de coliformes totales permisible por esta legislación, mientras que el

Cr(VI) no logró ser detectado por la técnica utilizada. Los demás parámetros que se muestran en la Tabla 16, no se encuentran legislados para aguas de este tipo.

El vertido inmediato de los efluentes tratados, ya sea por atenuación natural o bioaumentación, sobre el agua de arroyo (IAE, IAEC, t=0) produjo variaciones en parámetros tales como conductividad eléctrica, DQO y BCT, los cuáles aumentaron, respecto del agua de arroyo sin recibir vertido de efluentes tratados (IA). Estos resultados fueron de esperar y se deben a los valores elevados de dichos parámetros en los efluentes tratados (Tabla 15: tratamientos E y EC, t=7). Por otro lado, el vertido de un inóculo del consorcio SFC 500-1 (10% v/v) (AC, t=0) al agua de arroyo permite corroborar también los resultados anteriores. En estas condiciones, la conductividad eléctrica fue similar al agua del arroyo (IA), lo que una vez más confirma que fueron los efluentes tratados por atenuación natural o bioaumentación vertidos en el arroyo, los que provocaron su incremento. Además, el aumento en los valores de DQO, P, N y en BCT en el tratamiento AC se debe probablemente al inóculo bacteriano añadido, así como al medio de cultivo residual donde se hizo crecer al consorcio. Después de un día, las características físico-químicas y microbiológicas de las muestras correspondientes a los tratamientos ensayados (A, AE, AEC, AC) no cambiaron considerablemente respecto del inicio.

De manera similar a lo observado en este trabajo, existen numerosos antecedentes que demuestran alteraciones en las propiedades físico-químicas y microbiológicas de cuerpos de agua por la introducción de efluentes provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Price y col., 2018; Sharuddin y col., 2017; Drury y col., 2013; Osibanjo y col., 2011). Sin embargo, en algunos casos excepcionales se ha registrado la ausencia de cambios significativos en la calidad del agua de río por la descarga de efluentes de diferentes plantas de tratamiento, lo que podría deberse a una carga constante y sostenida de estos efluentes en los cursos de agua (Huo y col., 2017).

Tabla 15: Parámetros físico-químicos y microbiológicos de efluente de curtiembre.

Parámetros	E	EC	E	EC	Valores permitidos*
Momento de muestreo (d)	0	0	7	7	
Físico-químicos					
pH	8,20±0,01	8,21±0,00	8,97±0,03	9,03±0,03	6-9
Temperatura (°C)	19±1	19±1	17±1	17±1	≤ 40
Oxígeno disuelto (O ₂ D) (% de saturación)	3,25±0,51	3,50±0,81	74,50±4,19	87,35±2,58	N.R.
Sulfatos (mg/L)	858,67±39,19	894,50±63,52	718,37±49,49	742,37±23,63	≤ 500
Conductividad (mho/cm)	9950,00±50,00	8875,00±125,00	10750,00±250,30	9350,00±76,47	1000**
SS (mL/L) 10 min-120 min	0,1-0,5	0,1-0,5	-	-	≤ 0,5-≤ 1
Color	Grisáceo/marrón, turbio		Marrón muy claro, translúcido		N.R.
Olor	Pútrido		Inodoro		N.R.
DQO (mg/L)	3589,00±69,87	4003,50±44,12	1734,75±49,78	1360,00±44,43	< 250
DBO ₅ (mg/L)	877,45±84,28	1442,00±20,38	716,67±7,81	730,67±5,90	≤ 30
Fosfato total (P, mg/L)	59,66±14,04	69,66±1,96	22,00±3,13	38,13±3,21	≤ 0,5
Nitrógeno total (N, mg/L)	335,00±17,91	377,50±19,08	62,50±4,34	110,63±5,56	≤ 10
Cr(VI) (mg/L)	0,67±0,01	0,40±0,01	N.D.	N.D.	≤ 0,1
Fenoles (mg/L)	25,89±0,23	23,78±0,25	2,76±0,96	3,2±1,26	≤ 0,05
Microbiológicos (cultivables)					
Coliformes totales (NMP/100mL)	4,30x10 ⁴ ±2,06 x10 ³	4,90x10 ⁴ ±2,31x10 ⁴	46,0x10 ⁴ ±4,08 x10 ³	24,0x10 ⁴ ±1,04 x10 ³	≤ 5000
Coliformes termotolerantes (NMP/100mL)	6,00x10 ² ±2,58x10 ²	3,87x10 ² ±7,34x10 ¹	23,0x10 ² ±3,05 x10 ¹	46,0x10 ² ±6,03 x10 ¹	≤ 1000
Bacterias cultivables totales (BCT) (UFC/mL)	0,14x10 ⁷ ±0,14x10 ⁶	55,7x10 ⁷ ±0,42x10 ⁶	5,08x10 ⁷ ±5,48x10 ⁶	6,13x10 ⁷ ±4,64x10 ⁶	N.R.
Recuento de hongos totales (HCT) (UFC/mL)	0,35x10 ² ±0,04 x10 ²	0,20x10 ² ±0,02 x10 ²	3,75x10 ² ±4,48x10 ¹	3,75x10 ² ±2,49x10 ¹	N.R.

Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v). Los valores corresponden a los efluentes líquidos de los diferentes microcosmos de campo analizados a tiempo cero (0) y al día siete (7). Los valores muestran el promedio ± error estándar ($n=4$). Parámetros no determinados (-), no detectados por la técnica (N.D.) y no reglamentados (N.R.).

*Según Anexo único de la reglamentación de estándares y normas sobre vertidos para la preservación del recurso hídrico provincial, Provincia de Córdoba, 2016.

** Límites establecidos para aguas industriales y/o aguas de vertido a fuentes hídricas superficiales. Recopilación de datos de diferentes legislaciones Nacionales.

Tabla 16: Parámetros físico-químicos y microbiológicos de agua de arroyo.

Parámetros	A	AE	AEC	AC	A	AE	AEC	AC
Momento de muestreo (d)	0	0	0	0	1	1	1	1
Físico-químicos								
pH	8,47±0,01	8,57±0,01	8,74±0,02	8,29±0,04	8,62±0,01	8,71±0,01	8,98±0,01	8,31±0,01
Temperatura (°C)	19±1	19±1	19±1	19±1	19±1	20±1	20±1	19±1
Oxígeno disuelto (O ₂ D) (% de saturación)	81,37±2,06	80,96±1,72	81,60±1,07	81,56±1,58	78,40±1,08	66,67±5,58	69,35±3,98	72,45±4,22
Sulfatos (mg/L)	289,75±4,64	260,68±34,38	281,31±3,92	280,50±13,85	213,75±7,22	271,25±7,22	309,75±40,58	269,00±18,92
Conductividad (mho/cm)	1100,00±0,00	2500,00±0,00	2250,00±250,30	1400,00±76,47	1100,00±0,00	2600,00±0,00	2250,00±0,00	1500,00±0,00
Color	Translúcido		Translúcido		Translúcido		Translúcido	
Olor	Inodoro		Inodoro		Inodoro		Inodoro	
DQO (mg/L)	<20	82,00±2,98	31,50±6,47	713,50±6,47	<20	103,00±25,97	39,00±9,95	552,00±10,96
Fosfato total (P, mg/L)	1,13±0,00	1,75±0,00	3,4±0,00	8,04±0,00	1,30±0,00	1,30±0,00	3,05±0,00	9,20±0,00
Nitrógeno total (N, mg/L)	<10	11,50±1,50	15,50±0,49	55,50±0,51	<10	10,00±0,00	10,00±0,00	53,00±3,98
Cr(VI) (mg/L)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fenoles (mg/L)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Microbiológicos (cultivables)								
Coliformes totales (NMP/100mL)	11,0x10 ³ ±0,9 x10 ²	4,60x10 ³ ±2,00 x10 ²	4,60x10 ³ ±1,78 x10 ²	2,40x10 ³ ±2,33 x10 ²	11,0x10 ³ ±0,6 x10 ²	2,40x10 ³ ±4,30 x10 ²	2,40x10 ³ ±3,80 x10 ²	2,40x10 ³ ±1,70 x10 ²
Coliformes termotolerantes (NMP/100mL)	11,0x10 ³ ±0,9 x10 ²	2,40x10 ³ ±2,20 x10 ²	0,39x10 ³ ±1,00 x10 ²	0,93x10 ³ ±1,80 x10 ²	11,0x10 ³ ±0,6 x10 ²	2,40x10 ³ ±4,30 x10 ²	2,10x10 ³ ±2,30 x10 ²	1,50x10 ³ ±0
Bacterias cultivables totales (BCT) (UFC/mL)	6,80x10 ³ ±3,98x10 ²	5,86x10 ⁵ ±1,99x10 ⁴	7,80x10 ⁵ ±2,99x10 ⁴	12,6x10 ⁵ ±4,51x10 ⁴	8,90x10 ³ ±3,98x10 ²	1,05x10 ⁵ ±2,34x10 ⁴	9,20x10 ⁵ ±8,02x10 ⁴	13,6x10 ⁵ ±3,98x10 ⁴
Recuento de hongos totales (UFC/mL) (HCT)	1,50x10 ¹ ±2,99	1,70x10 ¹ ±9,96x10 ¹	2,30x10 ¹ ±2,99	1,35x10 ¹ ±3,51	1,75x10 ¹ ±2,49	1,45x10 ¹ ±0,00	2,20x10 ¹ ±4,01	1,60x10 ¹ ±2,99

Las letras indican el tratamiento (A: Agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1 EC, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v). Los valores muestran el promedio ± error estándar ($n=3$, excepto AC $n=2$). Parámetros no determinados (-) y no detectados por la técnica (N.D.).

Los análisis de ordenamiento son herramientas estadísticas de gran valor que permiten exhibir la estructura de los datos de una manera compacta y altamente informativa. En este trabajo, se utilizó el Análisis de Componentes Principales (*PCA*) para visualizar patrones generales de dispersión entre los diferentes tratamientos ensayados en los sistemas de microcosmos, y para examinar las correlaciones entre estos tratamientos y los parámetros físico-químicos y microbiológicos, ya sea del efluente de curtiembre o del agua de arroyo (Figura 36). Los dos primeros ejes del *PCA* explicaron el 90,8% de la varianza observada. Los tratamientos (valor promedio de 3 o 4 muestras) se separaron en dos grupos a lo largo del eje X: a la derecha los tratamientos con efluente y a la izquierda los tratamientos con agua de arroyo. Dentro del primer grupo, los efluentes tratados a tiempo inicial (sean éstos por atenuación natural -E0- o bioaumentación -EC0-) con valores elevados en la mayoría de los parámetros analizados (sulfato total, DQO, P, N, Cr(VI), fenoles, conductividad eléctrica y BCT), se separaron de los efluentes tratados después de 7 d (E7 y EC7), donde los valores de los parámetros físico-químicos y microbiológicos fueron menores, excepto el pH, el recuento de hongos cultivables totales (HCT) y el contenido de coliformes totales, que aumentaron. A partir de estos resultados, consideramos que los tratamientos de biorremediación aplicados (ya sea atenuación natural o bioaumentación) en general, disminuyeron los valores de los parámetros físico-químicos del efluente de curtiembre y favorecieron la mejora de su calidad.

En contraposición con los tratamientos que implicaron el uso de efluente de curtiembre ($t=0$), los tratamientos con agua de arroyo se caracterizaron por presentar niveles más bajos de la mayoría de los parámetros físico-químicos y microbiológicos analizados, pero valores más altos de oxigenación. Además, no hubo separación entre las muestras en relación a los vertidos simulados.

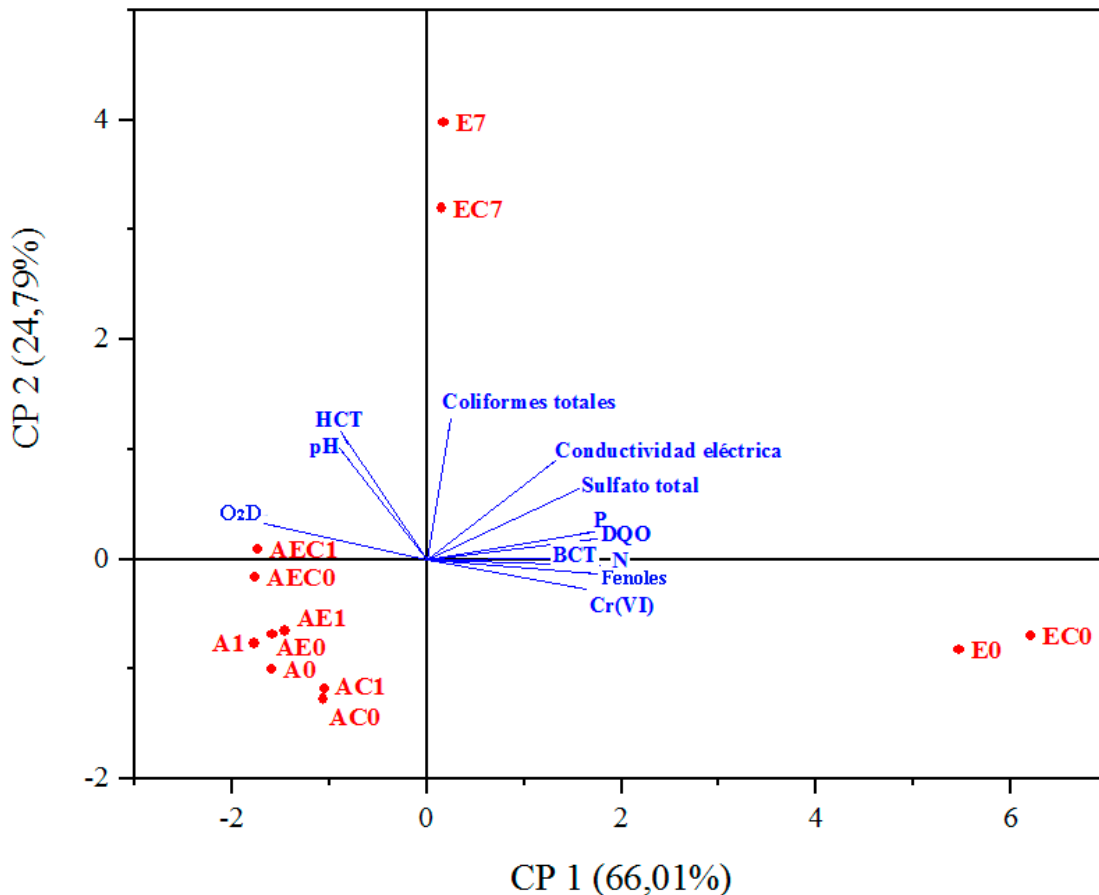


Figura 36: Análisis de Componentes Principales (PCA), definido por los dos primeros ejes (90,8%), entre las muestras tomadas de los sistemas de microcosmos y los parámetros físico-químicos y microbiológicos. Se consideró en el análisis pH, sulfato total, oxígeno disuelto (O₂D), conductividad eléctrica, DQO, fósforo total (P), nitrógeno total (N), Cr(VI), fenoles, coliformes totales, bacterias cultivables totales (BCT) y hongos cultivables totales (HCT). Las líneas indican la dirección y la magnitud de la asociación entre los tratamientos y parámetros. Para mayor claridad, se representaron como puntos rojos los tratamientos, las letras indican su nombre (E: efluente de curtiembre sin inoculación natural; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v) y el tipo de muestra (l: líquido); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno; t=7: día siete). Se consideraron para el análisis los valores promedios de n muestras ($n=4$ para efluente y $n=3$ para agua de arroyo) para cada tratamiento.

13.2. Secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S

El análisis fue realizado a 31 muestras, correspondientes a efluente (8), sedimento (4), agua de arroyo (17) y cultivos *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (2). Se amplificó la región V4 a partir de ADN metagenómico total, con cebadores

etiquetados que permitieron la secuenciación de todos los amplicones en simultáneo. El ensayo de secuenciación generó un total de 9.458.728 lecturas (4.729.364 en dirección 5´-3´y otras 4.729.364 en dirección opuesta 3´-5´) distribuidas entre las 31 muestras, equivalente a 1,25 Gb. Datos adicionales de la secuenciación y procesamiento se detallan en la Tabla A3 (ver Anexo).

Aunque los valores para la cobertura de Good se correspondieron con muestras secuenciadas en profundidad (valores cercanos a 1) (Tabla A4, ver Anexo), las curvas de rarefacción construidas a partir de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), definidas al 97% de similitud, no presentaron gran saturación ante un esfuerzo de muestreo creciente (Figura 37). Ésto se observó principalmente en las muestras de efluente y sedimento, lo que podría estar indicando que en estas matrices habrían quedado taxones bacterianos poco abundantes sin detectar, o en otras palabras que se requiere más esfuerzo de muestreo para captar toda la diversidad.

Con el propósito de asegurar una cobertura pareja, se tomaron 7347 lecturas procesadas por muestreo al azar (submuestreo), para realizar el análisis de la diversidad alfa y beta basado en OTUs definidas al 97% de similitud. Los cálculos de índices de riqueza (chao1, n° de especies observadas), índice de equitatividad (Heip), índice de dominancia (Berger Parker) e índice de diversidad (inversa de Simpson y Shannon-Weaver) de la totalidad de las muestras, se muestran en la Tabla A4 (ver Anexo). Sólo el índice de diversidad de Shannon se resume en la Figura 38A, mientras que los diagramas de Venn en la Figura 38B.

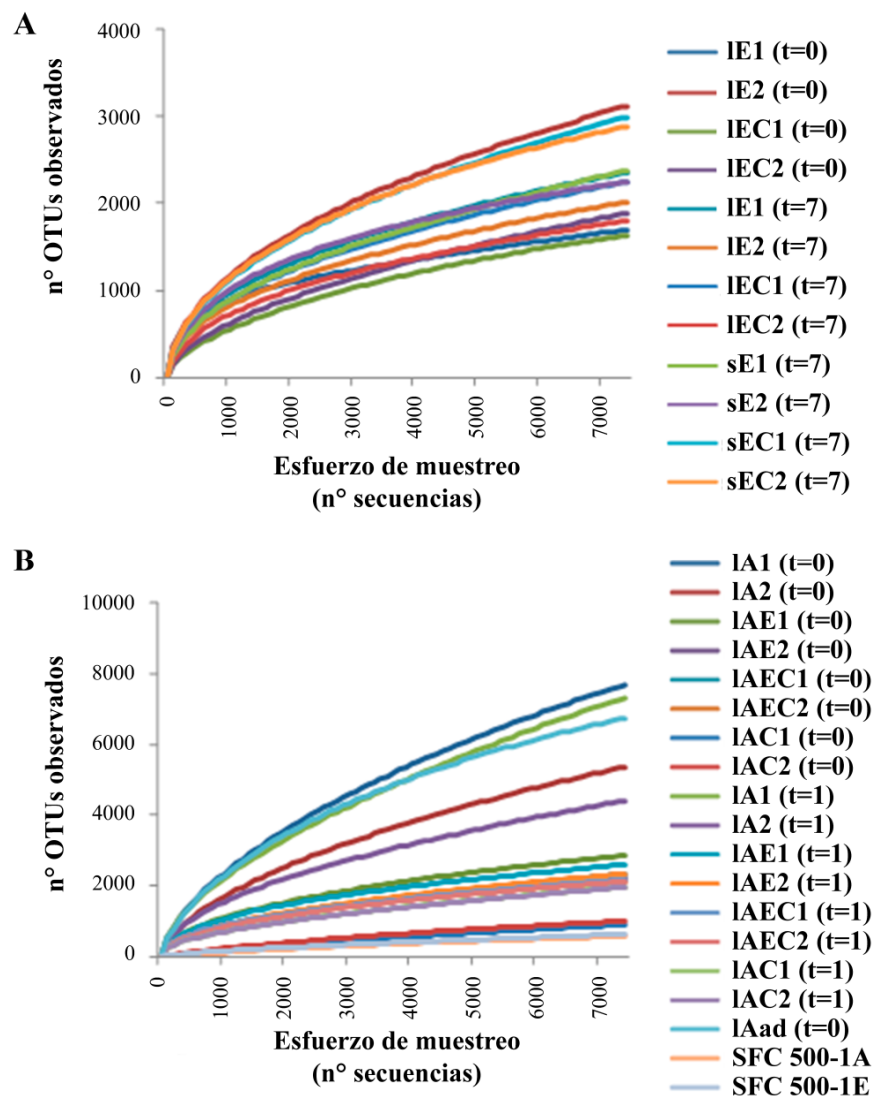


Figura 37: Curvas de rarefacción para cada muestra en base a OTUs definidas a 97% de similitud entre secuencias. Efluente y sedimento (A), agua de arroyo y cultivos *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (B). Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento; SFC 500-1A: cultivo *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A; SFC 500-1E: cultivo *over night* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno; t=7: día siete).

A tiempo inicial de experimentación, las muestras de efluente no inoculadas fueron las más diversas (muestras de atenuación natural: IE1 y IE2, t=0), debido principalmente a un aumento en la abundancia de especies (equitatividad) y en el número de especies (riqueza) (Tabla A4, ver Anexo). Sin embargo, la diversidad de estas muestras disminuyó con el tiempo (t=7) según el índice de Shannon-Weaver (Figura 38AI). En concordancia con este resultado, el porcentaje de OTUs compartidos aumentó casi un 30% con el tiempo en las muestras de efluente sin inocular –atenuación natural– (Figura 38BI). Las muestras de efluente bioaumentadas con el consorcio, IEC1 y IEC2 (t=0), presentaron menor diversidad que el efluente sin inocular (E), lo que fue de esperar debido a la inoculación con un 10% del consorcio SFC 500-1. Además, la dominancia en éstas muestras fue mayor (Tabla A4, ver Anexo), así como el porcentaje de OTUs compartidos (Figura 38BI), lo que también resulta lógico ya que menos especies, en este caso las integrantes del consorcio SFC 500-1 (*A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E) están más representadas en el total de especies. Después de 7 d de tratamiento, la diversidad en IEC1 y IEC2 incrementó respecto del inicio, mostrando valores de diversidad cercanos a las muestras de efluente sin inocular (IEC1 y IEC2) (Figura 38AI), lo que indica cierta autorregulación o autocontrol de las comunidades bacterianas del efluente. En concordancia, el porcentaje de OTUs únicos no resultó mayor al 10% (Figura 38BI).

Por otra parte, las muestras de sedimento que provinieron de microcosmos inoculados con el consorcio SFC 500-1, sEC1 y sEC2 (t=7), presentaron mayor diversidad que los sedimentos provenientes de sistemas de microcosmos con efluentes sin inocular (Figura 38AI). La diversidad, en estas muestras fue producto del mayor número de especies observadas (Tabla A4, ver Anexo).

En los tratamientos que implicaron el uso de agua de arroyo, las muestras que presentaron mayor diversidad, tanto en términos de riqueza como equitatividad, fueron A1, A2 (t=0) y Aad, que corresponden a muestras de agua de arroyo control (Figura 38AII y Tabla A4, ver Anexo). En concordancia, en el diagrama de Venn se observa que estas muestras contienen alrededor de un 30% más de OTUs únicos, respecto de las muestras de arroyo conteniendo efluentes tratados (Figura 38BII). Por otro lado, en las muestras de agua de arroyo que recibieron la descarga de efluentes tratados, ya sea por atenuación natural (AE) o bioaumento (AEC), la diversidad fue menor respecto de las muestras control (A1, A2), según

el índice de Shannon-Weaver y el porcentaje de OTUs únicos (43% para AE y 50% para AEC) (Figura 38AII, BII). El índice de Shannon-Weaver para estas muestras se mantuvo casi sin variación a $t=1$ del ensayo (Figura 38AII). Los resultados relacionados con el impacto de la descarga de efluentes sobre las comunidades bacterianas de los cuerpos de agua receptores son variables. Algunos estudios indican que existe una reducción en la diversidad bacteriana del río receptor (sedimento/agua) al igual que lo observado en nuestro trabajo, sugiriendo que este hecho puede llevar a homogeneizar las comunidades bacterianas del río (Sharuddin y col., 2017; Drury y col., 2013). Sin embargo, también se han informado aumentos en la diversidad e incluso ausencia de cambios en la composición de la comunidad bacteriana de los cuerpos de agua donde se vierten efluentes (Huo y col., 2017; Wakelin y col., 2008).

Por otro lado, los valores de diversidad más bajos y de dominancia más elevados se correspondieron con muestras de agua de arroyo inoculadas con el consorcio SFC 500-1 al 10% v/v (AC1, AC2; $t=0$) (Figura 38AII y Tabla A4, ver Anexo). El porcentaje de OTUs únicos también fue el menor (30%) para estas muestras (Figura 38BII). Sin embargo, después de 1 día de realizado el tratamiento (mezcla entre agua de arroyo y cultivo del consorcio SFC 500-1), las muestras presentaron mayor diversidad según el índice de Shannon (Figura 38AII).

Por último, las muestras provenientes de los cultivos *over night*, de las bacterias que conforman el consorcio SFC 500-1, no presentaron elevada diversidad lo cual fue esperable, debido a que corresponden a cultivos puros de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Ésto también fue confirmado mediante la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S a partir de estas muestras. En este sentido, los cultivos de *A. guillouiae* SFC 500-1A contenían una abundancia relativa de secuencia del 99% para el género *Acinetobacter*, mientras que del 98% para la especie *guillouiae* (con una confianza de clasificación del 100%). Los cultivos de *Bacillus* sp. SFC 500-1E por su parte, arrojaron un 96% de abundancia de secuencias para el género *Bacillus* y un 95% de abundancia para la especie *cereus* (con una confianza de clasificación del 99%).

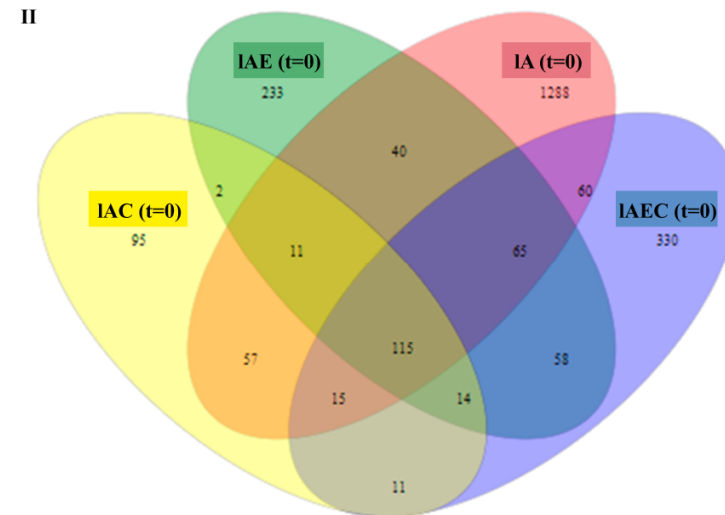
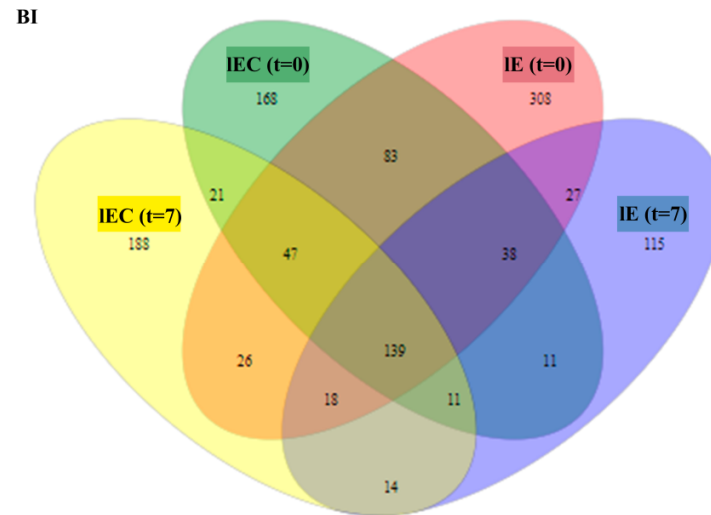
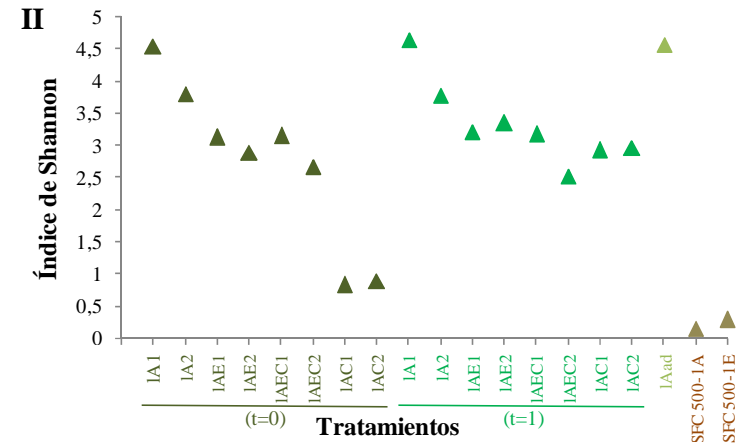
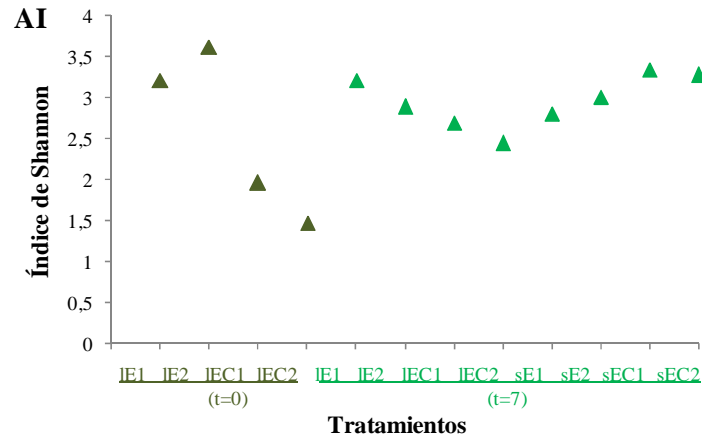


Figura 38: Diversidad alfa (A) y beta (B) de las diferentes muestras de efluentes de curtiembre (I), agua de arroyo y cultivos *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E (II). Se utilizó el método promedio para el cálculo del índice de Shannon-Weaver. Se consideraron sólo algunas muestras para realizar los diagramas de Venn. Los números dentro del diagrama representan número de OTUs. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento; SFC 500-1A: cultivo *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A; SFC 500-1E: cultivo *over night* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno; t=7: día siete).

13.2.1. Estructura de la comunidad bacteriana, de muestras de efluente y sedimento de curtiembre, a niveles taxonómicos altos

A partir de la clasificación taxonómica de las secuencias contra la base de datos “greengenes”, se realizó el análisis de la composición bacteriana a diferentes niveles jerárquicos (Tablas A3, A4, A5, ver Anexo). Para los niveles superiores de filo y clase, cada comunidad de los efluentes presentó una distribución característica (Figura 39 y 40).

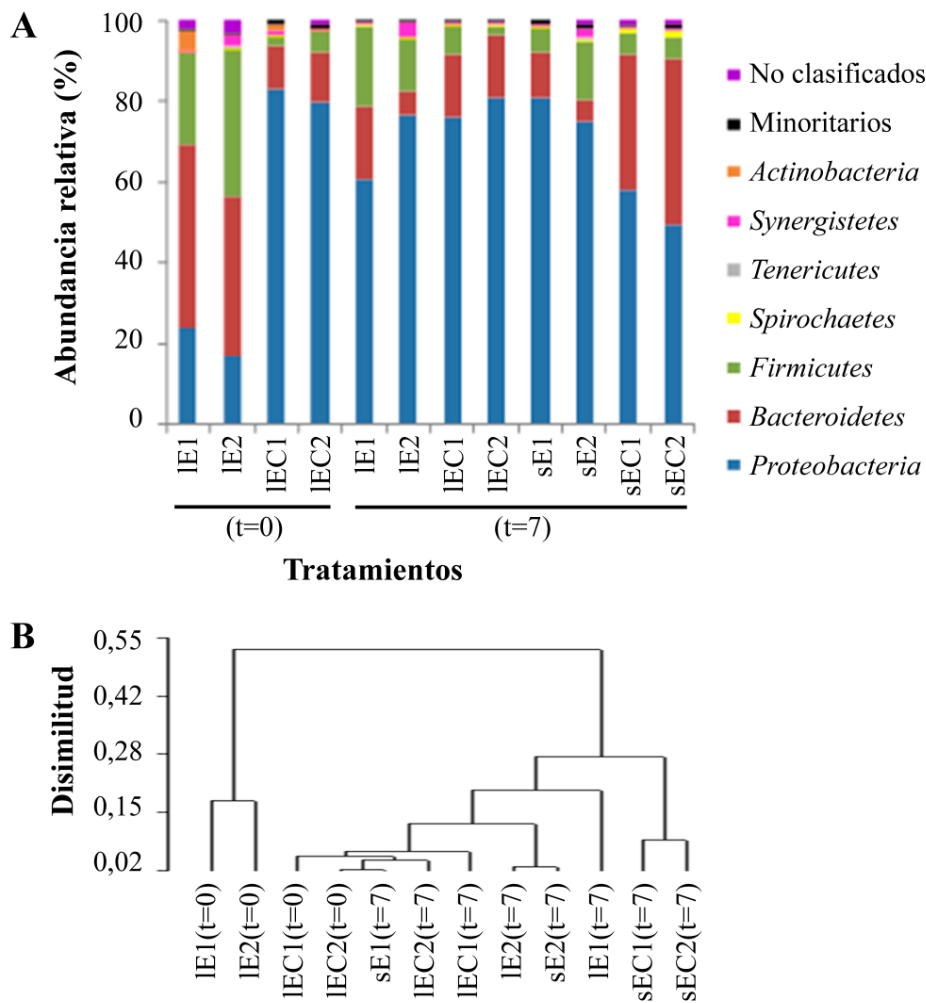


Figura 39: Patrones de distribución de filos bacterianos (A) y análisis de conglomerados (B) en muestras de efluentes líquidos y sedimentos de los diferentes microcosmos a campo. Los filos con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “minoritarios”. El análisis de agrupamiento se realizó sobre los 8 filos con mayor representación, sin incluir a las bacterias no clasificadas a éste nivel, utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete).

En general, los filos altamente representados en la mayoría de las muestras fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Figura 39A). Este resultado concuerda con datos reportados sobre la diversidad microbiana de las aguas residuales de curtiembres (Liang y col., 2017, Liang y col., 2016; Giordano y col., 2016; Chen y col., 2012) y de otras aguas residuales industriales y municipales (Zhang y col., 2012; Yang y col., 2011).

La clase *Bacteroidia*, perteneciente al filo *Bacteroidetes*, predominó en las muestras de efluente sin inocular IE1 y IE2 (38 y 17%) al inicio del experimento, seguido de las clases *Clostridia* (9 y 31%) del filo *Firmicutes*; y *Gammaproteobacteria* (10 y 8%) del filo *Proteobacteria* (Figura 40A). En las muestras de efluentes bioaumentadas con el consorcio SFC 500-1 (IEC1 y IEC2, t=0), las clases más abundantes fueron *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* proveniente del filo *Proteobacteria* (Figura 40A).

Después de 7 d de experimentación, las muestras de efluente sin inocular IE1 y IE2 fueron las que presentaron mayor variación en el patrón de distribución de filos bacterianos, respecto del tiempo inicial. El filo *Bacteroidetes* disminuyó (a un 18 y 6% para IE1 y IE2, respectivamente), mientras que el filo *Proteobacteria* aumentó hasta un 59 y 76% en IE1 y IE2 (t=7), respectivamente (Figura 39A). Los principales exponentes dentro de estos filos fueron las clases *Bacteroidia* y *Gammaproteobacteria* (Figura 40A). Si bien en las muestras de efluentes bioaumentadas con el consorcio SFC 500-1 (IEC1 y IEC2), el patrón de distribución de filos no varió considerablemente entre el tiempo inicial y después de 7 d de tratamiento, las clases bacterianas dentro de los filos predominantes sí lo hicieron (Figura 39A y 40A). En este sentido, dentro del filo *Proteobacteria*, la clase *Alphaproteobacteria* disminuyó considerablemente (un 70%) en la muestra IEC1 y la clase *Gammaproteobacteria* disminuyó alrededor de un 50% en IEC2, mientras que *Epsilonproteobacteria* incrementó alrededor de un 40% en ambas muestras. Además, dentro del filo *Bacteroidetes*, la clase *Bacteroidia* disminuyó (a un 3 y 2%) mientras que *Flavobacteria* adquirió buena representación (9 y 11%, IEC1 y IEC2, respectivamente).

