

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



***Idiomarina loihiensis* MAH1: ESTUDIOS DE SU
CAPACIDAD CARBONATOGÉNICA Y DE
FIJACIÓN DE LANTÁNIDOS Y ACTÍNIDOS**

TESIS DOCTORAL

D. FERNANDO MORCILLO DE AMUEDO

Granada, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Fernando Morcillo de Amuedo
D.L.: GR 3490-2010
ISBN: 978-84-693-5210-6

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

***Idiomarina loihiensis* MAH1: ESTUDIOS DE SU CAPACIDAD
CARBONATOGÉNICA Y DE FIJACIÓN DE LANTÁNIDOS Y
ACTÍNIDOS**

Memoria presentada por el Licenciado en Biología D. Fernando Morcillo de
Amuedo para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada,
Granada, 2010

V^oB^o de los directores

José M^a Arias Peñalver
Catedrático de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

M^a Teresa González Muñoz
Catedrática de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Mohamed Larbi Merroun
Doctor en Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

El Doctorando

Fernando Morcillo de Amuedo

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante los años 2004-2010, dentro del grupo de investigación Mixobacterias. Además, parte del contenido de este trabajo ha sido realizado en los laboratorios e instalaciones del Forschungszentrum Dresden-Rossendorf (FZDR) en Dresden, Alemania, durante varias estancias breves a través del programa de Acciones Integradas del Ministerio de Educación y Ciencias con Alemania (DAAD) y del programa de Acciones Integradas de la UGR. La última estancia fue realizada en calidad de invitado, siendo financiada, en gran parte, por el centro de investigación FZDR.

Para la realización de este trabajo el doctorando disfrutó de una beca con cargo al proyecto del Ministerio de Medio Ambiente (639/2006/3-4.2), de una beca de la Fundación Empresa Universidad y de una beca con cargo al Grupo de Investigación Bio 103, Mixobacterias, de la Junta de Andalucía.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada a través de los proyectos CGL2007-61489/BOS y MAT 2006-05411, del Ministerio de Ciencia e Innovación, y RNM 3943 de la Junta de Andalucía.

Dedico este trabajo a mi mujer, a mi familia y, en especial, a mi hermana María del Pilar y a mis abuelos (Ramón, Josefa y Pedro) que aún siguen cuidando de mí aunque ya no estén a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, José María Arias Peñalver, María Teresa González Muñoz y Mohamed Larbi Merroun. Gracias por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación, por todos los sabios consejos que me habéis dado en estos últimos años, por vuestra completa dedicación a la realización de este trabajo y por vuestra paciencia a la hora de enseñarme y guiarme por el mundo de la investigación en Microbiología. Por todo y mucho más, de corazón, muchísimas gracias.

A mis profesoras de Microbiología, Inés Martín Sánchez y M^a Antonia Fernández Vivas, que fueron las primeras en mostrarme el mundo de los microorganismos durante la licenciatura y a los profesores que las siguieron (Eva Valdívila, José María Arias, Antonio Luis Extremera, Manuel Martínez, Enrique Jáñez y José Gutiérrez Fernández) que reforzaron mis sentimientos de querer conocer más sobre este fascinante mundo.

A Concepción Jiménez López, por todos sus consejos, su apoyo y por tratarme como a un hermano durante los seis años que ha durado este trabajo.

A la profesora Francisca Martínez Ruiz, por ayudarme a comprender los aspectos más variados de la mineralogía y por su paciencia al enseñarme.

A Concepción de Linares por ayudarme en los comienzos de este trabajo y por su amistad.

A Sonja Selenska Pobell y Mohamed Larbi Merroun por darme la oportunidad de trabajar en Alemania y a Thomas, Andrea, Mónica y Marta, por ayudarme en todo lo que necesité durante mi estancia en Dresden.

Al resto de profesores del departamento que, aunque no han tenido una influencia directa, siempre han estado ahí para aconsejarme y apoyarme.

A mis compañeros y amigos, tanto los que continúan en el departamento (Teresa, Carmen, Fadwa, Manolo, Platero, Juanma, Rubén, Nuria, M^a Celes, Ana, Jessica, Samir, Marta, Teresa, Pablo, etc.) como los que ya no están en el (Arantxa, Mati, Marina, Chiara, Rubén "papa", Raquel, Ja, etc.), por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, por soportarme en los momentos duros y por los buenos ratos que aún nos quedan por pasar (¿¿¿ cuándo decís que nos vamos a Torre del Mar ???).

A mis amigos José Ignacio y Mohamed, por todos los sábados que hemos pasado entre los laboratorios de Microbiología/Biología Celular y la pista de vóley playa, por vuestra amistad y por vuestro apoyo y ayuda.

A Conchi, técnico de nuestro departamento, y Mari Carmen, secretaria del departamento, por su amistad, por todas las charlas y momentos divertidos que hemos tenido y por no mandarme a "freír espárragos" cada vez que les pedía un medio de cultivo o una dieta para un congreso.

A los miembros del Centro de Instrumentación Científica, y en especial a Juande, Conchi y María del Mar, por su amistad y por estar siempre dispuestos a ayudarme con la preparación de muestras y la interpretación de los resultados, y a todas las personas que han ayudado a la consecución de este trabajo.

A Ñoño y Luisa, por su gran amistad, consejos sobre el mundo de la investigación y porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado.

A mi familia y en especial a mis hermanas (Marta y Paula), mi tía Marga y mi tío Pedro por haberme ayudado y animado a seguir adelante en los momentos difíciles.

A mis padres, por haber creído y confiado en mí todo este tiempo, por haberme apoyado en todas las empresas que he intentado realizar, incluida la obtención del título de doctor y por todo el amor y cariño que me han dado.

Y por último, pero no por ello menos importante, a mi mujer Yana, por aguantar mis cambios de humor, por darme todo su amor y afecto y por darme fuerzas para seguir escribiendo este trabajo.

A todos y cada uno de ellos, gracias.

Relación de Acrónimos

ATCC (American type culture collection): Colección americana de cultivos tipo.

BLAST (Basic local alignment search tool): Herramienta básica para el alineamiento de secuencias

CCD (Charge-coupled device): Dispositivo de cargas interconectadas.

CECT: Centro español de cultivos tipo.

CIC: Centro de instrumentación científica.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

CPS (Capsular polysaccharides): Polisacáridos capsulares.

D-R: Dubinin-Radushkevich.

DSM (Deutsche sammlung von mikroorganismen): Colección alemana de microorganismos.

DSMZ (Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen): Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares.

EDX o **EDAX** (Energy dispersive X-ray): Energía dispersiva de rayos X.

EPS (Extracellular polymeric substance): Sustancia polimérica extracelular.

ESRF (European synchrotron radiation facility): Instalaciones europeas de radiación sincrotrón.

EXAFS (Extended X-ray absorption fine structure): Espectroscopia de absorción de estructura fina de rayos X.

HPLC (High performance liquid chromatography): Cromatografía líquida de alta eficacia.

HREM (High resolution transmission electron microscopy): Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución.

ICCD (Intensified charge-coupled device): Dispositivo intensificador de cargas interconectadas.

ICP-MS (Inductively-coupled plasma mass spectrometry): Espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado.

LPS (Lipopolysaccharides): Lipopolisacáridos.

MA (Marine agar): Agar marino.

MB y MBs (Marine broth): Caldo marino y caldo marino solido.

MEC: Ministerio de Educación y Ciencias.

MM y MMs: Medio marino y medio marino solido.

MR-VP (Methyl Red - Voges-Proskauer): Rojo de metilo - Voges-Proskauer.

Nd-Yag: Neodimio-itrio-aluminio-granate.

REEs (Rare earth elements): Elementos de las tierras raras.

ROBL (Rossendorf beamline): Línea de luz de Rossendorf.

SEM (Scanning electron microscopy): Microscopia electrónica de barrido.

TEM (Transmission electron microscopy): Microscopia electrónica de transmisión.

TM (Total membrane): Membrana total.

TRLFS (Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy): Espectroscopia de fluorescencia inducida por láser en tiempo resuelto.

TSA (Tryptic soy agar): Triptona y soja agar.

XANES (X-ray absorption near edge structure): Absorción de rayos X cerca de la estructura de borde.

XAS (X-ray absorption spectroscopy): Espectroscopia de absorción de rayos X.

XRD (X-ray diffraction): Difracción de rayos X.

Índice

Índice.

Capítulo 1. Introducción general	15
1.1. Geomicrobiología y biomineralización	17
1.1.1. Intervención de los microorganismos en los procesos geológicos	19
1.2. Los procesos de biomineralización en bacterias	21
1.2.1. Producción bacteriana de carbonatos	23
1.2.1.1. Formación de carbonato cálcico	24
1.2.1.2. Formación de carbonatos de magnesio y manganeso	29
1.2.1.2.1. El problema de la dolomita	31
1.2.1.3. Formación de otros carbonatos	32
1.2.2. Precipitación bacteriana de fosfatos	33
1.2.3. Biomineralización y bioacumulación intracelular	38
1.3. Estructura bacteriana y mecanismos de biosorción en bacterias	39
1.3.1. Los procesos de biosorción como solución a problemas medioambientales	44
1.4. Bibliografía	49
Capítulo 2. Objetivos	75
Capítulo 3. Caracterización de la cepa MAH1	79
3.1. Introducción	81
3.2. Material y métodos	83
3.3. Resultados	91
3.4. Discusión	98
3.5. Descripción de <i>Idiomarina loihiensis</i> MAH1	101
3.6. Bibliografía	102
Capítulo 4. Ca–Mg kutnahorite and struvite production by <i>Idiomarina</i> strains at modern seawater salinities	107
4.1. Introduction	109
4.2. Experimental procedures	111
4.3. Results	114
4.4. Discussions	118
4.5. References	122

Capítulo 5. Estudios sobre la interacción del uranio con <i>Idiomarina loihiensis</i> MAH1	127
5.1. Introducción	129
5.2. Material y métodos	132
5.3. Resultados	141
5.4. Discusión	160
5.5. Bibliografía	171
Capítulo 6. Estudios sobre la interacción del lantano y europio con <i>Idiomarina loihiensis</i> MAH1	179
6.1. Introducción	181
6.2. Material y métodos	185
6.3. Resultados	194
6.4. Discusión	211
6.5. Bibliografía	220
Capítulo 7. Conclusiones	228

Capítulo 1. Introducción general

Introducción general

1.1. Geomicrobiología y Biomineralización

La geomicrobiología es la ciencia que estudia el papel desempeñado por los microorganismos en los procesos geológicos, tanto los que han ocurrido en el pasado como los que están sucediendo en el presente. Ejemplo de estos procesos son el efecto de los microorganismos sobre los ciclos de muchos elementos y la precipitación de compuestos minerales (Wolicka y Borkowsky, 2007; Baskar y Baskar, 2009).

El origen de la palabra “geomicrobiología” es algo oscuro, aunque obviamente deriva del término “microbiología geológica” (en inglés geological microbiology). Beerstecher en 1954 definió geomicrobiología como el estudio de las relaciones entre la historia terrestre y la vida microbiana de la tierra. Kuznetsov *et al.* (1963) la define como el estudio de los procesos microbiológicos que tienen lugar en: 1) sedimentos modernos localizados en las masas de agua, 2) zonas en las que se produce una circulación de aguas subterráneas a través de rocas ígneas y sedimentarias, 3) zonas erosionadas de la corteza terrestre. Además, dentro de su concepto de geomicrobiología, engloba el estudio de la fisiología de microorganismos específicos que toman parte en los procesos geoquímicos. Ningún autor ha trazado la historia de la palabra geomicrobiología, pero sí han hecho hincapié en la importancia que científicos como Winogradsky, Waksman y Zobell tuvieron en el desarrollo de este campo.

Uno de los primeros contribuyentes al campo de la geomicrobiología fue Ehrenberg (1838), quien durante el segundo cuarto del siglo XIX descubrió la relación existente entre *Gallionella ferruginea* y depósitos ocreos de hierro. Posteriormente Winogradsky (1887; 1888) descubrió la oxidación de H_2S a azufre elemental por parte de *Beggiatoa* y la oxidación del $FeCO_3$ a óxido férrico por *Leptothrix ochracea*. Él creía que ambos organismos obtenían energía de estos procesos. Otras contribuciones importantes al campo de la geomicrobiología, ya dentro del siglo XX, fueron las de Harder (1919), geólogo y microbiólogo que estudió la importancia microbiana en la oxidación, precipitación y formación de depósitos de hierro, y las de Stutzer (1912), que al igual que Winogradsky, estudió la importancia de los microorganismos en la

Introducción general

formación de depósitos de azufre. En relación a este último ejemplo, el descubrimiento de las bacterias sulfato reductoras por parte de Beijerinck (1895) supuso un impulso en la comprensión del papel jugado por parte de las bacterias en la formación este tipo de depósitos (Erlich 2002).

Los estudios de Nadson (1903) y Bavendamm (1932) sobre la precipitación de carbonato cálcico y los estudios de Beijerinck (1913) y Zappfe (1931) sobre la oxidación del manganeso y su precipitación en ambientes naturales pusieron de manifiesto la importancia de los microorganismos sobre estos procesos.

El papel desempeñado por las bacterias en la erosión de las rocas fue sugerido a finales del siglo XIX por Muentz (1890) y posteriormente por Waksman (1932), que propuso que esta erosión podría ser fruto de la producción de ácidos por parte de diferentes organismos tales como las bacterias nitrificantes, hongos y líquenes.

Durante el transcurso del siglo XX se produjeron numerosos descubrimientos fundamentales para la geomicrobiología. Por ejemplo, el concepto de límite medioambiental de pH y E_h para los microorganismos en ambientes naturales, que fue propuesto e introducido por Baas Becking *et al.* (1960). Los estudios de Colmer *et al.* (1950) demostraron la existencia de bacterias oxidantes del hierro en minas de carbón y su relación con el drenaje ácido producido en estas. Posteriormente, la localización de estos mismos organismos en drenajes ácidos de minas de sulfato de cobre en Utah y el hallazgo de que estos microorganismos podían promover el lixiviado de metales a partir de menas de sulfuro (Bryner *et al.* 1954) dieron lugar a la primera aplicación industrial con organismos geomicrobiológicamente activos (Zimmerley *et al.*, 1958).

Los primeros intentos para detectar visualmente fósiles de procariotas de la era Precámbrica en rocas sedimentarias se realizaron por Barghoorn y Schopf, (1965). Los descubrimientos paleontológicos extraídos de estos estudios han tenido una profunda influencia en las teorías sobre la evolución de la vida en la Tierra.

Introducción general

El descubrimiento de las chimeneas hidrotermales y la presencia de microorganismos geológicamente activos, tanto en estas como en el lecho oceánico, se perfilaron como nuevos temas de estudios geomicrobiológicos a finales del siglo XX e inicios del XXI (Jannasch y Mottl, 1985; Tunncliffe, 1992; Parkes *et al.*, 1994; Dong y Yu, 2007; Ding y Valentine, 2008).

De todo lo anterior se deduce que la geomicrobiología, además de ser una rama de la ciencia multidisciplinaria que abarca diferentes conocimientos tales como químicos, microbiológicos y geológicos, es una ciencia que se encuentra en continua expansión y de la que, en la actualidad, todavía quedan muchas áreas por desarrollar y explorar.

1.1.1. Intervención de los microorganismos en los procesos geológicos

En la biosfera, los microorganismos pueden ser considerados como agentes geoquímicos, participando en numerosos procesos tales como concentración, dispersión o fraccionamiento de la materia (Ehrlich, 2002).

A) Como agentes de dispersión actuarían promoviendo la disolución de minerales insolubles. Por ejemplo, la reducción bioquímica del óxido de hierro o dióxido de manganeso a compuestos solubles (Tsutsumi, 2008; Langley *et al.*, 2009) o la erosión de la roca promovida por microorganismos (Tazaki, *et al.*, 2009) mediante la producción de sustancias que atacan a ciertos minerales presentes en esta, como es el caso de la producción de CO₂, que al reaccionar con el agua produce ácido carbónico (H₂CO₄), o la producción de ácido nítrico o sulfúrico por algunos quimiolitotrofos.