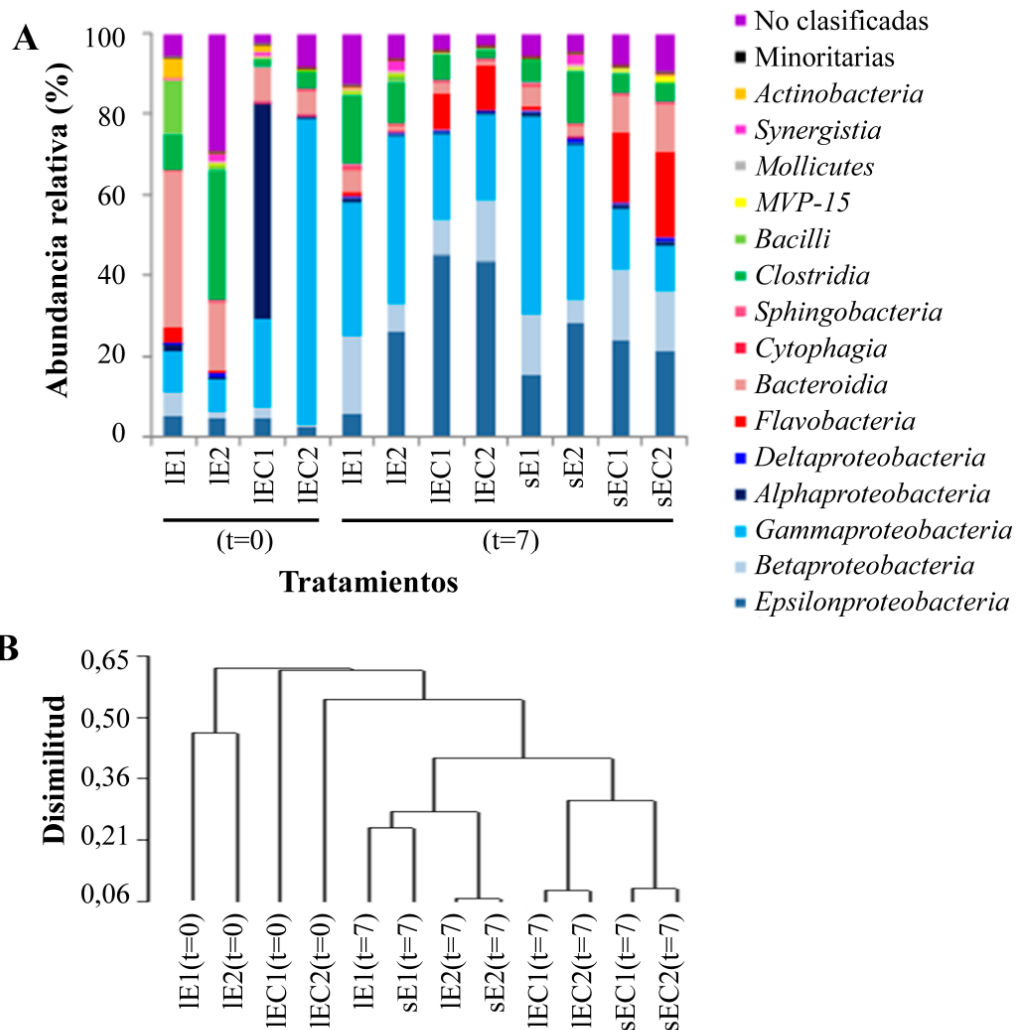


Figura 40: Patrones de distribución de clases bacterianas (A) y análisis de conglomerados (B) en muestras de efluentes líquidos y sedimentos de los diferentes microcosmos a campo. Las clases con abundancias menores a 0,5% fueron agrupadas como “minoritarias”. En la categoría “no clasificadas” se agruparon clases pertenecientes a filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* que no fueron clasificadas. El análisis de agrupamiento se realizó sobre las 16 clases con mayor representación, sin incluir a las bacterias no clasificadas a nivel de clase, utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete).

Las muestras de sedimento provenientes de sistemas de microcosmos con efluente sin inocular (sE1 y sE2) y bioaumentadas con el consorcio SFC 500-1 (sEC1 y sEC2), presentaron diferencias tanto en el patrón de distribución de filos como de clases bacterianas

(Figuras 39A y 40A). Se encontró una fuerte presencia del filo *Proteobacteria* en todas las muestras de sedimento, siendo la clase *Gammaproteobacteria* el componente mayoritario en las muestras sE1 y sE2 (48 y 38%), mientras que *Epsilonproteobacteria* en sEC1 y sEC2 (23 y 21%). Las clases *Flavobacteria* (17 y 21%) y *Bacteroidia* (9 y 11%) pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, también estuvieron bien representadas en estas últimas muestras (sEC1 y sEC2), probablemente debido a que ya eran abundantes en las muestras de efluente del cual provienen estos sedimentos (IEC1 y IEC2, t=7) (Figura 40A). Por otro lado, *Clostridia* fue la clase dominante, del filo *Firmicutes*, en todas las muestras de sedimento.

Otros taxones predominaron sólo en muestras específicas (Figuras 39A y 40A). Este fue el caso de las *Actinobacterias* que estuvieron presentes en las muestras de efluente sin inocular (IE1) y bioaumentadas con el consorcio SFC 500-1 (IEC1) a tiempo cero (4,6 y 1,7%, respectivamente) y *Synergistia*, dentro del phylum *Synergistetes*, que se detectó en la muestra E2 (0 y 7 d) y permaneció presente en su sedimento (sE2). Además, aunque los *Spirochaetes* estaban ligeramente representados en todas las muestras, este phylum bacteriano adquirió más representación en los sedimentos sEC1 y sEC2 obtenidos de los efluentes bioaumentados con el consorcio SFC 500-1.

Finalmente, las lecturas no asignadas en las muestras se deben a las estrictas restricciones utilizadas en la clasificación taxonómica y pueden sugerir que una estructura de comunidad procariota poco habitual podría estar presente en estos entornos.

En base a esta información de taxones de alto rango, se realizaron dos análisis de agrupamiento utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Figuras 39B y 40B). A nivel de filos bacterianos, la Figura 39B muestra dos grandes agrupamientos, con un valor de correlación cofenética de 0,934 (mientras más cerca de 1 se encuentre esta medida de proximidad, más exacta es la clasificación). Estos agrupamientos involucran a las muestras de efluente sin inocular y a tiempo inicial (IE1 y IE2, t=0) por un lado y el resto de muestras por el otro.

La Figura 40B en cambio, muestra el agrupamiento de las muestras a nivel de clases bacterianas, con un valor de correlación cofenética de 0,961. Del análisis, es posible observar nuevamente, cómo las muestras de efluente sin inocular (E1 y E2, t=0) forman un único agrupamiento y se separan del resto (segundo agrupamiento). Dentro de este último, las muestras se separan en dos ramificaciones principales, quedando la muestra de efluente

bioaumentada con el consorcio SFC 500-1 (IEC1, t=0) por un lado y IEC2 (t=0) junto con todas las muestras tomadas al día 7 por el otro. Además es posible observar que las muestras de sedimento proveniente de efluentes sin inocular fueron similares a los efluentes de donde provinieron estos sedimentos (IE1 y sE1; IE2 y sE2, t=7), mientras que las muestras que corresponden a efluentes bioaumentados con el consorcio SFC 500-1 (IEC1 y IEC2, t=7) se separaron de sus respectivos sedimentos (sEC1 y sEC2, t=7).

13.2.2. Estructura de la comunidad bacteriana, de muestras de efluente y sedimento de curtiembre, a nivel de género

En el proceso de clasificación, no todas las secuencias lograron ser asignadas taxonómicamente hasta el nivel de género. Para este trabajo, la proporción de secuencias que fueron clasificadas varió notoriamente entre muestras, siendo entre 48-63% en muestras de efluente sin inocular IE1 y IE2 (t=0) y 71-92% en el resto de las muestras (Tabla 17).

Tabla 17: Proporción de secuencias (%) que fueron clasificadas hasta el nivel taxonómico de género.

Muestra	IE1 (t=0)	IE2 (t=0)	IEC1 (t=0)	IEC2 (t=0)	IE1 (t=7)	IE2 (t=7)	IEC1 (t=7)	IEC2 (t=7)	sE1 (t=7)	sE2 (t=7)	sEC1 (t=7)	sEC2 (t=7)
Sec. clasificadas (%)	48,19	63,04	88,90	90,29	71,19	92,18	92,20	95,40	81,48	91,05	84,83	82,97

La Figura 41 muestra la abundancia de los géneros bacterianos presentes en cada muestra obtenida de los sistemas de microcosmos, así como la distribución de las muestras en función de las comunidades bacterianas presentes.

A nivel taxonómico de género, con asignación a nivel de especie en algunos casos, fue posible detectar un grupo de taxones presentes en la mayoría de las muestras, aunque las abundancias variaron considerablemente de una muestra a otra (Tabla A7 del Anexo y Figura 41). Los géneros *Brachymonas* (*denitrificans*), *Arcobacter* (*cryaerophilus* y otras especies no clasif.), *Campylobacter*, *Halomonas*, *Acinetobacter* (*guillouiae* y otras especies no clasif.), *Paludibacter*, *Tissierella* *Soehngenia*, *Proteocatella* (*sphenisci*) y *Proteiniclasticum* representaron lo más cercano a ese concepto, encontrándose en la mayoría de las muestras de efluente y sedimento (ubicadas en la región inferior del mapa de calor, Figura 41). Sin embargo, ciertos géneros presentaron altas proporciones sólo en algunas de las muestras. Tal

es el caso de los géneros *Brachymonas*, *Arcobacter*, y *Marinobacterium*, los cuales incrementaron su abundancia relativa con el tiempo (después de 7 d) en ambos tratamientos (atenuación natural -E- y bioaumentación -EC-), siendo estas variaciones más notables en el bioaumentación. Un aumento en la abundancia del género *Myroides* y una reducción en la representación de los géneros *Proteiniclasticum* y *Halomonas* fueron las principales variaciones observadas en muestras de efluente bioaumentadas con el consorcio SFC 500-1, luego de 7 d (t=7). El género *Acinetobacter* por su parte, poseía una abundancia relativa media > 47% en el efluente de curtiembre bioaumentado al principio del experimento (IEC, t=0), principalmente dado por la especie *A. guillouiae*, miembro del consorcio SFC 500-1 inoculado. Sin embargo, la representación de éste género y en particular un predominio de la especie *guillouiae* cayó notablemente en el tratamiento inoculado a lo largo del tiempo, presentando una abundancia relativa máxima de sólo 2,78% en las muestras tomadas el día 7 (IEC, sEC, t=7), lo que pone en duda una vez más la permanencia de los integrantes del consorcio SFC 500-1E en el efluente y sedimento. Lo contrario se observó en los controles no inoculados, donde la abundancia relativa media de *Acinetobacter*, dada principalmente por especies diferentes a *guillouiae*, varió desde un valor inicial de 4,11% en efluente (E, t=0) a 24,93% (en efluente E, t=7) y 58,42% (en sedimento sE, t=7) tomados después de 7 d. Sin embargo, *Acinetobacter guillouiae* siguió estando presente en todas las muestras, lo que indicaría la relevancia de esta especie y del género en las aguas residuales de la curtiembre.

Otros estudios también muestran que la cantidad de microorganismos exógenos disminuye poco después de la adición a un sitio (Nzila y col., 2016; Herrero y Stuckey, 2015). En general, uno de los principales problemas asociados con el bioaumentación ha sido la dificultad para mantener un número suficiente de los microorganismos de interés en el medio ambiente durante el proceso de biorremediación, es decir estabilidad temporal de las cepas recién introducidas (Nzila y col., 2016; Boon y col., 2000). Hay varias explicaciones para la muerte de los microorganismos introducidos, incluidos los estreses abióticos y bióticos. Entre estos, sustratos insuficientes, cambios de temperatura y pH, limitaciones de nutrientes, competencia entre microorganismos introducidos e indígenas, infecciones por fagos y protozoos (Nzila y col., 2016; Herrero y Stuckey, 2015). Para superar esta limitante, algunas investigaciones describen el uso de biorreactores avanzados de enriquecimiento, como una forma de mantener los microorganismos introducidos dentro del sistema de manera continua o

intermitente (Herrero and Stuckey, 2015). Otra estrategia que se plantea es liberar lentamente las células en la matriz a tratar, mediante técnicas de inmovilización (Herrero y Stuckey, 2015; Boon y col., 2000).

Se hallaron taxones abundantes exclusivos de muestras, como en los efluentes sin inocular y a tiempo inicial de experimentación (IE1 y IE2, t=0). En este sentido, podemos mencionar a los géneros *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Rickettsiella*, *Cloacibacterium*, así como miembros de las familias *Bacteroidetes*, *Bacillaceae*, *Veillonellaceae* e *Intrasporangiaceae* (donde no se logró la asignación taxonómica a nivel de género) (Tabla A7 del Anexo y Figura 41).

Por otro lado, los géneros destacados en muestras de sedimento (sE1 y sE2) provenientes de efluentes sin inocular fueron *Arcobacter* (14-26%), *Halomonas* (4-6%), *Marinobacterium* (1-9%) y *Acinetobacter* (especies no clasif.) (22-35%), mientras que para las muestras de sedimento sEC1 y sEC2 fueron los géneros *Brachymonas* (11-13%), *Arcobacter* (19-21%), *Marinobacterium* (4-6%), *Myroides* (17-21%) y *Paludibacter* (4-6%) (Tabla A7 del Anexo y Figura 41).

Por último y a pesar de la marcada representación del grupo de coliformes que se pudo inferir a partir del enfoque dependiente de cultivo (NMP/100 mL); sólo 2 (*Escherichia* y *Klebsiella*) de los 6 géneros (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Hafnia*) que se conoce que integran el grupo de coliformes, se detectaron a través de secuenciación de amplicones del gen rRNA 16S (técnica independiente de cultivo). Además, el número total de secuencias identificadas dentro de estos dos géneros representó un porcentaje insignificante del número total de secuencias del estudio (menos de 0,0005%). Este resultado evidencia cierta falta de congruencia entre ambos tipos de enfoques y puede indicar la necesidad de revisar los métodos tradicionalmente utilizados para el recuento de coliformes.

La Figura 41 también muestra un análisis de agrupamiento, el cual permite observar la distribución de las muestras de acuerdo a los géneros bacterianos presentes en cada una. El dendograma separó a la muestras en dos grandes grupos, la muestra de efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1 (IEC2, t=0), del resto de las muestras. Probablemente, esto se deba a la gran abundancia de *Acinetobacter* (75%) uno de los géneros que integra este consorcio SFC 500-1 en mayor proporción (Tabla A7, ver Anexo). Además, se logró la

asignación hasta el nivel de especie, siendo *guillouiae* la especie predominante en estas muestras, seguido de especies no clasificadas.

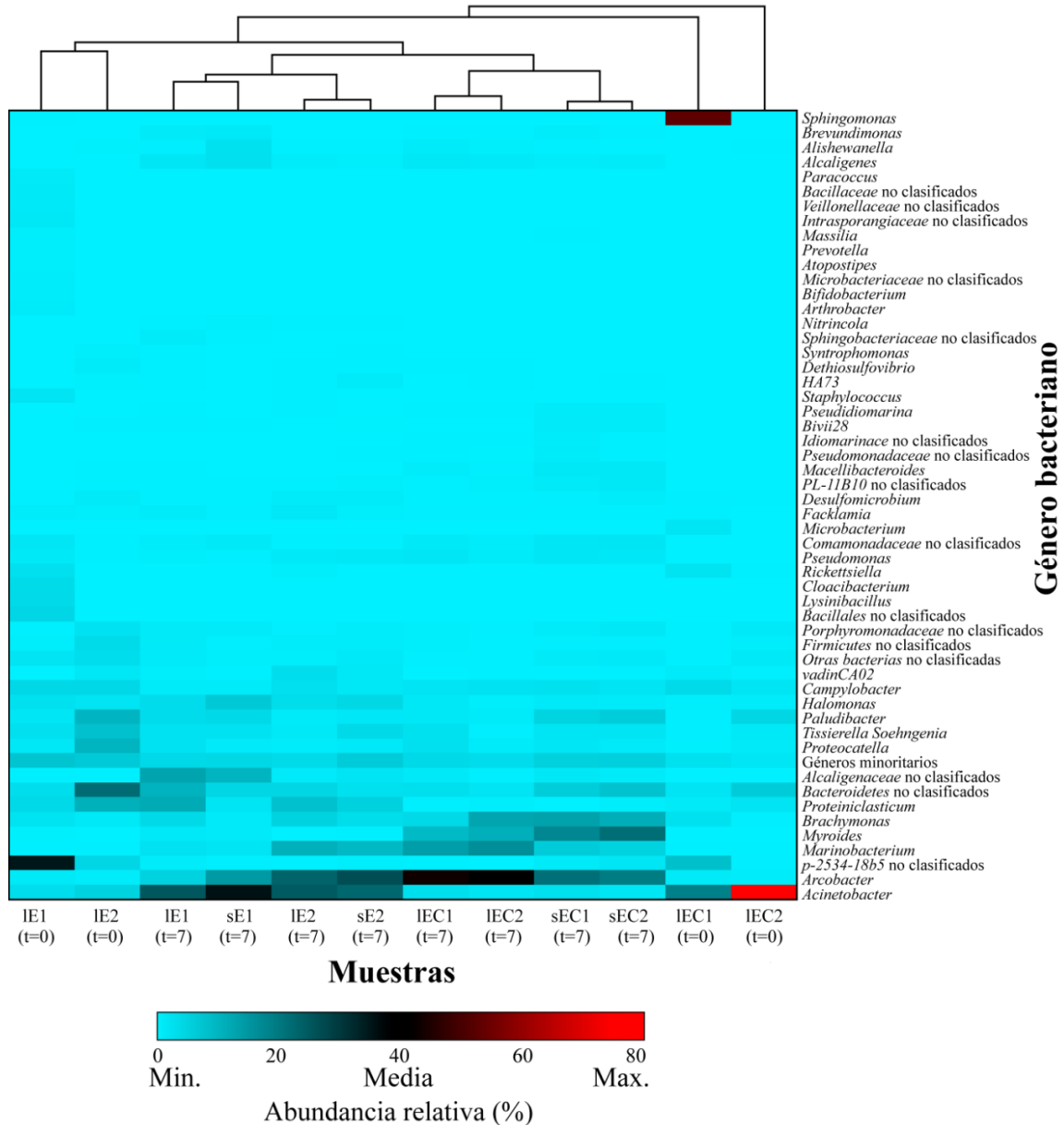


Figura 41: Mapa de calor de taxones bacterianos bajos encontrados en las muestras de efluentes y sedimentos de curtiembre. El análisis de conglomerados se realizó en los 53 taxones más representados (con abundancia >0,5%), incluido los "géneros" y las "familias" no clasificadas hasta el nivel de género, utilizando el índice de similitud Euclidiana y el método de agrupamiento de enlace promedio. Los géneros con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como "géneros minoritarios". Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete).

Dentro del segundo agrupamiento, la muestra de efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1 (IEC1, t=0) se separó del resto de las muestras. La separación entre IEC1 (18%) y IEC2 (75%) se debe probablemente a la diferencia en la abundancia de *A. guillouiae*, a pesar de que la inoculación con el consorcio SFC 500-1 se realizó a partir del mismo inóculo. Dentro del grupo más grande, las muestras de efluente sin inocular y a tiempo inicial (IE1 y IE2, t=0) se separaron de todas las muestras tomadas después de 7 d de experimentación. Dentro de este último agrupamiento la similitud entre muestras siguió un patrón semejante al agrupamiento a nivel de clases, donde las muestras de sedimento proveniente de efluente sin inocular fueron similares a los efluentes de donde provinieron estos sedimentos (IE1 y sE1; IE2 y sE2, t=7), mientras que las muestras que correspondieron a efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1 (IEC1 y IEC2, t=7) se separaron de sus respectivos sedimentos (sEC1 y sEC2, t=7).

En relación a los géneros hallados en efluente de curtiembre y sedimentos y su posible rol en estos ambientes, varios autores reportan que *B. denitrificans* (bacilo Gram-negativo, aerobio) está bien caracterizado por sus propiedades desnitrificantes y su tolerancia relativamente alta a los compuestos tóxicos, prevalentes en las aguas residuales de curtiembre como el Cr y los sulfuros (Kim y col., 2014; Leta y col., 2005; Seyoum y col., 2004). *Arcobacter* por su parte, está descrito como un patógeno zoonótico emergente, y las principales vías de transmisión son la manipulación o el consumo de productos alimenticios crudos/no cocidos contaminados de origen animal, agua y mariscos (Gobbi y col., 2018). *Arcobacter cryaerophilus* es la especie dominante registrada en aguas residuales (Pérez-Cataluña y col., 2018; Liu y col., 2015). Probablemente, su presencia en todas las muestras estudiadas se deba a la manipulación de productos de origen animal (cueros y sus desechos) por parte de la curtiembre que nos provee los efluentes. Su rol en estos ambientes, es aún desconocido. Con respecto a *Halomonas*, éste es un género bacteriano halófilo que también puede eliminar altas concentraciones de Cr(VI) (Albokari y col., 2018; Mabrouk y col., 2014). Diferentes cepas de *Myroides* (bacilos Gram-negativos, estrictamente aeróbicos) se han relacionado ampliamente con infecciones humanas (Benedetti y col., 2011; Green y col., 2001) y se han aislado de efluentes hospitalarios y aguas residuales municipales e industriales (Vaz-Moreira y col., 2016; Xiao y col., 2014). En contraste, otros estudios proponen la aplicación ambiental de algunos aislamientos de *Myroides* en los procesos de biorremediación

(Li y col., 2012; Maneerat y col., 2006). El género *Marinobacterium* (bacilos Gram-negativos, aeróbicos) desempeña un papel importante en el metabolismo de los compuestos orgánicos (Seung y col., 2018; Ben-Dov y col., 2008; Inoue y col., 2005), y se aisló originalmente de agua de mar (Seung y col., 2018; Park y col., 2016; Fuse y col., 2000). Sin embargo, también se ha reportado como un taxón microbiano aislado del lodo de una planta de tratamiento de aguas residuales de curtiembre (Chen y col., 2012). Finalmente, *Acinetobacter* está bien descrito como un género resistente a Cr(VI) (Hora y Shetty, 2014; Bhattacharya y Gupta, 2013; Essahale y col., 2012; Srivastava y Thakur, 2007). En estudios anteriores, nuestro grupo de investigación describió a *Acinetobacter guillouiae* SFC 500-1A, una cepa nativa aislada de sedimentos de curtiembre, como una bacteria capaz de eliminar simultáneamente altas concentraciones de Cr(VI) y fenol (Ontañón y col., 2015a, b).

Además, en este tipo de matrices se informan con frecuencia secuencias de taxones patógenos. Aquí encontramos secuencias que pertenecen a patógenos de artrópodos como *Rickettsiella*, a patógenos de animales cuyos cueros se utilizan como materia prima en el proceso de curtido, como algunos miembros de la familia *Porphyromonadaceae* y también a patógenos humanos sospechosos o ya probados, de los géneros *Arcobacter*, *Facklamia* y *Tissierella/Soehngenia*. Otros patógenos bacterianos como *Pantoea* sp., *E. coli* sp. y *Lysinibacillus* spp., también se ha informado que suelen estar presentes en las aguas residuales de curtiembres (Chowdhary y col., 2017).

Según algunas investigaciones, se espera que la adición de cultivos microbianos a un sistema produzca cambios en las comunidades microbianas (Zhu y col., 2015a, b). Algunas cepas agregadas al sistema podrían tener una proliferación constante, ejerciendo un papel clave en la eliminación de contaminantes, de acuerdo a lo descrito por Fang y col. (2013). Otra posibilidad, sería la eliminación de las bacterias introducidas del sistema, con el consiguiente aumento de otro/s grupo/s. Por ejemplo, Liu y col. (2015) agregaron *Rhizobium* sp. NJUST18 en un reactor para el cultivo de lodo granular aeróbico y observaron que *Paracoccus* y *Comamonas* se convirtieron en los géneros principales de dicha matriz, cuando inicialmente se encontraban en bajas proporciones. Por otro lado, debe considerarse que el bioaumento puede no tener un impacto adicional en la diversidad bacteriana de los efluentes. En este sentido, la capacidad del inóculo microbiano para lograr la eliminación efectiva de los contaminantes de interés, sin inducir efectos significativos y persistentes en la comunidad microbiana del

sistema, se considera un efecto deseable en el bioaumentación (Papadopoulou y col., 2018). Este último escenario se describe con frecuencia en suelos bioaumentados (Papadopoulou y col., 2018; Chang y col., 2016; Lopes y col., 2013). Sobre la base de los resultados de nuestro trabajo actual, se puede afirmar que el bioaumentación con el consorcio SFC 500-1, más allá del efecto de la inoculación *per se* que promovió un cambio en la clase *Gammaproteobacteria* (debido a la representación excesiva de *Acinetobacter guillouiae* SFC 500-1A), no produjo, en general, mayores variaciones en la estructura de las comunidades bacterianas del efluente de curtiembre. Los cambios producidos por el bioaumentación con el consorcio SFC 500-1 incluyeron un aumento en la abundancia del género *Myroides* y *Marinobacterium*. Posiblemente, el hecho de que no hayamos observado grandes cambios en la estructura y en particular de la comunidad microbiana del efluente de curtiembre después de la inoculación con el consorcio SFC 500-1, podría deberse en parte al origen de los microorganismos inoculados, ya que el consorcio SFC 500-1 fue aislado inicialmente de los sedimentos de esta industria de curtido. Este origen común puede, en parte, "minimizar" los efectos causados por dicha inoculación.

13.2.3. Relación entre los parámetros físico-químico-microbiológicos y la estructura de la comunidad bacteriana en muestras de efluente de curtiembre

Se realizaron Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) para estudiar la asociación entre dos conjuntos de variables, comunidades bacterianas y parámetros físico-químicos (Figura 42A), como así también comunidades bacterianas y parámetros microbiológicos (Figura 42B). En ambos casos, se abordaron diferentes niveles de la taxonomía bacteriana tales como filos (I), clases (II) y géneros (III).

En general, los dos primeros ejes canónicos explicaron entre el 77 y 98% de la variabilidad total observada. A nivel de filo, las muestras se separaron en dos grupos a lo largo del eje X (Figura 42AI y BI). Muestras de efluentes sin inocular IE1 y IE2 (t=0; 7) en el lado derecho, junto a la muestra bioaumentada con el consorcio SFC 500-1 (IEC1, t=0), y el resto de muestras de efluentes bioaumentadas fuertemente agrupadas en el lado izquierdo (independientemente del tiempo de muestreo). Por otro lado, las muestras se separaron principalmente en función del tratamiento (atenuación natural vs. bioaumentación) en el análisis realizado a nivel de clase y género (Figura 42AII, AIII, BII, BIII).

Es posible asociar nuevamente a taxones de alto rango con muestras de efluente, que contienen características físico-químicas y microbiológicas determinadas. Los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* fueron distintivos del microcosmos con efluente sin inocular (E1), caracterizado por altas concentraciones de Cr(VI), fenoles, DQO, P, N y valores más bajos de pH y O₂D, así como un recuento más bajo de coliformes totales, BCT y HCT en comparación con el resto de los microcosmos analizados (Figura 42ABI). Por el contrario, las *Proteobacterias* se asociaron a microcosmos bioaumentados con el consorcio SFC 500-1 (muestras IEC), que presentaron concentraciones más bajas de la mayoría de los parámetros ya detallados, pero valores más altos de Ph, O₂D y de parámetros microbiológicos como los coliformes totales, BCT y HCT (Figura 42ABI). Estos resultados están en concordancia con lo observado previamente en la Figuras 39, 40 y Tabla 15.

La Figura 42ABII y 42ABIII muestran las clases y géneros bacterianos más representativos dentro de los filos descritos anteriormente. Las clases *Bacteroidia* y *Flavobacteria* pertenecientes al filo *Bacteroidetes* fueron las dominantes en las muestras de efluente sin inocular E1, por ejemplo. Esta última clase no aparece en el CCA dado que su abundancia alcanzó como máximo un 3,8%, cuando el análisis canónico de correspondencia muestra sólo las clases con abundancia superiores al 12%. El género *Myroides* perteneciente a esta última clase jugaría un rol importante en estos ambientes. Por otro lado, *Bacilli* y *Clostridia* (género: *Proteinielasticum*) fueron las clases pertenecientes al filo *Firmicutes* con abundancias mayores al 12%, mientras que para las clases *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* y *Betaproteobacteria* pertenecientes al filo *Proteobacteria*, los géneros distintivos fueron *Sphingomonas*, *Acinetobacter* y *Marinobacterium*, *Arcobacter* y *Brachymonas*, respectivamente.

Los datos obtenidos del análisis indicaron que el pH y el O₂D fueron los dos factores más importantes que afectaron la estructura de las comunidades procarióticas. Los valores más bajos de pH y O₂D favorecieron la abundancia de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, mientras que la abundancia del filo *Proteobacterias* aumentó con un pH más alto y niveles más elevados de O₂D. Al comienzo del experimento, el O₂D presentó alrededor de un 3,5% de saturación; este porcentaje tan bajo era de esperar ya que el tanque de sedimentación primario a partir del cual se obtuvieron los efluentes no tenía aireación, mientras que a través de la aireación provista en los microcosmos, la saturación fue de casi 87% durante el experimento.

Aunque los microorganismos presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales pueden crecer en un rango de pH (6-9) (van der Gast y Thompson, 2005), la composición de las comunidades microbianas se ve notablemente afectada por ligeras variaciones en los valores de pH (Gao y col., 2016). En concordancia con nuestros resultados, otros investigadores han informado que el pH y el oxígeno disuelto son factores cruciales para los patrones de distribución de la diversidad bacteriana (Niu y col., 2016; Stadler y Love, 2016; Desta y col., 2014; Ibarbalz y col., 2013; Kuang y col., 2012; Zhang y col., 2012). Los resultados de los CCA también indicaron una correlación entre los niveles de contaminantes, como Cr(VI) y fenoles; la presencia de nutrientes, como N, P, materia orgánica y la abundancia relativa de ciertos taxones bacterianos. Cuanto más altos fueron los valores de estos parámetros, mayores fueron las abundancias de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, mientras que lo contrario podría describirse para las *Proteobacterias*. En relación a estos taxones, el filo *Bacteroidetes* se ha relacionado con la degradación de compuestos de carbono complejos, como los compuestos aromáticos de aguas residuales industriales (Koch y col., 2013; Li y col., 2013; Burns y col., 2012; Zhang y col., 2012), mientras que el filo *Firmicutes* puede tolerar condiciones ambientales altamente estresantes como hipersalinidad y amplios rangos de pH y oxígeno disuelto, típicos de los efluentes de curtiembre (Castelló y col., 2011; Vyrides y Stuckey, 2011; Calheiros y col., 2010; Lefebvre y col., 2006). *Alphaproteobacteria* por su parte, ha sido identificado como uno de los grupos dominantes en los suelos contaminados con cromo y arsénico en las cercanías de curtiembres y sus efluentes (Sheik y col., 2012; Lefebvre y col., 2006), mientras que algunos miembros de la clase *Betaproteobacteria* y *Epsilonproteobacteria* jugarían un papel importante en la degradación de compuestos alifáticos y aromáticos presentes en efluentes (Sidhu y col., 2017; Cydzik-Kwiatkowska y Zielińska, 2016; Desta y col., 2014).

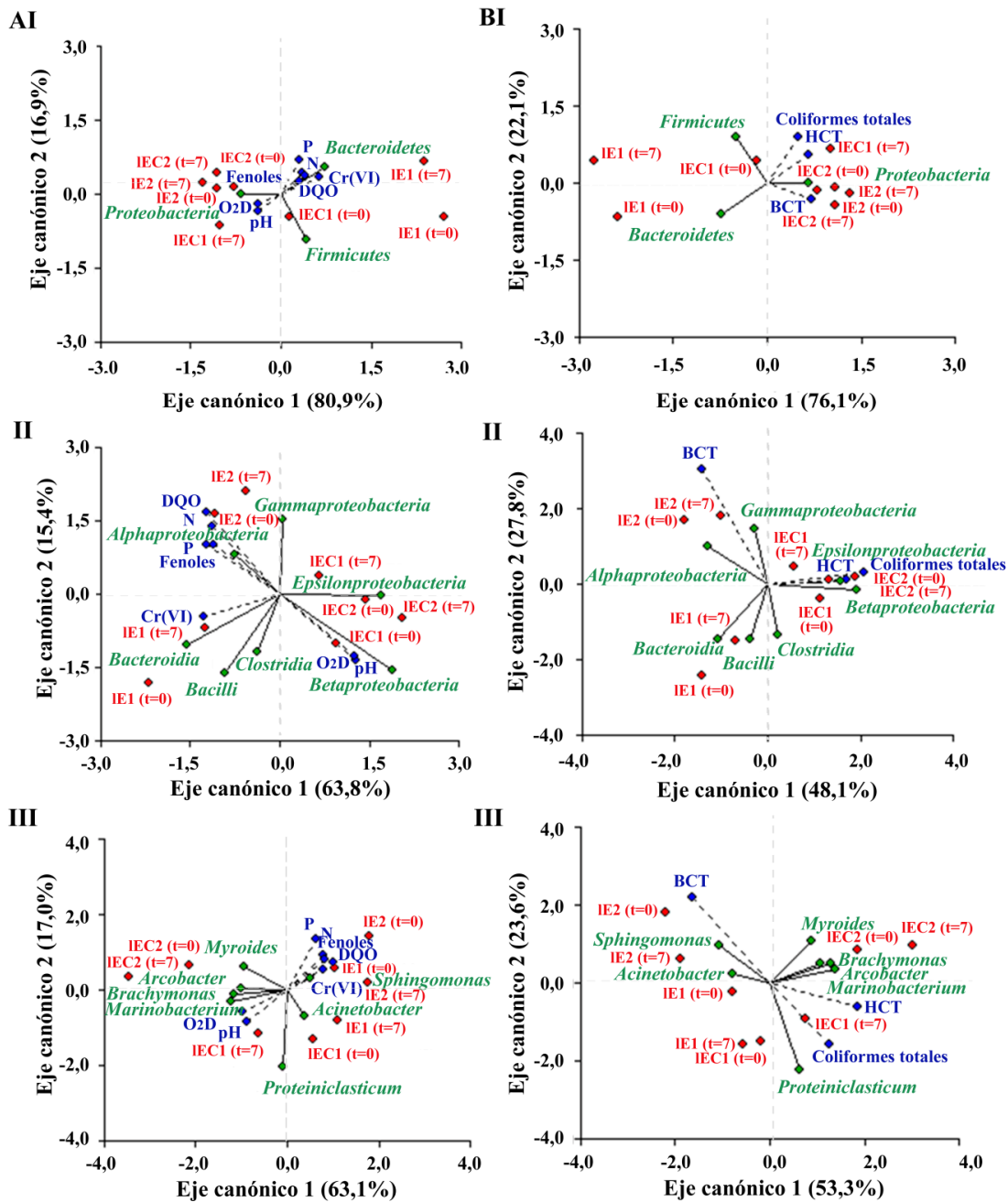


Figura 42: Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) basados en parámetros físico-químico-microbiológicos y taxones bacterianos. Los parámetros físico-químicos incluyeron: Cr(VI), fenoles, DQO, nitrógeno total (N), fósforo total (P), pH y oxígeno disuelto (O₂D) (A), mientras que los parámetros microbiológicos analizados fueron: bacterias cultivables totales (BCT), coliformes totales y hongos cultivables totales (HCT) (B). Además, para el análisis se consideraron los niveles de filos (I), clases (II) y géneros (III) con abundancias superiores a 6, 12 y 11%, respectivamente. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete).

13.2.4. Estructura de la comunidad bacteriana de muestras de agua de arroyo, a niveles taxonómicos altos

Se realizó también la clasificación taxonómica, a diferentes niveles jerárquicos, de las secuencias provenientes de las muestras de agua de arroyo (Tablas A8, A9, ver Anexo). Las Figuras 43 y 44 muestran la distribución de las comunidades bacterianas presentes en las muestras, para los niveles superiores de filo y clase.

Los filos *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* fueron los taxones de alto rango más representados en todas las muestras de agua de arroyo (Figura 43A y Tabla A8). Ésto concuerda con lo descrito por otros investigadores, quienes han reportado a *Proteobacterias* y *Bacteroidetes* como los filos dominantes en ecosistemas de agua dulce (Sharuddin y col., 2017; Cai y col., 2016; Chakraborty y col., 2013).

A tiempo inicial de experimentación, la clase *Betaproteobacteria*, perteneciente al filo *Proteobacteria*, predominó en las muestras de arroyo control 1A1, 1A2, 1Aad (45, 29 y 39%, respectivamente), seguido de las clases *Cytophagia* y *Saprospirae* (abundancia media del 5% en 1A1 y 1Aad) del filo *Bacteroidetes*, y la clase *Clostridia* (4 y 5%) del filo *Firmicutes* (Figura 44A y Tabla A9). Otros filos bacterianos tales como *Actinobacteria* (4 y 3%) y *Verrucomicrobia* (abundancia media 2%) también estuvieron presentes en las muestras de arroyo control a tiempo inicial (1A1, 1Aad; t=0). Estos resultados están en concordancia con el índice de Shannon (Figura 38B), el cual indicaba que las muestras de arroyo control serían las más diversas. El vertido de efluentes tratados (sean éstos por atenuación natural - 1AE1, 1AE2- o bioaumentación -1AEC1, 1AEC2-, t=0) sobre el agua de arroyo provocó cambios inmediatos en el perfil de las comunidades bacterianas y una disminución de la diversidad bacteriana, tal como fue planteado previamente por el índice de Shannon (Figura 38B). Las clases *Epsilonproteobacteria* (abundancia media 31%) y *Gammaproteobacteria* (abundancia media 23%) dentro del filo *Proteobacterias* se superpusieron a *Betaproteobacteria*, mientras que *Flavobacteria* (abundancia media 8%) y *Bacteroidia* (abundancia media 6%) proveniente del filo *Bacteroidetes* se superpusieron a *Cytophagia* y *Saprospirae*. La clase *Clostridia* (abundancia media 5%) siguió siendo la representante del filo *Firmicutes* (Figura 44A y Tabla A9). Estos cambios a nivel de clases bacterianas, se deben exclusivamente a la estructura de las comunidades bacterianas de los efluentes tratados (t=7), ya sea por atenuación natural o bioaumentación, vertidos sobre el agua de arroyo (Figura 40A).