B) Como agentes de fraccionamiento. En este sentido se entiende la actuación que selectivamente pueden ejercer sobre una mezcla de compuestos inorgánicos para promover cambios químicos selectivos de uno o más compuestos de la mezcla, causando una concentración o dispersión selectiva. Por ejemplo, el caso de la oxidación de arsenopirita por *Thiobacillus ferrooxidans*, en el que parte del hierro solubilizado por procesos de oxidación reacciona con arsénico solubilizado del mineral para producir un precipitado de arseniato férrico (Ehrlich, 1964; Lizama y Suzuki 1989; Li *et al.*, 2007).

Introducción general

C) Como agentes de concentración, llevan a cabo la acumulación y/o precipitación de materia inorgánica mediante distintos procesos que se desglosan a continuación.

- Promoción de la precipitación de compuestos insolubles, tanto extracelular como intracelularmente. En este sentido existen numerosos ejemplos, como es el caso de las bacterias purpúreas del azufre, y otras que depositan los gránulos de azufre dentro de sus células (Hensen *et al.*, 2006; Høgslund *et al.*, 2009), o las bacterias magnetotácticas, como las especies de *Magnetospirillum*, capaces de formar magnetita intracelularmente (Jogler y Schüller, 2009). Otros ejemplos pueden ser los de su intervención en la formación de minerales (biomineralización) tales como pirita (FeS_2) (Shen *et al.*, 2009), aragonito y dolomita (Wacey *et al.*, 2007), o estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Laiz *et al.*, 2009), entre otros, o la litificación, que es un proceso geológico en el cual los microorganismos producen o promueven la formación de compuestos que actuarán de cementantes entre las partículas inorgánicas dando lugar a la formación de rocas sedimentarias (Havemann y Foster, 2008).

- Procesos de sorción: Dentro de estos procesos, incluimos: (i) *Adsorción a nivel de la superficie celular*, como es el caso de la unión de varios metales a la pared celular, y (ii) *absorción y fijación a nivel de células*, como en el caso de la captación del mercurio por algunas bacterias y hongos (Chang y Hong, 1994; Ehrlich, 2002). Para el caso de la adsorción y fijación a las superficies celulares, los metales se unirán a la pared celular reaccionando con determinados grupos funcionales tales como sulfato, carboxilo o fosfato, actuando como núcleos de cristalización para la formación de sus correspondientes minerales.

Los procesos de biosorción, así como la capacidad de los microorganismos de precipitar metales y otros elementos gracias a su actividad metabólica, han sido de gran interés en los últimos años debido a su gran utilidad para la bioremediación de zonas contaminadas o el tratamiento de efluentes industriales. Estudios como los de Gadd (2004; 2009) y Volesky (2001; 2003; 2007) han resaltado el gran potencial que presentan muchas

algas, hongos y bacterias para el desarrollo de esta tarea, presentándose como una alternativa a otras técnicas más costosas. Más adelante trataremos este tema más en profundidad.

1.2. Los procesos de biomineralización en bacterias

La biomineralización es el proceso mediante el cual los organismos intervienen en la formación de los minerales. Estos procesos de biomineralización pueden ser, en principio, divididos en casos en los que, de alguna manera, se ejerce un control sobre la biomineralización y, aquellos otros, en los que no. Así, se podrían diferenciar procesos que no son diseñados específicamente para la biomineralización, pero que provocan la formación de minerales, y otros procesos en los que se dispone de una "maquinaria" específica para el propósito de la biomineralización. Lowenstam (1981) acuñó el término mineralización inducida biológicamente para la primera situación. La segunda se denomina como mineralización controlada biológicamente y fue propuesto por Mann en 1983. En el caso de las bacterias, salvo casos muy concretos, como la formación de magnetita y greigita en los magnetosomas, los procesos de biomineralización llevados a cabo por estos organismos se consideran como biomineralización inducida. En la Tabla 1.1 pueden verse, a modo de ejemplo, algunos minerales en cuya formación se encuentran implicadas las bacterias.

Las bacterias pueden participar en la biomineralización inducida mediante (a) la aportación de superficies que actúen fijando iones y/o (b) mediante su propio metabolismo. En el primer caso, las paredes celulares y polímeros secretados por las bacterias contienen una gran cantidad de ligandos que pueden tomar parte en procesos de fijación de cationes. Los cationes pueden asociarse en pequeños grupos dando lugar a un núcleo de cristalización. En este sentido el tipo y el espacio existente entre ligandos de una superficie puede influir en el tipo de catión que se fije, así como en la orientación y estructura del futuro núcleo (Fowle y Fein, 2001). En el segundo caso, las actividades bacterianas pueden afectar la concentración de metabolitos de la solución y los parámetros del entorno que determinan la precipitación o no de algunos compuestos.

Introducción general

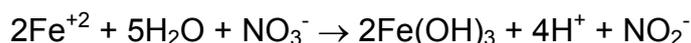
Mineral	Bacteria	Referencia	
Calcita	Bacterias del suelo (ensayados 210 microorganismos)	Boquet <i>et al.</i> , 1973	
	65 cepas del genero <i>Bacillus</i>	Ramos-Cormenzana, 1975	
	Bacteria marina	Morita, 1980	
	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Rivadeneira <i>et al.</i> , 1985	
	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Rivadeneira <i>et al.</i> , 1985	
	48 cepas de los géneros <i>Flavobacterium</i> y <i>Acinetobacter</i>	Ferrer <i>et al.</i> , 1988	
	<i>Synechococcus sp.</i>	Thompson y Ferris, 1990 Chafetz y Buczynski, 1992 Kropp <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Bacillus licheniformis</i> (EPS)	Tourney y Ngwenya, 2009	
	Aragonito	Bacteria marina	Greenfield, 1963
		Bacteria marina	McCallum y Guhathakurta, 1970
Bacteria marina		Krumbein, 1974	
Bacteria marina		Buczynski y Chafetz, 1991 Pedone y Folk, 1996	
Bacterias sulfato reductoras		Wacey <i>et al.</i> , 2007	
Dolomita	<i>Pseudomonas putida</i>	Rivadeneira <i>et al.</i> , 1986	
	Cepas del genero <i>Desulfovibrio</i>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 1995	
	<i>Virgibacillus marismortui</i> y <i>Halomonas meridiana</i>	Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2009	
	Estroncionita	<i>Bacillus sp.</i>	Ramos-Cormenzana, 1975
<i>Synechococcus sp.</i> (Capa S)		Schultze-Lam y Beveridge, 1994	
Comunidad microbiana		Douglas, 2004	
Estruvita	<i>Myxococcus xanthus</i>	Ben Omar <i>et al.</i> , 1994; 1998	
	<i>Myxococcus coralloides D</i>	González-Muñoz <i>et al.</i> , 1993; 1994	
	<i>Myxococcus xanthus</i>	González-Muñoz <i>et al.</i> , 1996	
Siderita	Biofilm bacteriano	Brown <i>et al.</i> , 1994	
Apatito e hidroxiapatito	<i>Escherichia coli</i>	Ennever <i>et al.</i> , 1974	
	<i>Providencia rettgeri</i>	Hirscheler <i>et al.</i> , 1990	
	<i>Serratia sp.</i>	Medina Ledo <i>et al.</i> , 2008	
Bobierita	<i>Acinetobacter sp</i>	Rivadeneira <i>et al.</i> , 1987	
Fosfato cálcico	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hutchison, 1961	
	Bacterias aisladas de salinas	Delgado, 2008	
Vaterita	<i>M. xanthus</i>	Rodríguez-Navarro <i>et al.</i> , 2007	
Barita	<i>M. xanthus</i>	González-Muñoz <i>et al.</i> , 2003	
Magnetita	<i>Shewanella oneidensis</i>	Pérez-González <i>et al.</i> , 2010	

Tabla 1.1. Ejemplos de minerales de origen biogénico producidos por diferentes bacterias.

Introducción general

Por ejemplo, las bacterias desnitrificantes o fotosintéticas pueden promover un incremento del pH en la solución, que es necesario para la precipitación de carbonatos, o las bacterias sulfato reductoras, que pueden inducir la formación de sulfuros metálicos mediante la generación de $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ (Little *et al.*, 1997).

Otro hecho a tener en cuenta es la modificación del potencial de óxido-reducción (E_0) que puede ser ocasionado por el metabolismo microbiano. Mediante la modificación de este parámetro, las bacterias influyen en el estado de diferentes metales como el hierro y el manganeso, que pueden presentarse como formas solubles reducidas (Mn^{+2} , Fe^{+2}) o como formas insolubles oxidadas (Mn^{+4} , Fe^{+3}). Un ejemplo es la oxidación de Fe^{+2} llevada a cabo por bacterias oxidadoras del hierro y reductoras de nitrato que pueden inducir la formación de hidróxidos de hierro según la siguiente reacción (Miot *et al.*, 2009):



Sin embargo hay que resaltar que para que se produzcan estos procesos es necesaria una sobresaturación de un catión o compuesto en la solución y deben darse también las condiciones termodinámicas y cinéticas adecuadas. A continuación, por ser parte de esta tesis doctoral, pasaremos a describir con cierto detalle la formación de carbonatos y fosfatos debida a la intervención de bacterias.

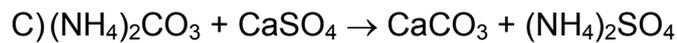
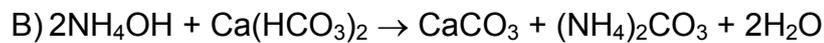
1.2.1. Producción bacteriana de carbonatos

En la naturaleza, parte del CO_2 puede ser fijado por diferentes organismos en forma de carbonatos. De hecho, se piensa que una gran parte de los carbonatos presentes en la superficie terrestre tienen un origen biogénico. Las bacterias, así como otros organismos, se encuentran relacionadas íntimamente con la formación de estos minerales. A continuación se citan algunos ejemplos de formación de carbonatos por diversas bacterias de grupos metabólicos diferentes.

Introducción general

La fijación de dióxido de carbono puede ocurrir en la oscuridad por una diversidad de organismos quimiolitótrofos tales como las bacterias nitrificantes, las bacterias oxidadoras del hierro, las bacterias verdes y purpúreas fotosintéticas anoxigénicas y las oxifotobacterias. Por lo tanto, en medios adecuados, varias bacterias pueden formar calcita o aragonito, según las condiciones (Greenfield, 1963).

También la reducción de nitrato por heterótrofos (A) o la liberación de amonio tras la desaminación oxidativa de los aminoácidos (B, C) pueden inducir la deposición de carbonato cálcico:



A continuación, explicaremos algunos casos en los que las bacterias median en la formación de los carbonatos, tanto en condiciones de laboratorio como en ambientes naturales.

1.2.1.1. Formación de carbonato cálcico

El carbonato cálcico es un compuesto químico que tiene la particularidad de presentar tres variantes polimórficas cristalinas. La configuración más estable de todas ellas, a presión y temperatura ambiental, se denomina calcita, presenta una estructura cristalina romboédrica con alta simetría. La segunda variedad, el aragonito, tiene una estructura cristalina ortorrómbica con una gran simetría también. Es ligeramente inestable con respecto a la calcita, por lo que con el tiempo sus átomos pasan a adoptar la configuración de esta. La última variante, la vaterita, cristaliza en el sistema hexagonal con una estructura bastante desordenada, es muy inestable con respecto a las otras dos anteriormente citadas (Hou y Feng, 2006). Esta es la razón de que en los sistemas biológicos, en todos los *phyla*, puedan encontrarse agrupaciones cristalinas de los dos primeros tipos de polimorfos, mientras que es más difícil encontrar grupos que precipiten vaterita. No obstante, actualmente, la precipitación de vaterita mediada por bacterias, ya ha sido descrita por

Introducción general

numerosos investigadores, tanto en ambientes naturales (Giralt *et al.*, 2001), como en condiciones de laboratorio (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003; Chekroun *et al.*, 2004). Por tanto, esto sugiere que su precipitación es más frecuente de lo que se pensaba en un principio (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

Entre los depósitos de CaCO_3 existentes en la Tierra, un caso de gran importancia lo constituyen los bancos sedimentarios de las Bahamas, en las costas de Florida. Para algunos autores, estos depósitos son debidos a procesos físicos/químicos, afirmando que la precipitación de carbonatos se debe a la evaporación, al aumento de los iones calcio y carbonato, al incremento del pH, de la salinidad o de la temperatura (Bustos-Serrano *et al.*, 2009). Para otros autores son debidos a la actividad bacteriana. La precipitación bacteriana de CaCO_3 fue descrita por primera vez por Murray e Irvine (1890). Estos autores relacionaron la precipitación del carbonato cálcico con la actividad bacteriana al observar, en medios de agua de mar adicionados de orina en descomposición y en putrefacción, formación de este compuesto cristalino. A partir de este momento la implicación de las bacterias en la deposición de carbonato cálcico fue puesta de manifiesto por varios autores. En 1903, Nadson demostró que los depósitos de CaCO_3 existentes en el lago Veisowe de Karkou (Rusia) podían tener su origen en la actividad microbiana, ya que al incubar sedimentos del fondo del lago con agua no estéril procedente del mismo, se observaba la formación de CaCO_3 .

Posteriormente, de los sedimentos de este lago, Nadson aisló numerosos microorganismos de diferentes especies como *Proteus vulgaris*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus salinus*, *Actinomyces albus*, *Actinomyces verrucosis* y *Actinomyces roseolus*. Este autor observó, también, la formación de este compuesto cuando incubaba sedimento estéril con un cultivo puro de *P. vulgaris* y cuando cultivaba *B. mycoides* en diferentes medios de cultivo (caldo y agar nutritivo y medio de gelatina). Para Drew (1911; 1914), las bacterias desnitrificantes eran las responsables de la deposición de CaCO_3 en sedimentos marinos en las Islas Bahamas. A partir de estos sedimentos aisló una bacteria desnitrificante que denominaron *Bacillus calcis* (= *Pseudomonas calcis*), y demostró que era capaz de precipitar carbonato cálcico en medios de

Introducción general

cultivo artificiales, provistos de nitrato potásico y de una sal orgánica de calcio. Así mismo, afirmó que el nitrato potásico era un factor indispensable para que ocurriera la precipitación de CaCO_3 . Por otra parte, Lipman (1929), indicó que las bacterias marinas son capaces de formar CaCO_3 siempre que haya en el medio gran cantidad de sales solubles, entre ellas sales de calcio. Además, encontró que el nitrato potásico no era necesario para la precipitación de carbonato cálcico. En ambientes marinos, las estructuras externas tales como la capa S de algunas cianobacterias, han sido reconocidas como una de las estructuras más importantes a la hora de actuar como núcleos de cristalización de carbonato cálcico (Schultze-Lam *et al.*, 1992).

Con objeto de dilucidar los grupos bacterianos implicados en la precipitación de CaCO_3 , se hicieron varios estudios taxonómicos. Según Bavendamm (1932), la precipitación de este compuesto es un importante proceso geoquímico que no está restringido a la actividad de un grupo determinado de bacterias. Así, las bacterias autótrofas y heterótrofas, incluyendo bacterias del azufre, bacterias fotosintéticas, bacterias que hidrolizan la urea, bacterias agarolíticas, celulolíticas y fijadoras de nitrógeno, todas ellas están implicadas en la formación de CaCO_3 . Posteriormente Boquet *et al.* (1973) afirmaron que la formación de calcita por bacterias es un fenómeno general y que puede ser producido por cualquier bacteria en condiciones favorables.

Tanto las conclusiones de Bavendamm *et al.* (1932), como de Boquet *et al.* (1973) han sido corroboradas por numerosos estudios. McCallum y Guhathakurta (1970), realizaron un estudio con veinticuatro bacterias aisladas del banco de las Bahamas sobre la precipitación de CaCO_3 en diferentes medios de cultivo líquidos, modificando las condiciones de temperatura y pH. Estas bacterias pertenecían a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio* y *Streptomyces*. Obtuvieron precipitación de este compuesto en todos los medios y condiciones experimentales ensayados. Rivadeneyra *et al.* (1983) observaron, en experimentos con bacterias no halófilas, que todas las bacterias capaces de mediar la precipitación de estruvita también eran capaces de precipitar calcita. Por otro lado, Sánchez-Román *et al.* (2007) investigaron la

Introducción general

producción de carbonatos, en condiciones de laboratorio, de 19 especies bacterianas perteneciente a los géneros *Halomonas*, *Salinivibrio*, *Marinomonas* y *Marinobacter*. Todas las especies ensayadas fueron capaces de precipitar calcita en el medio específico para esta.

Rivadeneira *et al.* (1996) han sugerido que el mecanismo de precipitación de carbonatos por bacterias implica la sorción de cationes Ca^{+2} , lo que causa un incremento local de la concentración de este ion. Esto, junto con la liberación de CO_2 proveniente de la degradación de la materia orgánica, favorece la precipitación de carbonato cálcico. Por otra parte, Ferris *et al.* (1995) han destacado que la producción de carbonatos ocurre usualmente sobre paredes celulares o en el material capsular. El EPS (sustancia polimérica extracelular) de las bacterias juega un papel muy importante en la precipitación de carbonatos, no solamente por su capacidad de fijar y concentrar los iones de calcio, sino también por la presencia de proteínas específicas que pueden influir en la precipitación (Braissant *et al.*, 2003). En este sentido, Ercole *et al.* (2007) estudiaron la importancia de las fracciones CPS (polisacáridos capsulares) y EPS de *Bacillus firmus* y *Bacillus sphaericus* en la precipitación de carbonato cálcico. De sus experimentos se deduce que ambas fracciones tienen una importancia crucial en la formación de los carbonatos y que dentro del mecanismo de precipitación podían estar involucradas diferentes partículas de ambas fracciones (proteínas, glicoproteínas, grupos aniónicos, etc.).

También se han realizado varios estudios para comprobar la influencia de distintos factores sobre la precipitación bacteriana de CaCO_3 . Se ha encontrado, por ejemplo, que un exceso de sales, tiene un efecto negativo sobre la precipitación bacteriana de aragonito (Ferrer *et al.*, 1988).

De otra parte, se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la precipitación de CaCO_3 . Para Ferrer *et al.* (1988) las altas temperaturas favorecen la precipitación de CaCO_3 . Sin embargo, Rivadeneira *et al.* (1991) observaron que la temperatura sólo influye en la formación del carbonato cálcico cuando las condiciones externas no son las más adecuadas para su precipitación. Así, a altas concentraciones de Mg^{+2} la precipitación de CaCO_3 se hace muy difícil y la temperatura puede tener un efecto importante sobre su

Introducción general

formación. Sin embargo, a concentraciones bajas de Mg^{+2} , que es una condición adecuada para la precipitación de este compuesto cristalino, la temperatura tiene poco efecto. En el caso de la precipitación de $CaCO_3$ por bacterias halófilas, Rivadeneyra *et al.* (1994), observaron que la temperatura y la concentración externa de sales influyen en la precipitación, ya que estos dos factores producen importantes cambios en la composición interna y la actividad fisiológica de estas bacterias, como había sido demostrado por Morita (1980) y Quesada *et al.* (1987). Otros trabajos corroboran el papel inhibitorio del Mg^{+2} sobre la precipitación del $CaCO_3$ (Buczynski y Chafetz, 1991; Kropp *et al.*, 1997). Delgado *et al.* (2008) afirmaron que es más influyente, en la precipitación de carbonatos, la relación molar de los iones Mg^{+2}/Ca^{+2} que la concentración total de Mg^{+2} . También hay evidencias del papel jugado por la presencia de fosfatos y sulfatos en la precipitación de carbonato cálcico. De hecho ambos pueden tener efectos inhibidores sobre la precipitación de este compuesto cristalino. En este sentido Rivadeneyra *et al.* (1985) describieron la inhibición de la precipitación de calcita en cultivos de *Azotobacter sp.* al haber en el medio sulfato amónico (0,05 %).

Otro factor que puede influenciar en la precipitación de calcio es la presencia o no de metales en el medio. En este sentido, Işık (2008) y Kurmaç (2009) realizaron estudios sobre el efecto de los metales pesados en los procesos de precipitación de calcio, en aguas residuales ricas en calcio, llevados a cabo por bacterias ureolíticas. Encontraron que los procesos de nitrificación, que se producían en algunos de sus tratamientos, inhibían la precipitación de calcio soluble. Este efecto de la nitrificación sobre la precipitación del calcio es debido principalmente a la disminución del pH y de la alcalinidad. No obstante, en las condiciones ensayadas, concentraciones de plomo superiores a 16 mgL^{-1} inhibían los procesos de nitrificación y, por tanto, los descensos de alcalinidad y pH que evitan la precipitación de calcio y la formación de $CaCO_3$. Sin embargo, altas concentraciones de otros metales como el níquel inhibían los procesos de biocalcificación.

1.2.1.2. Formación de carbonatos de magnesio y manganeso

Los iones de carbonato también pueden combinarse con elementos como el magnesio y el manganeso para dar lugar a minerales como la rodocrosita (MnCO_3), dipingita [$\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$], kutnahorita [$\text{Ca}(\text{Mg},\text{Mn},\text{Fe})(\text{CO}_3)_2$] o dolomita [$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$].

Existen numerosos depósitos de rodocrosita que han sido asociados a la actividad de los microorganismos, un ejemplo son los depósitos situados en la bahía de Punnus-loky (Rusia). Sokolova-Dubinina y Deriugina (1967) encontraron en esta región gran cantidad de bacterias reductoras de manganeso y escasez de bacterias sulfato reductoras. La baja actividad sulfato reductora en esta zona explicaría los bajos niveles de sulfuro de hierro y manganeso y la significativa formación de carbonatos. Los sedimentos de las fosas de Landsort (Mar Báltico) se caracterizan por estar compuestos de carbonatos de hierro y manganeso, sulfuro de hierro y fosfatos de calcio y manganeso. Es una zona anóxica en la que se piensa que los minerales formados se deben a la acción de los microorganismos (Suess, 1979). En 1999, Fan *et al.* encontraron indicios de la participación microbiana en la formación de rodocrosita en los depósitos de Sinian Gaoyan en China. Ruebush *et al.* (2006) y posteriormente Fischer *et al.* (2008) demostraron la participación de la fracción TM (membrana total) de *S. oneidensis* en la formación de rodocrosita a partir de óxidos de manganeso. Ambos autores afirman que la formación de rodocrosita se debe a las enzimas con actividad formiato-deshidrogenasa presentes en la fracción TM. El ion carbonato se formaría por hidratación del CO_2 resultante del proceso de oxidación del formiato, mientras que la rodocrosita precipitaría debido a la saturación del medio con este ion e iones Mn^{+2} .

Power *et al.* (2007; 2009) demostraron la participación de cianobacterias en la precipitación en laboratorio de la dipingita [$\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$] y, posteriormente, la formación de hidromagnesita [$\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] en lagos temporales en Atlin (Canadá). En sus estudios, señalaron que la actividad fotosintética puede dar lugar a la aparición de microambientes alcalinos por la retirada de bicarbonato y aumento de aniones hidroxilo, que

Introducción general

promoverían la formación de ambos minerales. Además, la capacidad de estas bacterias para fijar en su pared cationes, tales como Mg^{+2} o Ca^{+2} , promoverían la formación de dipingita, de manera que estos cationes actuarían como puentes de unión a aniones de carbonato y bicarbonato. Posteriormente la hidromagnesita se produciría a partir de un proceso de deshidratación de la dipingita.

La huntita, un carbonato cuya composición es $CaMg_3(CO_3)_2$, se describió por primera vez en condiciones de laboratorio por Davis *et al.* en 1977. Posteriormente, algunos autores han descrito su precipitación en condiciones de laboratorio, muchas veces junto con la precipitación de otros carbonatos como la dolomita, la Ca-Mg kutnahorita o la calcita magnésica (Rivadeneira *et al.*, 2006). La dolomita es uno de los carbonatos que más presencia tiene en las rocas sedimentarias, sobre todo en rocas de carbonatos del periodo Precámbrico, y frecuentemente se ha encontrado asociado a estructuras microbianas (Mckenzie y Vasconcelos, 2009). En cuanto a la kutnahorita, se trata de un mineral perteneciente al grupo de las dolomitas cuya fase rica en magnesio ya ha sido precipitada en laboratorios en condiciones de hipersalinidad (Rivadeneira *et al.*, 2006). Sin embargo la precipitación de kutnahorita rica en manganeso (auténtica kutnahorita) y en condiciones similares a las encontradas en mares y océanos aun no se ha logrado. La precipitación de este mineral en condiciones de salinidad de agua de mar es de gran relevancia ya que sería un argumento a favor de la participación bacteriana en la precipitación de dolomita en ambientes no hipersalinos, pudiendo dar respuesta al “problema de la dolomita”, que trataremos en el siguiente apartado. Además demostraría la precipitación de verdadera kutnahorita en estas mismas condiciones por influencia de las bacterias. En el caso de la calcita magnésica, su precipitación por bacterias ha sido descrita por numerosos autores, sirviendo de ejemplo Gonzalez-Muñoz *et al.* (2000) que describieron su precipitación, en condiciones de laboratorio, en cultivos de *M. xanthus*.

1.2.1.2.1. El problema de la dolomita

El denominado “problema de la dolomita” es uno de los problemas geológicos planteados, y aún sin resolver, desde la primera descripción de la dolomita por Dolomieu en 1791. Aún se desconoce por qué las grandes formaciones dolomíticas ocurrieron durante las Eras Geológicas más antiguas (Proterozoico y comienzos del Fanerozoico), y por qué a partir del Terciario sólo se ha producido calcita y aragonito en ambientes sedimentarios, siendo así a pesar de que el agua de mar está sobresaturada con respecto a la dolomita. Por otra parte, la producción inorgánica de dolomita sólo se obtiene en condiciones de elevada sobresaturación y salinidad, y a altas temperaturas, condiciones que no corresponden con las que en el pasado se formó dolomita de forma masiva.

Las investigaciones se han intensificado durante las últimas dos décadas, especialmente desde que se demostró que la precipitación de la dolomita puede estar relacionada con la actividad bacteriana (Vasconcelos *et al.*, 1995; Burns *et al.*, 2000). Algunos autores relacionan la dolomita encontrada en medios sedimentarios lacustres con la acción bacteriana, pero siempre en condiciones de hipersalinidad y, en general, relacionada con la actividad de bacterias sulfato reductoras y por tanto en condiciones de anaerobiosis (Vaconcelos y Mckenzie 1997; Warthmann *et al.*, 2000; García del Cura *et al.*, 2001; Mastandrea *et al.*, 2006). Estas condiciones están en contradicción con la presencia del yeso que típicamente acompaña a las formaciones dolomíticas. Si estas formaciones hubiesen ocurrido en presencia de bacterias sulfato reductoras no tendría sentido la presencia del yeso. Por otro lado está el problema de explicar cómo, en estas formaciones, aparecen fósiles que originalmente eran de calcita o aragonito, y que actualmente son de dolomita. Por el momento no existe ningún modelo biótico (que incluya precipitación de dolomita por bacterias) que haya explicado este problema.

1.2.1.3. Formación de otros carbonatos

Además del carbonato de calcio y magnesio existen una gran variedad de carbonatos cuya formación puede ser inducida por microorganismos, de los que son ejemplos los carbonatos de estroncio y los carbonatos de bario.

La estroncianita (SrCO_3) es uno de los pocos minerales existentes que contienen el estroncio y cuya precipitación por microorganismos, a nivel de laboratorio, ya fue demostrada por Roemer y Schwartz (1965) al conseguir la formación de este mineral a partir de celestita (SrSO_4) mediante una bacteria sulfato reductora. Anderson y Appanna (1994) produjeron SrCO_3 a partir de la mineralización del citrato de estroncio por *Pseudomonas fluorescens*. Warren *et al.* (2001) estudiaron la incorporación de Sr^{+2} en calcitas biogénicas utilizando medio de urea adicionado con pequeñas concentraciones de Ca^{+2} y Sr^{+2} . La incorporación de Sr^{+2} se producía en forma de una solución sólida homogénea de SrCO_3 y CaCO_3 . Fujita *et al.* (2004) realizaron estudios similares buscando posibles procesos de remediación de aguas subterráneas contaminadas con ^{29}Sr . Además de obtener resultados similares, observaron que la incorporación del estroncio en la calcita se veía favorecida por la rápida formación de ésta debido a la presencia de bacterias ureolíticas, en este caso de *Bacillus pasteurii*. Los procesos de formación de calcitas con estroncio en la naturaleza ya han sido observados por Ferris *et al.* (1995) en afloramientos de serpentinita en zonas de emergencia de aguas subterráneas, como resultado de la actividad de cianobacterias epilíticas. Douglas (2004) observó precipitados de SrCO_3 en la superficie de bacterias presentes en depósitos evaporíticos de California, que probablemente se debían a la capacidad de estas bacterias de concentrar el estroncio en la superficie celular y actuar como núcleos de mineralización.

El bario es un elemento que fácilmente es oxidado en el aire, es altamente reactivo en el agua y suele encontrarse muy frecuentemente en la naturaleza en forma de sulfatos como la barita (BaSO_4) y de carbonatos como la witherita (BaCO_3). La formación de witherita en condiciones de laboratorio fue demostrada por primera vez por Roemer y Schwartz (1965) al crecer bacterias anaerobias sulfato reductoras en un medio cuya única fuente de

azufre era sulfato de bario. Posteriormente, McCready *et al.* (1980), estudiando el fraccionamiento isotópico del azufre producido por *Desulfovibrio vulgaris* al utilizar como aceptor de electrones BaSO_4 , encontraron que los niveles de bario soluble presente en el medio se encontraban muy por debajo de lo esperado, este efecto fue explicado por los autores como una consecuencia de la formación de witherita debido a la oxidación de compuestos orgánicos y a la producción de CO_2 . Lu *et al.* (2004) describen a la witherita como un producto metasomático de la bio-barita consecuencia de la acción de bacterias sulfato reductoras y de la reducción de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Sanchez-Moral *et al.* (2004) encontraron que varias bacterias de los géneros *Agromyces*, *Bacillus*, *Lysobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* y *Ralstonia*, aisladas de las criptas de St. Callixtus y Domitilla (Roma, Italia), eran capaces de producir la precipitación de witherita.

Pye *et al.* (1990) encontraron indicios que sustentaban el posible papel jugado por los microorganismos en la formación de la siderita (FeCO_3) al estudiar la formación de diferentes minerales en sedimentos de North Norfolk (Inglaterra). Fredrickson *et al.* (1998) realizaron estudios de biomineralización de compuestos de hierro a partir de la reducción desasimilatoria del óxido férrico hidratado por parte de *Shewanella putrefaciens* CN32, aislada de aguas subterráneas. Encontraron que la cepa CN32 era capaz de producir siderita en el medio de cultivo estudiado. Islam *et al.* (2005) obtuvieron siderita biogénica a partir de un consorcio bacteriano reductor del Fe (III) aislado de aguas donde la siderita dominaba como principal mineral de hierro, para, posteriormente, usar esta siderita en la inmovilización de arsénico. Chistyakova *et al.* (2008) también lograron la formación de siderita utilizando, en este caso, la bacteria *Geoalkalibacter ferrihydriticus* aislada de sedimentos del lago Khadyn en Rusia.