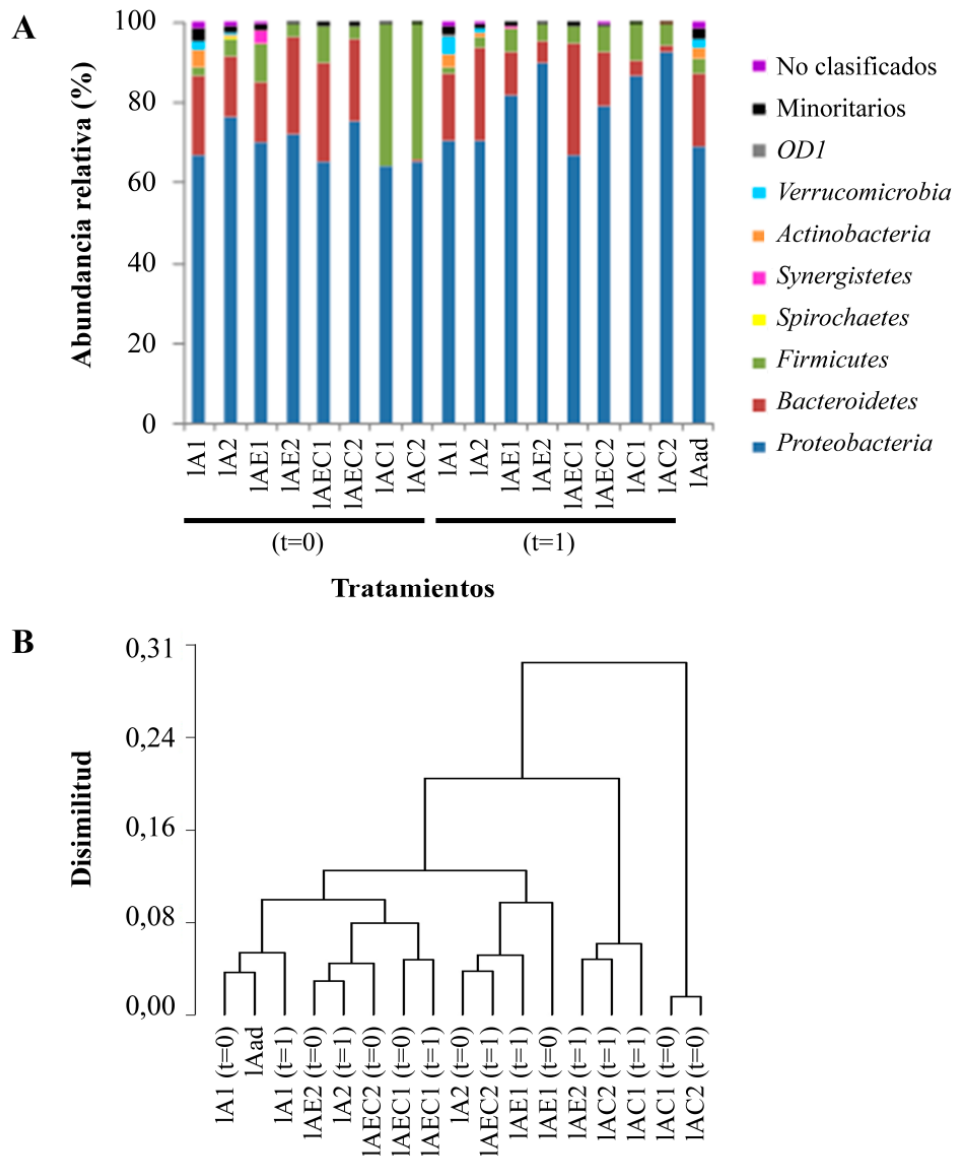


Figura 43: Patrones de distribución de filos bacterianos (A) y análisis de conglomerados (B) en muestras de agua de arroyo. Los filos con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “minoritarios”. El análisis de agrupamiento se realizó sobre los 9 filos con mayor representación, sin incluir a las bacterias no clasificadas a este nivel, utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio. Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno).

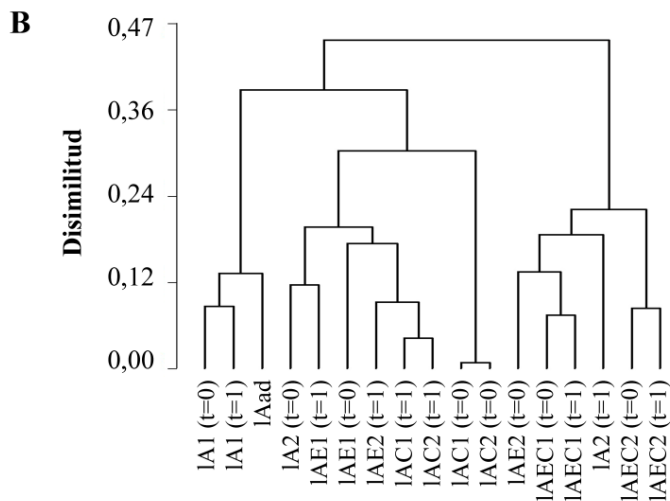
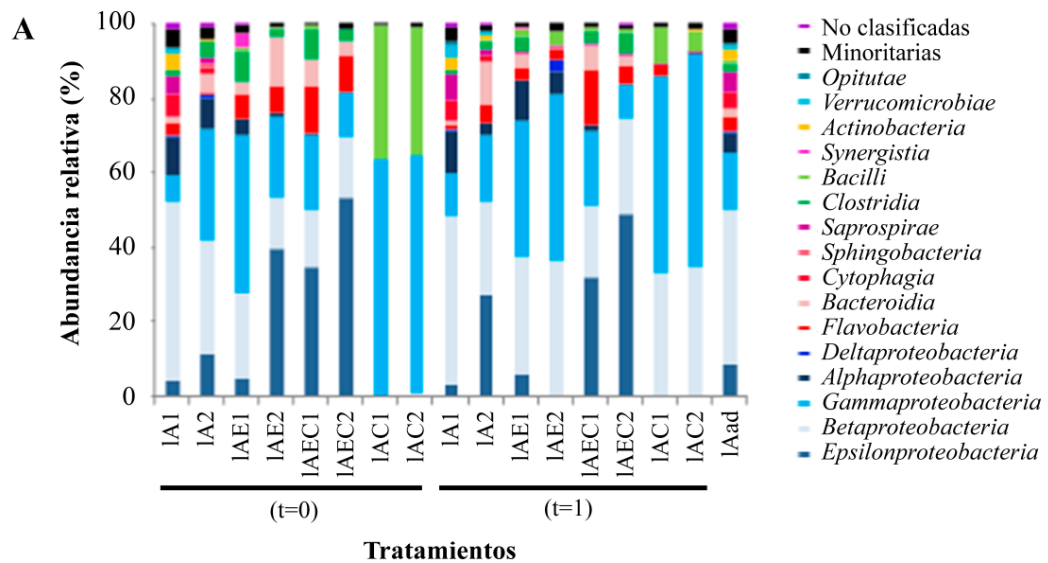


Figura 44: Patrones de distribución de clases bacterianas (A) y análisis de conglomerados (B) en muestras de agua de arroyo. Las clases con abundancias menores a 0,5% fueron agrupadas como “minoritarias”. En la categoría “no clasificadas” se agruparon clases pertenecientes a filos *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* que no fueron clasificadas. El análisis de agrupamiento se realizó sobre las 17 clases con mayor representación, sin incluir a las bacterias no clasificadas a nivel de clase, utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio. Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno).

Por otro lado, en las muestras de arroyo inoculadas directamente con el consorcio SFC 500-1 al 10% v/v (IAC1 y IAC2, t=0), la clase *Gammaproteobacteria* (abundancia media 63%) del filo *Proteobacterias* estuvo sobrerrepresentada, mientras que el filo *Firmicutes* (36 y 34%), con la clase *Bacilli* como representante, prevaleció sobre *Bacteroidetes* (0,3 y 0,5%). Estos resultados eran esperables dada la composición del consorcio inoculado (*A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, en proporción 20:1).

Después de un día de experimentación, las muestras de arroyo control (IA1, IA2; t=0) y aquellas conteniendo efluente de curtiembre bioaumentado (IAEC1, IAEC2; t=0), no presentaron grandes variaciones en la estructura de las comunidades bacterianas a nivel de filos y clases, respecto del tiempo inicial. En cambio, en las muestras de arroyo con un 10% v/v de efluente sin inocular (atenuación natural: IAE1 y IAE2), el filo *Proteobacterias* incrementó su abundancia en un 15% aproximadamente, donde la clase *Betaproteobacteria* y *Alfaproteobacteria* ganaron representación, pero la clase *Gammaproteobacteria* siguió siendo la más abundante, respecto del tiempo inicial. Por último, en las muestras de arroyo inoculadas con el consorcio SFC 500-1 al 10% v/v (IAC1 y IAC2, t=1), la abundancia del filo *Proteobacterias* incrementó alrededor de un 25%, respecto del día anterior y la clase *Betaproteobacteria* (abundancia promedio 37%) fue también el miembro de este filo que incrementó su representación.

Las Figuras 43B y 44B muestran la distribución de las muestras en base a la estructura de taxones de alto rango. A nivel de filos bacterianos, las muestras se separaron en dos grandes grupos (valor de correlación cofenética de 0,919), muestras de arroyo inoculadas con el consorcio SFC 500-1 al 10% v/v (IAC1 y IAC2, t=0) por un lado y el resto de muestras por el otro (Figura 43B). Dentro de este segundo gran agrupamiento, las muestras IAC1 y IAC2 (t=1) se ubicaron cerca de las anteriores y de las muestras de agua de arroyo conteniendo efluentes tratados por atenuación natural (IAE), mientras que las muestras de arroyo control (IA1 y IAad) y aquellas conteniendo efluentes tratados por bioaumentado (IAEC), se ubicaron en general en el otro extremo (Figura 43B). A nivel de clases bacterianas, el análisis de agrupamiento con un valor de correlación cofenética de 0,922 mostró en cambio dos grandes grupos, uno de ellos integrado principalmente por muestras de agua de arroyo conteniendo efluentes tratados por bioaumentado (IAEC), mientras que el otro grupo estuvo formado además por 3 subgrupos: a la izquierda muestras de agua de arroyo control, en el medio

principalmente muestras de agua de arroyo conteniendo efluentes tratados por atenuación natural (IAE) y muestras de arroyo inoculadas con el consorcio SFC 500-1 (IAC1 y IAC2, t=1), y en el otro extremo muestras de arroyo inoculadas con el consorcio SFC 500-1 a tiempo inicial (IAC1 y IAC2, t=0) (Figura 44B). A partir de los análisis de agrupamientos, podemos resumir que el vertido directo del consorcio SFC 500-1 sobre el agua de arroyo (si bien no es una situación probable de que ocurra en la realidad), fue el tratamiento que mayores cambios provocó en el perfil de las comunidades bacterianas en el agua de arroyo control a nivel de filo, mientras que el vertido del efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1 fue el que más cambios produjo en la estructura de la comunidad bacteriana en el agua de arroyo control a nivel de clases.

13.2.5. Estructura de la comunidad bacteriana de muestras de agua de arroyo, a nivel de género

La proporción de secuencias que fueron clasificadas hasta nivel de género varió claramente en función del tipo de muestras, siendo los porcentajes más bajos (entre 65-73%) para las muestras de agua de arroyo control (IA1, IA2 y IAad) y las más altas (99%) para las muestras de agua de arroyo inoculadas con el consorcio SFC 500-1, a tiempo inicial (IAC1 y IAC2; t=0). Para el resto de las muestras, el porcentaje de clasificación alcanzó entre un 76 y 89% (Tabla 18).

Tabla 18: Proporción de secuencias (%) que fueron clasificadas hasta el nivel taxonómico de género.

Muestra	IA1 (t=0)	IA2 (t=0)	IAE1 (t=0)	IAE2 (t=0)	IAEC1 (t=0)	IAEC2 (t=0)	IAC1 (t=0)	IAC2 (t=0)
Sec. clasificadas (%)	65,808	73,313	76,741	89,126	86,497	87,381	99,525	99,227

Muestra	IA1 (t=1)	IA2 (t=1)	IAE1 (t=1)	IAE2 (t=1)	IAEC1 (t=1)	IAEC2 (t=1)	IAC1 (t=1)	IAC2 (t=1)	IAad
Sec. clasificadas (%)	65,105	83,023	75,047	74,798	85,372	89,712	76,698	78,195	70,245

La Figura 45 muestra gráficamente la abundancia de los géneros bacterianos presentes en cada muestra de agua de arroyo obtenida de los sistemas de microcosmos donde fue simulado el vertido de efluentes tratados y de un inóculo del consorcio SFC 500-1, así como la distribución de las muestras en función de los géneros bacterianos presentes.

Como se mencionó anteriormente, las muestras de agua de arroyo control fueron las que presentaron mayor diversidad en términos de comunidades bacterianas (Figura 38). Se encontraron varios taxones, de bajo rango, con gran abundancia relativa en estas muestras (% medio entre 1A1, 1A2; t=0, y 1Aad), tales como: *Comamonadaceae* no clasif. (11%), *Hydrogenophaga* (12%), *Arcobacter* (7%) y *Acinetobacter* (11%) (Tabla A10). Es importante notar que los taxones mencionados pertenecen a diferentes clases (α , β , β , ε , γ , respectivamente) dentro del filo *Proteobacterias*. Además, que el porcentaje de géneros minoritarios haya alcanzado un valor promedio de 12% (1A1, 1A2 -t=0- y 1Aad), es indicativo también de una comunidad bacteriana muy diversa. Los géneros hallados están en concordancia con lo reportado por otros investigadores que evaluaron la diversidad microbiana de diferentes cuerpos de agua (Du y col., 2015; Shriparna y col., 2013; Malki y col., 2009). En particular, la presencia de *Arcobacter* sp., en agua dulce, ha sido asociada con contaminación fecal (Collado y col., 2008).

El vertido de efluentes tratados (por atenuación natural o bioaumentación) sobre el agua de arroyo provocó incrementos inmediatos en la abundancia relativa (% medio entre 1AE1, 1AE2, 1AEC1, AEC2; t=0) de géneros tales como: *Brachymonas* (5%), *Arcobacter* (30%), *Marinobacterium* (5%), *Myroides* (8%), *Paludibacter* (3%) y *Acinetobacter* (12%). Estos resultados coinciden con los géneros más abundantes reportados para los efluentes tratados (durante 7 d) que se utilizaron para simular el vertido (Figura 41 y Tabla A7). Después de 1 d, no se observaron grandes cambios en la estructura de las comunidades bacterianas de estas muestras, a nivel de géneros.

El vertido directo del consorcio SFC 500-1 sobre el agua de arroyo por su parte, produjo un incremento inmediato en la abundancia relativa (valor promedio entre 1AC1, 1AC2; t=0) de los géneros *Acinetobacter* (63%) y *Bacillus* (35%), tal como se esperaba dada la composición del consorcio inoculado. Después de un día, *Acinetobacter* siguió estando bien representado (14%), mientras que el porcentaje de *Bacillus* cayó por debajo del 0,5% (Tabla A10). También se observaron otros cambios en estas muestras después de 1 d, respecto del tiempo inicial, ya sea por un efecto del tiempo (t1 vs. t0) y/o combinación de efectos (tratamiento/tiempo: inoculación con el consorcio SFC 500-1/1 d). *Comamonadaceae* no clasificados incrementó su abundancia respecto del t=0, en un 8% aproximadamente, mientras que *Hydrogenophaga*, *Vogesella*, *Aeromonas*, *Rheinheimera*, *Pseudomonadaceae* no clasif., y

Exiguobacterium lo hicieron en alrededor de un 6, 7, 5, 27, 3 y 6%, respectivamente. La abundancia relativa de secuencias para estos taxones no superó en promedio el 0,1%, a tiempo inicial.

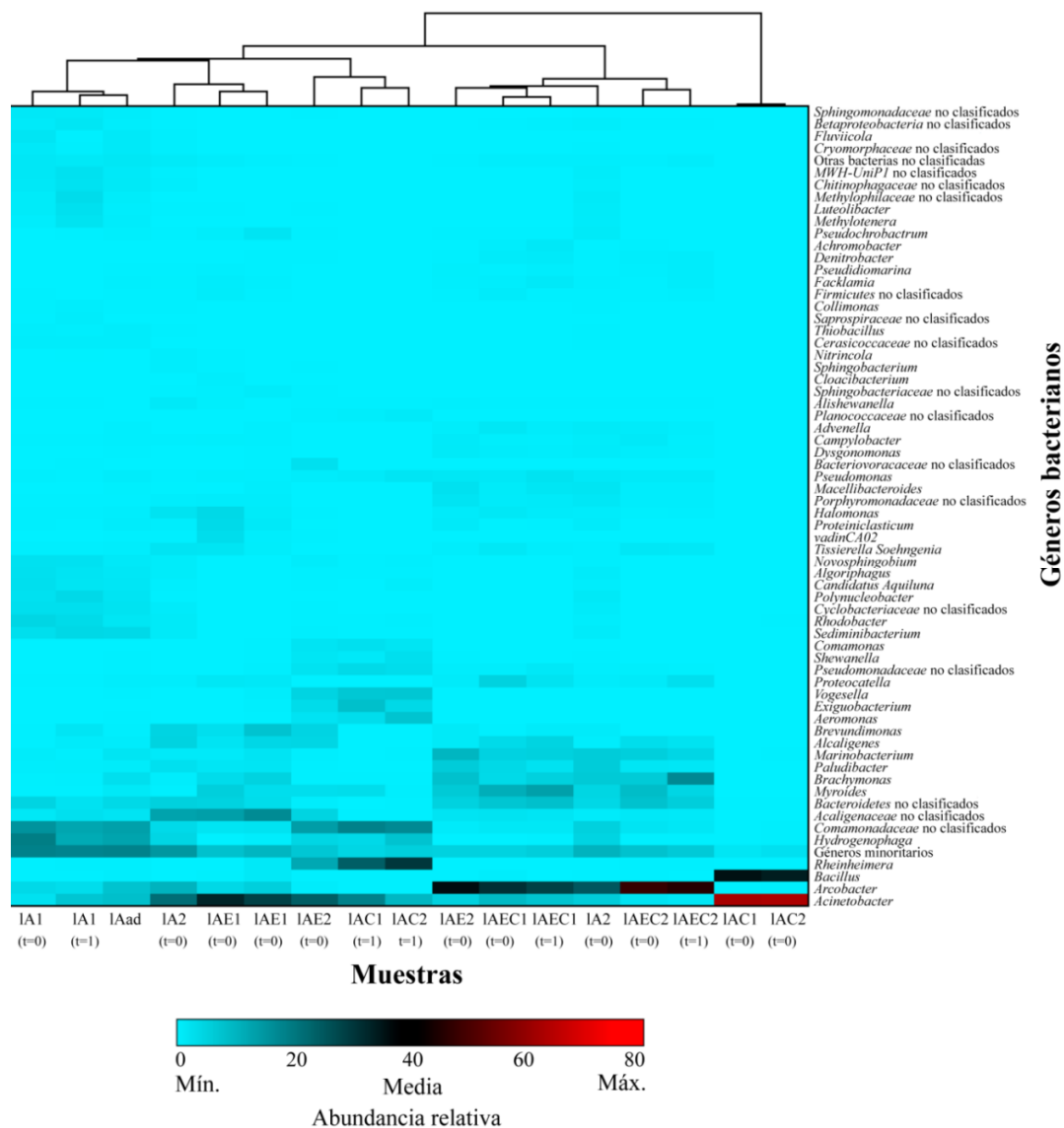


Figura 45: Mapa de calor de taxones bacterianos bajos encontrados en las muestras de agua de arroyo. El análisis de conglomerados se realizó en los 66 taxones más representados (con abundancia > 0,5%), incluido los "géneros" y las "familias" no clasificadas hasta el nivel de género, utilizando el índice de similitud Euclidiana y el método de agrupamiento de enlace promedio. Los géneros con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como "géneros minoritarios". Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno).

El análisis de agrupamiento de las muestras en base al perfil de comunidades bacterianas a nivel de género se muestra en la Figura 45. En general, este conglomerado sigue un patrón similar al análisis de agrupamiento en base a filos bacterianos (Figura 43B), con las muestras de agua de arroyo inoculadas con el consorcio SFC 500-1 por un lado, y el resto de las muestras por el otro, siendo las muestras control las más alejadas.

En relación a los géneros bacterianos que aumentaron su representación en el agua de arroyo, después de un día de inoculados con el consorcio SFC 500-1, se ha descrito que varias especies del género *Hydrogenophaga* (bacilos Gram-negativos, aerobios estrictos) han sido detectadas en acuíferos contaminados con compuestos aromáticos, en aguas residuales recogidas de un efluente textil, así como también en plantas de tratamiento de agua subterránea o superficial (Magic-Knezev y col., 2009; Yoon y col., 2008; Contzen y col., 2000). Además, se ha demostrado su probable rol en la degradación de compuestos aromáticos, así como en la oxidación de As (III) a As(V) (Van den Hoven y Santini, 2004; Contzen y col., 2000). Miembros del género *Vogesella* (bacilos Gram-negativos, aerobios estrictos) han sido encontrados en diferentes cuerpos de agua tales como agua de manantial, de estanque, de lagos y de ríos. Sin embargo, su rol en estos ambientes es aún desconocido (Sheu y col., 2013; Jørgensen y col., 2010; Chou y col., 2008). De manera similar, bacterias del género *Aeromonas* (bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos) han sido aisladas de aguas y se las ha asociado con enfermedades humanas (Janda y Abbott, 2010). Por otro lado, miembros del género *Rheinheimera* (bacilos Gram-negativos, anaerobios) han sido aislados principalmente de ambientes marinos, pero también de lagos y suelos contaminados con pesticidas y se los ha descrito como halotolerantes (Chen y col., 2013; Merchant y col., 2007). Por último, diferentes especies del género *Exiguobacterium* (bacilos Gram-positivos, anaerobios facultativos) también han sido reportadas como halotolerantes (Remonsellez y col., 2018), mientras que otras tendrían la capacidad de reducir Cr(VI) a Cr(III) (Batool y col., 2014a; Alam y Malik, 2008).

13.3. Evaluación de la toxicidad aguda de las muestras de agua de arroyo

Se realizaron 2 ensayos de toxicidad para estimar si los vertidos en estudio podrían afectar los ecosistemas acuáticos del agua de arroyo. Para tal fin, se considera importante que las especies de prueba a utilizar sean representativas del área de estudio y así aumentar la

previsibilidad de los posibles efectos ambientales (Chapman 2000). Por tal motivo, se realizaron los bioensayos utilizando especies que habitualmente habitan las cercanías de un arroyo, tales como *Lactuca sativa* L. (lechuga) y *Rhinella arenarum* (sapo común) y que pertenecen a distintos niveles tróficos. Se evaluó la toxicidad de un *pool* de muestras provenientes de diferentes tratamientos, tales como: agua de arroyo control (IA), agua de arroyo conteniendo un 10% v/v de los efluentes tratados por atenuación natural y bioaumentación (IAE y IAEC, respectivamente), así como muestras de agua de arroyo conteniendo un 10% v/v de un inóculo del consorcio SFC 500-1 (IAC).

13.3.1. Bioensayo con semillas de *Lactuca sativa* L.

Los resultados del bioensayo con semillas de *L. sativa* L., se muestran en la Tabla 19. Las muestras de arroyo, sean éstas control o conteniendo efluentes tratados por atenuación natural y bioaumentación o inoculadas con el consorcio SFC 500-1, en general no presentaron toxicidad en los tiempos evaluados (ni a $t=0$, ni después de 1 d de simulado el vertido en los sistemas de microcosmos). Los porcentajes de germinación de las semillas oscilaron entre el 95 y el 100%, valores por encima de los obtenidos en los controles del bioensayo (90%). De manera similar, la longitud de la radícula e hipocótilo fueron superiores a los del control del ensayo. Los índices de germinación (%IG) y de crecimiento relativo (ICR) también arrojaron resultados alentadores. Los valores de los IG indicaron, para todas las muestras, ausencia de compuestos fitotóxicos o su presencia en muy bajas concentraciones ($IG \geq 80\%$), según las categorías asignadas por Zucconi y col. (1981). Con respecto a los ICR, éstos indicaron ausencia de efectos significativos sobre la elongación de la raíz ($0 < ICR < 0,8$) en el *pool* de muestras de agua de arroyo control (IA, $t=0$) y estimulación de la elongación radical ($ICR > 1,2$) en el resto de las muestras, de acuerdo a Young y col. (2012). Estos resultados indican que el vertido de efluentes tratados o del consorcio SFC 500-1 (al 10% v/v) directamente sobre el agua de arroyo, no resultarían tóxicos para la especie vegetal *Lactuca sativa* L.

Tabla 19: Bioensayo de toxicidad, con semillas de *Lactuca sativa* L., de las muestras de agua de arroyo.

Tiempo de muestreo (t; d)		Longitud de radícula (x ± EE)	Longitud de hipocótilo (x ± EE)	Germinación (%G)	Índice de Germinación (%IG)	Índice de Crecimiento Relativo (ICR)
-	Control (agua)	1,42 ± 0,06	1,16 ± 0,04	90	-	-
(t=0)	IA	1,24 ± 0,09	1,41 ± 0,09	95	92,18 (AuCF)	0,87 (SER)
	IAE	1,86 ± 0,24	1,92 ± 0,09*	95	138,26 (AuCF)	1,30 (ELR)
	IAEC	2,12 ± 0,12*	2,11 ± 0,11*	90	149,30 (AuCF)	1,49 (ELR)
	IAC	1,75 ± 0,07	2,17 ± 0,09*	90	123,24 (AuCF)	1,23 (ELR)
(t=1)	IA	1,34 ± 0,08	1,72 ± 0,09*	100	104,85 (AuCF)	0,94 (SER)
	IAE	1,92 ± 0,09*	2,11 ± 0,10*	95	142,72 (AuCF)	1,35 (ELR)
	IAEC	2,20 ± 0,11*	2,16 ± 0,10*	95	163,54 (AuCF)	1,54 (ELR)
	IAC	1,98 ± 0,11*	2,10 ± 0,13*	90	139,44 (AuCF)	1,39 (ELR)

Los datos representan la media ± EE (n=5). (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el tratamiento y el control con agua (prueba de Dunnett). Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno). Ref: Ausencia de compuestos fitotóxicos (AuCF); Sin efectos significativos sobre la raíz (SER); Estimulación de la elongación de la raíz (ELR).

13.3.2. Bioensayo con embriones de *Rhinella arenarum*

Los resultados del bioensayo con embriones de *Rhinella arenarum*, se muestran en la Tabla 20. Las muestras de arroyo, sean éstas control o conteniendo efluentes tratados por atenuación natural o bioaumentado no presentaron toxicidad para la especie de prueba (al t=0 y al t=1). Estos resultados son alentadores ya que está bien reportado que la descarga de efluentes ricos en materia orgánica y con elevada turbidez en cuerpos de agua podría producir eutrofización y afectar la supervivencia de los animales que respiran por branquias (Amanial 2016; Islam y col., 2014; Noorjahan 2014; Ates y col., 1997).

Por otro lado, también se evaluó la toxicidad de las muestras de arroyo inoculadas directamente con el consorcio SFC 500-1 (IAC, t=0;1), situación poco probable de que ocurra en la realidad. En estas condiciones, se obtuvo un 100% de mortandad de los embriones de *Rhinella arenarum* después de estar en contacto con éstos durante 5 d. Por estudios previos, conocíamos que el medio de cultivo donde se hace crecer las bacterias, en este caso al consorcio SFC 500-1, resultaba tóxico para los embriones de *Rhinella arenarum*, es por esto que se agregó un nuevo tratamiento, que consistió en agua de arroyo + medio TY (10% v/v), para evaluar la toxicidad del mismo. Este tratamiento también causó el 100% de mortandad de los embriones luego de 5 d de exposición, por lo que la toxicidad del tratamiento IAC podría

estar dada en gran parte por el medio de cultivo residual en el inóculo del consorcio SFC 500-1, y no por las bacterias en sí.

Tabla 20: Bioensayo de toxicidad, con embriones de *Rhinella arenarum*, de las muestras de agua de arroyo.

Tiempo de muestreo (t; d)	Parámetro/tratamientos	Sobrevivencia (%)				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
-	Control (agua)	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
(t=0)	IA	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	IAE	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	IAEC	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	IAC	17 ± 12	13 ± 13	13 ± 13	13 ± 13	0 ± 0
	*IA+TY	100 ± 0	27 ± 18	10 ± 6	0 ± 0	0 ± 0
(t=1)	IA	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	IAE	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	IAEC	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	IAC	87 ± 7	83 ± 9	83 ± 9	23 ± 3	0 ± 0
	*IA+TY	97 ± 3	33 ± 18	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Los datos representan la media ± EE ($n=3$). Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno).

CONCLUSIONES



14. CONCLUSIONES

En general, podemos concluir que tanto la comunidad bacteriana del efluente de curtiembre como la del agua de arroyo fueron muy diversas, siendo *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* los tres filos predominantes. La disminución de la diversidad bacteriana en el efluente de curtiembre se debió en gran medida al efecto de la inoculación con el consorcio SFC 500-1, mientras que en el agua de arroyo se debió al vertido de efluentes *per se*, sean éstos atenuados naturalmente o bioaumentados.

El bioaumento del efluente de curtiembre, con el consorcio SFC 500-1, generó cambios en su composición luego de 7 d, pero los mismos no representaron más que un 10% de variación en relación a las OTUs únicas, lo que nos da indicios de cierta autoregulación de las comunidades bacterianas en esta matriz. Un aumento en la abundancia del género *Myroides* y una reducción en la representación de los géneros *Proteiniclasticum* y *Halomonas* fueron las principales variaciones observadas a niveles taxonómicos más bajos. Posiblemente, estas pequeñas variaciones puedan deberse en parte al origen de los microorganismos inoculados ya que como se especificó, el consorcio SFC 500-1 fue aislado de los sedimentos de la curtiembre en estudio. Este origen común podría, en parte, "minimizar" los efectos causados por la inoculación.

Se determinó que el pH y el O₂D fueron los parámetros físico-químicos que afectaron en mayor medida la estructura de las comunidades procariontas en el efluente de curtiembre, por lo tanto su adecuado control y ajustes deberían ser claves para el correcto funcionamiento de la estrategia de tratamiento biológico en estudio.

Por otro lado, la disminución en la diversidad de las comunidades bacterianas del agua de arroyo por el vertido de los efluentes, ya sean atenuados o bioaumentados con el consorcio SFC 500-1, fue dado por un incremento en la abundancia de los géneros más representados en los efluentes tratados, tales como *Brachymonas*, *Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Myroides*, *Paludibacter* y *Acinetobacter*. Además, el vertido de los efluentes provocó cambios en las características físico-químicas del cuerpo de agua, principalmente un incremento en los valores de la DQO y conductividad eléctrica y en menor medida en los niveles de P y N.

Por último, la ausencia de toxicidad del agua de arroyo conteniendo efluentes (atenuados o bioaumentados, 10% v/v) para la especie vegetal *Lactuca sativa* L., y para

embriones de *Rhinella arenarum*, proveen información útil en relación a la toxicidad ambiental que implicaría la descarga de los efluentes sobre un cuerpo de agua natural.

Se espera a futuro poder completar las investigaciones realizadas en esta tesis con estudios funcionales, utilizando por ejemplo análisis transcriptómicos, lo que permitirá establecer una asociación más precisa entre la estructura de la comunidad bacteriana de efluentes de curtiembre, su potencial fenotípico y su función metabólica en estos ambientes.

La figura 46 muestra un resumen de los hallazgos obtenidos, que fueron descritos en este capítulo.

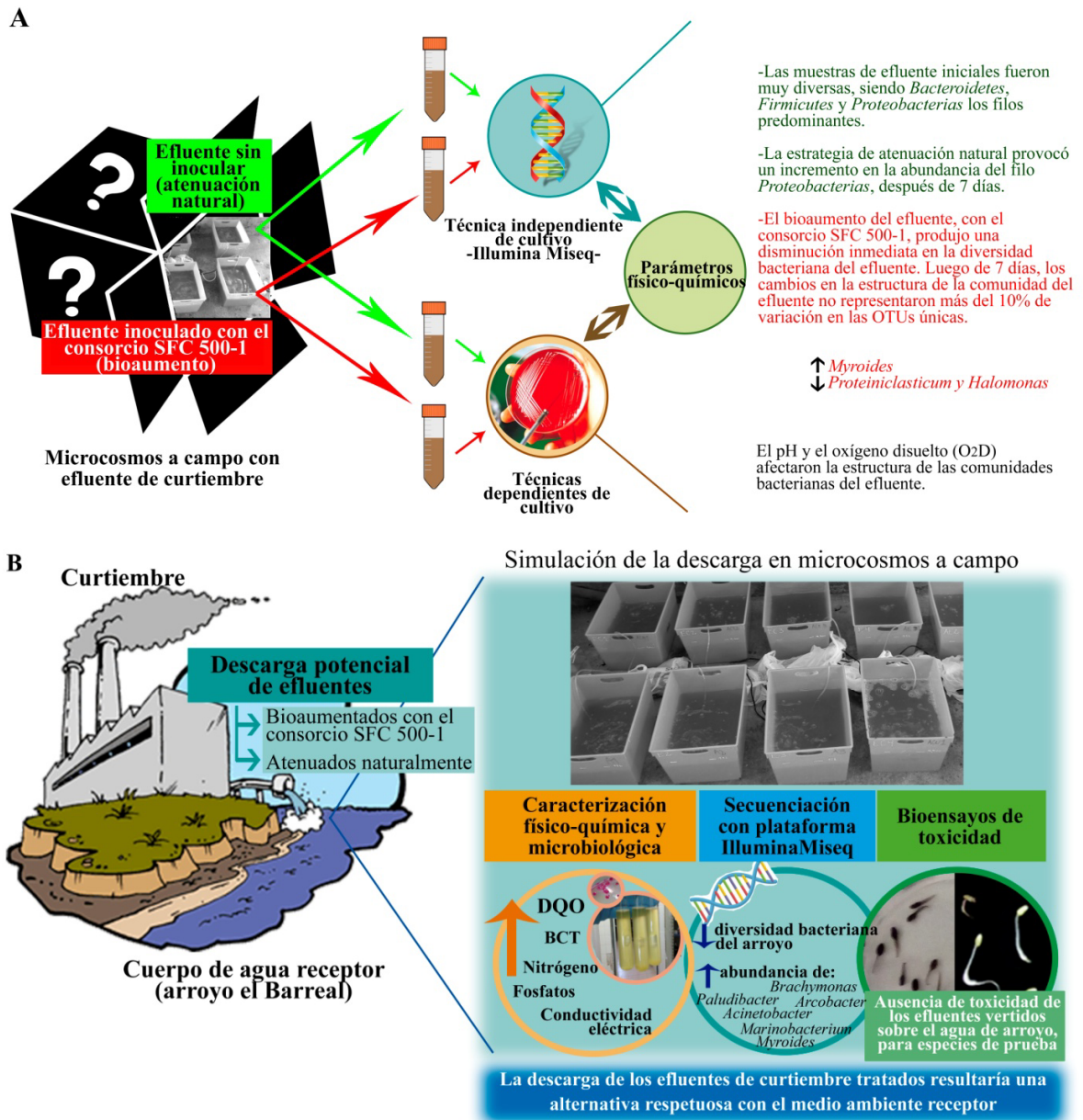


Figura 46: Esquema representativo que resume las variaciones en las comunidades bacterianas del efluente de curtiembre bioaumentadas con el consorcio SFC 500-1 y atenuadas naturalmente, su relación con variables ambientales y microorganismos cultivables (A), como así también el efecto que genera el vertido de efluentes tratados sobre la flora autóctona y características físico-químicas del arroyo El Barreal (B), elaborado en base a los resultados del Capítulo III.

**CONSIDERACIONES
FINALES Y PERSPECTIVAS**



CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

La descarga de efluentes a cielo abierto de una curtiembre, situada en la zona de la cuenca del arroyo El Barreal-Elena, llevó hace algunos años a nuestro laboratorio a intentar dar respuesta a esta problemática que es la contaminación ambiental mixta, en particular por metales y compuestos orgánicos, situación que se extiende también a nivel mundial. La biorremediación se planteó como estrategia potencial para abordar dicha problemática. En aquel momento, se realizó el aislamiento de un consorcio microbiano SFC 500-1 a partir de los canales de descarga de la curtiembre en estudio y se determinó que los microorganismos integrantes del mismo, *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, presentaban elevado potencial para la remoción simultánea de Cr(VI) y fenol en una amplia variedad de condiciones y medios de cultivos sintéticos. Además, se estudiaron algunos mecanismos por los cuales estas bacterias removían a estos contaminantes. Sin embargo, gran parte de las vías por las cuales estas señales de estrés son percibidas por las bacterias, y las consiguientes respuestas desencadenadas, es un área de investigación con muchos interrogantes por responder.

Esta tesis en particular, ofrece nuevas evidencias que muestran cómo los cambios en la morfología bacteriana, tamaño y en la ultraestructura celular, así como la producción de sustancias exopoliméricas (EPS, ADN, proteínas) y la formación de biopelículas parecen ser estrategias de adaptación utilizadas por las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1, *A. guillouiae* SFC 500-1A y *Bacillus* sp. SFC 500-1E, para resistir a los efectos adversos del Cr(VI) y fenol, y sobrevivir bajo estas condiciones de estrés. En relación a otros mecanismos involucrados en la percepción y respuesta a estos contaminantes, las bacterias integrantes del consorcio SFC 500-1 fueron capaces de detectar el Cr(VI) y fenol, transducir esta señal a través de cambios en el estado físico de la membrana, que fueron acompañados además por cambios en la composición de los grupos de cabeza polar y de los ácidos grasos de los PLs de membrana. En el caso particular de *A. guillouiae* SFC 500-1A éste fue capaz de desencadenar eventos de señalización de lípidos a nivel de la membrana celular, que incluyeron un aumento en las lípido quinasas, en las actividades de la PLA₂, generación de intermediarios como PPIn, PA y posiblemente LPE. Estas respuestas podrían permitir mantener la homeostasis y asegurar la integridad de la célula en condiciones adversas y muestran la importancia de la membrana celular como un componente clave para la adaptación rápida al estrés por Cr(VI) y fenol, que

había sido poco estudiado hasta el momento. Particularmente en *A. guillouiae* SFC 500-1A estos hallazgos son significativos porque describen, por primera vez, el rol de las lípido quinazas bacterianas y las fosfolipasas como enzimas claves para responder al estrés por los contaminantes en estudio. Creemos que los estudios básicos abordados mediante el empleo de técnicas bioquímicas y moleculares, fueron fundamentales y proporcionaron una base sólida para el desarrollo de una estrategia biotecnológica para el saneamiento de ambientes contaminados.