1.2.2. Precipitación bacteriana de fosfatos

El fósforo se presenta fundamentalmente en la naturaleza en forma de fosfatos, solubles e insolubles. Dentro de los fosfatos insolubles el más abundante es el apatito [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$], donde el radical libre puede estar representado exclusivamente por F, Cl o grupos OH, o por una combinación de ellos. Además, se ha visto que su estructura es muy tolerante a

Introducción general

las sustituciones, pudiendo incorporar la mitad de los elementos de la tabla periódica en su estructura cristalina (McConnell, 1973). Los depósitos de apatito abarcan aproximadamente la mitad de las reservas de fosfatos presente en la litosfera (Hughes y Rakovan, 2002) y muy frecuentemente aparecen formando depósitos en ambientes marinos. La formación de muchos de estos depósitos ha sido ya relacionada con la actividad de bacterias del azufre y otros microorganismos (Schulz y Schulz, 2005).

La precipitación bacteriana de apatito ha sido puesta de manifiesto por varios autores. En 1962, Rizzo *et al.*, observaron la precipitación de apatito por *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces israeli*, *Actinomyces naeslundii* y *Bacterionema matruchotii* en el estómago de animales, sugiriendo que estos microorganismos estaban implicados en la formación biológica del apatito. Más tarde, McConnell (1965), afirmó la intervención de los microorganismos en la precipitación de depósitos de apatito en ambientes marinos. Posteriormente, Ennever *et al.* (1974), estudiando el papel de los fosfolípidos bacterianos, encontraron que, *in vitro*, su papel es más de intermediarios de la precipitación de apatito que de agentes catalíticos. Un año después, Piper y Codespoti (1975) afirmaron que la formación de carbonato fluorapatito en aguas de mar, es debida a la desnitrificación bacteriana en las últimas capas de oxígeno del océano.

Posteriormente, Lucas y Prévot (1984; 1985), investigaron la precipitación bacteriana de apatito en agua de mar y agua dulce, adicionadas de ARN y fuentes de calcio, tales como calcita, aragonito y yeso. Como consecuencia de los resultados obtenidos, propusieron un mecanismo de precipitación basado en la ruptura del ácido ribonucleico por acción bacteriana; la D-ribosa proporcionaría la energía necesaria para el desarrollo microbiano, mientras que el ácido fosfórico precipitaría apatito por combinación con el calcio procedente de los carbonatos. Además, observaron que en los cultivos de agua dulce el tiempo de aparición de los cristales era más corto que en las aguas de mar, fenómeno que lo atribuyeron a un posible efecto inhibitor de los iones de magnesio presentes en el agua marina. Estos autores sugirieron que dicho modelo biogeoquímico puede explicar, en parte, la génesis de depósitos

Introducción general

de apatito en la naturaleza. No obstante, Omelon y Grynypas (2008) sugirieron que la alta concentración de fosfatos, presentes en poros de los sedimentos marinos, unido a la alta concentración de calcio y a una ligera alcalinidad del agua de mar, podrían originar una precipitación localizada de apatito

El fosfato también puede aparecer en la naturaleza en forma de sales de calcio, aluminio, hierro, magnesio o incluso uranio. Estos precipitados son más frecuentes en suelos y sedimentos. Para algunos investigadores la precipitación de fosfatos en suelos y sedimentos es debida a la actividad metabólica de los microorganismos. Como consecuencia del metabolismo puede producirse la liberación de iones activos de calcio, aluminio y hierro a partir de combinaciones orgánicas e inorgánicas de dichos iones. Por otra parte, su influencia sobre el pH y la energía libre puede ser también un factor en la formación de estos fosfatos insolubles (Williams y Patrick, 1971; Patrick *et al.*, 1973). Macaskie *et al.* (2000) estudiaron la bioprecipitación de fosfato de uranio mediada enzimáticamente por *Citrobacter* sp. La actividad fosfatasa liberaría iones fosfatos que interactuarían con los iones UO_2^{+2} unidos al lipopolisacárido externo (LPS). El LPS al ser el sitio de unión preferente de los iones UO_2^{+2} actuaría como sitio de nucleación de los cristales. La precipitación de fosfatos de uranio, como la autonita y la meta-autonita también ha sido descrita por otros autores como Beazley *et al.* (2007) y Jroundi *et al.* (2007). En ambos casos, al igual que Macaskie *et al.* (2000), destacaron la posible mediación de la actividad fosfatasa en la precipitación del mineral, así como la importancia de este proceso con vistas a posibles técnicas de bioremediación de aguas contaminadas con este radionucléido.

Entre los fosfatos que han merecido especial atención por los microbiólogos se encuentra la estruvita ($NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$). Ello es debido, por una parte, a que muchos tipos de bacterias pueden producir este mineral en condiciones de laboratorio y, por otra, por haberse establecido una relación entre su presencia en los cálculos renales y las infecciones urinarias (Gault *et al.*, 1995; Bruyere *et al.*, 2008).

En la naturaleza, la estruvita puede encontrarse asociada con la materia orgánica en descomposición como, por ejemplo, en los depósitos de guano

Introducción general

(por ello también llamada guanita), en las tierras pantanosas, en estiércoles, en sedimentos ricos en restos orgánicos, en cuevas basálticas (Dana, 1966; Donovan y Grimm, 2007), en aguas residuales (Ryu *et al.*, 2008) y en el tracto urinario de diversos animales, incluido el hombre (Walsh y Murru, 1987; Marrakchi *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009).

La primera descripción de la producción de estruvita por bacterias fue hecha por Robinson en 1889, quien sugirió que los microorganismos pueden precipitarla como consecuencia de la combinación de los iones amonio, producidos por el metabolismo de compuestos nitrogenados, con el fosfato y magnesio presentes en el medio. Robinson también adelantó la hipótesis de que la formación bacteriana de este mineral puede ser la razón de la presencia de estruvita en la naturaleza. Resultados similares fueron encontrados, más tarde, por Beavon y Heatley (1962), trabajando en la producción de estruvita por *S. aureus*. Nelson *et al.* (1991), estudiando la producción de estruvita por *Bacillus pumilus*, explicaron la liberación del ión amonio, necesario para la formación de estruvita, como consecuencia de la degradación de las células vegetativas por autolisinas.

En 1983, Rivadeneyra *et al.* observaron que no hay ninguna correlación entre la producción de estruvita y el grupo taxonómico de las cepas productoras de este mineral. También mostraron que la producción bacteriana de estruvita no es un fenómeno general. Además, en este mismo trabajo, estos autores demostraron que la producción de amonio no era el único factor responsable de la precipitación de estruvita por bacterias, ya que el 75% de las cepas que no producen estruvita también liberan el amonio durante su crecimiento. Posteriormente, González-Muñoz *et al.* (1993) afirmaron que, para la producción de estruvita por *M. coralloides* D, no basta con el suministro del ión amonio y de un pH alcalino en el medio de cultivo, sino que es necesaria la presencia física de la bacteria.

Se han realizado, además, estudios acerca del efecto de varios factores sobre la precipitación de estruvita. Beavon y Heatley (1962), encontraron que el ión magnesio favorece su precipitación, mientras el calcio la inhibe. Resultados similares fueron encontrados por Rivadeneyra *et al.* (1983). Ben Omar *et al.*

(1994) encontraron que el pH y el fosfato tienen efecto sobre la precipitación de estruvita.

En cuanto al efecto de la aireación, Malone y Towe (1970) estudiaron la formación de estruvita en cultivos bacterianos de agua de mar sometidos a distintos niveles de aireación, concluyendo que la aireación influía de forma positiva sobre la precipitación de la estruvita. Esto es similar a lo encontrado por Saidou *et al.* (2009) al estudiar la influencia de la aireación en la formación de estruvita en tuberías y bombas de recirculación de aguas residuales. Pérez-García *et al.* (1990), trabajando sobre la precipitación de estruvita en cultivos de *Arthrobacter sp* y *Pseudomonas sp*, encontraron que la agitación ayuda a su formación como consecuencia de su influencia sobre el crecimiento bacteriano.

La precipitación de estruvita en medios de agua de mar (natural o artificial) conteniendo cloruro magnésico o sulfato magnésico, ha sido descrita por Shinano y Sakai (1975) en cultivos puros de *Pseudomonas calciprecipitans*, y por Malone y Towe (1970) en cultivos de bacterias marinas. Los resultados obtenidos con estas dos fuentes de magnesio muestran que ambas son favorables para la precipitación bacteriana de este mineral. Resultados similares fueron encontrados, más tarde, por Pérez-García *et al.* (1989a), que confirmaron que la fuente de magnesio juega un papel importante en la formación de estruvita por bacterias. Estos autores observaron que el sulfato y el cloruro magnésico son las fuentes más favorables para la precipitación, mientras el acetato y el carbonato magnésico son fuentes inapropiadas para la formación bacteriana de este compuesto cristalino. En 1975, Shinano y Sakai estudiando el efecto de la concentración de iones magnesio en la precipitación de carbonatos por *P. calcipricipitans*. observaron producción de estruvita cuando la concentración de magnesio se aumenta con respecto a la de calcio. Así, con valores de la proporción de Mg^{+2}/Ca^{+2} de 4, 5 y 6,33 encontraron una cantidad considerable de estos cristales, mientras que a una proporción de Mg^{+2}/Ca^{+2} de 3, sólo se produjeron trazas de este compuesto cristalino. En este sentido, Le Corre *et al.* (2005) destacan que proporciones cercanas a 1 imposibilitan la cristalización de estruvita. Además destacan la importancia de los iones Ca^{+2} en el tamaño y forma de los cristales de estruvita producidos. Un

incremento en los iones de calcio reduce el tamaño e, incluso, llegan a inhibir su formación.

En relación al pH, Boistelle *et al.* (1984), observaron que la estruvita puede formarse en orinas estériles tanto a pH ácido como alcalino, siempre y cuando las concentraciones de magnesio, amonio y fosfato sean idóneas para la cristalización. Resultados similares fueron encontrados por Pérez-García *et al.* (1989b), quienes observaron que la precipitación de estruvita por bacterias se da en medios con valores de pH entre 5 y 9. Sin embargo, estos últimos autores afirmaron que los mejores resultados se obtienen para valores de pH entre 7 y 8. Además, el pH final de todos los casos varía entre 7 y 8,4. Hao *et al.* (2008) determinaron que el pH óptimo para la formación de estruvita se encontraba entre 7 y 9 usando agua ultrapura y que la presencia de iones Ca^{+2} , al utilizar aguas subterráneas, dificulta la precipitación pura de estruvita debido a la formación de otros precipitados. En este último caso encontraron muy difícil la obtención de precipitados puros de estruvita a partir de pH 8.

La temperatura también tiene un efecto sobre la precipitación bacteriana de estruvita. Así, Rivadeneyra *et al.* (1993), trabajando con la precipitación de estruvita por 54 cepas bacterianas aisladas del suelo y de las aguas dulces, encontraron que la precipitación de este compuesto cristalino se da en todas las temperaturas ensayadas. Los mejores resultados, sin embargo, se obtuvieron a 5 °C y 25 °C. Además, encontraron que la precipitación de los cristales disminuye por encima de 30 °C. Resultados similares fueron obtenidos por los estudios de Adnan *et al.* (2004) en los que la formación de estruvita se veía favorecida a temperaturas bajas.

1.2.3. Biomineralización y bioacumulación intracelular

Muchos microorganismos son capaces de acumular en su interior elementos como el azufre y el hierro y posteriormente, en muchos casos, dar lugar a minerales.

Un caso especialmente llamativo es el de las bacterias magnetotácticas. Estas bacterias son un grupo heterogéneo de procariontes capaces de alinearse, de una manera pasiva, con las líneas del campo magnético terrestre

y desplazarse en la dirección de estas (Blakemore, 1975). Esta característica especial radica en la presencia en su citoplasma de cristales de magnetita (Fe_3O_4) o greigita (Fe_3S_4) envueltos en una membrana, dando lugar al denominado “magnetosoma” (Balkwill *et al.*, 1980; Bazylinski y Frankel, 2003). En estas bacterias, la fase mineral de los magnetosomas parece estar bajo un estricto control. Esto quedó patente tras los experimentos de Meldrum *et al.* (1993) en los que diversas bacterias magnetotácticas continuaban sintetizando magnetita, y no greigita, en presencia de sulfuro de hidrogeno en el medio. La formación del magnetosoma es un proceso complejo en el que se produce una acumulación de hierro en el interior celular y, posteriormente, un traslado al interior de la vesícula del magnetosoma (Taoka *et al.*, 2009). Una vez en el interior de la vesícula se produce una biomineralización controlada de magnetita o greigita. Aunque el proceso en sí no está claro aún, si se sabe de la existencia de numerosas proteínas en la membrana del magnetosoma que juegan un papel crucial para la formación del cristal en su interior (Grünberg *et al.*, 2001; Wahyudi *et al.*, 2003; Scheffel *et al.*, 2008).

Otro caso interesante es el de algunos organismos relacionados con el azufre, como son las bacterias purpuras del azufre o los géneros *Beggiatoa* y *Thiothrix*. Estas bacterias son capaces de acumular gránulos de azufre elemental en su interior; en el caso de *Beggiatoa* mediante la oxidación de sulfuro de hidrogeno, para posteriormente oxidarlo a sulfato y utilizar los electrones en la producción de energía (Mußmann *et al.*, 2007). Nelson *et al.*, (1996) encontraron que estas bacterias eran capaces, en determinadas ocasiones, incluso de depositar selenio intracelularmente.

1.3. Estructura bacteriana y mecanismos de biosorción en bacterias

Las bacterias, como ya hemos descrito, o bien debido a las numerosas actividades que poseen o bien debido a su estructura, pueden influenciar en los procesos geológicos y en los ciclos de los elementos. Dentro de estos procesos la biosorción*, que puede definirse como la captación por parte de un material

*Proviene del término sorción, que significa “Retención de una sustancia por otra cuando están en contacto”. No está recogida por la RAE, aunque ya algunos diccionarios enciclopédicos la incluyen (Diccionario Enciclopédico Vox 1. © 2009 Larousse Editorial, S.L.).

Introducción general

biológico de sustancias presentes en una solución, es de una gran importancia. La biosorción engloba los procesos de adsorción, absorción, intercambio iónico, unión a una superficie y precipitación (Gadd, 2009), procesos que, en gran medida, vienen determinados por la composición de los orgánulos y membranas de la bacteria. En general, cualquier estructura que tenga proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, entre otras moléculas, proporcionan lugares en donde se pueden fijar los iones metálicos y otros elementos, ya que en su composición existen diferentes grupos funcionales a los que el metal puede unirse. En la Tabla 1.2 podemos ver los principales grupos funcionales que pueden interactuar con los metales (Volesky, 2003; Wang y Chen 2009).

En este sentido, de entre todas las estructuras que componen la bacteria, y en relación a los procesos de biosorción, la pared celular, los polímeros extracelulares y la capa S serían de las más importantes, debido principalmente a que son las estructuras más externas y se encuentran en contacto directo con el medio que rodea a la célula.

Las paredes celulares de las bacterias no son todas idénticas; de hecho, el análisis de la composición de la pared celular es uno de los factores a tener en cuenta en la diferenciación de especies bacterianas. Según el tipo de pared existen dos tipos de bacterias.

A) Gram positivas, en las que la pared está formada por una gruesa capa de peptidoglucano (polímero lineal de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico) conectado por puentes de aminoácidos en cuyo interior se encuentra inmersos polialcoholes como el ácido teicurónico y el ácido teicoico, que en muchos casos puede estar unido a moléculas lipídicas dando lugar a ácidos lipoteicoicos (presentes sólo en las bacterias Gram positivas).

B) Gram negativas, en las que la capa de peptidoglucano es mucho más delgada. Además, a esta delgada capa de peptidoglucano, hay que añadir una membrana externa formada por LPS y lipoproteínas.

Introducción general

Grupo funcional (Fórmula)	Grupo funcional (Denominación)	Ej. de localización
$R-O-H$	Hidroxilo	Alcoholes, carbohidratos, polisacáridos sulfonados, ácido urónico
$R-C \begin{matrix} // O \\ \backslash OH \end{matrix}$	Carboxilo	Ácidos grasos, proteínas y ácidos orgánicos
$R-C \begin{matrix} H \\ NH_2 \\ H \end{matrix}$	Amino	Proteínas y ácidos nucleídos
$R-C \begin{matrix} // O \\ \backslash O-R \end{matrix}$	Ester	Lípidos
$R-C \begin{matrix} H \\ SH \\ H \end{matrix}$	Sulfidrilo	Proteínas
$R-C \begin{matrix} // O \\ \backslash H \end{matrix}$	Carbonilo (Terminal)	Aldehídos y polisacáridos
$R-C \begin{matrix} // O \\ C \\ \end{matrix}$	Carbonilo (Interno)	Cetonas y polisacáridos
$R-O-P \begin{matrix} // O \\ OH \\ OH \end{matrix}$	Fosfato	Ácidos nucleídos, fosfolípidos
$R-S \begin{matrix} // O \\ \\ // O \end{matrix}$	Sulfonato	Polisacáridos sulfonatados

Tabla 1.2. Grupos funcionales más importantes capaces de interactuar con metales y otros elementos en los procesos de sorción (tomado de: Talaro y Talaro, 2002; Volesky 2003).

Los grupos funcionales de carácter aniónico presentes en el peptidoglicano, ácido teicurónico y ácido teicoico de las bacterias Gram positivas y en el peptidoglucano, fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas de las bacterias Gram negativas son los responsables de conferir a la pared celular una carga global negativa, otorgándole, por tanto la capacidad de fijar

Introducción general

diversos elementos (van der Wal *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2007). Las proteínas y péptidos que conforman muchos de estos compuestos, ofrecen una serie de grupos de unión a los metales, tales como grupos amino y carboxilo terminales, enlace peptídico desprotonado y, especialmente, sustituyentes de cadena. En este sentido Golab y Breitenbach (1995) indicaron que la capacidad de fijar cobre de *Streptomyces pilosus* era debida a la carga negativa de los grupos carboxilo presentes en su pared, mientras que Kang *et al.* (2007) resaltaron la importancia de los grupos amino presentes en la pared a bajos pH en la fijación del cromo. Por otro lado, en la pared abundan los grupos fosfato que pueden participar en la unión a diversos metales. Un ejemplo lo encontramos el trabajo de Ha *et al.* (2010), en el que se estudia el papel del EPS en procesos de sorción de zinc y de plomo. En este estudio comparan una cepa salvaje de *S. oneidensis* con una cepa modificada genéticamente que produce poca cantidad de EPS, en la que encontraron que el número de uniones a grupos fosfato era muy superior que en la cepa salvaje (donde abundaban más los enlaces a grupos carboxilo), posiblemente porque la baja cantidad de EPS permitía la difusión del metal hacia la pared celular en donde la abundancia de estos grupos fosfatos es muy superior.

Muchos microorganismos secretan en su superficie materiales viscosos, generalmente formados por polisacáridos y, menos frecuentemente, por proteínas. Algunas veces se utilizan los términos cápsula y capa mucosa para describir las capas de polisacáridos, aunque también se emplea el término glucocálix. El glucocálix se define como el material polisacárido que se extiende alrededor de la célula. Posee estructura y composición diferente en los distintos organismos, si bien contiene habitualmente glucoproteínas y un gran número de distintos polisacáridos, incluyendo polialcoholes y aminoazúcares. Dependiendo del grado de ordenación de esta estructura pasaría a denominarse cápsula cuando forman capas rígidas organizadas en una matriz impermeable que excluye colorantes, o capa mucosa cuando el glucocálix se deforma con facilidad, siendo incapaz de excluir partículas. Los polímeros de la cápsula de algunas bacterias están cargados negativamente debido a la presencia de uno o varios grupos del tipo de ácido urónico, piruvato, fosfato o sulfato. Pradhan *et al.* (2007) estudiaron los grupos

Introducción general

funcionales presentes en la capsula de una cepa de *Microcystis*, encontraron que la cepa utilizada, podía fijar diferentes metales mediante procesos de intercambio iónico con los grupos carboxilo y amino presentes en su cápsula. En concreto, esta cepa mostró una buena capacidad de sorción del hierro (a grupos carboxilo), seguida del cromo y níquel (a grupos amino y carboxilo). Por otro lado, Zhang y Min (2010) examinando la capacidad de sorción del cadmio por *Burkholderia fungorum*, encontraron la participación de grupos carboxilo, amino e hidroxilo, presentes en el exopolisacárido de la capsula, en la fijación de este metal. Además interpretaron esta sorción como un posible mecanismo de intercambio iónico, al igual que ocurrió en los estudios de Pradhan *et al* (2007). Además existen numerosos trabajos en los que se alude a la notable capacidad de sorción del EPS. El término de EPS abarcaría cualquier tipo de polímero secretado por la bacteria al exterior. Merroun *et al.* (1998; 2001; 2003) demostraron la implicación del EPS de *M. xanthus* en la sorción de plata, plomo y lantano, mientras que González- Muñoz *et al.* (1997) lo hicieron, con este mismo microorganismo, en la sorción del uranio. Por otro lado, Baker *et al.* (2010) estudiaron el papel del EPS de *Hymenobacter aerophilus* en la reactividad química de la superficie bacteriana. En sus estudios se observa el aumento en la concentración de los ligandos presentes en el EPS (grupos carboxilo, fosfato y amino) al entrar en contacto con el cadmio y, por tanto, un aumento de la capacidad de sorción del EPS. Otros autores, como Guibaud *et al.* (2008), Morillo-Pérez *et al.* (2008) o Sun *et al.* (2009), han estudiado la capacidad de sorción de la fracción EPS aislada de la bacteria.

Algunas bacterias poseen una capa externa de proteínas o glicoproteínas denominada capa S o capa superficial paracristalina. La capa S posee una apariencia cristalina con una simetría hexagonal y tetragonal dependiendo del número y estructura de las subunidades de proteínas y glicoproteínas que la forman. Esta capa se encuentra asociada al LPS de las bacterias Gram negativas o al peptidoglucano de las Gram positivas y en su ensamblaje participan diversos cationes divalentes (Velásquez y Dussan, 2009). Muchos elementos, como algunos metales, pueden unirse a esta estructura. Merroun *et al.* (2005; 2007) describieron la capacidad de la capa S de *B. sphaericus* JG-A12 en la fijación de uranio, cobre, plomo, aluminio, y

cadmio, así como la posible utilización de la capa S en la formación de nanopartículas de oro. En uno de estos estudios resaltan la implicación de grupos carboxilo y fosfato de la superficie celular en la fijación de estos elementos y la posible optimización de la captación del uranio mediante la inserción en la capa S de aminoácidos como el aspártico y el glutámico, que aumentarían la cantidad de grupos carboxilo en esta estructura. En este sentido, Patel *et al.* (2010) consiguieron una fijación del cadmio del 99,9 % (en los controles era sólo del 11 %) mediante la introducción del péptido hexahistidina en la proteína RsaA de la capa S de *Caulobacter crescentus*.

1.3.1. Los procesos de biosorción como solución a problemas medioambientales

Ocupando más del 70 % de la superficie de la Tierra el agua es, indudablemente, uno de los recursos naturales más preciados que existen en nuestro planeta, sin el cual la vida dejaría de existir. A pesar de este hecho bien conocido, la contaminación de los recursos hídricos es un problema muy extendido (Katsoyiannis y Katsoyiannis, 2006; Lourino-Cabana 2010). Existen numerosas fuentes de contaminación de las aguas, aunque estas, se pueden englobar en dos categorías: fuentes contaminantes directas e indirectas. Dentro de las fuentes directas encontramos los efluentes que provienen de industrias, refinerías y plantas de tratamientos de residuos, mientras que dentro de las fuentes indirectas se incluyen contaminantes que entran al sistema de suministro de aguas a través del suelo, aguas subterráneas y de la atmósfera (a través de la lluvia). En general estos contaminantes pueden clasificarse en dos categorías, orgánicos e inorgánicos (Vijayaraghavan y Yun, 2008).

Dentro de los contaminantes inorgánicos, y formando uno de los grupos de contaminantes más importante que encontramos, están los metales. Estos han sido utilizados extensamente en muchos tipos de industrias, entre las que se encuentran la minería, la industria metalúrgica y las industrias especializadas en la fabricación de componentes electrónicos. La presencia de iones metálicos en los efluentes industriales es extremadamente indeseable ya que son tóxicos para cualquier tipo de organismo. Dentro de este tipo de contaminantes, hay algunos de gran toxicidad como el mercurio (Jitaru y

Introducción general

Adams, 2004; Ebrahimpour *et al.*, 2010), el plomo, el cadmio (Karmakar *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2010) y el cromo (Pathe *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009). A modo de ejemplo citaremos el caso del plomo que produce varios tipos de alteraciones (la gran mayoría a nivel del sistema nervioso central) debido a que forma ligandos complejos (con grupos -SH, principalmente) con los sistemas enzimáticos del organismo (Singh *et al.* 2010). Además, el metabolismo del plomo interfiere considerablemente con el del calcio, dando lugar a un medio intracelular que dificulta considerablemente el transporte iónico (Lafond *et al.*, 2004; Barhoumi *et al.*, 2010). Por otra parte, compuestos como el tetraetil y el tetrametil de plomo son liposolubles y se absorben con facilidad por la piel, el tracto gastrointestinal y los pulmones.

Otros metales, como los pertenecientes al grupo de los radionúclidos (uranio, americio, plutonio, neptunio o curio) poseen una gran toxicidad incluso a concentraciones muy bajas. Para el caso del uranio, además de los efectos propiamente radiactivos, se ha detectado la producción de daños nefrológicos a largo plazo (Zamora *et al.* 2009).

Actualmente existen muchos métodos para el tratamiento de los efluentes generados por estas industrias y para la bioremediación de zonas ya contaminadas. Los métodos principales para la retirada de metales de soluciones acuosas se pueden clasificar en tres grupos: métodos físicos, químicos y biológicos. Dentro de los métodos tradicionales (métodos físicos y químicos), están la precipitación química, filtración, reducción u oxidación química, ósmosis inversa, intercambio iónico, evaporación y adsorción a materiales inorgánicos. No obstante, muchos de estos métodos presentan limitaciones: algunos son excesivamente caros, otros son difíciles de aplicar "in situ" y algunos pueden generar otros residuos de difícil reciclaje (Volesky, 2001; Gavrilesco *et al.*, 2009)

La utilización de material biológico, así como el uso de procesos microbianos, para la bioremediación de zonas contaminadas ha ido ganando interés progresivamente en los últimos años debido, entre otros factores, a que estos métodos reducen de forma considerable el empleo de productos químicos y a que son procesos poco costosos, respetuosos con el

Introducción general

medioambiente y eficientes incluso a bajos niveles de concentración del contaminante. En este sentido se han realizado muchos estudios con algas marinas (Leush *et al.*, 1995; Lee y Volesky, 1999; Mehta y Gaur 2005; Raja *et al.*, 2008; Pahlavanzadeh *et al.*, 2010) y microorganismos (Gadd, 1990; 1997; Haferburg y Kothe, 2007; Pal y Paul *et al.*, 2008; Chatterjee *et al.*, 2010). La capacidad de los microorganismos para fijar y concentrar determinados cationes es muy notable, sirviendo como ejemplo el citado por Mann 1990, según el cual algunos microorganismos marinos pueden fijar plomo y cadmio concentrándolo hasta niveles de 10^5 veces más que la concentración en que estos elementos se encuentran en el agua marina.

Las bacterias y otros microorganismos poseen una serie de mecanismos por los que son capaces de tolerar diferentes concentraciones de metales. Y se entiende que la capacidad de biosorción que presentan muchos microorganismos, y en particular las bacterias, viene determinada en gran medida por la presencia de estos mecanismos de tolerancia. Estos mecanismos pueden ser dependientes del metabolismo o independientes del mismo, como el caso de la sorción. En la Figura 1.1 se encuentran representados algunos de estos mecanismos (Hughes y Poole 1989; Lloyd y Macaskie; 2002; Özdemir *et al.*, 2009). De todos ellos, los procesos de sorción a las estructuras superficiales y a polímeros extracelulares secretados por las bacterias son de los más importantes. En la Tabla 1.3 puede verse la capacidad de sorción de algunos metales por diferentes bacterias.

En relación con la sorción de los metales, las bacterias tienen especial relevancia ya que son los microorganismos más abundantes y versátiles que existen. Se han utilizado en estudios de biosorción debido a su pequeño tamaño (su alta relación superficie/volumen proporciona una gran área de interacción con los contaminantes), a su capacidad para crecer bajo condiciones controladas y a su capacidad de resistencia y desarrollo en un amplio rango de ambientes (Urrutia, 1997; Srivastava y Majumder, 2008), incluyendo las chimeneas hidrotermales en las que la concentración de determinados metales puede llegar a ser muy alta. En concreto, este tipo de ambientes se caracteriza por la presencia de altos niveles de metales que

Introducción general

incluyen hierro, manganeso, zinc, cobre, cobalto o arsénico dependiendo de la composición química de la roca basáltica que forme parte de la interfase fluido-roca. En este ambiente extremo, se han desarrollado una gran variedad de bacterias y otros microorganismos capaces de tolerar estos niveles de metales gracias a la producción de EPS y al secuestro del metal mediante unión a componentes cargados o, también, gracias a otros mecanismos dependientes del metabolismo como transformaciones enzimáticas, producción de proteínas tales como las metalotioneinas y transporte activo del metal (Holden y Adams, 2003; Vetriani *et al.*, 2005; Minic *et al.*, 2006). Los dos primeros mecanismos son de carácter meramente pasivo, siendo de gran interés en los estudios de biosorción. Por tanto el estudio de microorganismos aislados de este tipo de zonas y de microorganismos relacionados con ellos puede ser de gran interés en vistas a la búsqueda de nuevos organismos capaces de fijar metales en condiciones más adecuadas y de una manera más eficiente (Zhou *et al.*, 2009).