Se avanzó en la evaluación del consorcio SFC 500-1 como sistema biológico para ser aplicado en el tratamiento de efluentes de curtiembre, a fin de completar el escenario creado por primera vez mediante estudios de remoción de contaminantes en medios sintéticos. El consorcio removió Cr(VI), fenoles y materia orgánica (DQO) a partir del efluente de curtiembre, tanto en condiciones *in vitro* y perfectamente controladas, así como en sistemas experimentales a mayor escala y bajo condiciones ambientales reales (microcosmos a campo), destacándose su eficiencia en relación a la de la flora nativa del efluente, principalmente en época invernal. Tomados en conjunto, los estudios a diferentes escalas contribuyeron a superar algunas de las limitaciones actuales de la biorremediación bacteriana.

Los resultados obtenidos en esta tesis a partir de técnicas independientes de cultivo, como la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S, permitió conocer la diversidad bacteriana presente en el efluente de curtiembre en estudio, lo que contribuyó a dilucidar la llamada “caja negra” de taxones bacterianos no clasificados, que constituyen una gran fuente de información con aplicaciones biotecnológicas potenciales.

Antes de promover la aplicación de agentes de bioaumentación, no solo deben evaluarse las capacidades de remediación, sino también el impacto que el inóculo puede ejercer en las comunidades nativas. En este sentido, el bioaumentación con el consorcio SFC 500-1 no representó más de un 10% de variación en las OTUs únicas en las comunidades microbianas nativas del efluente, lo que fue indicativo de cierta autorregulación de las comunidades bacterianas en esta matriz. El impacto que diversos parámetros físico-químicos ejercieron sobre la estructura de la comunidad bacteriana del efluente también fue evaluado, resultando que el pH y el oxígeno disuelto fueron los parámetros más influyentes.

La descarga simulada de efluentes, ya sea atenuados naturalmente o bioaumentados, en el agua de la corriente receptora promovió ligeros cambios en diferentes parámetros físico-

químicos y microbiológicos. Todos los taxones bacterianos que presentaron variaciones en sus abundancias después de recibir el efluente de la curtiembre formaban parte de la comunidad bacteriana del cuerpo de agua receptor, lo que indica que el bioaumentado con el consorcio SFC 500-1 no suprimió ni permitió el desarrollo de ningún taxón nuevo dentro de la matriz analizada. Por consiguiente, la estructura de las comunidades bacterianas que habitan el cuerpo de agua receptor no sufrió alteraciones mayores. Tomando en conjunto estas observaciones con los resultados de los bioensayos de toxicidad, que demostraron la ausencia de toxicidad del efluente bioaumentado (en las especies de prueba), se puede concluir que el tratamiento de aguas residuales con el consorcio SFC 500-1 constituiría una alternativa respetuosa con el medio ambiente para lograr la remediación de los efluentes industriales. Por otro lado, el desarrollo de un sistema de simulación de descarga de efluentes, como el presentado en este estudio, constituye una herramienta valiosa, económica y práctica para evaluar la calidad de diferentes efluentes industriales antes de su descarga en el agua natural receptora y también para analizar el impacto de diferentes actividades antropogénicas en los ecosistemas terrestres y acuáticos.

Considerando la hipótesis planteada originalmente y el conjunto de los resultados obtenidos a través del abordaje integral del problema en estudio, se propone al consorcio SFC 500-1 como un sistema biológico adecuado y sustentable medioambientalmente para ser aplicado en el tratamiento de efluentes de curtiembre, principalmente en época invernal.

Como ocurre en todo trabajo de investigación, a partir de los conocimientos adquiridos se generan nuevos interrogantes y perspectivas futuras, que implicarían, entre otros aspectos, la producción del consorcio SFC 500-1 como un formulado biológico y su posterior escalado en biorreactor, para su utilización en piletas de tratamiento *in situ*. Los estudios metatranscriptómicos del efluente de curtiembre serían también de gran utilidad para profundizar la comprensión de los diferentes procesos metabólicos que tienen lugar en estos entornos complejos y facilitarían la explotación del consorcio SFC 500-1 como estrategia biotecnológica para este efluente en particular, y por qué no para otros tipos de efluentes industriales, con características similares.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, M.N., Abdelhalim, W.S., Abdelhalim, H.S., 2016. Biological Treatment of Leather Tanneries Wastewater Effluent- Bench Scale Modeling. *International Journal of Engineering Science and Computing* 6, 2271–2286.
- Abdulla, H.M., Kamal, E.M., Ghorab, S.A.S., 2011. Bioreduction of hexavalent chromium in tannery effluent and reuse in production of non-edible economic seedlings. *Egypt. J. Appl. Sci.* 26, 336–350.
- Abdulla, H., Ahmed, E., H. Mohamed, A., D. El-Bassuony, A., 2010. Chromium removal from tannery wastewater using chemical and biological techniques aiming zero discharge of pollution, *Proceeding of 5th Scientific Environmental Conference*.
- Abraham, K., Sridevi, R., Suresh, B., Damodharam, T., 2013. Effect of heavy metals (Cd, Pb,Cu) on seed germination of *Arachis hypogea* L. *Asian J of plant Science and Research* 3, 10–12.
- Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S. V, Curtin, J., Matin, A., 2006. Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 188, 3371–3381.
- Adav, S.S., Lee, D.J., 2008. Aerobic granulation of pure bacterial strain *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China* 2, 461–467.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., San Martín-Úriz, P., Amils, R., 2008. Extracellular matrix assembly in extreme acidic eukaryotic biofilms and their possible implications in heavy metal adsorption. *Aquatic Toxicology* 88, 257–266.
- Ahmed, E., Abdulla, H.M., Mohamed, A.H., El-Bassuony, A.D., 2016. Remediation and recycling of chromium from tannery wastewater using combined chemical-biological treatment system. *Process Safety and Environmental Protection* 104, 1–10.
- Ahmed, S., Rasul, M.G., Brown, R., Hashib, M.A., 2011. Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: A short review. *Journal of Environmental Management* 92, 311–330.
- Akhand, P.S., Rao, P.D., 2013. Assessment of Tannery Effluent: a Case Study of Kanpur in India. *Eur. Chem. Bull.* 2, 461–464.
- Akmar, Z., Zakaria, Z., Surif, S., Azlina, W., 2007. Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 146, 30–38.
- Aktan, Y., Tan, S., Içgen, B., 2013. Characterizations of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 5285–5293.
- Al-Khalid, T., El-Naas, M.H., 2012. Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42, 1631–1690.
- Alam, M.Z., Ahmad, S., Malik, A., Ahmad, M., 2010. Mutagenicity and genotoxicity of tannery effluents used for irrigation at Kanpur, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1620–1628.
- Alam, M.Z., Malik, A., 2008. Chromate resistance, transport and bioreduction by *Exiguobacterium* sp. ZM-2 isolated from agricultural soil irrigated with tannery effluent. *Journal of Basic Microbiology* 48, 416–420.
- Albokari, M., Arishi, A., Essa, A., 2018. Molecular Analysis of the Bacterial Communities from Tannery Contaminated Sites in Riyadh , Saudi Arabia. *Research journal of biotechnology* 13, 46–53.
- Alexander, A.C., Luis, A.T., Culp, J.M., Baird, D.J., Cessna, A.J., 2013. Can nutrients mask community responses to insecticide mixtures? *Ecotoxicology* 22, 1085–1100.
- Ali, S., Akhtar, T., Alam, M., 2015. Effect of industrial effluents on crop plants: a review. *International Journal of Research in Engineering* 5, 28–39.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., Cunha-Queda, A.C., Duarte, E., Vallini, G., 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environment International* 33, 505–513.
- Amanial, H.R., 2016. Physico-chemical characterization of tannery effluent and its impact on the nearby river. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 8, 44–50.
- Amin, H., Arain, B.A., Abbasi, M.S., Amin, F., Jahangir, T.M., Soomro, N.-A., 2019. Evaluation of chromium phyto-toxicity, phyto-tolerance, and phyto-accumulation using biofuel plants for effective phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 21, 352–363.
- Ammary, B.Y., 2004. Nutrients requirements in biological industrial wastewater treatment. *African Journal of Biotechnology* 3, 236–238.
- Amoruso, M.A., Witz, G., Goldstein, B.D., 1987. Alteration of Erythrocyte Membrane Fluidity by Heavy Metal

- Cations. *Toxicology and Industrial Health* 3, 135–144.
- Amrani, A. El, Dumas, A., Wick, L.Y., Yergeau, E., Berthome, R., 2015. “Omics” Insights into PAH Degradation toward Improved Green Remediation Biotechnologies. *Environ Sci Technol* 49, 11281-91.
- Andrade, L.F., Davide, L.C., Gedraite, L.S., 2010. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 626–631.
- Andrews, S., 2010. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Angelim, A.L., Costa, S.P., Farias, B.C.S., Aquino, L.F., Melo, V.M.M., 2013. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. *Journal of Environmental Management* 127, 10–17.
- Anku, W.W., Mamo, M.A., Govender, P.P., 2017. Phenolic Compounds in Water: Sources, Reactivity, Toxicity and Treatment Methods, in: *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*. pp. 419–443.
- Antizar-Ladislao, B., Galil, N.I., 2004. Biosorption of phenol and chlorophenols by acclimated residential biomass under bioremediation conditions in a sandy aquifer. *Water Research* 38, 267–276.
- APHA-AWWA, 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th Ed.
- Aristi, I., von Schiller, D., Arroita, M., Barceló, D., Ponsatí, L., García-Galán, M.J., Sabater, S., Elozegi, A., Acuña, V., 2015. Mixed effects of effluents from a wastewater treatment plant on river ecosystem metabolism: subsidy or stress? *Freshwater Biology* 60, 1398–1410.
- Arisz, S.A., Testerink, C., Munnik, T., 2009. Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 869–875.
- Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., Kaliannan, T., 2014. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. *Ecological Engineering* 71, 728–735.
- Armendariz, A.L., Talano, M.A., Villasuso, A.L., Travaglia, C., Racagni, G.E., Reinoso, H., Agostini, E., 2016. Arsenic stress induces changes in lipid signalling and evokes the stomata closure in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 103, 45–52.
- Arora, P.K., Bae, H., 2014. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories* 13, 31.
- Arora, P.K., Srivastava, A., Singh, V., 2014. Novel degradation pathway of 2-chloro-4-aminophenol in *Arthrobacter* sp. SPG. *PeerJ PrePrints* 2, e194v1.
- Ashraf, S., Naveed, M., Afzal, M., Ashraf, S., Rehman, K., Hussain, A., Zahir, Z.A., 2018. Bioremediation of tannery effluent by Cr- and salt-tolerant bacterial strains. *Environmental Monitoring and Assessment* 190, 716.
- Ates, E., Orhon, D., Tunay, O., 1997. Characterization of Tannery wastewater for pre treatment-selected case studies. *Water Science & Technology* 36, 217–223.
- Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O., 2017. A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14, 1-16.
- Azbar, N., Yonar, T., Kestioglu, K., 2004. Comparison of various advanced oxidation processes and chemical treatment methods for COD and color removal from a polyester and acetate fiber dyeing effluent. *Chemosphere* 55, 35–43.
- Azimi, A., Azari, A., Rezakazemi, M., Ansarpour, M., 2017. Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewaters: A Review. *ChemBioEng* 4, 1–24.
- Azubuike, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., 2016. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32, 1–18.
- Badola, P., Sanders, C.R., 1997. *Escherichia coli* diacylglycerol kinase is an evolutionarily optimized membrane enzyme and catalyzes direct phosphoryl transfer. *Journal of Biological Chemistry* 272, 24176–24182.
- Baek, K.H., Yoon, B.D., Kim, B.H., Cho, D.H., Lee, I.S., Oh, H.M., Kim, H.S., 2007. Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude oil-contaminated soil with different treatments. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 67–73.
- Balakrishnan, P.A., Arunagiri, A., Rao, P.G., 2002. Ozone generation by silent electric discharge and its application in tertiary treatment of tannery effluent. *Journal of Electrostatics* 56, 77–86.
- Baldwin, B.R., Ogles, D., Nakatsu, C.H., 2014. Monitoring Microbial Community Dynamics to Evaluate Bioremediation, in *Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve*. Springer Japan, Tokyo, pp. 293–312.

- Banerjee, S., Gothalwal, R., Sahu, P.K., Sao, S., 2015. Microbial Observation in Bioaccumulation of Heavy Metals from the Ash Dyke of Thermal Power Plants of Chhattisgarh, India. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 6, 131–138.
- Barák, I., Muchová, K., 2013. The role of lipid domains in bacterial cell processes. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 4050–4065.
- Barakat, M.A., 2011. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry* 4, 361–377.
- Basha, K., Rajendran, A., Thangavelu, V., 2010. Recent Advances in the Biodegradation of Phenol: A Review. *Asian J Exp Biol Sci* 1, 219–234.
- Batool, R., Qurrat-ul-ain, K., Naeem, A., 2014a. Comparative Study of Cr(VI) Removal by *Exiguobacterium* sp. in Free and Immobilized Forms. *Bioremediation Journal* 18, 317–327.
- Batool, R., Yrjälä, K., Hasnain, S., 2014b. Impact of environmental stress on biochemical parameters of bacteria reducing chromium. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 573–583.
- Belosludtsev, K.N., Belosludtseva, N. V., Agafonov, A. V., Astashev, M.E., Kazakov, A.S., Saris, N.-E.L., Mironova, G.D., 2014. Ca²⁺-dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: A comparative study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 2600–2606.
- Ben-Dov, E., Shapiro, O.H., Gruber, R., Brenner, A., Kushmaro, A., 2008. Changes in microbial diversity in industrial wastewater evaporation ponds following artificial salination. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 437–446.
- Ben-Zeev, G., Teliás, M., Nussinovitch, I., 2010. Lysophospholipids modulate voltage-gated calcium channel currents in pituitary cells; effects of lipid stress. *Cell Calcium* 47, 514–524.
- Benazir, J.F., Suganthi, R., Rajvel, D., Pooja, M.P., Mathithumilan, B., 2010. Bioremediation of chromium in tannery effluent by microbial consortia. *African Journal of Biotechnology* 9, 3140–3143.
- Bencosme, S.A., TsutSumi, V., 1970. Fast method for processing biologic material for electron microscopy. *Laboratory Investigation* 23, 447–450.
- Benedetti, P., Rasso, M., Pavan, G., Sefton, A., Pellizzer, G., 2011. Septic shock, pneumonia, and soft tissue infection due to *Myroides odoratimimus*: report of a case and review of Myroides infections. *Infection* 39, 161–165.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96, 1049–1055.
- Beresford, N.J., Saville, C., Bennett, H.J., Roberts, I.S., Taberero, L., 2010. A new family of phosphoinositide phosphatases in microorganisms: Identification and biochemical analysis. *BMC Genomics* 11, 457.
- Beringer, J.E., 1974. R factor transfer in *Rhizobiurn Zegurninosarum*. *Journal of General Microbiology* 84, 188–198.
- Bernal, P., Muñoz-rojas, J., Hurtado, A., Ramos, J.L., Segura, A., 2007. A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environmental Microbiology* 9, 1135–1145.
- Beveridge, T., Hughes, M., Lee, H., Leung, K., Poole, R., Savvaidis, I., Silver, S., Trevors, J., 1997. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. *Adv Microb Physiol* 38, 177–243.
- Bhattacharya, A., Gupta, A., Kaur, A., Malik, D., 2015. Simultaneous Bioremediation of Phenol and Cr(VI) from Tannery Wastewater Using Bacterial Consortium. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology* 3, 50–55.
- Bhattacharya, A., Gupta, A., Kaur, A., 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. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 6628–6637.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911–917.
- Boadi, W.Y., Urbach, J., Brandes, J.M., Yannai, S., 1992. In-vitro exposure to mercury and cadmium alters term human placental membrane fluidity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 116, 17–23.
- Boeris, P.S., Agustín, M. del R., Acevedo, D.F., Lucchesi, G.I., 2016. Biosorption of aluminum through the use of non-viable biomass of *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology* 236, 57–63.

- Boon, N., Goris, J., Vos, P. De, Verstraete, W., Top, E.M., 2000. Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading *Comamonas testosteroni* Strain , 12 gfp. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2906–13.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 254, 248–254.
- Braga, P.C., Ricci, D., 2011. Thymol-Induced Alterations in *Candida albicans* Imaged by Atomic Force Microscopy, in *Atomic Force Microscopy in Biomedical Research: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 401–410.
- Bramucci, M., Nagarajan, V., 2006. Bacterial communities in industrial wastewater bioreactors. *Current Opinion in Microbiology* 9, 275–278.
- Burns, A.S., Pugh, C.W., Segid, Y.T., Behum, P.T., Lefticariu, L., Bender, K.S., 2012. Performance and microbial community dynamics of a sulfate-reducing bioreactor treating coal generated acid mine drainage. *Biodegradation* 23, 415–429.
- Busscher, H.J., Mei, H.C. Van Der, 2012. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS pathogens* 8, 1–4.
- Cabiscol, E., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3, 3–8.
- Cai, X., Yao, L., Sheng, Q., Jiang, L., Dahlgren, R.A., Wang, T., 2018. Properties of bacterial communities attached to artificial substrates in a hypereutrophic urban river. *AMB Express* 8, 22.
- Cai, W., Li, Y., Wang, P., Niu, L., Zhang, W., Wang, C., 2016. Effect of the pollution level on the functional bacterial groups aiming at degrading bisphenol A and nonylphenol in natural biofilms of an urban river. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 15727–15738.
- Cai, J., Abramovici, H., Gee, S.H., Matthew K., T., 2013. Diacylglycerol Kinases as Sources of Phosphatidic Acid. *Biochim Biophys Acta* 31, 1713–1723.
- Cairns, J., Pratt, J., 1989. The scientific basis of bioassays in *Environmental Bioassay Techniques and their Application*. *Developments in Hydrobiology*, 45, 5-20.
- Calheiros, C.S.C., Teixeira, A., Pires, C., Franco, A.R., Duque, A.F., Crispim, L.F.C., Moura, S.C., Castro, P.M.L., 2010. Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high salinity industrial wastewater polishing. *Water Research* 44, 5032–5038.
- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R., 2010. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal* 6, 1621.
- Cardenas, E., Tiedje, J.M., 2008. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 544–549.
- Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S., Sezenna, E., 2015. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5711–5741.
- Carolin, C.F., Kumar, P.S., Saravanan, A., Joshiba, G.J., Naushad, M., 2017. Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5, 2782–2799.
- Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F., Kjelleberg, S., 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology* 73, 278–288.
- 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.
- Castelló, E., Perna, V., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C., 2011. Microbial community composition and reactor performance during hydrogen production in a UASB reactor fed with raw cheese whey inoculated with compost. *Water Science and Technology* 64, 2265–2273.
- Čertík, M., Dercová, K., Sejáková, Z., Find'ová, M., Jakubík, T., 2003. Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) on the membrane lipids of bacterial cell. *Biologia - Section Cellular and Molecular Biology* 58, 1115–1121.
- Cervantes, C., Campos-García, J., 2007. Reduction and Efflux of Chromate by Bacteria, in *Molecular*

- Microbiology of Heavy Metals. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 407–419.
- Cervantes, C., Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J.F., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R., 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48, 203–210.
- Cesari, A.B., Paulucci, N.S., Biasutti, M.A., Morales, G.M., Dardanelli, M.S., 2018. Changes in the lipid composition of *Bradyrhizobium* cell envelope reveal a rapid response to water deficit involving lysophosphatidylethanolamine synthesis from phosphatidylethanolamine in outer membrane. *Research in Microbiology* 169, 303–312.
- Cesari, A.B., Paulucci, N.S., Biasutti, M.A., Reguera, Y.B., Gallarato, L.A., Kilmurray, C., Dardanelli, M.S., 2016. Reorganization of *Azospirillum brasilense* cell membrane is mediated by lipid composition adjustment to maintain optimal fluidity during water deficit. *Journal of Applied Microbiology* 120, 185–194.
- Chakraborty, R., Kumar, A., Bhowal, S.S., Mandal, A.K., Tiwary, B.K., Mukherjee, S., 2013. Diverse Gene Cassettes in Class 1 Integrons of Facultative Oligotrophic Bacteria of River Mahananda, West Bengal, India. *PLOS ONE* 8, 1–13.
- Chandra, R., Bharagava, R.N., Kapley, A., Purohit, H.J., 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. *Bioresource technology* 102, 2333–41.
- Chang, Y.-C., Reddy, M.V., Umamoto, H., Sato, Y., Kang, M.-H., Yajima, Y., Kikuchi, S., 2016. Bio-Augmentation of *Cupriavidus* sp. CY-1 into 2,4-D Contaminated Soil: Microbial Community Analysis by Culture Dependent and Independent Techniques. *PLOS ONE* 10, 1–18.
- Chao, A., Shen, T.-J., 2003. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. *Environmental and Ecological Statistics* 10, 429–443.
- Chao, A., Lee, S.-M., 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association* 87, 210–217.
- Chao, A., 1984. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11, 265–270.
- Chapman, P.M., 2000. Whole effluent toxicity testing—usefulness, level of protection, and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 3–13.
- Charles, J., Sancey, B., Morin-Crini, N., Badot, P.M., Degiorgi, F., Trunfio, G., Crini, G., 2011. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 2057–2064.
- Chen, Y., Lan, S., Wang, L., Dong, S., Zhou, H., Tan, Z., Li, X., 2017. A review: Driving factors and regulation strategies of microbial community structure and dynamics in wastewater treatment systems. *Chemosphere* 174, 173–182.
- Chen, W.-M., Yang, S.-H., Young, C.-C., Sheu, S.-Y., 2013. *Rheinheimera tilapiae* sp. nov., isolated from a freshwater culture pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 1457–1463.
- Chen, Z., Huang, Z., Cheng, Y., Pan, D., Pan, X., Yu, M., Pan, Z., Lin, Z., Guan, X., Wu, Z., 2012. Cr(VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus*. *Chemosphere* 87, 211–6.
- Chen, J., Tang, Y.Q., Wu, X.L., 2012. Bacterial Community Shift in Two Sectors of a Tannery Plant and its Cr (VI) Removing Potential. *Geomicrobiology Journal* 29, 226–235.
- 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. *Pol. J. Environ. Stud.* 24, 1939–1947.
- Cheung, H.Y., Wong, M.M.K., Cheung, S.H., Liang, L.Y., Lam, Y.W., Chiu, S.K., 2012. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 7, e36659.
- Cheung, K.H., Lai, H.Y., Gu, J.D., 2006. Membrane-associated hexavalent chromium reductase of *Bacillus megaterium* TKW3 with induced expression. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 855–862.
- Chirwa, E.N., Wang, Y., 2000. Simultaneous Chromium(VI) reduction and phenol degradation in an anaerobic consortium of bacteria. *Water research* 34, 2376–2384.
- Chou, Y.-J., Chou, J.-H., Lin, M.-C., Arun, A.B., Young, C.-C., Chen, W.-M., 2008. *Vogesella perlucida* sp. nov., a non-pigmented bacterium isolated from spring water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2677–2681.
- Chowdhary, P., More, N., Raj, A., Bharagava, R.N., 2017. Characterization and identification of pathogens from treated tannery wastewater bacterial. *Microbiology Research International* 5, 30–36.

- Chowdhury, M., Mostafa, M.G., Biswas, T.K., Mandal, A., Saha, A.K., 2015. Characterization of the Effluents from Leather Processing Industries. *Environmental Processes* 2, 173–187.
- Chrysochoou, M., Johnston, C.P., Dahal, G., 2012. A comparative evaluation of hexavalent chromium treatment in contaminated soil by calcium polysulfide and green-tea nanoscale zero-valent iron. *Journal of Hazardous Materials* 201, 33–42.
- Çıgğın, A.S., Orhon, D., Rossetti, S., Majone, M., 2011. Short-term and long-term effects on carbon storage of pulse feeding on acclimated or unacclimated activated sludge. *Water Research* 45, 3119–3128.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., O’Toole, W.P., 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* 38, e200.
- Cocco, L., Follo, M.Y., Manzoli, L., Suh, P.-G., 2015. Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease. *Journal of Lipid Research* 56, 1853–1860.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., Figueras, M.J., 2008. Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology* 10, 1635–1640.
- Collins, S.J., Russell, R.W., 2009. Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians. *Environmental Pollution* 157, 320–324.
- Comba, S., Menendez-Bravo, S., Arabolaza, A., Gramajo, H., 2013. Identification and physiological characterization of phosphatidic acid phosphatase enzymes involved in triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbial cell factories* 12, 9.
- Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H., Schulz, R., 2012. A critical view of current state of phytotechnologies to remediate soils: still a promising tool? *The Scientific World Journal* 2012, 173829.
- Connon, S.A., Tovanaboot, A., Dolan, M., Vergin, K., Giovannoni, S.J., Semprini, L., 2005. Bacterial community composition determined by culture-independent and -dependent methods during propane-stimulated bioremediation in trichloroethene-contaminated groundwater. *Environmental Microbiology* 7, 165–178.
- Conte, P., Agretto, A., Spaccini, R., Piccolo, A., 2005. Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils. *Environ Pollut* 135, 515–22.
- Contzen, M., Moore, E.R.B., Blümel, S., Stolz, A., Kämpfer, P., 2000. *Hydrogenophaga intermedia* sp. nov., a 4-aminobenzene-sulfonate Degrading Organism. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 487–493.
- Costa, C.R., Olivi, P., 2009. Effect of chloride concentration on the electrochemical treatment of a synthetic tannery wastewater. *Electrochimica Acta* 54, 2046–2052.
- Cronan, J.E., Wulff, D.L., 1969. A role for phospholipid hydrolysis in the lysis of *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *Virology* 38, 241–246.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielińska, M., 2016. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32, 1–8.
- Dadrasnia, A., Wei, K.S.C., Shahsavari, N., Azirun, M.S., Ismail, S., 2015. Biosorption potential of *Bacillus salmalya* strain 139SI for removal of Cr(VI) from aqueous solution. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12, 15321–15338.
- Dargo, H., Ayalew, A., 2014. Tannery Waste Water Treatment: A Review. *International Journal of Emerging Trends in Science and Technology Tannery* 1, 1488–1494.
- Darwish, E., Testerink, C., Khalil, M., El-Shihy, O., Munnik, T., 2009. Phospholipid Signaling Responses in Salt-Stressed Rice Leaves. *Plant and Cell Physiology* 50, 986–997.
- Das, T., Sharma, P.K., Busscher, H.J., Mei, H.C. Van Der, Krom, B.P., 2010. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3405–3408.
- Davydova, L., Bakholdina, S., Barkina, M., Velansky, P., Bogdanov, M., Sanina, N., 2016. Effects of elevated growth temperature and heat shock on the lipid composition of the inner and outer membranes of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochimie* 123, 103–109.
- De Craene, J.O., Bertazzi, D.L., Bär, S., Friant, S., 2017. Phosphoinositides, major actors in membrane trafficking and lipid signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 634.
- Degenaar, A.P., Ismail, A., Bux, F., 2008. Comparative evaluation of the microbial community in biological processes treating industrial and domestic wastewaters. *Journal of Applied Microbiology* 104, 353–363.
- Deghles, A., Kurt, U., 2016. Treatment of raw tannery wastewater by electrocoagulation technique: optimization of effective parameters using Taguchi method. *Desalination and Water Treatment* 57, 14798–14809.
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T., 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* 52, 149–182.
- Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U., Wingender, J., 2007. Chemical and physical methods for

- characterisation of biofilms. *Microchimica Acta* 158, 1–27.
- Dermou, E., Velissariou, A., Xenos, D., Vayenas, D. V., 2005. Biological Cr(VI) Reduction Using a Trickle Filter. *Journal of Hazardous Materials* 126, 78–85.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5069–5072.
- Desta, A.F., Assefa, F., Leta, S., Stomeo, F., Wamalwa, M., Njahira, M., Appolinaire, D., 2014. Microbial community structure and diversity in an integrated system of anaerobic-aerobic reactors and a constructed wetland for the treatment of tannery wastewater in Modjo, Ethiopia. *PLoS ONE* 9, e115576.
- Dhal, B., Thatoi, H., Das, N., Pandey, B.D., 2010. Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 1471–1479.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/>.
- Diez, M.C., 2010. Biological aspects involves in the degradation of organic pollutants. *Journal of soil science and plant nutrition* 10, 244–267.
- Dische, Z., 1962. General color reactions. *Methods in carbohydrate chemistry* 1, 478–512.
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U.B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B.P., Rai, J.P., Sharma, P.K., Lade, H., Paul, D., 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 7, 2189–2212.
- Djokic, L., Narancic, T., Biocanin, M., Saljnikov, E., Casey, E., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., 2013. Phenol removal from four different natural soil types by *Bacillus* sp. PS11. *Applied Soil Ecology* 70, 1–8.
- Dogan, N.M., Doganli, G.A., Dogan, G., Bozkaya, O., 2015. Characterization of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Thermal *Bacillus* and Determination of Environmental Conditions Affecting Exopolysaccharide Production. *International Journal of Environmental Research* 9, 1107–1116.
- Doke, K., Khan, E.M., Rapolu, J., Shaikh, A., 2011. Physico-chemical analysis of sugar industry effluent and its effect on seed germination of *Vigna angularis*, *Vigna cylindrical* and *Sorghum cernum*. *Ann. Environ. Sci.* 5, 7–11.
- Dong, G., Wang, Y., Gong, L., Wang, M., Wang, H., He, N., Zheng, Y., Li, Q., 2013. Formation of soluble Cr(III) end-products and nanoparticles during Cr(VI) reduction by *Bacillus cereus* strain XMCr-6. *Biochemical Engineering Journal* 70, 166–172.
- Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., van Lier, J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology* 98, 2369–2385.
- Dowhan, W., 2013. A retrospective: Use of *Escherichia coli* as a vehicle to study phospholipid synthesis and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831, 471–494.
- Dowhan, W., 2009. Molecular genetic approaches to defining lipid function. *Journal of lipid research* 50, S305–S310.
- Dowhan, W., 1997. MOLECULAR BASIS FOR MEMBRANE PHOSPHOLIPID DIVERSITY: Why Are There So Many Lipids? *Annual Review of Biochemistry* 66, 199–232.
- Drury, B., Rosi-Marshall, E., Kelly, J.J., 2013. Wastewater treatment effluent reduces the abundance and diversity of benthic bacterial communities in urban and suburban rivers. *Applied and environmental microbiology* 79, 1897–1905.
- Du, J., Yang, J.-E., Singh, H., Akter, S., Won, K., Yin, C.S., Jin, F.-X., Yi, T.-H., 2015. *Hydrogenophaga luteola* sp. nov. isolated from reed pond water. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 695–701.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., Johri, A., 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 143–152.
- Dubrovín, E. V., Popova, A. V., Kraevskiy, S. V., Ignatov, S.G., Ignatyuk, T.E., Yaminsky, I. V., Volozhantsev, N. V., 2012. Atomic Force Microscopy Analysis of the *Acinetobacter baumannii* Bacteriophage AP22 Lytic Cycle. *PLoS ONE* 7, 1–9.
- Dufrêne, Y.F., 2014. Atomic force microscopy in microbiology: new structural and functional insights into the microbial cell surface. *mBio* 5, 1–14.
- Duldhardt, I., Gaebel, J., Chrzanowski, L., Nijenhuis, I., Härtig, C., Schauer, F., Heipieper, H.J., 2010. Adaptation of anaerobically grown *Thauera aromatica*, *Geobacter sulfurreducens* and *Desulfococcus multivorans* to organic solvents on the level of membrane fatty acid composition. *Microbial Biotechnology* 3, 201–209.

- Eberlein, C., Baumgarten, T., Starke, S., Heipieper, H.J., 2018. Immediate response mechanisms of Gram-negative solvent-tolerant bacteria to cope with environmental stress: cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids and outer membrane vesicle secretion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 2583–2593.
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.
- Ekambaran, S.P., Perumal, S.S., Annamalai, U., 2016. Decolorization and biodegradation of remazol reactive dyes by *Clostridium* species. *3 Biotech* 6, 1–8.
- El-Sayed, M.H., 2016. Multiple Heavy Metal and Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strain HAF-13 Isolated from Industrial Effluents. *American Journal of Microbiological Research* 4, 26–36.
- El-Sayed, W.S., Ibrahim, M.K., Abu-Shady, M., El-Beih, F., Ohmura, N., Saiki, H., Ando, A., 2003. Isolation and Characterization of Phenol-catabolizing Bacteria from a Coking Plant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67, 2026–2029.
- Elangovan, R., Philip, L., Chandraraj, K., 2010. Hexavalent Chromium Reduction by Free and Immobilized Cell-free Extract of *Arthrobacter rhombi*-RE. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160, 81.
- Eller, G., Krüger, M., Frenzel, P., 2005. Comparing field and microcosm experiments: A case study on methano- and methylo-trophic bacteria in paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 51, 279–291.
- Emami, F., Tehrani-Bagha, A.R., Gharanjig, K., Menger, F.M., 2010. Kinetic study of the factors controlling Fenton-promoted destruction of a non-biodegradable dye. *Desalination* 257, 124–128.
- Emsley J., 1989. *The Elements*, Oxford, Reino Unido: Oxford University Press.
- Endeshaw, A., Gizaw, B., Zerihun, T., Misganaw, W., 2017. The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. *Open Journal of Environmental Biology* 2, 038–046.
- EPA, 2012. Guías de EPA-2012 para la reutilización de aguas residuales para la agricultura.
- EPA, 1994. Office of solid waste and emergency response. Hazardous site evaluation division., in: *Using Toxicity Test in Ecological Risk Assessment* 2, 0-051.
- Erijman, L., Figuerola, E.L.M., Guerrero, L.D., Ayarza, J.M., 2011. Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. *Revista argentina de Microbiología* 43, 127–135.
- Esparza-soto, M., Westerhoff, P., 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. *Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. Water Research* 37, 2301–2310.
- Essahale, A., Malki, M., Marín, I., Moumni, M., 2012. Hexavalent Chromium Reduction and Accumulation by *Acinetobacter* AB1 Isolated from Fez Tanneries in Morocco. *Indian Journal of Microbiology* 52, 48–53.
- Eyster, K.M., 2007. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *AJP: Advances in Physiology Education* 31, 5–16.
- Fang, F., Han, H., Zhao, Q., Xu, C., Zhang, L., 2013. Bioaugmentation of biological contact oxidation reactor (BCOR) with phenol-degrading bacteria for coal gasification wastewater (CGW) treatment. *Bioresource Technology* 150, 314–320.
- Fang, H.H.P., Xu, L., Chan, K., 2002. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research* 36, 4709–4716.
- Faouzi, M., Merzouki, M., H, E.L.F., Benlemlih, M., Science, F., Mahraz, D. El, Ben, M., 2013. Biological Treatment of Tannery Synthetic Effluent. *Journal of Biotechnology Letters* 4, 60–67.
- Fares, R., Aissa, A., Bouadi, A., Lounis, M., 2018. iMedPub Journals Biological Treatment of Wastewater by Addition of Activated Carbon Powder (CAP). *Journal of Waste Recycling* 3, 1–7.
- Farrell, A., Quilty, B., 2002. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 316–324.
- Feng, J.Q., Gang, H.Z., Li, D.S., Liu, J.F., Yang, S.Z., Mu, B.Z., 2019. Characterization of biosurfactant lipopeptide and its performance evaluation for oil-spill remediation. *RSC Advances* 9, 9629–32.
- Fenibo, E.O., Ijoma, G.N., Ramganes, S., Chikere, C.B., 2019. Microbial surfactants: the next generation multifunctional biomolecules for diverse applications- a review. Preprints 2019090044.
- Fernández, P.M., Viñarta, S.C., Bernal, A.R., Cruz, E.L., Figueroa, L.I.C., 2018. Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. *Chemosphere* 208, 139–148.
- Fernández, L., Hancock, R.E.W., 2012. Adaptive and Mutational Resistance : Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance 25, 661–681.