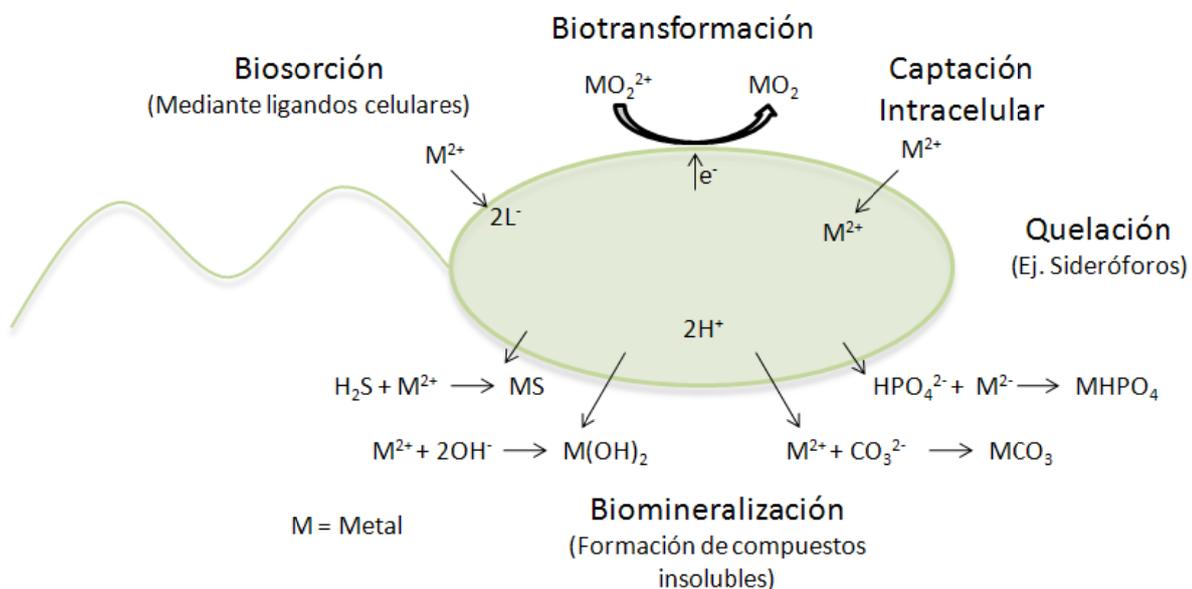


Figura 1.1. Principales mecanismos de resistencia a metales presentados por las bacterias y otros microorganismos (tomado de Lloyd y Macaskie 2002)

Introducción general

Metal	Bacteria	Sorción (mg/g)	Referencia
Pb	<i>Bacillus sp.</i>	92,3	Tunali <i>et al.</i> , (2006)
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	567,7	Choi y Yun (2004)
	<i>Enterobacter sp.</i>	50,9	Lu <i>et al.</i> , (2006)
	<i>Pseudomonas putida</i>	270,4	Uslu y Tanyol (2006)
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	163,3	Hasan <i>et al.</i> , (2009)
Zn	<i>Streptomyces rimosus</i>	30,0	Mameri <i>et al.</i> , (1999)
	<i>Bacillus firmus</i>	418,0	Salehizadeh y Shojaosadati (2003)
	<i>Aphanothece halophytica</i>	133,0	Incharoensakdi y Kitjahn (2002)
	<i>Pseudomonas putida</i>	17,7	Chen <i>et al.</i> , (2005)
Cu	<i>Bacillus firmus</i>	381,0	Salehizadeh and Shojaosadati (2003)
	<i>Bacillus sp.</i>	16,3	Tunali <i>et al.</i> , (2006)
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	65,3	Savvaidis <i>et al.</i> , (2003)
	<i>Pseudomonas putida</i>	96,9	Uslu y Tanyol (2006)
	<i>Sphaerotilus natans</i>	60,0	Beolchini <i>et al.</i> , (2006)
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	66,7	Ozturk <i>et al.</i> , (2004)
Cd	<i>Aeromonas caviae</i>	155,3	Loukidou <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Enterobacter sp.</i>	46,2	Lu <i>et al.</i> , (2006)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	278,0	Ziagova <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	250,0	Ziagova <i>et al.</i> , (2007)
Cr(IV)	<i>Bacillus coagulans</i>	39,9	Srinath <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Aeromonas caviae</i>	284,4	Loukidou <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	69,4	Zhou <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	83,3	Sahin y Ozturk (2004)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	95,0	Ziagova <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	143,0	Ziagova <i>et al.</i> , (2007)
Ni	<i>Bacillus thuringiensis</i>	45,9	Ozturk (2007)
Pd	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	128,2	de Vargas <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i>	119,8	de Vargas <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	106,3	de Vargas <i>et al.</i> , (2004)
Pt	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	62,5	de Vargas <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i>	32,3	de Vargas <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	40,1	de Vargas <i>et al.</i> , (2004)
U	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	68,8	Nakajima y Tsuruta (2004)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	45,9	Nakajima y Tsuruta (2004)
	<i>Bacillus megaterium</i>	37,8	Nakajima y Tsuruta (2004)
	<i>Citrobacter freundii</i>	48,0	Xie <i>et al.</i> , (2008)
	<i>Synechococcus elongatus</i>	53,5	Acharya <i>et al.</i> , (2009)
	<i>Pantoea sp.</i>	196,0*	Chabalala y Chirwa (2010)
	<i>Enterobacter sp.</i>	182,0*	Chabalala y Chirwa (2010)
Th	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	75,9	Nakajima y Tsuruta (2004)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	66,1	Nakajima y Tsuruta (2004)
	<i>Bacillus megaterium</i>	74,0	Nakajima y Tsuruta (2004)

*mg respecto a la cantidad inicial (200 mg/l)

Tabla 1.3. Capacidad de sorción de algunos metales por diferentes bacterias.

1.4. Bibliografía

- Acharya, C., Joseph, D., Apte, S.K. (2009). "Uranium sequestration by a marine cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* strain BDU/75042". *Bioresource Technology*, 100 (7), 2176-2181.
- Adnan, A., Dastur, M., Mavinic, D.S., Koch, F.A. (2004). "Preliminary investigation into factors affecting controlled struvite crystallization at the bench scale". *Journal of Environmental Engineering and Science*, 3 (3), 195-202.
- Anderson, S., Appanna, V.D. (1994). "Microbial formation of crystalline strontium carbonate". *FEMS Microbiology Letters*, 116 (1), 43-48.
- Baas Becking, L.G.M., Kaplan, I.R., Moore, D. (1960). "Limits of the environment in terms of pH and oxidation and reductions potentials". *Journal of Geology*, 68, 243-284.
- Baker, M.G., Lalonde, S.V., Konhauser, K.O., Foght, J.M. (2010). "Role of extracellular polymeric substances in the surface chemical reactivity of *Hymenobacter aerophilus*, a psychrotolerant bacterium". *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (1), 102-109.
- Balkwill, D.L., Maratea, D., Blakemore, R.P. (1980). "Ultrastructure of a magnetotactic spirillum". *Journal of Bacteriology*, 141 (3), 1399-1408.
- Barghoorn, E.S., Schopf, J.W. (1965). "Microorganisms from the late Precambrian of Central Australia". *Science*, 150, 337-339.
- Barhoumi, R., Qian, Y., Burghardt, R.C., Tiffany-Castiglioni, E. (2010). "Image analysis of Ca²⁺ signals as a basis for neurotoxicity assays: Promises and challenges". *Neurotoxicology and Teratology*, 32 (1), 16-24.
- Baskar, S., Baskar, R. (2009). "Geobiology and geomicrobiology: importance and need for studies in the Indian context" *Current Science*, 96 (2), 200-201.
- Bavendamm, W. (1932). "Die mikrobiologische Kalkfällung in der tropischen see". *Archives of Microbiology*, 3, 105-276.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. (2003). "Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes". *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54, 217-247.

Introducción general

- Beavon, J., Heatley, N.G. (1962). "The occurrence of struvite (magnesium ammonium phosphate hexahydrate) in microbial cultures". *Journal of General Microbiology*, 31, 167-169.
- Beazley, M.J., Martínez, R.J., Sobczyk, P.A., Webb, S.M., Taillefert, M. (2007). "Uranium biomineralization as a result of bacterial phosphatase activity: Insights from bacterial isolates from a contaminated subsurface" *Environmental Science and Technology*, 41 (16), 5701-5707.
- Beerstecher, E. (1954). "Petroleum Microbiology". Elsevier, Houston, 375 pp.
- Beijerinck, M.W. (1895). "Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache de Sulfatreduktion". *Zentralblatt fuer bakteriologie, parasitenkunde, infektionskrankheiten und hygiene*, 1, 49-59.
- Beijerinck, M.W. (1913). "Oxydation de mangancarbonates durch bakterien und schimmelpilzen". *Folia Microbiologica*, 2, 123-134.
- Ben Omar, N., Arias, J.M., González-Muñoz, M.T. (1998). "Extracellular bacterial mineralization within the context of geomicrobiology". *Microbiología*, 13 (2), 161-172.
- Ben Omar, N., Entrena, M., González-Muñoz, M.T., Arias, J.M. (1994). "Effects of pH and phosphate on the production of struvite by *Myxococcus xanthus*". *Geomicrobiology Journal*, 12 (2), 81-90.
- Beolchini, F., Pagnanelli, F., Toro, L., Vegliò, F. (2006). "Ionic strength effect on copper biosorption by *Sphaerotilus natans*: Equilibrium study and dynamic modelling in membrane reactor". *Water Research*, 40 (1), 144-152.
- Blakemore, R. (1975). "Magnetotactic bacteria". *Science*, 190, 377-379.
- Boistelle, R., Abbona, F., Berland, Y., Granvilllemin, M., Olmer, M. (1984). "Areas of magnesium ammonium phosphate nucleation in sterile, alkaline or acid urine | [Les domaines de nucléation du phosphate ammoniacomagnésien dans des urines stériles, alcalines ou acides]". *Nephrologie*, 5 (5), 217-221.
- Boquet, E., Boronat, A., Ramos Cormenzana, A. (1973). "Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon". *Nature*, 246 (5434), 527-529.

Introducción general

- Braissant, O., Cailleau, G., Dupraz, C., Verrecchia, E.P. (2003). "Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: The role of exopolysaccharides and amino acids". *Journal of Sedimentary Research*, 73 (3), 485-490.
- Brown, D.A., Kamineni, D.C., Sawicki, J.A., Beveridge, T.J. (1994). "Minerals associated with biofilms occurring on exposed rock in a granitic underground research laboratory". *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (9), 3182-3191.
- Bruyere, F., Traxer, O., Saussine, C., Lechevallier, E. (2008). "Infection and urinary lithiasis | [Infection et lithiase urinaire]". *Progres en Urologie*, 18 (12), 1015-1020.
- Bryner, L.C., Beck, J.V., Davis, D.B., Wilson, D.G. (1954): "Microorganisms in leaching sulfideminerals". *Industrial and Engineering Chemistry*, 46, 2587-2592.
- Buczynski, C., Chafetz, H.S. (1991). "Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy". *Journal of Sedimentary Petrology*, 61 (2), 226-233.
- Burns, S.J., McKenzie, J.A., Vasconcelos, C., (2000). "Dolomite formation and biogeochemical cycles in the Phanerozoic" *Sedimentology Millennium* 41, 49-61.
- Bustos-Serrano, H., Morse, J.W., Millero, F.J. (2009). "The formation of whittings on the Little Bahama Bank". *Marine Chemistry*, 113 (1-2), 1-8.
- Chabalala, S., Chirwa, E.M.N. (2010). "Uranium (VI) reduction and removal by high performing purified anaerobic cultures from mine soil". *Chemosphere*, 78 (1), 52-55.
- Chafetz, H.S., Buczynski, C. (1992). "Bacterially induced lithification of microbial mats". *Palaios*, 7 (3), 277-293.
- Chang, J.-S., Hong, J. (1994). "Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64)". *Biotechnology and Bioengineering*, 44 (8), 999-1006.
- Chatterjee, S.K., Bhattacharjee, I., Chandra, G. (2010). "Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*" *Journal of Hazardous Materials*, 175 (1-3), 117-125.

Introducción general

- Chekroun, K.B., Rodríguez-Navarro, C., González-Muñoz, M.T., Arias, J.M., Cultrone, G., Rodríguez-Gallego, M. (2004). "Precipitation and growth morphology of calcium carbonate induced by *Myxococcus xanthus*: Implications for recognition of bacterial carbonates". *Journal of Sedimentary Research*, 74 (6), 868-876.
- Chen, T., Wise, S.S., Holmes, A., Shaffiey, F., Wise Jr., J.P., Thompson, W.D., Kraus, S., Wise Sr., J.P. (2009). "Cytotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in human and North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) lung cells". *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 150 (4), 487-494.
- Chen, X.C., Wang, Y.P., Lin, Q., Shi, J.Y., Wu, W.X., Chen, Y.X. (2005). "Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46 (2), 101-107.
- Chistyakova, N.I., Rusakov, V.S., Nazarova, K.A., Koksharov, Yu.A., Zavarzina, D.G., Greneche, J.-M. (2008). "Iron minerals formed by dissimilatory iron-and sulfur reducing bacteria studied by Mössbauer spectrometry". *Hyperfine Interactions*, 182 (1-3), 55-63.
- Choi, S.B., Yun, Y.-S. (2004). "Lead biosorption by waste biomass of *Corynebacterium glutamicum* generated from lysine fermentation process". *Biotechnology Letters*, 26 (4), 331-336.
- Colmer, A.R., Temple, K.L., Hinkle, H.E. (1950). "An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines". *Journal of Bacteriology*, 59, 317-328.
- Dana, E.S. (1966). "Dana's Mineralogy". John Wiley and Sons, New York.
- Davies, P.J., Bubela, B., Ferguson, J. (1977). "Simulation of carbonate diagenetic processes: formation of dolomite, huntite and monohydrocalcite by the reactions between nesquehonite and brine". *Chemical Geology*, 19, 187-214.
- Delgado, G., Delgado, R., Párraga, J., Rivadeneyra, M.A., Aranda, V. (2008). "Precipitation of carbonates and phosphates by bacteria in extract solutions from a semi-arid saline soil. Influence of Ca²⁺ and Mg²⁺ concentrations and Mg²⁺/Ca²⁺ molar ratio in biomineralization". *Geomicrobiology Journal*, 25 (1), 1-13.

Introducción general

- De Vargas, I., Macaskie, L.E., Guibal, E. (2004). "Biosorption of palladium and platinum by sulfate-reducing bacteria". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79 (1), 49-56.
- Ding, H., Valentine, D.L. (2008). "Methanotrophic bacteria occupy benthic microbial mats in shallow marine hydrocarbon seeps, Coal Oil Point, California". *Journal of Geophysical Research G: Biogeosciences*, 113 (1), Art n° G01015.
- Dolomieu, D.G. (1791). "Sur un de pierres très-peu effervescentes avec les acides of phosphorescentes par la collision". *Journal of Physique*, 39, 3–10.
- Dong, H., Yu, B. (2007). "Geomicrobiological processes in extreme environments: A review". *Episodes*, 30 (3), 202-216.
- Donovan, J.J., Grimm, E.C. (2007). "Episodic struvite deposits in a Northern Great Plains flyway lake: Indicators of mid-Holocene drought?". *Holocene*, 17 (8), 1155-1169.
- Douglas, S. (2004). "Microbial biosignatures in evaporite deposits: Evidence from Death Valley, California". *Planetary and Space Science*, 52 (1-3), 223-227.
- Drew, G.H. (1911). "The action of some denitrifying bacteria in tropical and temperate seas, and the bacterial precipitation of calcium carbonate in the sea". *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 9, 142-155.
- Drew, G.H. (1914). "On the precipitation of calcium carbonate in the sea by marine bacteria, and on the action of denitrifying bacteria in tropical and temperate seas". *Carnegie Institution of Washington*, 172 (5), 7-45.
- Ebrahimpour, M., Mosavisefat, M., Mohabbati, R. (2010). "Acute toxicity bioassay of mercuric chloride: An alien fish from a river". *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92 (1), 169-173.
- Ehrenberg, C.G. (1838). "Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen". L. Voss, Leipzig, Alemania, 547 pp.
- Ennever, J., Vogel, J.J., Streckfuss, J.L. (1974). "Calcification by *Escherichia coli*". *Journal of Bacteriology*, 119 (3), 1061-1062.
- Ercole, C., Cacchio, P., Botta, A.L., Centi, V., Lepidi, A. (2007). "Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: The role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides". *Microscopy and Microanalysis*, 13 (1), 42-50.

Introducción general

- Erlich, H.L. (1964). "Bacterial oxidation of arsenopyrite and enargite". *Economic Geology*, 59, 1306-1312.
- Erlich, H.L. (2002). "Geomicrobiology". Marcel Decker Inc, New York, 768 pp.
- Fan, D., Ye, J., Yin, L., Zhang, R. (1999). "Microbial processes in the formation of the Sinian Gaoyan manganese carbonate ore, Sichuan Province, China" *Ore Geology Reviews*, 15 (1-3), 79-93.
- Feng, J., Shi, Q., Wang, X., Wei, M., Yang, F., Xu, H. (2010). "Silicon supplementation ameliorated the inhibition of photosynthesis and nitrate metabolism by cadmium (Cd) toxicity in *Cucumis sativus* L". *Scientia Horticulturae*, 123 (4), 521-530.
- Ferris, F.G., Fratton, C.M., Gerits, J.P., Schultze-Lam, S., Sherwood Lollar, B. (1995). "Microbial precipitation of a strontium calcite phase at a groundwater discharge zone near Rock Creek, British Columbia, Canada". *Geomicrobiology Journal*, 13 (1), 57-67.
- Ferrer, M.R., Quevedo-Sarmiento, J., Rivadeneyra, M.A., Bejar, V., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A. (1988). "Calcium carbonate precipitation by two groups of moderately halophilic microorganisms at different temperatures and salt concentrations". *Current Microbiology*, 17 (4), 221-227.
- Fischer, T.B., Heaney, P.J., Jang, J.-H., Ross, D.E., Brantley, S.L., Post, J.E., Tien, M. (2008). "Continuous time-resolved X-ray diffraction of the biocatalyzed reduction of Mn oxide". *American Mineralogist*, 93 (11-12), 1929-1932.
- Fowle, D.A., Fein, J.B. (2001). "Quantifying the effects of *Bacillus subtilis* cell walls on the precipitation of copper hydroxide from aqueous solution". *Geomicrobiology Journal*, 18, 77-91.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kennedy, D.W., Dong, H., Onstott, T.C., Hinman, N.W., Li, S.-M. (1998). "Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62 (19-20), 3239-3257.
- Fujita, Y., Redden, G.D., Ingram, J.C., Cortez, M.M., Ferris, F.G., Smith, R.W. (2004). "Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68 (15), 3261-3270.

Introducción general

- Gadd, G.M. (1990). "Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms". *Experientia*, 46 (8), 834-840.
- Gadd, G.M. (1997). "Health impacts of large releases of radionuclides. Roles of microorganisms in the environmental fate of radionuclides". Ciba Foundation symposium, 203, 94-104.
- Gadd, G.M. (2004). "Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation". *Geoderma*, 122 (2-4 SPEC. IIS.), 109-119.
- Gadd, G.M. (2009). "Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84 (1), 13-28.
- García del Cura, M.A., Calvo, J.P., Ordóñez, S., Jones, B.F., Cañaveras, J.C. (2001). "Petrographic and geochemical evidence for the formation of primary, bacterially induced lacustrine dolomite: La Roda 'white earth' (Pliocene, Central Spain)". *Sedimentology*, 48, 897-915.
- Gault, M.H., Longerich, L.L., Crane, G., Cooper, R., Dow, D., Best, L., Stockall, E., Brown, W. (1995). "Bacteriology of urinary tract stones". *Journal of Urology*, 153, 1164-1170.
- Gavrilescu, M., Pavel, L.V., Cretescu, I. (2009). "Characterization and remediation of soils contaminated with uranium". *Journal of Hazardous Materials*, 163 (2-3), 475-510.
- Giralt, S., Julia, R., Klerkx, J.A.N. (2001). "Microbial biscuits of vaterite in lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan)". *Journal of Sedimentary Research*, 71 (3), 430-435.
- Golab, Z., Breitenbach, M., Jezierski, A. (1995). "Sites of copper binding in *Streptomyces pilosus*". *Water, Air, and Soil Pollution*, 82 (3-4), 713-721.
- González-Muñoz, M.T., Arias, J.M., Montoya, E., Rodríguez-Gallego, M. (1993). "Struvite production by *Myxococcus coralloides* D". *Chemosphere*, 26 (10), 1881-1887.
- González-Muñoz, M.T., Ben Chekroun, K., Ben Aboud, A., Arias, J.M., Rodríguez-Gallego, M. (2000). "Bacterially induced Mg-calcite formation: Role of Mg²⁺ in development of crystal morphology". *Journal of Sedimentary Research*, 70 (3), 559-564.

Introducción general

- González-Muñoz, M.T., Ben Omar, N., Martínez-Cañamero, M., Rodríguez-Gallego, M., Galindo, A.L., Arias, J.M. (1996). "Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*". *Journal of Crystal Growth*, 163 (4), 434-439.
- González-Muñoz, M.T., Entrena, M., Ben Omar, N., Huertas, F., Arias, J.M. (1994). "Production of syngenetic minerals with struvite by *Myxococcus coralloides* D". *Geomicrobiology Journal*, 12 (4), 279-283.
- González-Muñoz, M., Fernández-Luque, B., Martínez-Ruiz, F., Chekroun, K.B., Arias, J.M., Rodríguez-Gallego, M., Martínez-Cañamero, M., De Linares, C., Paytans, A. (2003). "Precipitation of barite by *Myxococcus xanthus*: Possible implications for the biogeochemical cycle of barium". *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9), 5722-5725.
- González-Muñoz, M.T., Merroun, M.L., Ben Omar, N., Arias, J.M. (1997). "Biosorption of uranium by *Myxococcus xanthus*". *International Biodeterioration and Biodegradation*, 40 (2-4), 107-114.
- Greenfield, L.J. (1963). "Metabolism and concentration of calcium carbonate by a marine bacterium". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 109, 23-45.
- Grünberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M., Schüler, D. (2001). "A Large Gene Cluster Encoding Several Magnetosome Proteins Is Conserved in Different Species of Magnetotactic Bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10), 4573-4582.
- Guibaud, G., Bordas, F., Saaid, A., D'abzac, P., Van Hullebusch, E. (2008). "Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63 (1), 48-54.
- Ha, J., Gélabert, A., Spormann, A.M., Brown Jr., 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), 1-15.
- Haferburg, G., Kothe, E. (2007). "Microbes and metals: Interactions in the environment". *Journal of Basic Microbiology*, 47 (6), 453-467.

Introducción general

- Hao, X.-D., Wang, C.-C., Lan, L., Van Loosdrecht, M.C.M. (2008). "Struvite formation, analytical methods and effects of pH and Ca^{2+} ". *Water Science and Technology*, 58 (8), 1687-1692.
- Harder, E.C. (1919). "Iron depositing bacteria and their geologic relations". United States Geological Survive Professional Paper, 113.
- Hasan, S.H., Srivastava, P., Talat, M. (2009). "Biosorption of Pb (II) from water using biomass of *Aeromonas hydrophila*: Central composite design for optimization of process variables". *Journal of Hazardous Materials*, 168 (2-3), 1155-1162.
- Havemann, S.A., Foster, J.S. (2008). "Comparative characterization of the microbial diversities of an artificial microbialite model and a natural stromatolite". *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (23), 7410-7421.
- Hensen, D., Sperling, D., Trüper, H.G., Brune, D.C., Dahl, C. (2006). "Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*". *Molecular Microbiology*, 62 (3), 794-810.
- Hirscheler, H., Lucas, J., Hubert, J.C. (1990). "Bacterial involvement in apatite genesis". *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 211-220.
- Holden, J.F., Adams, M.W.W. (2003). "Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments". *Current Opinion in Chemical Biology*, 7 (2), 160-165.
- Hou, W., Feng, Q. (2006). "Morphology and formation mechanism of vaterite particles grown in glycine-containing aqueous solutions". *Materials Science and Engineering C* 26 (4), 644-647.
- Høgslund, S., Revsbech, N.P., Kuenen, J.G., Jørgensen, B.B., Gallardo, V.A., Vossenberg, J.V.D., Nielsen, J.L., Holmkvist, L., Arning E.T., Nielsen, L.P. (2009). "Physiology and behaviour of marine *Thioploca*". *ISME Journal*, 3 (6), 647-657.
- Hutchison, J.G.P. (1961). "Crystals in colonies of *Staphylococcus aureus*". *Journal of Pathology and Bacteriology*, 82 214-217.
- Hughes, J.M., Rakovan, J. (2002). "The crystal structure of apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{OH},\text{Cl})$ ". *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 48 (1), 1-12.

Introducción general

- Hughes, M.N. Poole, R.K. (1989). "Metals and microorganisms". Chapman and Hall, London., 428 pp.
- Incharoensakdi, A., Kitjahn, P. (2002). "Zinc biosorption from aqueous solution by a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*". Current Microbiology, 45 (4), 261-264.
- Islam, F.S., Pederick, R.L., Gault, A.G., Adams, L.K., Polya, D.A., Charnock, J.M., Lloyd, J.R. (2005). "Interactions between the Fe (III) - reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens* and arsenate and capture of the metalloid by biogenic Fe (II)". Applied and Environmental Microbiology, 71 (12), 8642-8648.
- İşik, M. (2008). "Nickel inhibition of calcium precipitation by ureolytic mixed microorganisms under batch conditions". Separation and Purification Technology, 62 (2), 337-341.
- Jannasch, H.W., Mottl, M.J. (1985). "Geomicrobiology of the deep sea hydrothermal vents". Science, 229, 717-725.
- Jitaru, P., Adams, F. (2004). "Toxicity, sources and biogeochemical cycle of mercury". Journal De Physique. IV, 121, 185-193.
- Jogler, C., Schüler, D. (2009). "Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation". Annual Review of Microbiology, 63, 501-521.
- Jroundi, F., Merroun, M.L., Arias, J.M., Rossberg, A., Selenska-Pobell, S., González-Muñoz, M.T. (2007). "Spectroscopic and microscopic characterization of uranium biomineralization in *Myxococcus xanthus*". Geomicrobiology Journal, 24 (5), 441-449.
- Kang, S.-Y., Lee, J.-U., Kim, K.-W. (2007). "Biosorption of Cr (III) and Cr (VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*". Biochemical Engineering Journal, 36 (1), 54-58.
- Karmakar, R., Bhattacharya, R., Chatterjee, M. (2000). "Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium-induced hepatotoxicity in mice". BioMetals, 13 (3), 231-239.
- Katsoyiannis, I.A., Katsoyiannis, A.A. (2006). "Arsenic and other metal contamination of groundwaters in the industrial area of Thessaloniki, Northern Greece". Environmental Monitoring and Assessment, 123 (1-3), 393-406.

Introducción general

- Kropp, J., Block, A., Von Bloh, W., Klenke, T., Schellnhuber, H.J. (1997). "Multifractal characterization of microbially induced magnesian calcite formation in recent tidal flat sediments". *Sedimentary Geology*, 109 (1-2), 37-51.
- Krumbein, W.E. (1974). "On the precipitation of aragonite on the surface of marine bacteria". *Die Naturwissenschaften*, 61 (4), 167.
- Kurmaç, Y. (2009). "The impact of toxicity of metals on the activity of ureolytic mixed culture during the precipitation of calcium". *Journal of Hazardous Materials*, 163 (2-3), 1063-1067.
- Kuznetsov, S.I., Ivanov, M.V., Lyalikova, N.N. (1963). "Introduction to Geological Microbiology". New York, McGraw-Hill, 252 pp.
- Lafond, J., Hamel, A., Takser, L., Vaillancourt, C., Mergler, D. (2004). "Low environmental contamination by lead in pregnant women: Effect on calcium transfer in human placental". *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 67 (14), 1069-1079.
- Laiz, L., Miller, A.Z., Jurado, V., Akatova, E., Sánchez-Moral, S., González, J.M., Dionísio, A., MacEdo, M.F., Saiz-Jiménez, C. (2009). "Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeteriorated monuments". *Naturwissenschaften*, 96 (1), 71-79.
- Langley, S., Gault, A., Ibrahim, A., Renaud, R., Fortin, D., Clark, I.D., Ferris, F.G. (2009). "A comparison of the rates of Fe(III) reduction in synthetic and bacteriogenic iron oxides by *Shewanella putrefaciens* CN32". *Geomicrobiology Journal*, 26 (2), 57-70.
- Le Corre, K.S., Valsami-Jones, E., Hobbs, P., Parsons, S.A. (2005). "Impact of calcium on struvite crystal size, shape and purity". *Journal of Crystal Growth*, 283 (3-4), 514-522.
- Lee, H.S., Volesky, B. (1999). "Interference of aluminum in copper biosorption by an Algal Biosorbent". *Water Quality Research Journal of Canada*, 34 (3), 519-533.
- Leusch, A., Holan, Z., Volesky, B. (1995). "Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically-reinforced biomass of marine algae". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 62 (3), 279-288.

Introducción general

- Li, Q., Jiang, T., Yan, Y.-B., Li, G.-H., Qiu, G.-Z. (2007). "Characterization of bio-oxidation of arsenopyrite". TMS Annual Meeting, 15-27.
- Lipman, C.B. (1929). "Further studies on marine bacteria with special reference to the Drew hypothesis on CaCO₃ precipitation in the sea" Carnegie Institution of Washington, 26, 231-248.
- Little, B.J., Wagner, P.A. and Lewandowski, Z. (1997). "Spatial relationships between bacteria and mineral surfaces". In: Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals (Ed. Banfield, J.F., Nealson, K.H.), Mineralogical Society of America, 35, 123–159.
- Lizama, H.M., Suzuki, I. (1989). "Bacterial leaching of a sulfide ore by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* part II: Column leaching studies". Hydrometallurgy, 22 (3), 301-310.
- Lloyd, J.R., Macaskie, L.E. (2002). "Biochemical basis of microbe-metal interactions". In: Interactions of microorganisms with radionuclides (Eds Keith-Roach, M.J., Livens, F.R.), Elsevier Science Ltd, Oxford, 408 pp.
- Loukidou, M.X., Zouboulis, A.I., Karapantsios, T.D., Matis, K.A. (2004). "Equilibrium and kinetic modeling of chromium (VI) biosorption by *Aeromonas caviae*". Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 242 (1-3), 93-104.
- Lourino-Cabana, B., Lesven, L., Billon, G., Proix, N., Recourt, P., Ouddane, B., Fischer, J.C., Boughriet, A. (2010). "Impacts of metal contamination in calcareous waters of deûle river (France): Water quality and thermodynamic studies on metallic mobility". Water, Air, and Soil Pollution, 206 (1-4), 187-201.
- Lowenstamm, H.A. (1981). "Minerals formed by microorganisms". Science, 211, 1126-1131.
- Lu, W.-B., Shi, J.-J., Wang, C.-H., Chang, J.-S. (2006). "Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance". Journal of Hazardous Materials, 134 (1-3), 80-86.
- Lu, Z., Liu, C., Liu, J., Wu, F. (2004). "Bio-barite in witherite deposits from Southern Qinling and its significance". Progress in Natural Science, 14 (10), 889-895.

Introducción general

- Lucas, J., Prévot, L. (1984). "Synthèse de l'apatite par voie bactérienne à partir de matière organique phosphatée et de divers carbonates de calcium dans des eaux douce et marine naturelles". *Chemical Geology*, 42 (1-4), 101-118.
- Lucas, J., Prévot, L. (1985). "The synthesis of apatite by bacterial activity: mechanism". *Sciences Geologiques, Memoire 77*, 83-92.
- Macaskie, L.E., Bonthron, K.M., Yong, P., Goddard, D.T. (2000). "Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter sp.*: A concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation" *Microbiology*, 146 (8), 1855-1867.
- Malone, Ph.G., Towe, K.M. (1970). "Microbial carbonate and phosphate precipitates from sea water cultures". *Marine Geology*, 9 (5), 301-309.
- Mameri, N., Boudries, N., Addour, L., Belhocine, D., Lounici, H., Grib, H., Pauss, A. (1999). "Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass". *Water Research*, 33 (6), 1347-1354.
- Mann, S. (1983). "Mineralization in biological systems". *Structure and Bonding*, 54, 125-174.
- Mann, H., (1990). "Biosorption of heavy metals by bacterial biomass". In: *Biosorption of Heavy Metals* (Ed. Volesky, B), CRC Press, Boca Raton, FL, 93–137.
- Marrakchi, O., Belhaj, R., Bahlous, A., Hayder, N., Gargah, T., Mohsni, A., Lakhoua, R., Abdelmoula, J. (2008). "Urinary stones in Tunisian children, based on series of 187 cases | [La lithiase urinaire chez l'enfant tunisien. Étude à propos de 187 cas]". *Progres en Urologie*, 18 (13), 1056-1061.
- Mastandrea, A., Perri, E., Russo, F., Spadafora, A., Tucker, M. (2006). "Microbial primary dolomite from a Norian carbonate platform: Northern Calabria, southern Italy". *Sedimentology*, 53, 465–480.
- McCallum, M.F., Guhathakurta, K. (1970). "The precipitation of calcium carbonate from seawater by bacteria isolated from Bahama Bank sediments". *Journal Applied Bacteriology*, 33, 649-655.
- McConnell, D. (1965). "Precipitation of phosphates in sea water". *Economic Geology*, 60, 1059-1062.