- Fernández, P.M., Figueroa, L.I.C., Fariña, J.I., 2010. Critical Influence of Culture Medium and Cr(III) Quantification Protocols on the Interpretation of Cr(VI) Bioremediation by Environmental Fungal Isolates. *Water, Air, and Soil Pollution* 206, 283–293.
- Figueroa, E.L.M., Erijman, L., 2007. Bacterial taxa abundance pattern in an industrial wastewater treatment system determined by the full rRNA cycle approach. *Environmental Microbiology* 9, 1780–1789.
- Fleming, H., Wuertz, S., 2002. Sorption properties of biofilms, in *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. pp. 2958–2967.
- Flora, S.J.S., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2, 191–206.
- Fodelianakis, S., Antoniou, E., Mapelli, F., Magagnini, M., Nikolopoulou, M., Marasco, R., Barbato, M., Tsiola, A., Tsikopoulou, I., Giaccaglia, L., Mahjoubi, M., Jaouani, A., Amer, R., Hussein, E., Al-Horani, F.A., Benzha, F., Blaghen, M., Malkawi, H.I., Abdel-Fattah, Y., Cherif, A., Daffonchio, D., Kalogerakis, N., 2015. Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *Journal of Hazardous Materials* 287, 78–86.
- Francius, G., Lebeer, S., Alsteens, D., Wildling, L., Gruber, H.J., Hols, P., Keersmaecker, S. De, Vanderleyden, J., Dufrêne, Y.F., 2008. Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *American Chemical Society* 2, 1921–1929.
- François, F., Lombard, C., Guigner, J.M., Soreau, P., Brian-Jaisson, F., Martino, G., Vandervennet, M., Garcia, D., Molinier, A.L., Pignol, D., Peduzzi, J., Zirah, S., Rebuffat, S., 2012. Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1097–1106.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J., 2008. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2461–2470.
- Fredriksson, N.J., Hermansson, M., Wilén, B.-M., 2013. The Choice of PCR Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant. *PLOS ONE* 8, e76431.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., Li, W., 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28, 3150–3152.
- Fuse, H., Takimura, O., Murakami, K., Yamaoka, Y., Omori, T., 2000. Utilization of dimethyl sulfide as a sulfur source with the aid of light by *Marinobacterium* sp. Strain DMS-S1. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5527–5532.
- Gadd, G.M., 2009. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84, 13–28.
- Gadd, G.M., 1992. Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters* 100, 197–203.
- Galindo, E., Peña, C., Serrano-Carreón, L., 2007. Domesticar microorganismos en un biorreactor: los retos del bioingeniero. *Biotecnología* 14, 131–143.
- Gami, A.A., Shukor, M.Y., Khalil, K.A., Dahalan, F.A., Khalid, A. iff, Ahmad, iti A., 2014. Phenol and its toxicity. *Journal of environmental microbiology and toxicology* 2, 11–24.
- Gao, P., Xu, W., Sontag, P., Li, X., Xue, G., Liu, T., Sun, W., 2016. Correlating microbial community compositions with environmental factors in activated sludge from four full-scale municipal wastewater treatment plants in Shanghai, China. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 4663–4673.
- García, J.J., Martínez-Ballarín, E., Millán-Plano, S., Allué, J.L., Albendea, C., Fuentes, L., Escanero, J.F., 2005. Effects of trace elements on membrane fluidity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 19–22.
- Garg, S.K., Garg, S., Tripathi, M., Singh, K., 2018. Microbial Treatment of Tannery Effluent by Augmenting Psychrotrophic *Pseudomonas putida* Isolate. *Environmental Pollution and Protection* 3, 23–39.
- Garg, S.K., Tripathi, M., Srinath, T., 2012. Strategies for Chromium Bioremediation of Tannery Effluent, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer US, Boston, MA, 217, pp. 75–140.
- Garhwal, D., Vaghela, G., Panwala, T., Revdiwala, S., Shah, A., Mulla, S., 2014. Lead tolerance capacity of clinical bacterial isolates and change in their antibiotic susceptibility pattern after exposure to a heavy metal. *International Journal of Medicine and Public Health* 4, 253–256.
- Ghannoum, M.A., 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 122–143.
- Gidhamaari, S., Mamidala, E., 2012. Studies of Efficiency of Immobilizedbacteria in Tannery. *J. Bio. Innov* 2,

33–42.

- Giles, D.K., Hankins, J. V, Guan, Z., Trent, M.S., 2011. Remodelling of the *Vibrio cholerae* membrane by incorporation of exogenous fatty acids from host and aquatic environments. *Molecular Microbiology* 79, 716–728.
- Giordano, C., Boscaro, V., Munz, G., Mori, G., Vannini, C., 2016. Summer holidays as break-point in shaping a tannery sludge microbial community around a stable core microbiota. *Scientific Reports* 6, 1–9.
- Glenn, T.C., 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources* 11, 759–769.
- Gobbi, D.D.S., Spindola, M.G., Moreno, L.Z., Matajira, C.E.C., Oliveira, M.G.X., Paixão, R., Ferreira, T.S.P., Moreno, A.M., 2018. Isolation and molecular characterization of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* from the pork production chain in Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 38, 393–399.
- Godheja, J., Shekhar, S.K., Satyanarayan, G.N.V., Modi, D.R., 2017. Antibiotic and Heavy Metal Tolerance of Some Indigenous Bacteria Isolated From Petroleum Contaminated Soil Sediments with A Study of Their Aromatic Hydrocarbon Degradation Potential. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6, 194–211.
- Goldstein, R.M., Mallory, L.M., Alexander, M., 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and environmental microbiology* 50, 977–983.
- Goswami, S., Mazumder, D., 2014. Scope of biological treatment for composite tannery wastewater. *International Journal of Environmental Sciences* 5, 607–622.
- Gotelli, N.J., Colwell, R.K., 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4, 379–391.
- Grant, S.B., Saphores, J.-D., Feldman, D.L., Hamilton, A.J., Fletcher, T.D., Cook, P.L.M., Stewardson, M., Sanders, B.F., Levin, L.A., Ambrose, R.F., Deletic, A., Brown, R., Jiang, S.C., Rosso, D., Cooper, W.J., Marusic, I., 2012. Taking the “Waste” Out of “Wastewater” for Human Water Security and Ecosystem Sustainability. *Science* 337, 681–686.
- Green, B.T., Nolan, P.E., Green, K., 2001. *Myroides odoratus* Cellulitis and Bacteremia: Case Report and Review. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 33, 932–934.
- Grenni, P., Falconi, F., Caracciolo, A.B., 2012. Microcosm Experiments for Evaluating Natural Bioremediation of Contaminated Ecosystems. *Chemical Engineering Transactions* 28, 7–12.
- Griffith, O.H., Ryan, M., 1999. Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: Structure, function, and interaction with lipids, *Biochimica et biophysica acta*.
- 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* 20, 6563–6573.
- Günther, S., Koch, C., Hübschmann, T., Röske, I., Müller, R.A., Bley, T., Harms, H., Müller, S., 2012. Correlation of Community Dynamics and Process Parameters As a Tool for the Prediction of the Stability of Wastewater Treatment. *Environmental Science & Technology* 46, 84–92.
- Gupta, P., Diwan, B., 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports* 13, 58–71.
- Gustavson, K.E., Sonsthagen, S.A., Crunkilton, R.A., Harkin, J.M., 2000. Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analyses. *Environmental Toxicology* 15, 421–430.
- Guzik, U., Greń, I., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D., 2011. Catechol 1,2-dioxygenase from the new aromatic compounds – Degrading *Pseudomonas putida* strain N6. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 504–512.
- Ha, J., Gélabert, A., Spormann, A.M., Brown, G.E., 2010. Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: Batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 1–15.
- Hamid, B., Kaushik, G., Chawla, J., Ahmad Baba, Z., 2015. Isolation and Development of Efficient Bacterial Consortia for Bioremediation of Textile Dye Effluent. *Journal of Pollution Effects & Control* 3:142.
- Hamza, R.A., Iorhemen, O.T., Zaghoul, M.S., Tay, J.H., 2018. Rapid formation and characterization of aerobic granules in pilot-scale sequential batch reactor for high-strength organic wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering* 22, 27–33.
- Hamza, R.A., Zaghoul, M.S., Iorhemen, O.T., Sheng, Z., Tay, J.H., 2019. Optimization of organics to nutrients (COD:N:P) ratio for aerobic granular sludge treating high-strength organic wastewater. *Science of The Total Environment* 650, 3168–3179.
- Hao, L., Liao, B.Q., 2015. Effect of organic matter to nitrogen ratio on membrane bioreactor performance.

- Environmental Technology 36, 2674–2680.
- Hardaway, K.L., Buller, C.S., 1979. Effect of ethylenediaminetetraacetate on phospholipids and outer membrane function in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 137, 62–68.
- Harish, R., Samuel, J., Mishra, R., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2012. Bio-reduction of Cr (VI) by exopolysaccharides (EPS) from indigenous bacterial species of Sukinda chromite mine, India. *Biodegradation* 23, 487–496.
- He, M., Li, X., Guo, L., Miller, S.J., Rensing, C., Wang, G., 2010. Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus*. *BMC Microbiology* 2010, 10:221.
- Heip, C., 1974. A New Index Measuring Evenness. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54, 555–557.
- Heipieper, H.J., Meinhardt, F., Segura, A., 2003. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: Biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiology Letters* 229, 1–7.
- Heipieper, H., Diefenbach, R., Keweloh, H., 1992. Conversion of cis Unsaturated Fatty Acids to trans, a Possible Mechanism for the Protection of Phenol-Degrading *Pseudomonas putida* P8 from Substrate Toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1847–1852.
- Heredia, R.M., Boeris, P.S., Biasutti, A., Lo, A., Paulucci, N.S., Ine, G., 2016. Coordinated response of phospholipids and acyl components of membrane lipids in *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) under stress caused by cationic surfactants. *Microbiology* 160, 2618–2626.
- Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S., 2007. Acclimation to low level exposure of copper in *Bufo arenarum* embryos: linkage of effects to tissue residues. *International journal of environmental research and public health* 4, 166–172.
- Herkovits, J., Perez-Coll, C., Herkovits, F.D., 2002. Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environmental Pollution* 116, 177–183.
- Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S., 1999. Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio (ANFITOX). *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* 42, 24–30.
- Heřman, P., Konopásek, I., Plášek, J., Svobodová, J., 1994. Time-resolved polarized fluorescence studies of the temperature adaptation in *Bacillus subtilis* using DPH and TMA-DPH fluorescent probes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1190, 1–8.
- Herrero, M., Stuckey, D.C., 2015. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere* 140, 119–128.
- Higgins, D.G., Thompson, J.D., Gibson, T.J., 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments, in *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis, Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 383–402.
- Hilbi, H., 2006. Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cellular Microbiology* 8, 1697–1706.
- Holk, A., Rietz, S., Zahn, M., Quader, H., Scherer, G.F.E., 2002. Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant physiology* 130, 90–101.
- Hora, A., Shetty, K.V., 2014. Inhibitory and stimulating effect of single and multi-metal ions on hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter* sp. Cr-B2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 3211–3219.
- Horváth, I., Glatz, A., Nakamoto, H., Mishkind, M.L., Munnik, T., Saidi, Y., Goloubinoff, P., Harwood, J.L., Vigh, L., 2012. Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid connections. *Progress in Lipid Research* 51, 208–220.
- Howlett, N.G., Avery, S. V., 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Applied and environmental microbiology* 63, 2971–6.
- Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., Wu, Z., 2018. Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules* 23, 2313.
- Huang, F., Guo, C.L., Lu, G.N., Yi, X.Y., Zhu, L.D., Dang, Z., 2014. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere* 109, 134–142.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 2465–2466.

- Huo, Y., Bai, Y., Qu, J., 2017. Unravelling riverine microbial communities under wastewater treatment plant effluent discharge in large urban areas. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 6755–6764.
- Ibañez, S.G., Villasuso, A.L., Racagni, G.E., Agostini, E., Medina, M.I., 2016. Phenol modulates lipid kinase activities in *Vicia sativa* plants. *Environmental and Experimental Botany* 122, 109–114.
- Ibanez, S., Paisio, C., Wevar Oller, A., Talano, M., González, P., Medina, M., Agostini, E., 2015. Overview and New Insights of Genetically Engineered Plants for Improving Phytoremediation, in *Phytoremediation*. Cham, Springer Int. pp. 99–113.
- Ibarbalz, F.M., Pérez, M.V., Figuerola, E.L.M., Erijman, L., 2014. The bias associated with amplicon sequencing does not affect the quantitative assessment of bacterial community dynamics. *PLoS ONE* 9, e99722.
- Ibarbalz, F.M., Figuerola, E.L.M., Erijman, L., 2013. Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks. *Water Research* 47, 3854–3864.
- Ibekwe, A.M., Ma, J., Murinda, S.E., 2016. Bacterial community composition and structure in an Urban River impacted by different pollutant sources. *Science of The Total Environment* 566–567, 1176–1185.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126, 1821–1835.
- Ingram, L.O., 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 1233–1236.
- Inoue, K., Habe, H., Yamane, H., Omori, T., Nojiri, H., 2005. Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: Isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiology Letters* 245, 145–153.
- Islam, B., Musa, A., Ibrahim, E., Sharafa, S., Elfaki, B., 2014. Evaluation and Characterization of Tannery Wastewater. *Journal of Forest Products & Industries*, 3, 141–150.
- Istivan, T.S., Coloe, P.J., 2006. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* 152, 1263–1274.
- Jackson, M., Crick, D., J Brennan, P., 2000. Phosphatidylinositol Is an Essential Phospholipid of *Mycobacteria*. *The Journal of biological chemistry* 275, 30092–30099.
- Jacob, J.M., Karthik, C., Saratale, R.G., Kumar, S.S., Prabakar, D., Kadirvelu, K., Pugazhendhi, A., 2018. Biological approaches to tackle heavy metal pollution: A survey of literature. *Journal of Environmental Management* 217, 56–70.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 35–73.
- Jardine, J., Mavumengwana, V., Ubomba-Jaswa, E., 2019. Antibiotic resistance and heavy metal tolerance in cultured bacteria from hot springs as indicators of environmental intrinsic resistance and tolerance levels. *Environmental Pollution* 249, 696–702.
- Jennerjahn, T.C., 2012. Biogeochemical response of tropical coastal systems to present and past environmental change. *Earth-Science Reviews* 114, 19–41.
- Jiang, X., Zhang, J., Zhou, B., Hu, X., Zhu, Z., Chang, C., Lü, J., Song, B., 2017. Anomalous behavior of membrane fluidity caused by copper-copper bond coupled phospholipids. *Biological Physics* 8, 14093.
- Jin, R., Liu, Y., Liu, G., Tian, T., Qiao, S., Zhou, J., 2017. Characterization of Product and Potential Mechanism of Cr (VI) Reduction by Anaerobic Activated Sludge in a Sequencing Batch Reactor. *Scientific Reports* 7, 16-81.
- Johnson, C.W., Beckham, G.T., 2015. Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin. *Metabolic Engineering* 28, 240–247.
- Jorfi, S., Rezaee, A., Jaafarzadeh, N.A., Esrafil, A., Akbari, H., Ali, G.A., 2014. Bioremediation of pyrene-contaminated soils using biosurfactant. *Jentashapir Journal of Health Research* 5, e23228.
- Jørgensen, N.O.G., Brandt, K.K., Nybroe, O., Hansen, M., 2010. *Vogesella mureinivorans* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from lake water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2467–2472.
- Joshi, B.H., Modi, K.G., 2012. Screening and Characterization of Heavy Metal Resistant Fungi for its Prospects in Bioremediation of Contaminated Soil. *J. Environ. Res. Develop.* 7, 1531–1538.
- Jost, L., 2007. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* 88, 2427–2439.
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., Wagner, M., 2002. The Microbial Community Composition of a Nitrifying-Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 84–99.
- Kanally, R.A., Bartha, R., Watanabe, K., Harayama, S., 2000. Rapid Mineralization of Benzo pyrene by a Microbial Consortium Growing on Diesel Fuel. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4205–4211.

- Kang, Y., Park, W., 2010. Protection against diesel oil toxicity by sodium chloride-induced exopolysaccharides in *Acinetobacter* sp. strain DR1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109, 118–123.
- Kanu, I., Achi, O., 2011. Industrial effluents and their impact on water quality of receiving rivers in Nigeria. *Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation* 1, 75–86.
- Karbownik, M., Garcia, J.J., Lewiński, A., Reiter, R.J., 2001. Carcinogen-Induced, Free Radical-Mediated Reduction in Microsomal Membrane Fluidity: Reversal by Indole-3-propionic Acid. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33, 73–78.
- Kates, M., 1972. Radioisotopic techniques in lipidology, in: *In Techniques in Lipidology*. pp. 498–500.
- Kavitha, V., Radhakrishnan, N., Gnanamani, A., Mandal, A.B., 2011. Management of chromium induced oxidative stress by marine *Bacillus licheniformis*. *Biology and Medicine* 3, 16–26.
- Keerthi, Suganthi, V., Mahalakshmi, M., Balasubramanian, N., 2013. Development of hybrid membrane bioreactor for tannery effluent treatment. *Desalination* 309, 231–236.
- Kern, R., Joseleau-Petit, D., Chattopadhyay, M.K., Richarme, G., 2001. Chaperone-like Properties of Lysophospholipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 1268–1274.
- Keweloh, H., Weyrauch, G., Rehm, H.J., 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 33, 66–71.
- Kiliç, N.K., Kürkçü, G., Kumruoğlu, D., Dönmez, G., 2015. EPS production and bioremoval of heavy metals by mixed and pure bacterial cultures isolated from Ankara Stream. *Water Science and Technology* 72, 1488–1494.
- Kim, I.-S., Ekpeghere, K.I., Ha, S.-Y., Kim, B.-S., Song, B., Kim, J.-T., Kim, H.-G., Koh, S.-C., 2014. Full-scale biological treatment of tannery wastewater using the novel microbial consortium BM-S-1. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 49, 355–364.
- Kindt R, C.R., 2005. Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. Nairobi (Kenya). World Agroforestry Centre (ICRAF).
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2012. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41, e1.
- Koch, C., Günther, S., Desta, A.F., Hübschmann, T., Müller, S., 2013. Cytometric fingerprinting for analyzing microbial intracommunity structure variation and identifying subcommunity function. *Nature Protocols* 8, 190–202.
- Koechler, S., Farasin, J., Cleiss-Arnold, J., Arsène-Ploetze, F., 2015. Toxic Metal Resistance in Biofilms: Diversity of Microbial Responses and Their Evolution. *Research in Microbiology* 166, 764–773.
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. Microbial sciences: The superficial life of microbes. *Nature* 441, 300–302.
- Kooijman, E., Testerink, C., 2010. Phosphatidic Acid: An Electrostatic/Hydrogen-Bond Switch?, in *Lipid Signaling in Plants*. Plant Cell Monographs. p. vol 16.
- Korbsrisate, S., Tomaras, A.P., Damnin, S., Ckumdee, J., Srinon, V., Lengwehasatit, I., Vasil, M.L., Suparak, S., 2007. Characterization of two distinct phospholipase C enzymes from *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 153, 1907–1915.
- Krastanov, A., Alexieva, Z., Yemendzhiev, H., 2013. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng. Life Sci.* 13, 76–87.
- Krishnan, V., Ahmad, D., Jeru, J.B., 2008. Influence of COD:N:P ratio on dark greywater treatment using a sequencing batch reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 83, 756–762.
- Krishnaveni, R., Devi, Y.P., Rao, S.R., 2013. Bioremediation of Steel Industrial Effluents Using Soil Microorganisms. *International Journal of Biotechnology and Research* 4, 51–56.
- Kuang, J.-L., Huang, L.-N., Chen, L.-X., Hua, Z.-S., Li, S.-J., Hu, M., Li, J.-T., Shu, W.-S., 2012. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *The ISME Journal* 7, 1038–1050.
- Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V.D., Dhewa, T., 2011. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. *International Journal of Environmental Sciences* 1, 1079–1093.
- Kumari, V., Kumar, S., Haq, I., Yadav, A., Singh, V., Ali, Z., Raj, A., 2014. Effect of tannery effluent toxicity on seed germination á-amylase activity and early seeding growth of Mung Bean (*Vigna Radiata*) seeds. *International Journal of Latest Research in Science and Technology* 4, 165–170.
- Kurata, Y., Ono, Y., Ono, Y., 2008. Occurrence of phenols in leachates from municipal solid waste landfill sites in Japan. *Journal of Material Cycles and Waste Management* 10, 144–152.
- Laha, S., Tansel, B., Ussawarujikulchai, A., 2009. Surfactant–soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: A review. *Journal of Environmental*

- Management 90, 95–100.
- Lai, C.C., Huang, Y.C., Wei, Y.H., Chang, J.S., 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J Hazard Mater* 167, 609–614.
- Lakowicz, J.R., 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd edn. New York, NY, USA: Kluwer Academic.
- Lalnunhlimi, S., Veenagayathri, K., 2016. Decolorization of azo dyes by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 39–46.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Thanasekaran, K., Moletta, R., Godon, J.J., 2006. Microbial diversity in hypersaline wastewater: the example of tanneries. *Extremophiles* 10, 505–513.
- Leta, S., Assefa, F., Dalhammar, G., 2005. Enhancing biological nitrogen removal from tannery effluent by using the efficient *Brachymonas denitrificans* in pilot plant operations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 545–552.
- Li, J., Lin, S., Qin, S., 2016. Characteristics of Sediment Bacterial Community in Response to Environmental Impacts in a Sewage Polluted River. *Journal of Coastal Research* 196–206.
- Li, R., Ning, X. an, Sun, J., Wang, Y., Liang, J., Lin, M., Zhang, Y., 2015. Decolorization and biodegradation of the Congo red by *Acinetobacter baumannii* YNWH 226 and its polymer production's flocculation and dewatering potential. *Bioresource Technology* 194, 233–239.
- Li, W.W., Yu, H.Q., 2014. Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresource Technology* 160, 15–23.
- Li, H., Shen, T.-T., Wang, X.-L., Lin, K.-F., Liu, Y.-D., Lu, S.-G., Gu, J.-D., Wang, P., Lu, Q., Du, X.-M., 2013. Biodegradation of perchloroethylene and chlorophenol co-contamination and toxic effect on activated sludge performance. *Bioresource Technology* 137, 286–293.
- Li, T., Deng, X.P., Wang, J.J., Zhao, H., Wang, L., Qian, K., 2012. Biodegradation of 3,4-dichloroaniline by a novel *Myroides odoratimimus* strain LWD09 with moderate salinity tolerance. *Water, Air, and Soil Pollution* 223, 3271–3279.
- Li, M., Hong, Y., Wang, X., 2009. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 927–935.
- Li, B., Pan, D., Zheng, J., Cheng, Y., Ma, X., Huang, F., Lin, Z., 2008. Microscopic investigations of the Cr(VI) uptake mechanism of living *Ochrobactrum anthropi*. *Langmuir* 24, 9630–9635.
- Li, J., Mclandsborough, L.A., 1999. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. *International Journal of Food Microbiology* 53, 185–193.
- Liang, H., Ye, D., Luo, L., 2017. Unravelling diversity and metabolic potential of microbial consortia at each stage of leather sewage treatment. *RSC Advances* 7, 41727–41737.
- Liang, H., Ye, D., Li, P., Su, T., Wua, J., Luo, L., 2016. Evolution of bacterial consortia in an integrated tannery wastewater treatment process. *RSC Advances* 6, 87380–87388.
- Lindemann, S.R., Bernstein, H.C., Song, H.-S., Fredrickson, J.K., Fields, M.W., Shou, W., Johnson, D.R., Beliaev, A.S., 2016. Engineering microbial consortia for controllable outputs. *The Isme Journal* 10, 2077.
- Litman, B.J., Barenholz, Y.B.T.-M. in E., 1982. Fluorescent probe: Diphenylhexatriene, in *Biomembranes - Part H: Visual Pigments and Purple Membranes - I*. Academic Press, pp. 678–685.
- Liu, Y., Zhu, L., 2017. Enhanced treatment of dispersed dye-production wastewater by self-assembled organobentonite in a one-step process with poly-aluminium chloride. *Scientific Reports* 7, 1–10.
- Liu, X., Chen, Y., Zhang, X., Jiang, X., Wu, S., Shen, J., Sun, X., Li, J., Lu, L., Wang, L., 2015. Aerobic granulation strategy for bioaugmentation of a sequencing batch reactor (SBR) treating high strength pyridine wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 295, 153–160.
- Liu, Y., Dong, Q., Shi, H., 2015. Distribution and population structure characteristics of microorganisms in urban sewage system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 7723–7734.
- Liu, H.H., Yang, Y.R., Shen, X.C., Zhang, Z.L., Shen, P., Xie, Z.X., 2008. Role of DNA in Bacterial Aggregation. *Current Microbiology* 57, 139–144.
- Liu, A., Ahn, I.-S., Mansfield, C., Lion, L.W., Shuler, M.L., Ghiorse, W.C., 2001. Phenanthrene desorption from soil in the presence of bacterial extracellular polymer: observations and model predictions of dynamic behavior. *Water Research* 35, 835–843.
- 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 Biotechnologica* 22, 235–243.
- Lofrano, G., Meriç, S., Zengin, G.E., Orhon, D., 2013. Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: A review. *Science of the Total Environment* 461–462, 265–281.

- Longo, G., Kasas, S., 2014. Effects of antibacterial agents and drugs monitored by atomic force microscopy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 6, 230–244.
- Lopes, A.R., Danko, A.S., Manaia, C.M., Nunes, O.C., 2013. Molinate biodegradation in soils: natural attenuation versus bioaugmentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 2691–2700.
- López, G.A., Heredia, R.M., Boeris, P.S., Lucchesi, G.I., 2016. Content of cardiolipin of the membrane and sensitivity to cationic surfactants in *Pseudomonas putida*. *Journal of Applied Microbiology* 121, 1004–1014.
- Lorenzen, W., Bozhüyük, K.A.J., Cortina, N.S., Bode, H.B., 2014. A comprehensive insight into the lipid composition of *Myxococcus xanthus* by UPLC-ESI-MS. *Journal of lipid research* 55, 2620–2633.
- Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J., Knight, R., 2011. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal* 5, 169–172.
- Lozupone, C.A., Knight, R., 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 11436 LP-11440.
- Lu, J., 2015. Chapter 6 - Identification of Forensic Information from Existing Conventional Site-Investigation Data, in *Introduction to Environmental Forensics (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 149–164.
- Lyu, J., Park, J., Kumar Pandey, L., Choi, S., Lee, H., De Saeger, J., Depuydt, S., Han, T., 2018. Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 149, 225–232.
- Ma, X., Wu, C., Jun, H., Zhou, R., Shi, B., 2018. Microbial community of tannery wastewater involved in nitrification revealed by illumina MiSeq sequencing. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1168–1177.
- Ma, Q., Qu, Y., Shen, W., Zhang, Z., Wang, J., Liu, Z., Li, D., Li, H., Zhou, J., 2015. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresource Technology* 179, 436–443.
- Mabrouk, M.E.M., Arayes, M.A., Sabry, S.A., 2014. Hexavalent chromium reduction by chromate-resistant haloalkaliphilic *Halomonas* sp. M-Cr newly isolated from tannery effluent. *Biotechnology, Biotechnological Equipment* 28, 659–667.
- Magic-Knezev, A., Wullings, B., der Kooij, D., 2009. *Polaromonas* and *Hydrogenophaga* species are the predominant bacteria cultured from granular activated carbon filters in water treatment. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1457–1467.
- Maier, R.M., 1999. Biochemical cycling, in *Environmental Microbiology*, Ed. Maier, R.M., Pepper, I.L. AndGerba. Canada: Academic Press. pp. 319–346.
- Maisuria, V.B., Hosseinidoust, Z., Tufenkji, N., 2015. Polyphenolic extract from maple syrup potentiates antibiotic susceptibility and reduces biofilm formation of pathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 3782–3792.
- Makkar, R.S., Rockne, K.J., 2003. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2280–2292.
- Malaviya, P., Singh, A., 2014. Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters. *Critical Reviews in Microbiology* 00, 1–27.
- Malki, M., Marín, I., Essahale, A., Amils, R., Moumni, M., 2009. Physico-chemical parameters and bacterial diversity in the Moroccan's Sebou River. *Journal of Food Agriculture and Environment* 6, 132–136.
- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30, 261–278.
- Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H., Kawai, F., 2006. A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 254–259.
- Mangaiyarkarasi, M.S.M., Rao, T.S., Tata, B.V.R., 2011. Bioreduction of Cr (VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18, 157–167.
- Mann, R.M., Hyne, R. V, Choung, C.B., Wilson, S.P., 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157, 2903–2927.
- Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., Mendoza, D. De, 2004. Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors. *Journal of bacteriology* 186, 6681–6688.
- Mark Ibekwe, A., Leddy, M.B., Bold, R.M., Graves, A.K., 2012. Bacterial community composition in low-flowing river water with different sources of pollutants. *FEMS Microbiology Ecology* 79, 155–166.

- Markowicz, A., Płociniczak, T., Piotrowska-seget, Z., 2010. Response of Bacteria to Heavy Metals Measured as Changes in FAME Profiles 19, 957–965.
- Marquez-Rocha, F., 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution* 128, 313–320.
- Marquis, O., Millery, A., Guittonneau, S., Miaud, C., 2006. Solvent toxicity to amphibian embryos and larvae. *Chemosphere* 63, 889–892.
- Marti, E., Balcázar, J.L., 2014. Use of pyrosequencing to explore the benthic bacterial community structure in a river impacted by wastewater treatment plant discharges. *Research in Microbiology* 165, 468–471.
- Martín, J.A.R., Arana, C. De, Ramos-Miras, J.J., Gil, C., Boluda, R., 2015. Impact of 70 years urban growth associated with heavy metal pollution. *Environmental Pollution* 196, 156–163.
- Martínez-Estévez, M., Palma, G.R.-D., Muñoz-Sánchez, J.A., Brito-Argáez, L., Loyola-Vargas, V.M., Teresa Hernández-Sotomayor, S.M., 2003. Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal of Plant Physiology* 160, 1297–1303.
- Martínez-Santos, M., Lanzén, A., Unda-Calvo, J., Martín, I., Garbisu, C., Ruiz-Romera, E., 2018. Treated and untreated wastewater effluents alter river sediment bacterial communities involved in nitrogen and sulphur cycling. *Science of The Total Environment* 633, 1051–1061.
- Mary, M.S., Gopal, J., Tata, B.V.R., Rao, T.S., Vincent, S., 2008. A Confocal microscopic study on colony morphology and sporulation of *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 2435–2442.
- Masood, F., Malik, A., 2013. Cytotoxic and genotoxic potential of tannery waste contaminated soils. *Science of The Total Environment* 444, 153–160.
- Matoba, Y., Katsube, Y., Sugiyama, M., 2002. The crystal structure of prokaryotic phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry* 277, 20059–20069.
- 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.
- Max, B., Tugores, F., Cortés-Diéguez, S., Domínguez, J.M., 2012. Bioprocess Design for the Microbial Production of Natural Phenolic Compounds by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168, 2268–2284.
- McGuinness, M., Dowling, D., 2009. Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. *International journal of environmental research and public health* 6, 2226–2247.
- Merchant, M.M., Welsh, A.K., McLean, R.J.C., 2007. *Rheinheimera texasensis* sp. nov., a halointolerant freshwater oligotroph. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2376–2380.
- Metcalfe, L., Eddy, H.P., Tchobanoglous, G., 2014. *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. fifth ed. McGraw-Hill, London.
- Metcalfe and Eddy, I., 1991. *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal, and Reuse*, 3rd ed. Tchobanoglous, G., Burton, F.L. and Stensel, H.D. New York: McGraw-Hill, Inc.
- Michałowicz, J., Posmyk, M., Duda, W., 2009. Chlorophenols induce lipid peroxidation and change antioxidant parameters in the leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Physiology* 166, 559–568.
- Michałowicz, J., Duda, W., 2007. Phenols – Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies* 16, 347–362.
- Michel, G., 1979. The changes in cell size and phospholipid composition during growth of a chain-forming envC mutant of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 100, 1–3.
- Mielczarek, A.T., Nguyen, H.T.T., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., 2013. Population dynamics of bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal in Danish wastewater treatment plants. *Water Research* 47, 1529–1544.
- Mishra, A., Mishra, K.P., 2015. Bacterial Response as Determinant of Oxidative Stress by Heavy Metals and Antibiotic. *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences* 2, 229–239.
- Moazzenipour, B., Salehpour, A., Ahansazan, B., Ghorbanian, S., Rashedi, H., 2017. The removal investigation of coconut acid surfactants in activated sludge's system. *Journal of Ecological Engineering* 18, 68–73.
- Modoi, C., Roba, C., Török, Z., Ozunu, A., 2014. Environmental risks due to heavy metal pollution of water resulted from mining wastes in NW Romania. *Environmental engineering and management journal* 13, 2325–2336.
- Moehren, G., Gustavsson, L., Hoek, J.B., 1994. Activation and Desensitization of Phospholipase-D in Intact Rat Hepatocytes 240. *Journal of Biological Chemistry* 269, 838–848.
- Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces

- enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 255–261.
- Moorman, M.A., Thelemman, C.A., Zhou, S., Pestka, J.J., Linz, J.E., Ryser, E.T., 2008. Altered Hydrophobicity and Membrane Composition in Stress-Adapted *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection* 71, 182–185.
- More, T.T., Yadav, J.S.S., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management* 144, 1–25.
- Moriarty, F., 1999. *Ecotoxicology: The study of pollutants in ecosystems*. 3rd Ed. Academic Press, London.
- Morii, H., Ogawa, M., Fukuda, K., Taniguchi, H., 2014. Ubiquitous distribution of phosphatidylinositol phosphate synthase and archaetidylinositol phosphate synthase in Bacteria and Archaea, which contain inositol phospholipid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443, 86–90.
- Morii, H., Ogawa, M., Fukuda, K., Taniguchi, H., Koga, Y., 2010. A revised biosynthetic pathway for phosphatidylinositol in *Mycobacteria*. *The Journal of Biochemistry* 148, 593–602.
- Morita, Y.S., Fukuda, T., Sena, C.B.C., Yamaryo-Botte, Y., McConville, M.J., Kinoshita, T., 2011. Inositol lipid metabolism in mycobacteria: biosynthesis and regulatory mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 1810, 630–41.
- Morita, Y.S., Yamaryo-botte, Y., Miyanagi, K., Callaghan, J.M., Patterson, J.H., Crellin, P.K., Coppel, R.L., Billman-jacobe, H., Kinoshita, T., Mcconville, M.J., 2010. Stress-induced Synthesis of Phosphatidylinositol 3-Phosphate in *Mycobacteria*. *The Journal of biological chemistry* 285, 16643–16650.
- Morris, B.E.L., Henneberger, R., Huber, H., Moissl-Eichinger, C., 2013. Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 384–406.
- Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P., 2010. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. Imperial College Press.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluorid-methanol. *Journal of Lipid Research* 5, 600–608.
- Motahari, A., Bresler, G., 2012. Information Theory of DNA Shotgun Sequencing. *IEE Transactions on Information Theory* 59, 6273–6289.
- Mueller, K., González, J.E., 2011. Complex regulation of symbiotic functions is coordinated by MucR and quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 193, 485–496.
- Mueller, J.G., Resnick, S.M., Shelton, M.E., Pritchard, P.H., 1992. Effect of inoculation on the biodegradation of wathered Prudhoe Bay crude oil. *Journal of Industrial Microbiology* 10, 95–102.
- Mulcahy, H., Charron-mazenod, L., Lewenza, S., 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens* 4, e1000213.
- Munnik, T., 2014. PI-PLC: Phosphoinositide-Phospholipase C in Plant Signaling Phospholipases in plant signaling, Phospholipases in plant signaling, signaling and communication in plants 20, pp.27-54.
- Munnik, T., Vermeer, J.E.M., 2010. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* 33, 655–669.
- Munnik, T., Arisz, S., De Vrije, T., Musgrave, a, Cell, T.P., Munnik, T., Amsterdam, B., 1995. G Protein Activation Stimulates Phospholipase D Signaling in Plants. *The Plant cell* 7, 2197–2210.
- Murínová, S., Dercová, K., 2014. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *International journal of microbiology* 2014, 873081.
- Murínová, S., Dercová, K., Čertík, M., Lászlóvá, K., 2014. The adaptation responses of bacterial cytoplasmic membrane fluidity in the presence of environmental stress factors — polychlorinated biphenyls and 3-chlorobenzoic acid. *Biologia* 69, 428–434.
- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Ferroni, G.D., Leduc, L.G., 2011. Cytoplasmic membrane response to copper and nickel in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiological Research* 166, 186–206.
- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Leduc, L.G., Ferroni, G.D., 2007. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 95, 60–82.
- Naik, U.C., Srivastava, S., Thakur, I.S., 2012. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* IST105 from electroplating effluent for detoxification of hexavalent chromium. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 3005–3014.
- Nampoothiri, K.M., Hoischen, C., Bathe, B., Haedrich, B., Pfeifferle, W., Krumbach, K., Sahn, H., Eggeling, L., 2002. Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology* 58, 89–96.
- Narain, K., Bhat, M.M., Abhilash, P.C., Yunus, M., 2012. Impact of distillery effluent on seedling growth and pigment concentration of *Cicer arietinum* L. *Journal of Environmental Research And Development* 6, 601–608.
- Navari-Izzo, F., Cestone, B., Cavallini, A., Natali, L., Giordani, T., Quartacci, M.F., 2006. Copper excess triggers

- phospholipase D activity in wheat roots. *Phytochemistry* 67, 1232–1242.
- Nazir, A., Iftikhar, S., Abbas, M., Iqbal, M., Ahmad, I., 2019. Toxicity evaluation of tannery effluents using bioassays Toxicity evaluation of tannery effluents using bioassays. *Current Science Perspectives* 5, 29–39.
- Nemergut, D.R., Schmidt, S.K., Fukami, T., O'Neill, S.P., Bilinski, T.M., Stanish, L.F., Knelman, J.E., Darcy, J.L., Lynch, R.C., Wickey, P., Ferrenberg, S., 2013. Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and molecular biology reviews* : 77, 342–356.
- Nesvera, 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. *Advances in Applied Microbiology* 93, 1–53.
- Nguema, P.F., Luo, Z., Lian, J., 2015. The biosorption of Cr(VI) ions by dried biomass obtained from a chromium-resistant bacterium. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 8, 454–464.
- Ngwenya, N., Chirwa, E.M.N., 2011. Biological removal of cationic fission products from nuclear wastewater. *Water Science and Technology* 63, 124–128.
- Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N., 2009. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84, 802–807.
- Nina, S., Ludmila, D., Svetlana, B., Olga, N., Olga, P., Valery, S., Mikhail, B., 2013. Effect of phenol-induced changes in lipid composition on conformation of OmpF-like porin of *Yersinia pseudotuberculosis*. *FEBS Letters* 587, 2260–2265.
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B., Pandian, S.K., 2011. Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. *Marine Environmental Research* 71, 283–294.
- Niu, T., Zhou, Z., Shen, X., Qiao, W., Jiang, L.-M., Pan, W., Zhou, J., 2016. Effects of dissolved oxygen on performance and microbial community structure in a micro-aerobic hydrolysis sludge in situ reduction process. *Water Research* 90, 369–377.
- Noorjahan, C.M., 2014. Physicochemical Characteristics, Identification of Fungi and Biodegradation of Industrial Effluent. *Journal of Environment and Earth Science* 4, 32–39.
- Novotnik, B., Zuliani, T., Ščančar, J., Milačič, R., 2014. Inhibition of the nitrification process in activated sludge by trivalent and hexavalent chromium, and partitioning of hexavalent chromium between sludge compartments. *Chemosphere* 105, 87–94.
- Nzila, A., Razzak, S.A., Zhu, J., 2016. Bioaugmentation: An emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13, e846.
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* 28, 449–461.
- Ochoa, J.J., Vilchez, M.J., Palacios, M.A., Garcia, J.J., Reiter, R.J., Munoz-Hoyos, A., 2003. Melatonin protects against lipid peroxidation and membrane rigidity in erythrocytes from patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *Journal of Pineal Research* 35, 104–108.
- Ojeda Suárez, J.T., 2004. Manual de análisis de aguas residuales.
- Okabe, S., Shimazu, Y., 2007. Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 935–944.
- Okazaki, Y., Saito, K., 2014. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant Journal* 79, 584–596.
- Oliver, J.D., Colwell, R.R., 1973. Extractable Lipids of Gram-Negative Marine Bacteria: Phospholipid Composition. *Journal of Bacteriology* 114, 897–908.
- Onbasli, D., Aslim, B., 2009. Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some *Pseudomonas* spp. strains. *Journal of Hazardous Materials* 168, 64–67.
- Ontañón, O.M., Landi, C., Carleo, A., Gagliardi, A., Bianchi, L., González, P.S., Agostini, E., Bini, L., 2018a. What makes *A. guillouiae* SFC 500-1A able to co-metabolize phenol and Cr(VI)? A proteomic approach. *Journal of Hazardous Materials* 354, 215–224.
- Ontañón, O.M., Fernandez, M., Agostini, E., González, P.S., 2018b. Identification of the main mechanisms involved in the tolerance and bioremediation of Cr (VI) by *Bacillus* sp. SFC 500-1E. *Environ Sci Pollut Res* 25, 16111–16120.
- Ontañón, O.M., González, P.S., Barros, G.G., Agostini, E., 2017. Improvement of simultaneous Cr(VI) and phenol removal by an immobilised bacterial consortium and characterisation of biodegradation products. *New Biotechnology* 37, 172–179.
- Ontañón, O.M., 2016. Biorremediación de Cr(VI) y fenol utilizando bacterias autóctonas de la provincia de

- Córdoba. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Ontañón, O.M., González, P.S., Agostini, E., 2015a. Optimization of simultaneous removal of Cr (VI) and phenol by a native bacterial consortium: Its use for bioaugmentation of co-polluted effluents. *Journal of Applied Microbiology* 119, 1011–1022.
- Ontañón, O.M., González, P.S., Agostini, E., 2015b. Biochemical and molecular mechanisms involved in simultaneous phenol and Cr(VI) removal by *Acinetobacter guillouiae* SFC 500-1A. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 13014–13023.
- Ortiz-Hernández, M.L., Rodríguez, A., Sánchez-Salinas, E., Castrejón-Godínez, M.L., 2014. Bioremediation of Soils Contaminated with Pesticides: Experiences in Mexico, in *Current Research and Perspectives*. Springer International Publishing, Cham, pp. 69–99.
- Osibanjo, O., Daso, A.P., M. Gbadebo, A., 2011. The impact of industries on surface water quality of River Ona and River Alaro in Oluyole Industrial Estate, Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 10, 696–702.
- Ozturk, S., Aslim, B., Suludere, Z., 2009. Bioresource Technology Evaluation of chromium (VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource Technology* 100, 5588–5593.
- Padmaperuma, G., Kapoore, R.V., Gilmour, D.J., Vaidyanathan, S., 2018. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. *Critical Reviews in Biotechnology* 38, 690–703.
- Pal, A., Paul, A.K., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal Microbiology* 48, 49–64.
- Pampín, R.M., Sáez, G.V., Lorber, K.E., Romegialli, F.M., 2007. Producción limpia en la industria de curtiembre. Universidad de Santiago de Compostela.
- Pan, X., Liu, Z., Chen, Z., Cheng, Y., Pan, D., Shao, J., Lin, Z., Guan, X., 2014. Investigation of Cr(VI) reduction and Cr(III) immobilization mechanism by planktonic cells and biofilms of *Bacillus subtilis* ATCC-6633. *Water research* 55, 21–9.
- Panda, S.K., Choudhury, S., 2005. Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 95–102.
- Pande, S., Kost, C., 2017. Bacterial Unculturability and the Formation of Intercellular Metabolic Networks. *Trends in Microbiology* 25, 349–361.
- Pandey, B., Fulekar, M.H., 2012. Bioremediation technology: A new horizon for environmental. *Biology and Medicine* 4, 51–59.
- Pandey, S., Nautiyal, B., Sharma, C., 2008. Pollution level in distillery effluent and its phytotoxic effect on seed germination and early growth of maize and rice. *Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology, India* 29, 267–270.
- Papadopoulou, E.S., Genitsaris, S., Omirou, M., Perruchon, C., Stamatopoulou, A., Ioannides, I., Karpouzias, D.G., 2018. Bioaugmentation of thiabendazole-contaminated soils from a wastewater disposal site: Factors driving the efficacy of this strategy and the diversity of the indigenous soil bacterial community. *Environmental Pollution* 233, 16–25.
- Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A., 2016. Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* 18, 1403–1414.
- Park, J., Yoon, J. hyun, Depuydt, S., Oh, J.W., Jo, Y. min, Kim, K., Brown, M.T., Han, T., 2016. The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 147–153.
- Park, S., Jung, Y.-T., Kim, S., Yoon, J.-H., 2016. *Marinobacterium aestuariivivens* sp. nov., isolated from a tidal flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 1718–1723.
- Parsons, J.B., Rock, C.O., 2014. Bacterial Lipids: Metabolism and Membrane Homeostasis. *Prog Lipid Res.* 52, 249–276.
- Patel, S., Homaei, A., Patil, S., Daverey, A., 2019. Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 27–37.
- Patil, P.S., 2016. Decolorization, Degradation and Kinetic Study of Textile Dye Navy Blue HE2R using Immobilized Bacterial Consortium PMB11. *Journal of Environmental Science and Pollution Research* 2, 99–102.
- Paul, E., Plisson-Saune, S., Mauret, M., Cantet, J., 1998. Process state evaluation of alternating oxic-anoxic activated sludge using ORP, pH and DO. *Water Science and Technology* 38, 299–306.
- Payne, S.M., Mey, A.R., Wyckoff, E.E., 2015. Vibrio Iron Transport: Evolutionary Adaptation to Life in Multiple Environments. *Microbiology and molecular biology reviews* 80, 69–90.

- Payraastre, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M., Gratacap, M.-P., 2001. Phosphoinositides : key players in cell signalling, in time and space. *Cellular Signalling* 13, 377–387.
- Peng, X., Frohman, M.A., 2013. Mammalian Phospholipase D Physiological and Pathological Roles. *Acta Physiologica* 204, 219–226.
- Pepi, M., Heipieper, H.J., Fischer, J., Ruta, M., Volterrani, M., Focardi, S.E., 2008. Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp. ORAs2 and *Pseudomonas* sp. ORAs5 strains. *Extremophiles: life under extreme conditions* 12, 343–9.
- Pérez-Cataluña, A., Collado, L., Salgado, O., Lefiñanco, V., Figueras, M.J., 2018. A polyphasic and taxogenomic evaluation uncovers *Arcobacter cryaerophilus* as a species complex that embraces four genomovars. *Frontiers in Microbiology* 9, 1–14.
- Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., Laval, K., Lebeau, T., Lemanceau, P., Leyval, C., Lindström, K., Pandard, P., Romero, E., Sarr, A., Schloter, M., Simonet, P., Smalla, K., Wilke, B.-M., Martin-Laurent, F., 2011. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples.” *Journal of Microbiological Methods* 84, 454–460.
- Philippot, L., Andersson, S.G.E., Battin, T.J., Prosser, J.I., Schimel, J.P., Whitman, W.B., Hallin, S., 2010. The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nature Reviews Microbiology* 8, 523.
- Philp, J., Atlas, R., 2005. Bioremediation of Contaminated Soils and Aquifers, in: *Bioremediation*. pp. 139–236.
- Pini, C.V., Bernal, P., Godoy, P., Ramos, J.L., Segura, A., 2009. Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Microbial Biotechnology* 2, 253–261.
- Pokotylo, I., Kolesnikov, Y., Kravets, V., Zachowski, A., Ruelland, E., 2014. Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: Variations around a canonical theme. *Biochimie* 96, 144–157.
- Polti, M.A., Amoroso, M.J., Abate, C.M., 2010. Full Paper Chromate reductase activity in *Streptomyces* sp. MC1. *Cultures* 18, 11–18.
- Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., Antonio, D.D., Savini, V., Bonaventura, G. Di, 2008. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiology Letters* 287, 41–47.
- Porwal, H.J., Mane, A. V., Velhal, S.G., 2015. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. *Water Resources and Industry* 9, 1–15.
- Price, J.R., Ledford, S.H., Ryan, M.O., Toran, L., Sales, C.M., 2018. Wastewater treatment plant effluent introduces recoverable shifts in microbial community composition in receiving streams. *Science of The Total Environment* 613–614, 1104–1116.
- Priester, J.H., Olson, S.G., Webb, S.M., Mary, P., Hersman, L.E., Holden, P.A., Priester, J.H., Olson, S.G., Webb, S.M., Neu, M.P., Hersman, L.E., Holden, P.A., 2006. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1988–1996.
- Prieto Contreras, L.F., Alvelar Gonzáles, F.J., Loera Muro, V.M., Quiñones Valles, C., Loera Muro, A., Ramírez López, E.M., Esperanza García, F., Guerrero Barrera, A.L., 2015. Bioflocks structure from enriched lab-scale stabilization ponds used to remove high chromium concentrations. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4, 625–634.
- Prosser, J.I., Bohannan, B.J.M., Curtis, T.P., Ellis, R.J., Firestone, M.K., Freckleton, R.P., Green, J.L., Green, L.E., Killham, K., Lennon, J.J., Osborn, A.M., Solan, M., van der Gast, C.J., Young, J.P.W., 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 5, 384.
- Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28, 1823–1829.
- Puglisi, E., E. Hamon, R., Vasileiadis, S., Coppolecchia, D., Trevisan, M., 2013. Adaptation of Soil Microorganisms to Trace Element Contamination: A Review of Mechanisms, Methodologies, and Consequences for Risk Assessment and Remediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42, 2435–2470.
- Pun, R., Raut, P., Pant, B.R., 2013. Removal of chromium(VI) from leachate using bacterial biomass. *Scientific World* 11, 63–65.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41, 590–596.
- Quince, C., Ijaz, U.Z., Sloan, W.T., Schirmer, M., Hall, N., D’Amore, R., 2015. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research* 43,

- Quince, C., Curtis, T.P., Sloan, W.T., 2008. The rational exploration of microbial diversity. *The Isme Journal* 2, 997.
- Quintelas, C., da Silva, V.B., Silva, B., Figueiredo, H., Tavares, T., 2011. Optimization of production of extracellular polymeric substances by *Arthrobacter viscosus* and their interaction with a 13X zeolite for the biosorption of Cr(VI). *Environmental Technology* 32, 1541–1549.
- Racagni-Di Palma, G., Brito-Argáez, L., Hernández-Sotomayor, S.M.T., 2002. Phosphorylation of signaling phospholipids in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 899–906.
- Raghu, P., Manifava, M., Coadwell, J., Ktistakis, N.T., 2009. Emerging findings from studies of phospholipase D in model organisms (and a short update on phosphatidic acid effectors). *Biochimica et biophysica acta* 1791, 889–897.
- Rajkumar, D., Palanivelu, K., 2004. Electrochemical treatment of industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 113, 123–129.
- Ramette, A., Tiedje, J.M., 2007. Biogeography: An emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microbial Ecology* 53, 197–207.
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C., 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* 21, 321–332.
- Ramos-Díaz, A., Brito-Argáez, L., Munnik, T., Hernández-Sotomayor, S.M.T., 2007. Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta* 225, 393–401.
- Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P., Ramos-gonz, I., Rojas, A., Ter, W., Segura, A., 2002. Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56, 743–68.
- Rangaraj, G., Sousbie, P., Torrijos, M., Bernet, N., Alwar Ramanujam, R., 2014. Nitrification and denitrification characteristics in a sequencing batch reactor treating tannery wastewater. *Clean Technologies and Environmental Policy* 17, 735–745.
- Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology* 57, 369–394.
- Reddy, G. V, Shah, M.P., 2016. Microbial Decolorization of Various Dyes by a *Bacillus subtilis* Strain Isolated from an Industrial Effluent Treatment Plant. *Journal of Advanced Research in Biotechnology* 1, 1–6.
- Remonsellez, F., Castro-Severyn, J., Pardo-Esté, C., Aguilar, P., Fortt, J., Salinas, C., Barahona, S., León, J., Fuentes, B., Areche, C., Hernández, K.L., Aguayo, D., Saavedra, C.P., 2018. Characterization and Salt Response in Recurrent Halotolerant *Exiguobacterium* sp. SH31 Isolated From Sediments of Salar de Huasco, Chilean Altiplano. *Frontiers in microbiology* 9, 2228.
- Renesto, P., Dehoux, P., Gouin, E., Touqui, L., Cossart, P., Raoult, D., 2003. Identification and Characterization of a Phospholipase D–Superfamily Gene in Rickettsiae. *The Journal of Infectious Diseases* 188, 1276–1283.
- Rincon-Florez, V., Carvalhais, L., Schenk, P., 2013. Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology. *Diversity* 5, 581–612.
- Rinklebe, J., Doring, A., Overesch, M., Laing, G. Du, Wennrich, R., Stärk, H.-J., Mothes, S., 2010. Dynamics of mercury fluxes and their controlling factors in large Hg-polluted floodplain areas. *Environmental Pollution* 158, 308–318.
- Ritchie, S., Gilroy, S., 1998. Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2697–702.
- Rittmann, B.E., Hausner, M., Löffler, F., Love, N.G., Muyzer, G., Okabe, S., Oerther, D.B., Peccia, J., Raskin, L., Wagner, M., 2006. A Vista for Microbial Ecology and Environmental Biotechnology. *Environmental Science & Technology* 40, 1096–1103.
- Rizzo, L., Fiorentino, A., Anselmo, A., 2012. Effect of solar radiation on multidrug resistant *E. coli* strains and antibiotic mixture photodegradation in wastewater polluted stream. *Science of The Total Environment* 427–428, 263–268.
- Roma-Rodrigues, C., Santos, P.M., Benndorf, D., Rapp, E., Sá-Correia, I., 2010. Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. *Journal of Proteomics* 73, 1461–1478.
- Romantsov, T., Guan, Z., Wood, J.M., 2009. Biochimica et Biophysica Acta Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *BBA - Biomembranes* 1788, 2092–2100.
- Römbke, J., Moltman, J.F., 1996. *Appl. Ecotoxicol.* Lewis Publishers, New York, USA.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29–33.

- Roth, M.G., 2008. Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* 9, 1233–1239.
- Rowlett, V.W., Mallampalli, V.K.P.S., Karlstaedt, A., Dowhan, W., Taegtmeier, H., Margolin, W., Vitrac, H., 2017. The impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function 1. *Journal of Bacteriology* 199, e00849-16.
- Rozitis, D., Strade, E., 2015. COD reduction ability of microorganisms isolated from highly loaded pharmaceutical wastewater pre-treatment process. *Journal of Materials and Environmental Science* 6, 507–512.
- Ruberto, L., Mac Cormack, W.P., Giuliotti, A.M., Merini, L.J., 2013. Microcosms: a Key Tool for the Scaling Up of Soil Bio/Phytoremediation Processes. *Advances in Environmental Research* 30, 201–228.
- Ruberto, L., Dias, R., Lo Balbo, A., Vazquez, S.C., Hernandez, E.A., Mac Cormack, W.P., 2009. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1101–1110.
- Ruelland, E., Kravets, V., Derevyanchuk, M., Martinec, J., Zachowski, A., Pokotylo, I., 2014. Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environmental and Experimental Botany* 114, 129–143.
- Sabumon, P., 2016. Perspectives on Biological Treatment of Tannery Effluent. *Advances in Recycling & Waste Management* 1, 1.
- Saha, A.K., Dowling, J.N., Mukhopadhyay, N.K., Glew, R.H., 1989. *Legionella micdadei* protein kinase catalyzes phosphorylation of tubulin and phosphatidylinositol. *Journal of Bacteriology* 171, 5103–5110.
- Salehizadeh, H., Shojaosadati, S.A., 2003. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Research* 37, 4231–4235.
- Samanta, A., Bera, P., Khatun, M., Sinha, C., Pal, P., Lalee, A., Mandal, A., 2012. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. *Journal of Microbial. Biotech. Research* 2, 178–189.
- Samantaray, D., Mohapatra, S., Mishra, B.B., 2014. Microbial Bioremediation of Industrial Effluents, in *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier, Oxford, pp. 325–339.
- Samuel, J., Paul, M.L., Ravishankar, H., Mathur, A., Saha, D.P., Natarajan, C., Mukherjee, A., 2013. The differential stress response of adapted chromite mine isolates *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and its impact on bioremediation potential. *Biodegradation* 24, 829–42.
- Samuel, J., Paul, M.L., Pulimi, M., Nirmala, M.J., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2012. Hexavalent chromium bioremoval through adaptation and consortia development from Sukinda chromite mine isolates. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51, 3740–3749.
- Santos, P.M., 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: A Journal of Integrative Biology* 11, 233–251.
- Saranraj, P., Sujitha, D., 2013. Microbial Bioremediation of Chromium in Tannery Effluent: A Review. *International Journal of Microbiological Research* 4, 305–320.
- Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., Birnbaum, S., 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution* 136, 187–195.
- Sarubbo, L., Brasileiro, P., Silveira, G., Luna, J., Rufino, R., 2018. Application of a Low Cost Biosurfactant in the Removal of Heavy Metals in Soil. *Chem Eng Transactions* 64, 433–438.
- Sau, G.B., Chatterjee, S., Mukherjee, S.K., 2010. Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1. *Polish Journal of Microbiology* 59, 185–190.
- Sauder, L.A., Peterse, F., Schouten, S., Neufeld, J.D., 2012. Low-ammonia niche of ammonia-oxidizing archaea in rotating biological contactors of a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Microbiology* 14, 2589–2600.
- Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L., 2011. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLOS ONE* 6, 1–14.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537–7541.
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2005. Introducing MOTHUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and environmental microbiology* 71, 1501–1506.

- Schulz, C.J., Childers, G.W., 2011. Fecal Bacteroidales Diversity and Decay in Response to Variations in Temperature and Salinity. *American Society for Microbiology* 77, 2563–2572.
- Segura, A., Molina, L., Fillet, S., Krell, T., Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., Ramos, J.-L., 2012. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 415–421.
- Segura, A., Bernal, P., Pini, C., Krell, T., Daniels, C., Ramos, J.-L., 2010. Membrane Composition and Modifications in Response to Aromatic Hydrocarbons in Gram Negative Bacteria BT, in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1595–1603.
- Seung, S.B., Jung, J., Chung, D., Baek, K., 2018. *Marinobacterium aestuarii* sp. nov., a benzene-degrading marine bacterium isolated from estuary sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 651–656.
- Seyoum, L., Gumaelius, L., Fassil, A., Dalhammar, G., 2004. Identification of efficient denitrifying bacteria from tannery wastewater in Ethiopia and a study of effects of chromium III and sulphide on their denitrification rate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 405–411.
- Shah, M.U., Moniruzzaman, M., Sivapragasam, M., Talukder, M.M., Yusup, S.B., Goto, M., 2019. A binary mixture of a biosurfactant and an ionic liquid surfactant as a green dispersant for oil spill remediation. *J Mol Liq* 280, 111–119.
- Shankar, S., Kansraj, C., Dinesh, M.G., Satyan, R.S., Kiruthika, S., Tharanipriya, A., 2014. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11, 367–376.
- Sharma, S., Malaviya, P., 2016. Bioremediation of tannery wastewater by chromium resistant novel fungal consortium. *Ecological Engineering* 91, 419–425.
- Sharma, R., Goel, A., 2015. Status of textiles recycling and waste utilization in the Amroha district. *International Journal of Basic and Applied Agricultural Research* 13, 112–116.
- Sharma, S.K., Petrusevski, B., Amy, G., 2008. Chromium removal from water: a review. *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua* 57, 541–553.
- Sharmila, S., Christiana, I., Kiran, P., Reddy, M.V.R., Sankaran, K., Kaliraj, P., 2013. Bacterial lipid modification enhances immunoprophylaxis of filarial abundant larval transcript-2 protein in *Mastomys* model. *Parasite Immunology* 35, 201–213.
- Sharuddin, S.S., Ramli, N., Hassan, M.A., Mustapha, N.A., Amran, A., Mohd-Nor, D., Sakai, K., Tashiro, Y., Shirai, Y., Maeda, T., 2017. Bacterial community shift revealed *Chromatiaceae* and *Alcaligenaceae* as potential bioindicators in the receiving river due to palm oil mill effluent final discharge. *Ecological Indicators* 82, 526–529.
- Sheik, A., Muller, E., Wilmes, P., 2014. A hundred years of activated sludge: time for a rethink. *Frontiers in Microbiology* 5, 47.
- Sheik, C.S., Mitchell, T.W., Rizvi, F.Z., Rehman, Y., Faisal, M., Hasnain, S., McInerney, M.J., Krumholz, L.R., 2012. Exposure of Soil Microbial Communities to Chromium and Arsenic Alters Their Diversity and Structure. *PLOS ONE* 7, 1–13.
- Sheng, G.-P., Zhang, M.-L., Yu, H.-Q., 2008. Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 62, 83–90.
- Sheng, G.P., Yu, H.Q., Yue, Z.B., 2005. Production of extracellular polymeric substances from *Rhodospseudomonas acidophila* in the presence of toxic substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 69, 216–222.
- Sheu, S.-Y., Chen, J.-C., Young, C.-C., Chen, W.-M., 2013. *Vogesellafluminis* sp. nov., isolated from a freshwater river, and emended description of the genus *Vogesella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 3043–3049.
- Shokralla, S., Gibson, J.F., Nikbakht, H., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hajibabaei, M., 2014. Next-generation DNA barcoding: using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources* 14, 892–901.
- Shriparna, M., Dhananjay, K., Nanda, A.K., Ranadhir, C., 2013. 16S rRNA gene sequence analyses of the metagenome derived from waters of river Mahananda at Siliguri: An approach to understand bacterial diversity. *Indian Journal of Biotechnology* 12, 80–87.
- Siddiquee, M., Islam, M.S., Rahman, M.M., 2013. Assessment of pollution caused by tannery-waste and its impact on aquatic bacterial community in Hajaribag, Dhaka. *Stamford Journal of Microbiology* 2, 20–23.
- Sidek, M.S.B.M., 2010. The removal of chromium (VI) and phenol from industrial waste waters mediated by *Acinetobacter haemolyticus*. Masters thesis, Universiti Teknologi Malaysia, Faculty of Science.
- Sidhu, C., Vikram, S., Pinnaka, A.K., 2017. Unraveling the Microbial Interactions and Metabolic Potentials in

- Pre- and Post-treated Sludge from a Wastewater Treatment Plant Using Metagenomic Studies. *Frontiers in microbiology* 8, 1–10.
- Siegel, A.F., 2006. Rarefaction Curves, in *Encyclopedia of Statistical Sciences*. American Cancer Society.
- Siliakus, M.F., van der Oost, J., Kengen, S.W.M., 2017. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles* 21, 651–670.
- Silva-Castro, G., Uad, I., Gonzalez-Lopez, J., G. Fandiño, C., Toledo, F., Calvo, C., 2012. Application of selected microbial consortia combined with inorganic and oleophilic fertilizers to recuperate oil-polluted soil using land farming technology. *Clean Technologies and Environmental Policy* 14, 719–726.
- Singh, Y., Ramteke, P.W., Tripathy, A., Shukla, P.K., 2013. Isolation and Characterization of *Bacillus* resistant to multiple heavy metals. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2, 525–530.
- Sinha, R.K., Herat, S., Bharambe, G., Brahambhatt, A., 2010. Vermistabilization of sewage sludge (biosolids) by earthworms: converting a potential biohazard destined for landfill disposal into a pathogen-free, nutritive and safe biofertilizer for farms. *Waste Management & Research* 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. *Environmental Monitoring and Assessment* 80, 17–31.
- Sivaprakasam, S., Mahadevan, S., Sekar, S., Rajakumar, S., 2008. Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories* 7, 15.
- Slavik, J., 1994. Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology.
- Smith, W.L., Gadd, G.M., 2000. Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Advanced Research in Biotechnology* 88, 983–991.
- Smutek, W., Zdarta, A., Guzik, U., Dudzińska-Bajorek, B., Kaczorek, E., 2015. *Rahnella* sp. strain EK12: Cell surface properties and diesel oil biodegradation after long-term contact with natural surfactants and diesel oil. *Microbiological Research* 176, 38–47.
- Soares, G.M.B., Amorim, M.T.P., Hrdina, R., Costa-Ferreira, M., 2002. Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. *Process Biochemistry* 37, 581–587.
- Sobisch, T., Heß, H., Niebelschütz, H., Schmidt, U., 2000. Effect of additives on biodegradation of PAH in soils. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 162, 1–14.
- Sobrero, M.C., Ronco, A., 2004. Toxicity assay with lettuce seeds. *Toxicological Assays and Water Quality Evaluation Methods, México* 71–79.
- Sohlenkamp, C., Geiger, O., 2015. Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews* 40, 133–159.
- Sohlenkamp, C., López-Lara, I.M., Geiger, O., 2003. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Progress in Lipid Research* 42, 115–162.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1994. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Handbook for Rhizobia.
- Song, H., Ding, M.-Z., Jia, X.-Q., Ma, Q., Yuan, Y.-J., 2014. Synthetic microbial consortia: From systematic analysis to construction and applications. *Chemical Society reviews* 43, 6954–6981.
- Song, J.K., Rhee, J.S., 2001. Enhancement of stability and activity of phospholipase A1 in organic solvents by directed evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1547, 370–378.
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M.C., Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H., McCutcheon, J.P., 2016. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* 353, 488–492.
- Srivastava, N.K., Majumder, C.B., 2008. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 151, 1–8.
- Srivastava, S., Thakur, I.S., 2007. Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter* sp. for removal of hexavalent chromium from tannery effluent. *Biodegradation* 18, 637–646.
- Stadler, L.B., Love, N.G., 2016. Impact of microbial physiology and microbial community structure on pharmaceutical fate driven by dissolved oxygen concentration in nitrifying bioreactors. *Water Research* 104, 189–199.
- Stallwood, B., Shears, J., Williams, P.A., Hughes, K.A., 2005. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *Journal of Applied Microbiology* 99, 794–802.
- Stambulska, U.Y., Bayliak, M.M., Lushchak, V.I., 2018. Chromium(VI) toxicity in legume plants: Modulation effects of rhizobial symbiosis. *BioMed Research International* 2018, 1–13.
- Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., Mamais, D., Lekkas, T.D., 2004. Investigation of Cr (VI) reduction in

- continuous-flow activated sludge systems Investigation of Cr (VI) reduction in continuous-flow activated sludge systems. *Chemosphere* 57, 1069–1077.
- Steinberger, R.E., Holden, P.A., 2005. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5404–5410.
- Storteboom, H., Arabi, M., Davis, J.G., Crimi, B., Pruden, A., 2010. Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine River, urban, and agricultural sources. *Environmental Science and Technology* 44, 1947–1953.
- Strahl, H., Errington, J., 2017. Bacterial Membranes : Structure , Domains , and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 519–38.
- Stubbs, E.B., Kelleher, J.A., Sun, G.Y., 1988. Phosphatidylinositol kinase, phosphatidylinositol-4-phosphate kinase and diacylglycerol kinase activities in rat brain subcellular fractions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 958, 247–254.
- Sukumaran, M., Rama murthy, V., Raveendran, S., Sridhara, G., Netaji, S., 2008. Biodiversity of microbes in tannery effluent. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring* 18, 313–318.
- Sul, W.J., Kim, I.S., Ekpeghere, K.I., Song, B., Kim, B.S., Kim, H.G., Kim, J.T., Koh, S.C., 2016. Metagenomic insight of nitrogen metabolism in a tannery wastewater treatment plant bioaugmented with the microbial consortium BM-S-1. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 51, 1164–1172.
- Sundar, K., Sadiq, I.M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2011. Bioremoval of trivalent chromium using *Bacillus* biofilms through continuous flow reactor. *Journal of Hazardous Materials* 196, 44–51.
- Sungur, Ş., Özkan, A., 2017. Characterization of Wastewaters Obtained from Hatay Tanneries. *Natural and Engineering Sciences* 2, 111–118.
- Suteu, D., Zaharia, C., Bilba, D., Muresan, A., 2009. Decolorization wastewaters from the textile industry – physical methods , chemical methods. *Industria textila* 60, 254–263.
- Sutherland, I.W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3–9.
- Tahmourespour, A., Kermanshahi, R.K., Salehi, R., Nabinejad, A., 2008. The relationship between cell surface hydrophobicity and antibiotic resistance of Streptococcal strains isolated from dental plaque and caries. *Irian Journal of Basic Medical Science* 10, 251–255.
- Tahri Joutey, N., Bahafid, W., Sayel, H., Ananou, S., El Ghachtouli, N., 2014. Hexavalent chromium removal by a novel *Serratia proteamaculans* isolated from the bank of Sebou River (Morocco). *Environmental Science and Pollution Research* 21, 3060–3072.
- Tan, B.K., Bogdanov, M., Zhao, J., Dowhan, W., Raetz, C.R.H., Guan, Z., 2012. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16504–16509.
- Tang, X., Benesch, M.G.K., Brindley, D.N., 2015. Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology. *Journal of Lipid Research* 56, 2048–2060.
- Tannæs, T., Dekker, N., Bukholm, G., Bijlsma, J.J.E., Appelmelk, B.J., 2001. Phase variation in the *Helicobacter pylori* phospholipase A gene and its role in acid adaptation. *Infection and Immunity* 69, 7334–7340.
- Taranto, M.P., Fernandez Murga, M.L., Lorca, G., Valdez, G.F., 2003. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 86–91.
- Tanokura, M., Miyakawa, T., Guan, L., Hou, F., 2015. Bioscience , Biotechnology , and Biochemistry Structural analysis of enzymes used for bioindustry and bioremediation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 79, 1391–401.
- Tekerlekopoulou, A.G., Tsiflikiotou, M., Akritidou, L., Viennas, A., Tsiamis, G., Pavlou, S., Bourtzis, K., Vayenas, D. V., 2013. Modelling of biological Cr(VI) removal in draw-fill reactors using microorganisms in suspended and attached growth systems. *Water Research* 47, 623–636.
- Testerink, C., Munnik, T., 2011. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany* 62, 2349–2361.
- Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., Madamwar, D., 2006. Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. 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. *Journal of Environmental Management* 146, 383–399.
- Thijs, S., Vangronsveld, J., 2015. Rhizoremediation, in: *Principles of Plant-Microbe Interactions*. pp. 277–286.
- Thomassin-Lacroix, E., Eriksson, M., Reimer, K., Mohn, W., 2002. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 551–556.

- Thompson, I.P., Van Der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.C., 2005a. Minireview Bioaugmentation for bioremediation : the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology* 7, 909–915.
- Tiehm, A., 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Applied and environmental microbiology* 60, 258–263.
- Trana, Á.K., Khuller, G., Subrahmanyam, D., 1980. Metabolism of Phospholipids in *Nocardia* polychromogenes. *Journal of general microbiology* 116, 89–92.
- Trevors, J.T., 2003. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 57, 87–103.
- Trigo, A., Valencia, A., Cases, I., 2009. Systemic approaches to biodegradation. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 98–108.
- Tripathi, M., Garg, S.K., 2013. Co-remediation of pentachlorophenol and Cr 6 + by free and immobilized cells of native *Bacillus cereus* isolate: Spectrometric characterization of PCP dechlorination products , bioreactor trial and chromate reductase activity. *Process Biochemistry* 48, 496–509.
- Tripathi, M., Vikram, S., Jain, R.K., Garg, S.K., 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.
- Truu, J., Truu, M., Espenberg, M., Nõlvak, H., Juhanson, J., 2015. Phytoremediation and Plant-Assisted Bioremediation in Soil and Treatment Wetlands: A Review. *The Open Biotechnology Journal* 9, 85–92.
- Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W., Wood, J.M., 2005. The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. *Journal of Biological Chemistry* 280, 41387–41394.
- Tuan, N.N., Hsieh, H.-C., Lin, Y.-W., Huang, S.-L., 2011. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresource Technology* 102, 4232–4240.
- Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., de Carvalho, C.C.C.R., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22, 231–241.
- Uesugi, Y., Arima, J., Iwabuchi, M., Hatanaka, T., 2007. C-terminal loop of *Streptomyces* phospholipase D has multiple functional roles. *Protein Science* 16, 197–207.
- Ugurlu, A., Karahasan Yagci, A., Ulusoy, S., Aksu, B., Bosgelmez-Tinaz, G., 2016. Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6, 698–701.
- Umar, M., Ibrahim, M., Mustapha, M., Mohammed, I., Tashi, U., Obafemi, A., Ahmad, G., 2017. Physicochemical Analysis and Microbiological Assessment of Tannery Effluent Discharged from Tanneries around Nigeria's Kano Industrial Estates. *Journal of Advances in Microbiology* 2, 1–12.
- UN-FAO, 2016. World statistical compendium for raw hides and skins, leather and leather footwear 1999-2015.
- UN-FAO, 2013. World statistical compendium for raw hides and skins, leather and leather footwear 1993-2012.
- US EPA, 1984. Locating and estimating air emission from sources of chromium. EPA 450/4 84: 5-9.
- US EPA Environmental Protection Agency., 2000. Introduction to phytoremediation.
- Valentín-Vargas, A., Toro-Labrador, G., Massol-Deyá, A.A., 2012. Bacterial Community Dynamics in Full-Scale Activated Sludge Bioreactors: Operational and Ecological Factors Driving Community Assembly and Performance. *PLOS ONE* 7, 1–12.
- Van Den Bosch, H., Roy Vagelos, P., 1970. Fatty acyl-coA and fatty acyl-acyl carrier protein as acyl donors in the synthesis of lysophosphatidate and phosphatidate in *Escherichia coli*, in *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Lipids and Lipid Metabolism*. pp. 233–248.
- Van der Gast, C.J., Thompson, I.P., 2005. Effects of pH amendment on metal working fluid wastewater biological treatment using a defined bacterial consortium. *Biotechnology and Bioengineering* 89, 357–366.
- Vanden Hoven, R.N., Santini, J.M., 2004. Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1656, 148–155.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Ho, D.P., Batstone, D.J., Tyson, G.W., 2014. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Current Opinion in Biotechnology* 27, 55–64.
- Varnero, M.T., Rojas, C., Orellana, R., 2007. Phytotoxicity indices of organic residues during composting. *J. Soil Sc Nutr* 7, 28–37.
- Vasconcelos Morais, P., Branco, R., Francisco, R., 2011. Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. *BioMetals* 24, 401–410.

- Vasquez, M.I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Is the evaluation of "traditional" physicochemical parameters sufficient to explain the potential toxicity of the treated wastewater at sewage treatment plants? *Environmental Science and Pollution Research* 20, 3516–3528.
- Vaz-Moreira, I., Varela, A.R., Pereira, T. V., Fochat, R.C., Manaia, C.M., 2016. Multidrug Resistance in Quinolone-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospital Effluent and the Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microbial Drug Resistance* 22, 155–163.
- Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Christie-Oleza, J., Ferrero, M., Bosch, R., Cormack, W.P. Mac, 2013. Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils: Towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 77, 22–30.
- Verma, J.P., Jaiswal, D.K., 2016. Book Review: *Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste*. *Frontiers in Microbiology* 6, 2015–2016.
- Villegas, L.B., Martínez, M.A., Rodríguez, A., Amoroso, M.J., 2014. Microbial Consortia, a Viable Alternative for Cleanup of Contaminated Soils, in *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives*. Springer International Publishing, Cham, pp. 135–148.
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2014. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 38, 633–659.
- Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo, J., 2004. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. *Revista del Instituto Nacional de Ecología* 1–62.
- Vyrides, I., Stuckey, D.C., 2011. Chromium Removal Mechanisms and Bacterial Community in an Integrated Membrane Bioreactor System. *Environmental Engineering Science* 28, 661–670.
- Wagner, M., Nicell, J.A., 2002. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research* 36, 4041–4052.
- Wakelin, S.A., Colloff, M.J., Kookana, R.S., 2008. Effect of wastewater treatment plant effluent on microbial function and community structure in the sediment of a freshwater stream with variable seasonal flow. *Applied and environmental microbiology* 74, 2659–2668.
- Wang, P., Zhao, J., Xiao, H., Yang, W., Yu, X., 2019. Bacterial community composition shaped by water chemistry and geographic distance in an anthropogenically disturbed river. *Science of The Total Environment* 655, 61–69.
- Wang, X., Xia, Y., Wen, X., Yang, Y., Zhou, J., 2014. Microbial Community Functional Structures in Wastewater Treatment Plants as Characterized by GeoChip. *PLOS ONE* 9, 1–10.
- Wang, D., Zheng, W., Liao, D., Li, X., Yang, Q., Zeng, G., 2013. Effect of initial pH control on biological phosphorus removal induced by the aerobic/extended-idle regime. *Chemosphere* 90, 2279–2287.
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., Ding, K., 2012. Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7042 LP-7047.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5261 LP-5267.
- Wang, X., Devaiah, S.P., Zhang, W., Welti, R., 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* 45, 250–278.
- Waranusantigul, P., Lee, H., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Auesukaree, C., 2011. Isolation and characterization of lead-tolerant *Ochrobactrum intermedium* and its role in enhancing lead accumulation by *Eucalyptus camaldulensis*. *Chemosphere* 85, 584–590.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345, 63–65.
- Weber, F.J., Bont, J.A.M. De, 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba)* 1286, 225–245.
- Weber, D.J., Saviteer, S.M., Rutala, W.A., Thomann, C.A., 1988. In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32, 642–645.
- Weiss, J., Beckerdite-quagliata, S., Elsbach, P., 1979. Determinants of the Action of Phospholipase A on the Envelope Phospholipids of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 254, 11010–11014.
- Wellington, E.M.H., Boxall, A.B.A., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M., Williams, A.P., 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases* 13, 155–165.
- Wells, G.F., Park, H.-D., Eggleston, B., Francis, C.A., Criddle, C.S., 2011. Fine-scale bacterial community

- dynamics and the taxa–time relationship within a full-scale activated sludge bioreactor. *Water Research* 45, 5476–5488.
- Wessels Perelo, L., 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials* 177, 81–89.
- Whang, L.M., Liu, P.W.G., Ma, C.C., Cheng, S.S., 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J Hazard Mater* 151, 155–163.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6578 LP-6583.
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5088–5090.
- Wong, K.K., Quilty, B., Hamzah, A., Surif, S., 2015. Phenol Biodegradation and Metal Removal by a Mixed Bacterial Consortium. *Bioremediation Journal* 19, 104–112.
- Wright, G.C., Weiss, J., Kim, K.S., Verheij, H., Elsbach, P., 1990. Bacterial phospholipid hydrolysis enhances the destruction of *Escherichia coli* ingested by rabbit neutrophils. Role of cellular and extracellular phospholipases. *The Journal of Clinical Investigation* 85, 1925–1935.
- Xiao, Z., Zhu, X., Xi, L., Hou, X., Fang, L., Lu, J.R., 2014. Biodegradation of C5-C8 fatty acids and production of aroma volatiles by *Myroides* sp. ZB35 isolated from activated sludge. *Journal of Microbiology* 52, 407–412.
- Xiaoqiang, J., Chang, L., Hao, S., Mingzhu, D., Jin, D., Qian, M., Yingjin, Y., 2016. Design, analysis and application of synthetic microbial consortia. *Synthetic and Systems Biotechnology* 1, 109–117.
- Xu, M., Cao, J., Li, C., Tu, Y., Wu, H., Liu, W., 2018. Operational and biological analyses of branched water-adjustment and combined treatment of wastewater from a chemical industrial park. *Environmental Technology* 39, 253–263.
- Xu, L., Luo, M., Yang, L., Wei, X., Lin, X., Liu, H., 2011. Encapsulation of *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 in alginatecarboxymethyl cellulose capsules for reduction of hexavalent chromium under alkaline conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38, 1709–1718.
- Yadav, A., Mishra, S., Kaithwas, G., Raj, A., Bharagava, R.N., 2016. Organic Pollutants and Pathogenic Bacteria in Tannery Wastewater. *Organic Pollutants and Pathogenic Bacteria in Tannery Wastewater and their Removal Strategies. Microbes and Environmental Management* 7, 120–127.
- Yang, C., Li, Y., Zhou, B., Zhou, Y., Zheng, W., Tian, Y., Van Nostrand, J.D., Wu, L., He, Z., Zhou, J., Zheng, T., 2015. Illumina sequencing-based analysis of free-living bacterial community dynamics during an *Akashiwo sanguine* bloom in Xiamen sea, China. *Scientific Reports* 5, 1–11.
- Yang, C., Zhang, W., Liu, R., Li, Q., Li, B., Wang, S., Song, C., Qiao, C., Mulchandani, A., 2011. Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology* 45, 7408–7415.
- Yang, C., Cheng, Y., Ma, X., Zhu, Y., Holman, H.Y., 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.
- Yang, H., Roberts, M.F., 2002. of a bacterial Ca²⁺-dependent phospholipase D. *Protein Science* 11, 2958–2968.
- Yao, J., Rock, C.O., 2013. Phosphatidic acid synthesis in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831, 495–502.
- Ye, L., Zhang, T., Wang, T., Fang, Z., 2012. Microbial Structures, Functions, and Metabolic Pathways in Wastewater Treatment Bioreactors Revealed Using High-Throughput Sequencing. *Environmental Science & Technology* 46, 13244–13252.
- Yong-Nan, Xiao-Xiao, L., Chen, L.D., Lu, Y., Liang, A.R., Jing, S., Ai-Liang, Z.J., Zhao, H., Ming-Wen, Y., 2017. Phospholipase D and phosphatidic acid mediate heat stress induced secondary metabolism in *Ganoderma lucidum*. *Environmental Microbiology* 19, 4657–4669.
- Yoon, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Choi, K., 2015. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. *Food Research International* 72, 25–36.
- Yoon, J.-H., Kang, S.-J., Ryu, S.H., Jeon, C.O., Oh, T.-K., 2008. *Hydrogenophaga bisanensis* sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 393–397.

- Young, B.J., Riera, N.I., Beily, M.E., Bres, P.A., Crespo, D.C., Ronco, A.E., 2012. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76, 182–186.
- Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J.-L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T.M., Raetz, C.R.H., Lopez-Lara, I.M., Geiger, O., 2010. *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 302–307.
- Zayed, A., Terry, N., 2003. Chromium in the Environment: Factors Affecting Biological Remediation. *Plant and Soil* 249, 139–156.
- Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A., Gedalanga, P., 2018. Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microbial biotechnology* 11, 833–847.
- Zhang, S., Sha, C., Jiang, W., Li, W., Zhang, D., Li, J., Meng, L., Piao, Y., 2015. Ammonium removal at low temperature by a newly isolated heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas fluorescens* wsw-1001. *Environmental Technology* 36, 2488–2494.
- Zhang, X., Qu, Y., Ma, Q., Zhang, Z., Li, D., Wang, J., Shen, W., Shen, E., Zhou, J., 2015. Illumina MiSeq Sequencing Reveals Diverse Microbial Communities of Activated Sludge Systems Stimulated by Different Aromatics for Indigo Biosynthesis from Indole. *PLOS ONE* 10, 1–14.
- Zhang, L., Jiang, J., Yang, J., Hira, D., Furukawa, K., 2012. High rate nitrogen removal by the CANON process at ambient temperature. *Water Science and Technology* 65, 1826–1833.
- Zhang, L., Sun, Y., Guo, D., Wu, Z., Jiang, D., 2012. Molecular diversity of bacterial community of dye wastewater in an anaerobic sequencing batch reactor. *African journal of microbiology research* 6, 286–293.
- Zhang, T., Shao, M.F., Ye, L., 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME Journal* 6, 1137–1147.
- Zhang, D.-F., Li, H., Lin, X.-M., Wang, S.-Y., Peng, X.-X., 2011. Characterization of Outer Membrane Proteins of *Escherichia Coli* in Response to Phenol Stress. *Current Microbiology* 62, 777–783.
- Zhang, Y., Yang, Z., Huang, X., Peng, J., Fei, X., Gu, S., Xie, Y., Ji, C., Mao, Y., 2008. Cloning, Expression, and Characterization of a Thermostable PAP2L2, a New Member of the Type-2 Phosphatidic Acid Phosphatase Family from *Geobacillus toebii* T-85. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72, 3134–3141.
- Zhao, Y., Huang, J., Zhao, H., Yang, H., 2013. Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates. *Bioresource Technology* 143, 439–446.
- Zheng, L., Lin, Y., Lu, S., Zhang, J., Bogdanov, M., 2017. Biogenesis, transport and remodeling of lysophospholipids in Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 1404–1413.
- Zhou, W., Yang, J., Lou, L., Zhu, L., 2011. Solubilization properties of polycyclic aromatic hydrocarbons by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environmental Pollution* 159, 1198–1204.
- Zhu, X., Chen, M., He, X., Xiao, Z., Zhou, H., Tan, Z., 2015. Bioaugmentation treatment of PV wafer manufacturing wastewater by microbial culture. *Water Science and Technology* 72, 754–761.
- Zhu, X., Liu, R., Liu, C., Chen, L., 2015. Bioaugmentation with isolated strains for the removal of toxic and refractory organics from coking wastewater in a membrane bioreactor. *Biodegradation* 26, 465–474.
- Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., 1985. Phytotoxins during the Stabilization of Organic Matter. *Composting of Agricultural and Other Wastes*, Elsevier, London 73–86.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1981. Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle* 22, 54–57.

ANEXO



ANEXO

Tabla A1: Parámetros físico-químicos determinados en muestras de efluentes de curtiembre, en los ensayos en microcosmos, en época invernal.

Parámetros/Efluente	2015					
	Control (flora nativa)			Inoculado con consorcio SFC 500-1 (10%)		
	0	7	14	0	7	14
DQO (mg/L)	2144 ± 126,07 a1	1185,33 ± 27,10 a2	688 ± 48,06 a3	3144,67 ± 29,39 b1	1210 ± 49,78 a2	914,28 ± 78,60 a3
Reducción DQO (%)	0 ± 0,0	44,71 ± 1,26	67,91 ± 1,29	0 ± 0,0	61,51 ± 1,58	70,91 ± 2,5
Fenoles (mg/L)	3,70 ± 0,15	2,52 ± 0,12	0 ± 0,0	3,70 ± 0,15	2,16 ± 0,05	0 ± 0,0
Cr(VI) (mg/L) (DFC)	0,55 ± 0,20	N. D.	N. D.	0,55 ± 0,20	N. D.	N. D.
Viabilidad efluente (UFC/mL)	8,75 ⁶ ± 1,25 ⁶	2,70 ⁸ ± 0,20 ⁸	1,60 ⁷ ± 0,05 ⁷	2,51 ⁷ ± 0,52 ⁷	4,00 ⁸ ± 0,35 ⁸	1,86 ⁶ ± 0,07 ⁶

Efluente/ Parámetros	2016 a														
	Control (flora nativa)			Inoculado con consorcio SFC 500-1						Inoculado con medio de cultivo TY					
				1%			10%			1%			10%		
	0	7	14	0	7	14	0	7	14	0	7	14	0	7	14
DQO (mg/L)	1782,00 ± 310,94 a1	1278,00 ± 76,62 a1	1032,00 ± 93,02 a2	1902,00 ± 42,13 ab1	1086,00 ± 60,67 a2	895,00 ± 40,54 a2	2600,00 ± 176,53 b1	1115,00 ± 75,34 a2	873,00 ± 81,74 a2	2196,00 ± 52,16 ab1	1132,00 ± 208,62 a2	806,00 ± 182,54 a2	2708,00 ± 76,23 b1	1248,00 ± 52,16 a2	1024,00 ± 68,20 a2
Reducción de DQO (%)	0 ± 0,0	28,28 ± 4,30	42,09 ± 5,22	0 ± 0,0	42,90 ± 3,19	52,94 ± 2,13	0 ± 0,0	57,12 ± 2,90	66,42 ± 3,15	0 ± 0,0	48,45 ± 9,50	63,45 ± 4,79	0 ± 0,0	53,91 ± 1,93	62,19 ± 2,52
Fenoles (mg/L)	4,52 ± 0,12	0 ± 0,0	0 ± 0,0	4,52 ± 0,12	0 ± 0,0	0 ± 0,0	4,52 ± 0,12	0 ± 0,0	0 ± 0,0	4,52 ± 0,12	0 ± 0,0	0 ± 0,0	4,52 ± 0,12	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Cr(VI) (mg/L) (DFC)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Viabilidad en efluente (UFC/mL)	8,00 ⁵ ± 0,48 ⁵	7,83 ⁶ ± 1,14 ⁶	1,15 ⁶ ± 0,15 ⁶	1,46 ⁷ ± 0,11 ⁷	1,28 ⁷ ± 0,04 ⁷	1,03 ⁶ ± 0,22 ⁶	6,17 ⁷ ± 0,89 ⁷	1,28 ⁸ ± 0,29 ⁸	1,19 ⁷ ± 0,21 ⁷	8,50 ⁶ ± 1,00 ⁶	4,00 ⁷ ± 0,76 ⁷	1,92 ⁶ ± 0,14 ⁶	1,50 ⁶ ± 0,27 ⁶	1,65 ⁸ ± 0,05 ⁸	6,17 ⁶ ± 1,20 ⁶
Viabilidad sedimento (UFC/mL)	-	-	9,42 ⁷ ± 1,33 ⁷ a	-	-	1,68 ⁸ ± 0,27 ⁸ a	-	-	7,42 ⁸ ± 2,75 ⁸ b	-	-	1,60 ⁸ ± 0,17 ⁸ a	-	-	8,83 ⁸ ± 1,48 ⁸ b
2016 b															
DQO (mg/L)	1661,33 ± 91,51	1783 ± 71,73	665,60 ± 117,96	1816,00 ± 96,29	1648,00 ± 151,22	972,00 ± 124,61	2641,33 ± 127,51	1617 ± 89,95	667,20 ± 100,97	1978,00 ± 90,27	1392,00 ± 148,25	970,00 ± 122,36	2370,00 ± 42,13 b1	2278,00 ± 178,53	1301,33 ± 115,61

	a1	ab1	a2	ab1	a1	ab2	c1	ab2	a3	ab1	a1	ab2		b1	b2
Reducción DQO (%)	0 ± 0,0	0 ± 0,0	66,59 ± 3,23	0 ± 0,0	9,25 ± 8,32	46,47 ± 6,86	0 ± 0,0	38,77 ± 3,40	74,89 ± 4,94	0 ± 0,0	29,63 ± 7,49	50,96 ± 6,18	0 ± 0,0	3,88 ± 3,00	45,09 ±
N (mg/L)	295 ± 8	-	60 ± 5	-	-	-	195 ± 2	-	65 ± 15	-	-	-	-	-	-
Fenoles (mg/L)	0,56 ± 0,16	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,56 ± 0,16	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,56 ± 0,16	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,56 ± 0,16	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,56 ± 0,16	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Cr (VI) (mg/L) (EAA)	N. D.	N. D.	N. D.	-	-	-	N. D.	N. D.	N. D.	-	-	-	-	-	-
Cr total (mg/L) (EAA)	0,216 ± 0,000	0,172 ± 0,000	N. D.	-	-	-	0,216 ± 0,000	0,143 ± 0,000	N. D.	-	-	-	-	-	-
Viabilidad efluente (UFC/mL)	6,83 ⁶ ± 0,87 ⁶	1,33 ⁷ ± 0,09 ⁷	1,01 ⁶ ± 0,39 ⁶	1,68 ⁶ ± 0,08 ⁶	4,75 ⁷ ± 0,24 ⁷	3,49 ⁷ ± 0,98 ⁷	2,42 ⁷ ± 0,45 ⁷	1,57 ⁸ ± 0,08 ⁸	2,89 ⁷ ± 0,68 ⁷	7,50 ⁶ ± 0,86 ⁶	1,70 ⁷ ± 0,21 ⁷	1,52 ⁷ ± 0,12 ⁷	1,20 ⁷ ± 0,06 ⁷	1,23 ⁸ ± 0,09 ⁸	8,67 ⁷ ± 0,44 ⁷
Viabilidad sedimento (UFC/mL)	-	-	9,17 ⁸ ± 0,44 ⁸ a	-	-	4,99 ⁸ ± 1,62 ⁸ a	-	-	8,83 ⁸ ± 0,72 ⁸ a	-	-	6,83 ⁸ ± 0,60 ⁸ a	-	-	9,00 ⁸ ± 1,32 ⁸ a

Los datos representan la media ± EE (n=2). Letras diferentes indican DES ($p < 0,05$) en los tratamientos que pertenecen a un determinado día, mientras que números diferentes indican DES ($p < 0,05$) entre los días (0, 7 y 14) de muestreo de un determinado tratamiento.

Las determinaciones de Cr(VI) fue realizada por el método de la difenilcarbazida (DFC), mientras que la de Cr total, Cr(III) (y en algunas ocasiones también la de Cr(VI)) por Espectroscopía de absorción atómica (EAA). Límite de detección de EAA: 0,005 mg/L; Límite de cuantificación de EAA: 0,01 mg/L.

N. D: no detectable.

Tabla A2: Parámetros físico-químicos determinados en muestras de efluentes de curtiembre, en los ensayos en microcosmos, en verano.

Parámetros/Efluente	2015					
	Control (flora nativa)			Inoculado con consorcio SFC 500-1 (10%)		
	0	7	14	0	7	14
DQO (mg/L)	3708,33 ± 182,93	1635 ± 49,35	852 ± 35,62	4703 ± 165,95	864 ± 28,08	786 ± 12,85
	a1	a2	a3	b1	b2	a2
Reducción DQO (%)	0 ± 0,0	55,90 ± 1,33	77,02 ± 0,96	0 ± 0,0	81,62 ± 0,59	83,28 ± 0,25
Fenoles (mg/L)	13,62 ± 0,64	0 ± 0,0	0 ± 0,0	13,62 ± 0,64	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Cr(VI) (mg/L) (DFC)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Viabilidad efluente (UFC/mL)	5,00 ⁶ ± 0,29 ⁶	9,75 ⁷ ± 1,48 ⁷	1,27 ⁶ ± 0,11 ⁶	1,56 ⁸ ± 0,17 ⁸	4,75 ⁵ ± 0,25 ⁵	1,11 ⁴ ± 0,06 ⁴
Viabilidad sedimento (UFC/mL)	-	-	4,58 ⁶ ± 0,83 ⁶ a	-	-	3,17 ⁶ ± 0,60 ⁶ b

Efluente/ Parámetros	2016														
	Control (flora nativa)			Inoculado con consorcio SFC 500-1						Inoculado con medio de cultivo TY					
				1%			10%			1%			10%		
	0	7	14	0	7	14	0	7	14	0	7	14	0	7	14
DQO (mg/L)	3096,00 ± 228,32 c1	1117,00 ± 53,90 a2	886,00 ± 28,96 b2	4216,00 ± 553,65 ab1	1715,00 ± 29,59 b2	1202,00 ± 97,03 a2	4353,00 ± 166,97 ab1	1232,00 ± 32,10 a2	774,00 ± 26,08 b2	3816,00 ± 266,25 ac1	1536,00 ± 64,19 b12	1106,00 ± 14,04 ab2	3948,00 ± 196,59 ac1	1660,50 ± 60,68 b12	797,00 ± 23,07 b2
Reducción DQO (%)	0 ± 0,0	63,92 ± 2,47	71,38 ± 0,94	0 ± 0,0	59,32 ± 1,00	71,49 ± 2,30	0 ± 0,0	71,70 ± 0,74	82,22 ± 0,60	0 ± 0,0	59,75 ± 1,68	71,02 ± 0,37	0 ± 0,0	57,94 ± 1,54	79,81 ± 0,58
P (mg/L)	29,27 ± 0,74	-	21,19 ± 0,81	24,32 ± 0,69	-	16,98 ± 0,03	24,48 ± 0,52	-	17,72 ± 1,10	21,35 ± 0,65	-	18,55 ± 0,46	34,30 ± 1,71	-	30,40 ± 1,40
N (mg/L)	290,50 ± 2,51	200,00 ± 5,01	125,00 ± 10,03	220,00 ± 15,04	-	52,50 ± 2,51	235,00 ± 5,05	182,5 ± 6,52	132,50 ± 2,51	290,00 ± 2,01	-	82,50 ± 12,54	275,00 ± 15,04	220,00 ± 5,02	90,00 ± 0,00
Fenoles (mg/L)	8,08 ± 0,27	0 ± 0,0	0 ± 0,0	8,08 ± 0,27	0 ± 0,0	0 ± 0,0	8,08 ± 0,27	0 ± 0,0	0 ± 0,0	8,08 ± 0,27	0 ± 0,0	0 ± 0,0	8,08 ± 0,27	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Cr(VI) (mg/L) (DFC)	0,50 ± 0,02	0,34 ± 0,01	N. D.	0,50 ± 0,02	-	-	0,50 ± 0,02	0,42 ± 0,00	N. D.	0,50 ± 0,02	-	-	0,50 ± 0,02	-	-
Viabilidad efluente (UFC/mL)	3,17 ⁶ ± 1,01 ⁶	3,58 ⁷ ± 0,89 ⁷	8,00 ⁶ ± 1,30 ⁶	2,17 ⁷ ± 0,59 ⁷	5,58 ⁷ ± 0,74 ⁷	8,50 ⁶ ± 1,01 ⁶	1,93 ⁸ ± 0,07 ⁸	2,18 ⁸ ± 0,23 ⁸	1,88 ⁶ ± 0,36 ⁶	5,17 ⁶ ± 1,17 ⁶	1,25 ⁸ ± 0,05 ⁸	9,00 ⁶ ± 0,50 ⁶	4,50 ⁶ ± 1,16 ⁶	2,68 ⁸ ± 0,10 ⁸	1,10 ⁷ ± 0,09 ⁷
Viabilidad sedimento (UFC/mL)	-	-	1,52 ⁸ ± 0,08 ⁸ a	-	-	4,50 ⁸ ± 0,57 ⁸ b	-	-	3,33 ⁸ ± 0,56 ⁸ b	-	-	1,20 ⁸ ± 0,16 ⁸ a	-	-	5,83 ⁸ ± 0,72 ⁸ b

Efluente/ Parámetros	2017														
	Control (flora nativa)			Inoculado con consorcio SFC 500-1						Inoculado con medio de cultivo TY					
				1%			10%			1%			10%		
	0	7	14	0	7	14	0	7	14	0	7	14	0	7	14
DQO (mg/L)	2632,00 ± 12,04 a1	778,67 ± 86,37 a2	486,67 ± 39,91 ac2	2740,00 ± 76,23 a1	634,00 ± 62,19 a2	264,00 ± 26,06 a3	3304,00 ± 80,24 b1	960,00 ± 36,58 a2	551,33 ± 40,61 cb3	2716,00 ± 24,07 a1	638,00 ± 2,01 a2	528,00 ± 16,05 ac2	3472,00 ± 28,08 b1	748,00 ± 136,41 a2	652,00 ± 56,17 cb2
Reducción DQO (%)	0 ± 0,0	70,42 ± 3,28	81,51 ± 1,52	0 ± 0,0	76,86 ± 2,27	90,36 ± 0,73	0 ± 0,0	70,94 ± 1,11	83,31 ± 1,23	0 ± 0,0	76,51 ± 0,07	80,56 ± 0,59	0 ± 0,0	78,46 ± 3,93	81,22 ± 1,62
P (mg/L)	25,10 ± 1,20	23,3 ± 0,50	22,66 ± 0,90	27,28 ± 0,90	-	25,92 ± 1,00	23,47 ± 1,90	19,56 ± 0,4	14,67 ± 1,8	19,56 ± 1,50	-	13,2 ± 0,70	24,12 ± 1,80	23,47 ± 1,30	22,00 ± 0,00
N (mg/L)	367,5 ±	205,00 ±	132,50	285 ±	-	97,50 ±	370 ±	200,00	52,5 ±	350,00 ±	-	107,50 ±	370,00	205,00	117,5 ±

	2,54	3,80	± 7,52	5,01		7,52	1,03	± 0,00	2,51	0,00		7,52	± 8,04	± 2,60	1,55
Fenoles (mg/L)	4,6 ± 1,08	0 ± 0,0	0 ± 0,0	4,6 ± 1,08	0 ± 0,0	0 ± 0,0	4,6 ± 1,08	0 ± 0,0	0 ± 0,0	4,6 ± 1,08	0 ± 0,0	0 ± 0,0	4,6 ± 1,08	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Cr(VI) (mg/L) (EAA)	0,27 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,09 ± 0,00	-	-	-	0,27 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,18 ± 0,00	-	-	-	-	-	-
Cr total (mg/L) (EAA)	0,75 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,15 ± 0,00	-	-	-	0,75 ± 0,00	0,50 ± 0,00	0,30 ± 0,00	-	-	-	-	-	-
Viabilidad efluente (UFC/mL)	2,44 ⁷ ± 0,31 ⁷	2,08 ⁷ ± 0,61 ⁷	3,43 ⁵ ± 0,67 ⁵	2,17 ⁷ ± 0,67 ⁷	1,15 ⁷ ± 0,13 ⁷	1,07 ⁶ ± 0,24 ⁶	8,61 ⁷ ± 1,75 ⁷	5,72 ⁷ ± 1,03 ⁷	8,50 ⁵ ± 2,45 ⁵	1,12 ⁷ ± 0,19 ⁷	3,50 ⁷ ± 0,29 ⁷	1,40 ⁶ ± 0,28 ⁶	2,00 ⁷ ± 0,29 ⁷	3,50 ⁷ ± 0,08 ⁷	1,18 ⁶ ± 0,09 ⁶
Viabilidad sedimento (UFC/mL)	-	-	1,05 ⁸ ± 0,71 ⁸ bc	-	-	1,02 ⁸ ± 0,21 ⁸ bc	-	-	2,32 ⁸ ± 0,60 ⁸ a	-	-	4,93 ⁷ ± 2,09 ⁷ b	-	-	2,00 ⁸ ± 0,29 ⁸ bc

Los datos representan la media ± EE (n=2). Letras diferentes indican DES ($p < 0,05$) en los tratamientos que pertenecen a un determinado día, mientras que números diferentes indican DES ($p < 0,05$) entre los días (0, 7 y 14) de muestreo de un determinado tratamiento.

Las determinaciones de Cr(VI) fue realizada por el método de la difenilcarbazida (DFC), mientras que la de Cr total, Cr(III) (y en algunas ocasiones también la de Cr(VI)) por Espectroscopía de absorción atómica (EAA). Límite de detección de EAA: 0,005 mg/L; Límite de cuantificación de EAA: 0,01 mg/L.

N. D: no detectable.



Figura A1. Fotografía de los sistemas de microcosmos a campo. Primera etapa de trabajo con efluente de curtiembre (1) y segunda etapa de trabajo con agua de arroyo (2).

Análisis de la calidad de los datos de la secuenciación

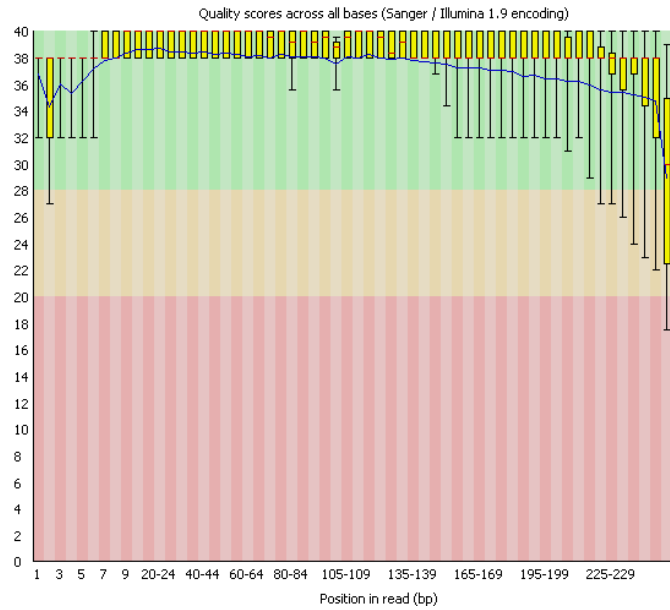


Figura A2: Puntajes de calidad a lo largo de las bases incorporadas en las lecturas provenientes de la secuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S mediante la plataforma Illumina MiSeq. Un puntaje alto (fondo verde) indica buen secuenciamiento. La calidad en la mayoría de las plataformas se degrada a medida que avanza la ejecución, por lo que es común ver que cae en el área naranja hacia el final de una lectura.

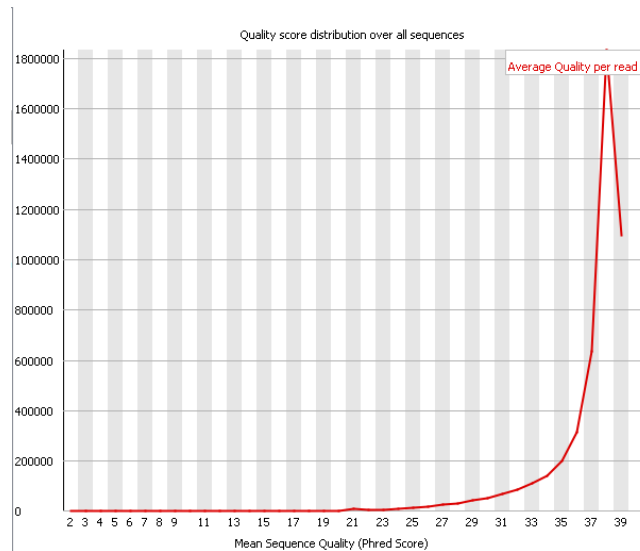


Figura A3: Distribución del puntaje de calidad (Phred) por secuencia para las lecturas provenientes de la secuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S mediante la plataforma Illumina MiSeq. La puntuación de calidad por secuencia permite ver si un subconjunto de sus secuencias tiene valores universalmente bajos de calidad. En este ensayo el puntaje de calidad por secuencia fue el óptimo.

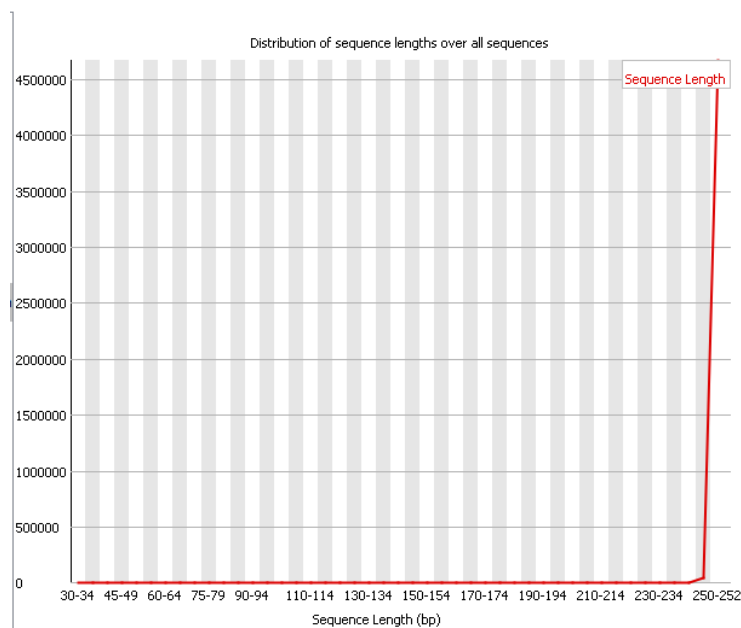


Figura A4: Distribución de longitud de las secuencias para las lecturas provenientes de la secuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S mediante la plataforma Illumina MiSeq. Los secuenciadores de alto rendimiento generan fragmentos de secuencia de longitud uniforme. En este caso, la longitud promedio de secuencia fue de 251 pb, lo que coincide con la longitud de los productos amplificados por los cebadores F515/R818.

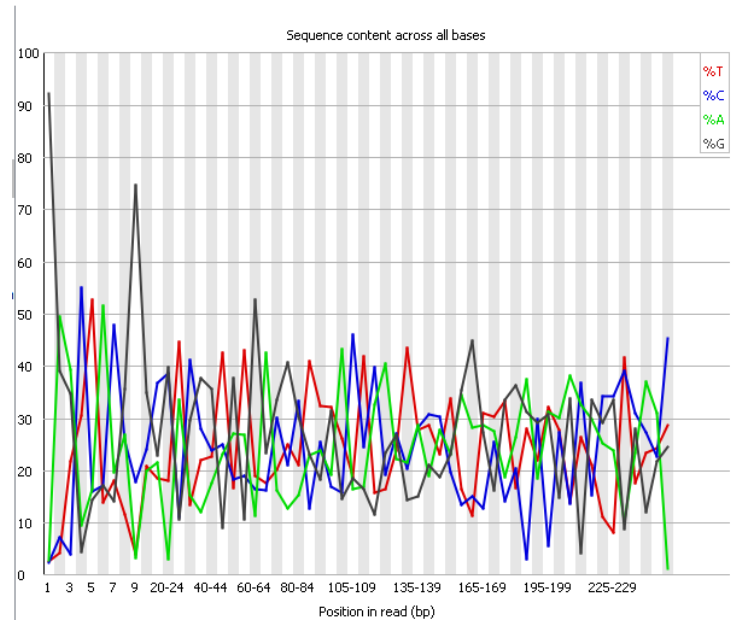


Figura A5: Contenido de cada base nucleotídica (%) en las secuencias de las lecturas provenientes de la secuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S mediante la plataforma Illumina MiSeq. La falta de linealidad es correcta cuando se trabaja con amplicones del gen de ARNr 16S e indican secuencias sobre representadas.

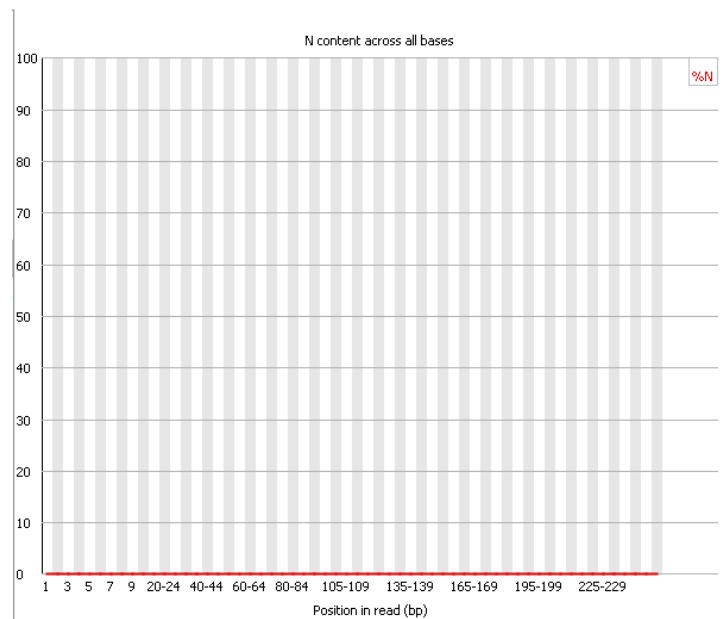


Figura A6: Contenido de base N en las secuencias de las lecturas provenientes de la secuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S mediante la plataforma Illumina MiSeq. Si un secuenciador no puede identificar a una base nucleotídica como A ó T ó C ó G con suficiente confianza, normalmente lo sustituye por N. En nuestro caso, la interpretación de los datos fue suficientemente buena como para identificar a la mayoría de las bases nucleotídicas.

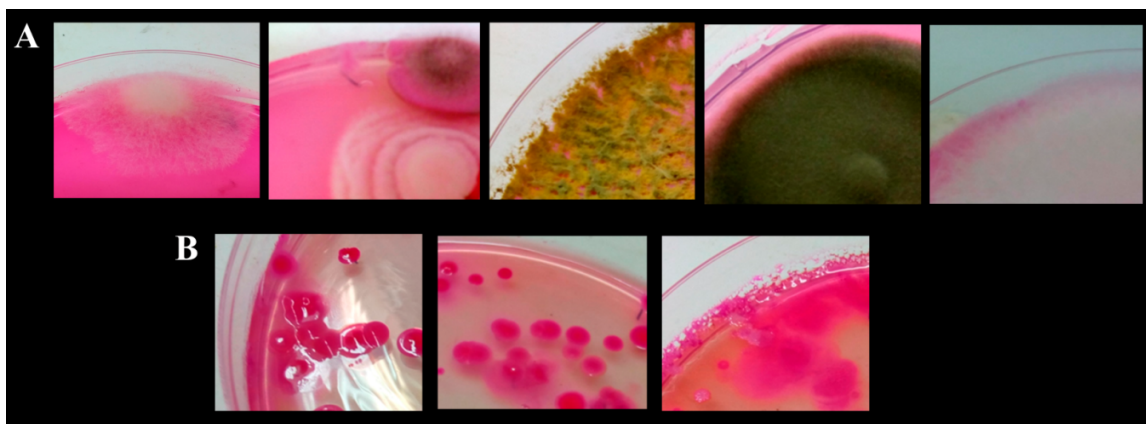


Figura A7. Fotografías de poblaciones de hongos cultivables. A) Presencia de hongos filamentosos en sistemas de microcosmos al momento inicial de experimentación ($t=0$). B) Presencia de levaduras en los sistemas de microcosmos analizados en el día 7 ($t=7$).

Tabla A3: Características del secuenciamiento por plataforma Illumina MiSeq.

Nombre muestra	N° de secuencias	Long media (pb)	N° OTUS
IE1 (t=0)	58776	253	1020
IE2 (t=0)	380832	253	4116
IEC1 (t=0)	235936	253	1866
IEC2 (t=0)	491880	253	3108
IE1 (t=7)	430696	253	3534
IE2 (t=7)	277616	253	2238
IEC1 (t=7)	454512	253	3528
IEC2 (t=7)	408760	253	2784
sE1 (t=7)	401616	253	3396
sE2 (t=7)	241384	253	2196
sEC1 (t=7)	417504	253	4152
sEC2 (t=7)	569120	253	4872
IA1 (t=0)	340928	253	9906
IA2 (t=0)	379952	253	8022
IAE1(t=0)	380032	253	3228
IAE2 (t=0)	502696	253	3510
IAEC1 (t=0)	506248	253	4008
IAEC2 (t=0)	483864	253	3558
IAC1 (t=0)	538080	253	1920
IAC2 (t=0)	445528	253	2016
IA1 (t=1)	339656	253	10566
IA2 (t=1)	415632	253	7242
IAE1(t=1)	354816	253	2760
IAE2 (t=1)	411904	253	2994
IAEC1 (t=1)	474728	253	3888
IAEC2 (t=1)	510496	253	3564
IAC1 (t=1)	401344	253	2946
IAC2 (t=1)	355856	253	2796
IAad (t=0)	241944	253	6300
SFC 500-1A	523960	253	1188
SFC 500-1E	556200	253	1368
Total	12532496		55088

Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento; SFC 500-1A: cultivo *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A; SFC 500-1E: cultivo *over night* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno; t=7: día siete).

Tabla A4: Cobertura del secuenciamiento y estudio de la diversidad alfa de las muestras, basado en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) definidas al 97% de similitud.

Nombre muestra (tiempo, d)	N° de Secuencias	Cobertura de Good	Riqueza		Equitatividad	Diversidad		
			Chao1	Especies observadas	Equitatividad (Heip)	Dominancia (Berger Parker)	Inv. Simpson	Shannon-Weaver
IE1 (t=0)	7347	0,99	285,555	170,000	0,141	0,344	7,479	3,213
IE2 (t=0)	7347	0,98	550,275	309,100	0,118	0,159	17,881	3,621
IEC1 (t=0)	7347	0,99	300,466	165,114	0,037	0,522	3,204	1,959
IEC2 (t=0)	7347	0,99	361,370	174,063	0,019	0,742	1,797	1,469
IE1 (t=7)	7347	0,99	443,403	237,938	0,100	0,247	10,110	3,213
IE2 (t=7)	7347	0,99	332,440	207,558	0,082	0,242	7,910	2,889
IEC1 (t=7)	7347	0,99	418,989	219,363	0,063	0,419	4,896	2,691
IEC2 (t=7)	7347	0,99	343,652	188,272	0,056	0,382	5,061	2,441
sE1 (t=7)	7347	0,99	346,824	227,928	0,069	0,352	6,256	2,809
sE2 (t=7)	7347	0,99	327,966	237,039	0,081	0,253	7,700	3,010
sEC1 (t=7)	7347	0,98	529,704	293,651	0,092	0,207	11,305	3,337
sEC2 (t=7)	7347	0,98	531,225	301,098	0,085	0,205	10,104	3,280
IA1 (t=0)	7347	0,94	1440,610	783,207	0,117	0,167	24,143	4,534
IA2 (t=0)	7347	0,96	1100,874	538,593	0,081	0,211	13,114	3,797
IAE1(t=0)	7347	0,98	443,180	271,321	0,080	0,322	7,519	3,123
IAE2 (t=0)	7347	0,99	406,749	212,095	0,081	0,352	6,633	2,891
IAEC1 (t=0)	7347	0,98	458,991	231,652	0,096	0,306	8,604	3,143
IAEC2 (t=0)	7347	0,99	407,284	220,306	0,060	0,441	4,665	2,658
IAC1 (t=0)	7347	0,99	214,386	77,518	0,016	0,622	1,943	0,823
IAC2 (t=0)	7347	0,99	246,066	97,106	0,014	0,628	1,954	0,883
IA1 (t=1)	7347	0,94	1586,486	708,254	0,144	0,090	39,580	4,636
IA2 (t=1)	7347	0,97	959,551	432,899	0,099	0,241	12,823	3,777

IAE1(t=1)	7347	0,99	380,691	241,329	0,099	0,246	9,636	3,216
IAE2 (t=1)	7347	0,99	385,649	225,062	0,122	0,149	15,359	3,346
IAEC1 (t=1)	7347	0,98	453,448	231,538	0,099	0,284	9,367	3,171
IAEC2 (t=1)	7347	0,99	399,117	218,706	0,052	0,436	4,380	2,524
IAC1 (t=1)	7347	0,99	380,768	181,405	0,097	0,184	10,408	2,920
IAC2 (t=1)	7347	0,99	393,860	182,736	0,101	0,226	10,271	2,965
IAad (t=0)	7347	0,96	983,869	665,753	0,142	0,102	32,759	4,563
SFC 500-1A	7347	0,99	129,835	54,975	0,002	0,983	1,034	0,144
SFC 500-1E	7347	0,99	148,632	60,975	0,005	0,959	1,087	0,282

Para el análisis de la diversidad alfa que implicó el cálculo de diferentes índices ecológicos promedio, se trabajó con 7347 secuencias por muestra.

Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento; SFC 500-1A: cultivo *over night* de *A. guillouiae* SFC 500-1A; SFC 500-1E: cultivo *over night* de *Bacillus* sp. SFC 500-1E) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno; t=7: día siete). En color rojo se destacan los índices que tomaron valores más elevados.

Valores de abundancia relativa de diferentes taxones bacterianos basadas en la secuenciación de amplicones derivados del gen de ARNr 16S, en muestras de efluente y sedimento.

Tabla A5: Abundancia relativa (%) de filios bacterianos.

Filo/muestra	IE1 (t=0)	IE2 (t=0)	IEC1 (t=0)	IEC2 (t=0)	IE1 (t=7)	IE2 (t=7)	IEC1 (t=7)	IEC2 (t=7)	sE1 (t=7)	sE2 (t=7)	sEC1 (t=7)	sEC2 (t=7)
<i>Proteobacteria</i>	23,410	16,609	82,825	80,060	59,830	76,024	76,410	81,195	81,108	74,593	58,091	49,482
<i>Bacteroidetes</i>	45,664	39,778	10,792	12,393	18,446	6,112	15,362	15,195	11,298	5,624	33,528	41,300
<i>Firmicutes</i>	23,288	36,812	2,556	5,640	19,479	13,111	7,473	2,561	6,457	14,337	5,443	5,476
<i>Spirochaetes</i>	0,040	0,182	0,054	0,086	0,174	0,112	0,212	0,491	0,179	0,470	1,109	1,553
<i>Tenericutes</i>	0,013	0,579	0,478	0,128	0,243	0,429	0,022	0,019	0,067	0,520	0,327	0,337
<i>Synergistetes</i>	0,068	2,476	0,905	0,377	0,698	3,443	0,133	0,338	0,225	2,455	0,214	0,344
<i>Actinobacteria</i>	5,104	0,065	1,793	0,013	0,033	0,028	0,017	0,003	0,009	0,563	0,091	0,019
Minoritarios	0,440	0,493	0,408	0,121	0,176	0,200	0,039	0,180	0,213	0,269	0,151	0,376
No clasificados	1,973	3,006	0,189	1,182	0,921	0,541	0,332	0,180	0,444	1,169	1,046	1,113

Los filios con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “minoritarios”. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete).

Tabla A6: Abundancia relativa (%) de clases bacterianas.

Clase/muestra	IE1 (t=0)	IE2 (t=0)	IEC1 (t=0)	IEC2 (t=0)	IE1 (t=7)	IE2 (t=7)	IEC1 (t=7)	IEC2 (t=7)	sE1 (t=7)	sE2 (t=7)	sEC1 (t=7)	sEC2 (t=7)
<i>Epsilonproteobacteria</i>	5,226	4,707	4,774	2,498	6,075	26,090	45,187	43,648	15,302	28,044	23,896	21,258
<i>Betaproteobacteria</i>	5,975	1,657	2,638	0,575	19,024	6,979	8,823	15,195	15,104	6,310	17,630	15,104
<i>Gammaproteobacteria</i>	10,344	8,480	22,012	76,641	33,059	41,579	21,762	21,465	48,990	38,789	15,101	11,280

<i>Alphaproteobacteria</i>	1,660	0,138	52,933	0,040	1,329	0,363	0,352	0,712	1,326	0,182	0,917	0,753
<i>Deltaproteobacteria</i>	0,190	1,625	0,467	0,299	0,284	1,008	0,272	0,160	0,342	1,242	0,490	1,030
<i>Flavobacteriia</i>	3,838	0,073	0,047	0,052	1,127	0,080	9,221	11,069	0,986	0,135	17,571	21,681
<i>Bacteroidia</i>	38,178	17,527	8,717	6,170	6,070	1,633	3,205	2,082	5,591	2,899	9,931	11,910
<i>Cytophagia</i>	0,571	0,004	0,000	0,001	0,003	0,008	0,007	0,001	0,007	0,006	0,034	0,009
<i>Sphingobacteria</i>	0,000	0,014	0,000	0,003	0,802	0,000	0,007	0,001	0,344	0,000	0,022	0,007
<i>Clostridia</i>	9,296	31,972	2,092	4,830	17,116	10,457	6,398	1,951	5,718	12,879	4,558	4,728
<i>Bacilli</i>	13,434	1,170	0,305	0,320	1,196	1,809	0,485	0,381	0,386	0,805	0,429	0,289
<i>MVP-15</i>	0,040	0,121	0,030	0,078	0,111	0,106	0,207	0,461	0,155	0,417	1,073	1,477
<i>Mollicutes</i>	0,013	0,512	0,478	0,118	0,237	0,409	0,021	0,019	0,063	0,520	0,285	0,293
<i>Synergistia</i>	0,068	2,476	0,905	0,377	0,698	3,443	0,133	0,338	0,225	2,455	0,214	0,344
<i>Actinobacteria</i>	4,668	0,060	1,793	0,013	0,033	0,028	0,017	0,003	0,009	0,553	0,088	0,019
Minoritarias	0,919	0,864	0,494	0,228	0,457	0,398	0,080	0,090	0,331	0,423	0,419	0,651
No clasificadas	5,580	28,600	2,315	7,757	12,379	5,610	3,823	2,424	5,121	4,341	7,342	9,167

Las clases con abundancias menores a 0,5% fueron agrupadas como “minoritarias”. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete).

Tabla A7: Abundancia relativa (%) de géneros bacterianos.

Género/muestra	IE1 (t=0)	IE2 (t=0)	IEC1 (t=0)	IEC2 (t=0)	IE1 (t=7)	IE2 (t=7)	IEC1 (t=7)	IEC2 (t=7)	sE1 (t=7)	sE2 (t=7)	sEC1 (t=7)	sEC2 (t=7)
<i>Sphingomonas</i>	0,122	0,014	52,678	0,006	0,001	0,008	0,012	0,011	0,013	0,003	0,001	0,009
<i>Brevundimonas</i>	0,054	0,027	0,020	0,003	1,034	0,048	0,142	0,086	1,181	0,062	0,599	0,361
<i>Paracoccus</i>	1,048	0,008	0,003	0,001	0,042	0,031	0,008	0,011	0,021	0,000	0,001	0,018
<i>Brachymonas</i>	2,136	1,184	2,448	0,372	3,707	5,045	3,784	12,654	0,942	3,251	13,259	11,230
<i>Comamonadaceae</i> no	1,714	0,119	0,074	0,055	0,607	0,172	1,203	0,606	1,248	0,291	1,655	1,841

clasificados													
<i>Acaligenaceae</i> no clasificados	0,108	0,203	0,040	0,043	12,816	0,953	1,166	0,315	10,003	2,008	1,348	0,775	
<i>Alcaligenes</i>	0,040	0,060	0,013	0,027	1,734	0,616	1,494	1,131	2,715	0,543	0,620	0,870	
<i>Massilia</i>	0,503	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,084	0,000	
<i>Arcobacter</i>	1,252	0,703	1,030	0,608	5,202	23,330	43,193	41,348	14,429	26,540	21,357	19,486	
<i>Campylobacter</i>	3,974	3,970	3,692	1,876	0,867	2,746	1,992	2,295	0,868	1,504	2,533	1,769	
<i>Pseudidiomarina</i>	0,027	0,008	0,000	0,004	0,122	0,293	0,230	0,131	0,059	0,033	0,862	0,864	
<i>Idiomarinaceae</i> no clasificados	0,013	0,008	0,010	0,000	0,029	0,002	0,165	0,084	0,021	0,003	0,712	0,175	
<i>Alishewanella</i>	0,000	0,243	0,047	0,134	0,390	0,233	0,865	0,524	2,501	0,172	0,205	0,046	
<i>Halomonas</i>	2,490	1,995	0,447	0,618	3,330	3,230	1,404	0,547	6,655	4,020	1,132	0,818	
<i>Marinobacterium</i>	0,163	0,260	0,152	0,198	2,425	10,921	13,924	16,367	1,890	9,395	6,206	4,978	
<i>Nitrincola</i>	0,000	0,006	0,000	0,014	0,094	0,144	0,047	0,070	0,565	0,135	0,065	0,074	
<i>Acinetobacter</i>	3,130	5,083	18,811	75,291	25,159	24,690	2,782	1,918	35,665	22,748	2,674	1,734	
<i>Pseudomonas</i>	1,184	0,092	0,037	0,035	0,481	1,103	1,614	0,863	0,288	1,385	1,603	1,307	
<i>Pseudomonadaceae</i> no clasificadas	0,013	0,035	0,000	0,004	0,020	0,057	0,190	0,080	0,043	0,119	0,814	0,178	
<i>Rickettsiella</i>	2,735	0,065	2,237	0,151	0,063	0,400	0,000	0,007	0,000	0,029	0,005	0,007	
<i>Desulfomicrobium</i>	0,190	1,027	0,278	0,200	0,122	0,780	0,160	0,093	0,133	0,755	0,304	0,612	
<i>Myroides</i>	0,244	0,071	0,047	0,052	1,110	0,072	9,214	11,067	0,982	0,132	17,528	21,655	
<i>Cloacibacterium</i>	3,593	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,011	0,000	
<i>Paludibacter</i>	1,687	9,959	0,335	4,389	3,313	0,780	1,492	0,845	3,724	1,302	4,826	6,050	
<i>Macellibacteroides</i>	0,054	0,123	0,006	0,063	0,169	0,034	0,675	0,315	0,043	0,049	1,575	1,377	
<i>Porphyromonadaceae</i> no clasificado	0,108	2,338	0,125	1,117	1,047	0,256	0,554	0,313	0,988	0,669	0,875	1,345	

<i>Prevotella</i>	0,571	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Blvii28</i>	0,013	0,268	0,013	0,048	0,289	0,040	0,031	0,021	0,105	0,082	0,940	0,760
<i>p-2534-18B5</i> no clasificado	34,912	4,272	8,168	0,380	0,692	0,233	0,110	0,029	0,390	0,407	1,046	1,681
<i>Bacteroidetes</i> no clasificados	3,062	22,126	2,017	6,155	10,433	4,377	2,916	2,021	4,364	2,578	5,947	7,680
<i>Sphingobacteriaceae</i> no clasificados	0,000	0,006	0,000	0,003	0,772	0,000	0,000	0,001	0,229	0,000	0,007	0,004
<i>Bacillaceae</i> no clasificados	1,184	0,006	0,000	0,003	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004
<i>Lysinibacillus</i>	3,606	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Staphylococcus</i>	2,082	0,000	0,013	0,003	0,003	0,146	0,000	0,000	0,000	0,076	0,072	0,005
<i>Bacillales</i> no clasificados	4,301	0,033	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,001	0,001
<i>Facklamia</i>	0,721	0,441	0,098	0,071	0,861	1,256	0,352	0,264	0,270	0,437	0,235	0,126
<i>Atopostipes</i>	0,544	0,056	0,020	0,014	0,020	0,020	0,001	0,000	0,000	0,026	0,005	0,002
<i>Tissierella Soehngenia</i>	2,722	8,079	0,254	1,200	2,360	1,218	2,571	0,365	2,264	3,781	1,912	2,071
<i>Proteocatella</i>	1,429	10,139	0,237	1,063	2,275	0,605	2,636	0,763	0,942	1,150	1,642	1,006
<i>Proteiniclasticum</i>	3,702	10,919	1,044	2,042	11,694	7,959	0,096	0,405	1,764	5,375	0,051	0,461
<i>Syntrophomonas</i>	0,000	0,544	0,006	0,053	0,109	0,051	0,033	0,009	0,057	0,192	0,026	0,042
<i>Veillonellaceae</i> no clasificados	1,129	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Firmicutes</i> no clasificados	0,544	3,468	0,108	0,419	1,025	0,691	0,573	0,223	0,312	0,593	0,348	0,373
Otras bacterias no clasificado	1,973	3,006	0,189	1,182	0,921	0,541	0,332	0,180	0,444	1,169	1,046	1,113
<i>vadinCA02</i>	0,027	1,447	0,857	0,299	0,475	2,985	0,008	0,111	0,137	1,474	0,109	0,130
<i>HA73</i>	0,000	0,249	0,006	0,022	0,131	0,210	0,024	0,088	0,037	0,868	0,070	0,153
<i>Dethiosulfovibrio</i>	0,040	0,760	0,030	0,055	0,091	0,187	0,100	0,133	0,045	0,112	0,034	0,060
<i>PL-11B10</i> no clasificado	0,040	0,121	0,030	0,078	0,111	0,106	0,207	0,461	0,155	0,417	1,073	1,477
<i>Microbacteriaceae</i> no clasificados	0,626	0,000	0,013	0,000	0,003	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001

<i>Microbacterium</i>	0,000	0,002	1,776	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Arthrobacter</i>	0,803	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Intrasporangiaceae</i> clasificada	no 1,361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Bifidobacterium</i>	0,680	0,004	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Minoritarios	7,346	6,451	2,591	1,630	3,836	3,431	3,697	3,244	3,505	6,112	4,582	5,269

Los géneros con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “minoritarios”. La abundancia del género *Bacillus* fue menor a 0,15% en todas las muestras. Las letras indican el tratamiento (E: efluente de curtiembre sin inocular -atenuación natural-; EC: efluente de curtiembre bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v) y tipo de muestra (l: líquido; s: sedimento); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=7: día siete).

Tablas de valores de abundancia relativa de diferentes taxones bacterianos basadas en la secuenciación de amplicones derivados del gen de ARNr 16S, en muestras de arroyo.

Tabla A8: Abundancia relativa (%) de filios bacterianos.

Filo/muestra	IA1 (t=0)	IA2 (t=0)	IAE1 (t=0)	IAE2 (t=0)	IAEC1 (t=0)	IAEC2 (t=0)	IAC1 (t=0)	IAC2 (t=0)	IA1 (t=1)	IA2 (t=1)	IAE1 (t=1)	IAE2 (t=1)	IAEC1 (t=1)	IAEC2 (t=1)	IAC1 (t=1)	IAC2 (t=1)	IAad
<i>Proteobacteria</i>	66,888	76,415	70,154	72,166	64,964	75,211	63,853	65,067	70,254	70,622	81,944	89,778	66,726	78,992	86,539	92,734	68,637
<i>Bacteroidetes</i>	19,870	14,747	14,750	23,831	24,963	20,344	0,279	0,492	17,059	22,752	10,759	5,261	27,775	13,745	3,827	1,180	18,691
<i>Firmicutes</i>	1,999	4,642	9,567	3,201	9,211	3,597	35,783	34,328	1,215	2,783	5,672	4,235	4,571	6,102	9,420	5,354	3,772
<i>Spirochaetes</i>	0,248	0,526	0,065	0,343	0,162	0,348	0,005	0,007	0,141	0,296	0,175	0,007	0,224	0,360	0,009	0,004	0,244
<i>Synergistetes</i>	0,105	0,250	3,519	0,130	0,056	0,039	0,005	0,008	0,103	0,098	0,554	0,126	0,074	0,048	0,003	0,011	0,148
<i>Actinobacteria</i>	4,310	0,591	0,332	0,017	0,094	0,031	0,010	0,014	3,337	0,968	0,130	0,264	0,052	0,079	0,167	0,681	2,658
<i>Verrucomicrobia</i>	2,344	0,604	0,155	0,015	0,028	0,052	0,022	0,007	4,199	1,299	0,101	0,149	0,048	0,031	0,005	0,000	1,851
<i>ODI</i>	0,361	0,098	0,035	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,546	0,161	0,002	0,000	0,001	0,001	0,001	0,002	0,327
Minoritarios	2,432	1,077	0,735	0,094	0,081	0,077	0,02	0,041	1,917	0,513	0,289	0,095	0,069	0,053	0,018	0,026	2,138
No clasificados	1,443	1,050	0,688	0,202	0,440	0,300	0,023	0,035	1,229	0,508	0,374	0,085	0,460	0,589	0,011	0,008	1,534

Los filios con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “minoritarios”. Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno).

Tabla A9: Abundancia relativa (%) de clases bacterianas.

Clase/muestra	IA1 (t=0)	IA2 (t=0)	IAE1 (t=0)	IAE2 (t=0)	IAEC1 (t=0)	IAEC2 (t=0)	IAC1 (t=0)	IAC2 (t=0)	IA1 (t=1)	IA2 (t=1)	IAE1 (t=1)	IAE2 (t=1)	IAEC1 (t=1)	IAEC2 (t=1)	IAC1 (t=1)	IAC2 (t=1)	IAad
<i>Epsilonproteobacteria</i>	4,127	10,736	4,477	37,393	31,744	48,810	0,214	0,280	3,273	26,021	5,909	0,637	29,193	46,039	0,229	0,211	8,203
<i>Betaproteobacteria</i>	45,421	28,508	21,457	12,834	14,302	14,865	0,648	1,046	43,905	24,096	30,025	35,470	17,608	23,783	33,242	34,825	39,361
<i>Gammaproteobacteria</i>	6,530	28,018	40,099	20,556	18,299	11,115	62,853	63,518	10,898	16,780	35,101	44,455	18,424	8,767	52,754	56,996	14,733
<i>Alphaproteobacteria</i>	9,677	7,617	3,900	1,231	0,515	0,294	0,118	0,190	11,074	3,404	10,342	6,242	1,287	0,327	0,283	0,676	5,217
<i>Deltaproteobacteria</i>	0,842	0,680	0,168	0,116	0,096	0,120	0,014	0,023	0,737	0,234	0,417	2,775	0,185	0,062	0,013	0,004	0,730
<i>Flavobacteriia</i>	3,151	0,888	6,186	6,567	11,189	8,804	0,046	0,089	0,701	4,733	2,987	3,107	13,577	4,497	3,296	0,467	3,561
<i>Bacteroidia</i>	1,163	4,404	3,043	12,053	6,562	3,605	0,057	0,104	1,092	10,590	3,607	0,365	5,950	3,323	0,041	0,065	1,692
<i>Cytophagia</i>	5,960	1,705	0,004	0,006	0,011	0,018	0,040	0,084	5,396	1,774	0,027	0,347	0,016	0,015	0,227	0,272	4,156
<i>Sphingobacteria</i>	0,333	0,814	0,465	0,027	0,011	0,008	0,008	0,003	0,398	0,071	0,852	0,555	0,040	0,001	0,097	0,114	0,148
<i>Saprospirae</i>	4,481	1,547	0,006	0,007	0,022	0,029	0,026	0,098	7,094	1,495	0,022	0,374	0,035	0,056	0,095	0,164	5,224
<i>Clostridia</i>	1,454	3,985	7,637	2,466	7,382	3,065	0,059	0,073	0,781	1,978	3,352	0,217	3,259	5,086	0,091	0,074	2,056
<i>Bacilli</i>	0,394	0,376	1,113	0,514	1,068	0,362	35,712	34,244	0,339	0,548	2,004	4,004	1,182	0,714	9,322	5,276	1,454
<i>Synergistia</i>	0,105	0,250	3,519	0,130	0,056	0,039	0,005	0,008	0,103	0,098	0,554	0,126	0,074	0,048	0,003	0,011	0,148
<i>Actinobacteria</i>	4,284	0,585	0,328	0,017	0,094	0,031	0,010	0,014	3,328	0,968	0,124	0,264	0,0488	0,0799	0,167	0,681	2,655
<i>Verrucomicrobiae</i>	1,016	0,267	0,115	0,012	0,015	0,031	0,014	0,003	3,191	1,023	0,047	0,124	0,045	0,023	0,001	0,000	0,714
<i>Opitutae</i>	0,732	0,147	0,025	0,001	0,004	0,009	0,001	0,001	0,737	0,184	0,027	0,009	0,003	0,004	0,003	0,000	0,770
Minoritarias	3,744	2,959	1,964	0,473	0,258	0,451	0,036	0,057	1,926	1,134	0,608	1,11	0,32	0,45	1,037	1,034	3,187
No clasificadas	6,586	7,514	6,494	5,597	8,372	8,344	0,139	0,165	4,027	4,869	3,995	0,819	8,754	6,726	0,099	0,130	5,991

Las clases con abundancias menores a 0,5% fueron agrupadas como “minoritarias”. Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno).

Tabla A10: Abundancia relativa (%) de géneros bacterianos.

Género/muestra	IA1 (t=0)	IA2 (t=0)	IAE1 (t=0)	IAE2 (t=0)	IAEC1 (t=0)	IAEC2 (t=0)	IAC1 (t=0)	IAC2 (t=0)	IA1 (t=1)	IA2 (t=1)	IAE1 (t=1)	IAE2 (t=1)	IAEC1 (t=1)	IAEC2 (t=1)	IAC1 (t=1)	IAC2 (t=1)	IAad
<i>Sphingomonadaceae</i> no clasificados	1,314	0,197	0,014	0,000	0,012	0,004	0,008	0,012	1,231	0,157	0,009	0,087	0,058	0,056	0,007	0,017	0,658
<i>Novosphingobium</i>	2,442	0,715	0,021	0,009	0,023	0,038	0,013	0,037	2,430	0,294	0,036	0,673	0,057	0,045	0,125	0,258	1,167
<i>Brevundimonas</i>	0,143	4,657	2,837	1,028	0,154	0,057	0,014	0,012	1,790	0,769	7,623	4,632	0,791	0,045	0,019	0,015	0,330
<i>Pseudochrobactrum</i>	0,049	0,170	0,553	0,087	0,112	0,046	0,002	0,005	0,098	1,085	1,936	0,102	0,156	0,059	0,009	0,006	0,413
<i>Rhodobacter</i>	4,446	1,084	0,025	0,001	0,033	0,029	0,052	0,095	3,598	0,446	0,047	0,132	0,040	0,025	0,091	0,323	1,663
<i>Brachymonas</i>	0,241	0,456	3,372	8,023	3,712	6,388	0,068	0,066	0,362	6,584	5,077	0,215	5,320	17,383	0,119	0,116	2,767
Comamonadaceae no clasificados	15,531	3,661	1,898	0,814	1,404	1,984	0,184	0,384	12,553	5,350	2,162	14,088	1,358	1,487	18,597	17,220	13,550
<i>Hydrogenophaga</i>	19,154	4,444	0,050	0,041	0,066	0,185	0,234	0,350	11,736	4,650	0,473	4,358	0,222	0,123	3,815	7,636	12,872
<i>Comamonas</i>	0,011	0,002	0,006	0,000	0,037	0,046	0,005	0,001	0,004	0,000	0,166	1,942	0,000	0,004	2,714	1,823	0,003
Acaligenaceae no clasificados	1,417	13,136	13,718	2,006	2,213	1,273	0,055	0,055	2,741	0,831	16,944	4,888	1,798	1,142	0,197	0,166	1,937
<i>Alcaligenes</i>	0,168	5,097	2,020	1,039	3,574	3,071	0,019	0,014	0,772	0,431	4,166	4,484	4,920	2,126	0,071	0,026	0,595
<i>Achromobacter</i>	0,009	0,000	0,008	0,070	0,440	0,114	0,004	0,001	0,004	0,071	0,029	0,025	1,272	0,032	0,011	0,004	0,046
<i>Denitrobacter</i>	0,009	0,027	0,069	0,128	0,783	0,453	0,002	0,000	0,014	0,094	0,108	0,122	0,923	0,598	0,000	0,000	0,062
<i>Advenella</i>	0,016	0,025	0,042	0,568	1,578	0,851	0,002	0,007	0,014	1,031	0,290	0,031	0,650	0,463	0,009	0,004	0,277
<i>Polynucleobacter</i>	2,452	0,120	0,052	0,003	0,015	0,008	0,000	0,053	3,829	1,228	0,024	0,031	0,016	0,006	0,009	0,022	1,990
<i>Collimonas</i>	0,237	0,084	0,002	0,000	0,006	0,008	0,000	0,005	0,548	0,167	0,002	0,005	0,015	0,004	0,023	0,031	0,102
<i>Betaproteobacteria</i> no clasificados	0,978	0,189	0,014	0,019	0,199	0,140	0,008	0,019	1,676	0,577	0,009	0,021	0,338	0,098	0,053	0,031	0,529
<i>MWH-UniPI</i> no clasificado	1,457	0,328	0,021	0,004	0,007	0,011	0,016	0,028	2,555	0,719	0,006	0,013	0,026	0,010	0,007	0,013	1,127
<i>Methylophilaceae</i> no clasificados	0,915	0,048	0,012	0,003	0,000	0,000	0,005	0,014	3,288	1,074	0,004	0,031	0,035	0,028	0,005	0,013	0,717
<i>Methylotenera</i>	0,527	0,061	0,018	0,003	0,001	0,001	0,001	0,007	2,204	0,779	0,002	0,017	0,025	0,012	0,007	0,006	0,644

<i>Vogesella</i>	0,037	0,016	0,016	0,007	0,015	0,072	0,014	0,014	0,018	0,015	0,423	4,680	0,010	0,039	6,854	7,016	0,095
<i>Thiobacillus</i>	0,504	0,191	0,002	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,332	0,111	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000	0,000	0,648
<i>Arcobacter</i>	3,787	10,378	4,027	36,398	31,333	47,679	0,202	0,258	3,106	25,241	5,641	0,617	28,851	45,652	0,215	0,193	7,717
<i>Campylobacter</i>	0,150	0,273	0,416	0,986	0,410	1,125	0,010	0,016	0,084	0,748	0,266	0,017	0,340	0,383	0,013	0,017	0,357
<i>Aeromonas</i>	0,075	0,012	0,004	0,001	0,012	0,033	0,004	0,012	0,044	0,019	0,202	2,117	0,001	0,020	3,101	7,519	0,148
<i>Pseudidiomarina</i>	0,014	0,225	0,273	0,416	0,197	0,393	0,004	0,008	0,035	0,177	0,130	0,007	0,503	0,592	0,005	0,004	0,092
<i>Shewanella</i>	0,009	0,033	0,006	0,197	0,020	0,026	0,002	0,007	0,014	0,109	0,187	1,703	0,000	0,025	1,142	2,877	0,105
<i>Alishewanella</i>	0,171	1,143	0,414	0,337	0,140	0,211	0,013	0,008	0,221	0,188	0,076	0,085	0,146	0,156	0,173	0,085	0,062
<i>Rheinheimera</i>	0,143	0,046	0,044	0,023	0,047	0,176	0,047	0,061	0,270	0,069	1,138	12,156	0,033	0,090	24,093	30,299	0,333
<i>Halomonas</i>	0,377	2,135	3,867	0,862	1,355	0,251	0,031	0,035	0,332	0,625	0,881	0,172	0,866	0,305	0,037	0,020	0,502
<i>Marinobacterium</i>	0,741	0,955	0,976	9,885	4,954	5,608	0,071	0,089	0,287	6,155	2,072	0,289	5,390	4,318	0,069	0,087	1,884
<i>Nitriicola</i>	0,023	0,520	0,195	0,019	0,003	0,038	0,000	0,003	0,080	0,017	0,029	0,007	0,006	0,023	0,000	0,002	0,049
<i>Acinetobacter</i>	2,456	21,680	32,978	5,351	9,250	2,394	62,585	63,187	7,322	5,997	28,819	24,302	7,588	1,598	18,543	9,734	8,302
<i>Pseudomonas</i>	0,344	0,155	0,416	1,508	1,308	1,018	0,025	0,021	0,169	1,291	0,374	0,703	2,135	0,926	0,972	1,773	0,674
<i>Pseudomonadaceae</i> no clasificados	0,046	0,048	0,044	0,537	0,499	0,416	0,013	0,008	0,030	0,319	0,302	2,134	1,316	0,242	3,729	3,158	0,205
<i>Bacteriovoraceae</i> no clasificados	0,037	0,058	0,016	0,000	0,003	0,000	0,001	0,000	0,124	0,021	0,200	2,645	0,000	0,000	0,000	0,000	0,046
<i>Myroides</i>	0,107	0,197	5,645	6,556	11,183	8,777	0,037	0,061	0,094	4,536	2,978	2,932	13,533	4,483	3,231	0,357	1,213
<i>Fluviicola</i>	1,802	0,372	0,000	0,000	0,001	0,006	0,002	0,005	0,190	0,061	0,004	0,009	0,000	0,000	0,003	0,008	1,104
<i>Cryomorphaceae</i> no clasificados	1,159	0,286	0,000	0,000	0,000	0,003	0,004	0,014	0,379	0,084	0,000	0,017	0,003	0,000	0,003	0,000	1,140
<i>Cloacibacterium</i>	0,009	0,004	0,532	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,002	0,030	0,000	0,073	0,001	0,000	0,001	0,015	0,019
<i>Paludibacter</i>	0,429	2,625	1,648	6,161	3,866	1,689	0,022	0,046	0,562	6,163	1,758	0,223	2,337	1,463	0,019	0,029	0,734
<i>Macellibacteroides</i>	0,058	0,080	0,042	2,552	0,913	0,481	0,011	0,016	0,014	1,901	0,484	0,015	1,757	0,503	0,003	0,013	0,251
<i>Porphyromonadaceae</i> no clasificado	0,119	0,509	0,673	1,925	0,780	0,419	0,010	0,005	0,134	1,433	0,667	0,073	0,926	0,493	0,007	0,004	0,102
<i>Dysgonomonas</i>	0,030	0,046	0,018	1,064	0,598	0,487	0,001	0,001	0,001	0,802	0,207	0,007	0,466	0,401	0,003	0,000	0,112
<i>Bacteroidetes</i> no	4,765	5,381	5,043	5,168	7,166	7,878	0,099	0,111	2,371	4,086	3,262	0,510	8,154	5,850	0,067	0,096	3,908

clasificados																	
<i>Sphingobacterium</i>	0,018	0,541	0,086	0,023	0,006	0,000	0,005	0,000	0,077	0,000	0,078	0,225	0,015	0,000	0,025	0,026	0,000
<i>Sphingobacteriaceae</i> no clasificados	0,004	0,168	0,378	0,003	0,003	0,001	0,000	0,000	0,040	0,003	0,773	0,233	0,020	0,000	0,000	0,002	0,003
<i>Cyclobacteriaceae</i> no clasificados	2,799	0,833	0,004	0,000	0,004	0,014	0,025	0,048	2,871	0,852	0,006	0,099	0,010	0,003	0,025	0,056	2,165
<i>Algoriphagus</i>	2,721	0,724	0,000	0,006	0,003	0,001	0,010	0,032	1,976	0,793	0,006	0,207	0,003	0,009	0,174	0,137	1,481
<i>Sediminibacterium</i>	2,916	1,052	0,006	0,006	0,009	0,026	0,014	0,070	4,027	0,862	0,020	0,347	0,023	0,053	0,089	0,155	3,822
<i>Chitinophagaceae</i> no clasificados	1,302	0,429	0,000	0,001	0,004	0,001	0,011	0,025	2,303	0,562	0,000	0,007	0,008	0,003	0,003	0,004	1,246
<i>Saprospiraceae</i> no clasificados	0,211	0,058	0,000	0,000	0,006	0,001	0,000	0,003	0,657	0,050	0,002	0,009	0,003	0,000	0,001	0,004	0,069
<i>Bacillus</i>	0,117	0,067	0,242	0,098	0,519	0,084	35,680	34,215	0,190	0,155	1,210	0,116	0,050	0,053	0,119	0,143	0,433
<i>Planococcaceae</i> no clasificados	0,004	0,000	0,000	0,000	0,001	0,008	0,002	0,003	0,000	0,000	0,006	0,252	0,000	0,009	0,584	1,009	0,000
<i>Exiguobacterium</i>	0,004	0,004	0,008	0,003	0,003	0,047	0,005	0,008	0,009	0,000	0,358	3,429	0,006	0,028	8,272	3,909	0,072
<i>Facklamia</i>	0,051	0,237	0,591	0,378	0,516	0,209	0,005	0,005	0,047	0,321	0,284	0,031	1,102	0,609	0,007	0,006	0,363
<i>Tissierella</i> <i>Soehngenia</i>	0,389	1,998	1,884	0,545	1,390	1,458	0,008	0,025	0,254	0,367	0,554	0,027	0,544	1,336	0,033	0,017	0,469
<i>Proteocatella</i>	0,136	0,536	1,509	0,817	5,266	0,937	0,014	0,014	0,108	0,639	1,294	0,050	2,216	2,856	0,019	0,011	0,512
<i>Proteiniclasticum</i>	0,382	0,442	3,677	0,940	0,080	0,046	0,025	0,026	0,169	0,791	1,170	0,083	0,153	0,031	0,019	0,029	0,615
Firmicutes no clasificados	0,100	0,235	0,711	0,192	0,758	0,160	0,011	0,008	0,073	0,198	0,209	0,005	0,112	0,275	0,003	0,004	0,171
Otras bacterias no clasificadas	1,443	1,050	0,688	0,202	0,440	0,300	0,023	0,035	1,229	0,508	0,374	0,085	0,460	0,589	0,011	0,008	1,534
<i>vadinCA02</i>	0,058	0,166	3,187	0,044	0,011	0,013	0,002	0,005	0,061	0,030	0,428	0,110	0,023	0,018	0,001	0,011	0,128
<i>Candidatus Aquiluna</i>	2,846	0,372	0,054	0,006	0,061	0,019	0,007	0,008	1,855	0,427	0,033	0,095	0,020	0,068	0,075	0,568	1,640
<i>Luteolibacter</i>	0,877	0,227	0,111	0,009	0,012	0,031	0,008	0,003	2,748	0,877	0,033	0,100	0,042	0,015	0,001	0,000	0,532
<i>Cerasicoccaceae</i> no	0,591	0,073	0,025	0,000	0,004	0,006	0,000	0,001	0,640	0,153	0,018	0,005	0,003	0,003	0,003	0,000	0,648

clasificados																	
Minoritarios	14,123	8,919	4,792	2,928	2,48	2,751	0,243	0,314	13,004	5,877	3,931	3,095	2,804	2,731	2,365	2,865	12,846

Los géneros con abundancias menores a 0,5% fueron agrupados como “minoritarios”. Las letras indican el tratamiento (A: agua de arroyo; AE: Agua de arroyo + efluente tratado por atenuación natural, 10% v/v; AEC: Agua de arroyo + efluente bioaumentado con el consorcio SFC 500-1, 10% v/v; AC: Agua de arroyo + consorcio SFC 500-1 crecido en medio TY, 10% v/v; Aad: agua de arroyo tomada un día diferente al inicio del experimento) y tipo de muestra (l: líquido); los números representan réplicas biológicas (1, 2); t corresponde al tiempo de muestreo (t=0: tiempo cero; t=1: día uno).