Introducción general

- McConnell, D. (1973). "Precipitation of phosphates in a primeval sea". *Science*, 181 (4099), 582.
- McCready, R.G.L., Bland, C.J., Gonzales, D.E. (1980). "Preliminary studies on the chemical, physical, and biological stability of Ba/RaSO₄ precipitates". *Hydrometallurgy*, 5 (2-3), 109-116.
- McKenzie, J.A., Vasconcelos, C. (2009). "Dolomite Mountains and the origin of the dolomite rock of which they mainly consist: Historical developments and new perspectives". *Sedimentology*, 56 (1), 205-219.
- Medina Ledo, H., Thackray, A.C., Jones, I.P., Marquis, P.M., Macaskie, L.E., Sammons, R.L. (2008). "Microstructure and composition of biosynthetically synthesised hydroxyapatite". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19 (11), 3419-3427.
- Mehta, S.K., Gaur, J.P. (2005). "Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: Progress and prospects". *Critical Reviews in Biotechnology*, 25 (3), 113-152.
- Meldrum, F.C., Mann, S., Heywood, B.R., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A. (1993). "Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 251 (1332), 231-236.
- Merroun, M.L., Ben Omar, N., Alonso, E., Arias, J.M., González-Muñoz, M.T. (2001). "Silver sorption to *Myxococcus xanthus* biomass". *Geomicrobiology Journal*, 18 (2), 183-192.
- Merroun, M.L., Ben Omar, N., González-Muñoz, M.T., Arias, J.M. (1998). "*Myxococcus xanthus* biomass as biosorbent for lead". *Journal of Applied Microbiology*, 84 (1), 63-67.
- Merroun, M.L., Chekroun, K.B., Arias, J.M., González-Muñoz, M.T. (2003). "Lanthanum fixation by *Myxococcus xanthus*: Cellular location and extracellular polysaccharide observation". *Chemosphere*, 52 (1), 113-120.
- Merroun, M.L., Raff, J., Rossberg, A., Hennig, C., Reich, T., Selenska-Pobell, S. (2005). "Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12". *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5532-5543.

Introducción general

- Merroun, M.L., Rossberg, A., Hennig, C., Scheinost, A.C., Selenska-Pobell, S. (2007). "Spectroscopic characterization of gold nanoparticles formed by cells and S-layer protein of *Bacillus sphaericus* JG-A12". *Materials Science and Engineering*, 27 (1), 188-192.
- Minic, Z., Serre, V., Hervé, G. (2006). "Adaptation of organisms to extreme conditions of deep-sea hydrothermal vents [Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes]". *Comptes Rendus – Biologies*, 329 (7), 527-540.
- Miot, J., Benzerara, K., Morin, G., Kappler, A., Bernard, S., Obst, M., Férard, C., Skouri-Panet, F., Guigner, J.-M., Posth, N., Galvez, M., Brown Jr., G.E., Guyot, F. (2009). "Iron biomineralization by anaerobic neutrophilic iron-oxidizing bacteria". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73 (3), 696-711.
- Morillo-Pérez, J.A., García-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M. (2008). "Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (11), 2699-2704.
- Morita, R.Y. (1980). "Calcite precipitation by marine bacteria". *Geomicrobiology Journal*, 2, 63-82.
- Mußmann, M., Hu, F.Z., Richter, M., De Beer, D., Preisler, A., Jørgensen, B.B., Huntemann, M., Glöckner, F.O., Amann, R., Koopman, W.J.H., Lasken, R.S., Janto, B., Hogg, J., Stoodley, P., Boissy, R., Ehrlich, G.D. (2007). "Insights into the genome of large sulfur bacteria revealed by analysis of single filaments". *PLoS Biology*, 5 (9), 1923-1937.
- Muentz, A. (1890). "Sur la decomposition des roches et la formation de la terre arable". *C.R. Academy of Sciences*, 110, 1370-1372.
- Murray, J., Irvin, R. (1890). "On coral reefs and other carbonate of lime formations in modern seas" *Proceedings of Royal Society of London*, 17, 79-109.
- Nadson, G.A. (1903). "Microorganisms as geologic agents". I. Tr Komisii Isslect Min Vodg St Petersburg, Slavyanska.
- Nakajima, A., Tsuruta, T. (2004). "Competitive biosorption of thorium and uranium by *Micrococcus luteus*". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 260 (1), 13-18.

Introducción general

- Nelson, B., Struble, J., McCarthy, G. (1991). "In vitro production of struvite by *Bacillus pumilus*". Canadian Journal of Microbiology, 37 (12), 978-983.
- Nelson, D.C., Casey, W.H., Sison, J.D., Mack, E.E., Ahmad, A., Pollack, J.S. (1996). "Selenium uptake by sulfur-accumulating bacteria". Geochimica et Cosmochimica Acta, 60 (18), 3531-3539.
- Omelon, S.J., Grynopas, M.D. (2008). "Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization". Chemical Reviews, 108 (11), 4694-4715.
- Osborne, C.A., Albasan, H., Lulich, J.P., Nwaokorie, E., Koehler, L.A., Ulrich, L.K. (2009). "Quantitative Analysis of 4468 Uroliths Retrieved from Farm Animals, Exotic Species, and Wildlife Submitted to the Minnesota Urolith Center: 1981 to 2007". Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice, 39 (1), 65-78.
- Özdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., Güven, K. (2009). "Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* subsp. *decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* subsp. *stromboliensis*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies". Chemical Engineering Journal, 152 (1), 195-206.
- Öztürk, A. (2007). "Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*". Journal of Hazardous Materials, 147 (1-2), 518-523.
- Öztürk, A., Artan, T., Ayar, A. (2004). "Biosorption of nickel (II) and copper (II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3(2)". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 34 (2), 105-111.
- Pahlavanzadeh, H., Keshtkar, A.R., Safdari, J., Abadi, Z. (2010). "Biosorption of nickel (II) from aqueous solution by brown algae: Equilibrium, dynamic and thermodynamic studies". Journal of Hazardous Materials, 175 (1-3), 304-310.
- Pal, A., Paul, A.K. (2008). "Microbial extracellular polymeric substances: Central elements in heavy metal bioremediation" Indian Journal of Microbiology, 48 (1), 49-64.
- Parkers, R.J., Cragg, B.A., Bale, S.J., Getliff, J.M., Goodman, K., Rochelle, P.A., Fry, J.C., Weighman, A.J., Harvey, S.M. (1994). "Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments". Nature, 371, 410-413.

Introducción general

- Patel, J., Zhang, Q., McKay, R.M.L., Vincent, R., Xu, Z. (2010). "Genetic engineering of *Caulobacter crescentus* for removal of cadmium from water". Applied Biochemistry and Biotechnology, 160 (1), 232-243.
- Pathe, P.P., Nandy, T., Kaul, S.N., Szpyrkowicz, L. (1996). "Chromium recovery from chrome tan wastewater". International Journal of Environmental Studies, 51 (2), 125-145.
- Patrick Jr, W.H., Gotoh, S., Williams, B.G. (1973). "Strengite dissolution in flooded soils and sediments". 179, 564-565.
- Pedone, V.A., Folk, R.L. (1996). "Formation of aragonite cement by nannobacteria in the Great Salt Lake, Utah". Geology, 24 (8), 763-765.
- Pérez-García, I., Rivadeneyra, M.A., Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Cormenzana, A. (1990). "Struvite formation by *Arthrobacter sp.* and *Pseudomonas sp.*: The influence of agitation". Chemosphere, 20 (1-2), 243-251.
- Pérez-García, I., Rivadeneyra, M.A., Ramos-Cormenzana, A. (1989a). "Influence of magnesium source and magnesium and phosphate concentration on bacterial struvite formation". Microbios Letters, 42 (167-168), 129-134.
- Pérez-García, I., Rivadeneyra, M.A., Ramos-Cormenzana. (1989b). "The influence of pH on struvite formation by bacteria". Chemosphere, 18 (7-8), 1633-1638.
- Pérez-González, T., Jiménez-López, C., Neal, A.L., Rull-Pérez, F., Rodríguez-Navarro, A., Fernández-Vivas, A., Iáñez-Pareja, E. (2010). "Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*". Geochimica et Cosmochimica Acta, 74 (3), 967-979.
- Piper, D.Z., Codespoti, L.A. (1975). "Marine phosphorite deposits and the nitrogen cycle". Science, 179, 564-565.
- Power, I.M., Wilson, S.A., Thom, J.M., Dipple, G.M., Southam, G. (2007). "Biologically induced mineralization of dypingite by cyanobacteria from an alkaline wetland near Atlin, British Columbia, Canada". Geochemical Transactions, 8, 13.
- Power, I.M., Wilson, S.A., Thom, J.M., Dipple, G.M., Gabites, J.E., Southam, G. (2009). "The hydromagnesite playas of Atlin, British Columbia, Canada: A biogeochemical model for CO₂ sequestration". Chemical Geology, 260 (3-4), 302-316.

Introducción general

- Pradhan, S., Singh, S., Rai, L.C. (2007). "Characterization of various functional groups present in the capsule of *Microcystis* and study of their role in biosorption of Fe, Ni and Cr". *Bioresource Technology*, 98 (3), 595-601.
- Pye, K., Dickson, J.A.D., Schiavon, N., Coleman, M.L., Cox, M. (1990). "Formation of siderite-Mg-calcite-iron sulphide concretions in intertidal marsh and sandflat sediments, North Norfolk, England". *Sedimentology*, 37 (2), 325-343.
- Quesada, E., Bejar, V., Valderrama, M.J., Ramos-Cormenzana, A. (1987). "Growth characteristics and salt requirement of *Deleya halophila* in a defined medium". *Current Microbiology*, 16 (1), 21-25.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S., Rengasamy, R. A. (2008). "Perspective on the biotechnological potential of microalgae". *Critical Reviews in Microbiology*, 34 (2), 77-88.
- Ramos-Cormenzana, A. (1975). "Formation of calcite crystals by bacteria of the genus *Bacillus*". *Microbios*, 13 (51-52), 61-70.
- Rivadeneira, M.A., Delgado, R., Moral, A., Ferrer, M.R., Ramos-Cormenzana, A. (1994). "Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio sp.* from an inland saltern". *FEMS Microbiology Ecology*, 13 (3), 197-204.
- Rivadeneira, M.A., Delgado, R., Quesada, E., Ramos-Cormenzana, A. (1991). "Precipitation of calcium carbonate by *Deleya halophila* in media containing NaCl as sole salt". *Current Microbiology*, 22 (3), 185-190.
- Rivadeneira, M.A., Garcia-Cervigon, A., Pérez-García, I., Ramos-Cormenzana, A. (1986). "Síntesis de dolomita por una cepa de *Pseudomonas putida* aislada del suelo". *Revista Latinoamericana de Microbiología* 29.
- Rivadeneira, M.A., González-López, J., Garcia-Cervigon, A., Ramos-Cormenzana, A. (1985). "Formation of calcite and struvite crystals by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum*". *Microbios*, 42 (168), 91-95.
- Rivadeneira, M.A., Martín-Algarra, A., Sánchez-Navas, A., Martín-Ramos, D. (2006). "Carbonate and phosphate precipitation by *Chromohalobacter marismortui*". *Geomicrobiology Journal*, 23 (1), 1-13.

Introducción general

- Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., Ramos-Cormenzana, A. (1993). "The effect of incubation temperature on struvite formation by bacteria". *Folia Microbiologica*, 38 (1), 5-9.
- Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., Salmerón, V., Ramos-Cormenzana, A. (1985). "Bacterial precipitation of calcium carbonate in presence of phosphate". *Soil Biology and Biochemistry*, 17 (2), 171-172.
- Rivadeneira, M.A., Ramos-Cormenzana, A., Delgado, G., Delgado, R. (1996). "Process of carbonate precipitation by *Deleya halophila*". *Current Microbiology*, 32 (6), 308-313.
- Rivadeneira, M.A., Ramos-Cormenzana, A., Garcia-Cervigon, A. (1983). "Bacterial formation of struvite". *Geomicrobiology Journal*, 3 (2), 151-163.
- Rivadeneira, M.A., Ramos-Cormenzana, A., Garcia-Cervigon, A. (1987). "Formation of bobierita (magnesium phosphate) cristal aggregates by *Acinetobacter sp.*". *Journal of Mineralogy*, 13, 443-447.
- Rizo, A.A., Martín, G.R., Scott, D.B., Mergenhagen, S.E. (1962). "Mineralization of Bacteria". *Science*, 9 (135), 439 – 441.
- Robinson, H. (1889). "On the formation of struvite by microorganisms". *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 6, 360-362.
- Rodríguez-Navarro, C., Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, A., González-Muñoz, M.T., Rodríguez-Gallego, M. (2007). "Bacterially mediated mineralization of vaterite". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71 (5), 1197-1213.
- Rodríguez-Navarro, C., Rodríguez-Gallego, M., Chekroun, K.B., González-Muñoz, M.T. (2003). "Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization". *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 2182-2193.
- Roemer, R., Schwartz, W. (1965). "Geomikrobiologische Untersuchungen. V. Verwertung von Sulfatmineralien and Schwermetallen. Tolleranz bei Desulfizierern". *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 5, 122-135.
- Ruebush, S.S., Icopini, G.A., Brantley, S.L., Tien, M. (2006). "In vitro enzymatic reduction kinetics of mineral oxides by membrane fractions from *Shewanella oneidensis* MR-1". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70 (1), 56-70.

Introducción general

- Ryu, H.-D., Kim, D., Lee, S.-I. (2008). "Application of struvite precipitation in treating ammonium nitrogen from semiconductor wastewater". *Journal of Hazardous Materials*, 156 (1-3), 163-169.
- Şahin, Y., Öztürk, A. (2004). "Biosorption of chromium (VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*". *Process Biochemistry*, 40 (5), 1895-1901.
- Saidou, H., Ben Moussa, S., Ben Amor, M. (2009). "Influence of airflow rate and substrate nature on heterogeneous struvite precipitation". *Environmental Technology* 30, (1), 75-83.
- Salehizadeh, H., Shojaosadati, S.A. (2003). "Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*". *Water Research*, 37 (17), 4231-4235.
- Sánchez-Moral, S., Luque, L., Cañaveras, J.C., Laiz, L., Jurado, V., Hermosin, B., Saiz-Jiménez, C. (2004). "Bioinduced barium precipitation in St. Callixtus and Domitilla catacombs". *Annals of Microbiology*, 54 (1), 1-12.
- Sánchez-Román, M., Rivadeneyra, M.A., Vasconcelos, C., McKenzie, J.A. (2007). "Biom mineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria". *FEMS Microbiology Ecology*, 61 (2), 273-284.
- Sánchez-Román, M., McKenzie, J.A., de Luca Rebello Wagener, A., Rivadeneyra, M.A., Vasconcelos, C. (2009). "Presence of sulfate does not inhibit low-temperature dolomite precipitation". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73 (18), 5361-5376.
- Savvaidis, I., Hughes, M.N., Poole, R.K. (2003). "Copper biosorption by *Pseudomonas cepacia* and other strains". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19 (2), 117-121.
- Scheffel, A., Gärdes, A., Grünberg, K., Wanner, G., Schüler, D. (2008). "The major magnetosome proteins MamGFDC are not essential for magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* but regulate the size of magnetosome crystals". *Journal of Bacteriology*, 190 (1), 377-386.
- Schultze-Lam, S., Beveridge, T.J. (1994). "Nucleation of celestite and strontianite on a cyanobacterial S-layer". *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (2), 447-453.

Introducción general

- Schultze-Lam, S., Harauz, G., Beveridge, T.J. (1992). "Participation of a cyanobacterial S-layer in fine-grain mineral formation". *Journal of Bacteriology*, 174 (24), 7971-7981.
- Schulz, H.N., Schulz, H.D. (2005). "Large sulfur bacteria and the formation of phosphorite". *Science*, 307 (5708), 416-418.
- Shen, Y., Farquhar, J., Masterson, A., Kaufman, A.J., Buick, R. (2009). "Evaluating the role of microbial sulfate reduction in the early Archean using quadruple isotope systematic". *Earth and Planetary Science Letters*, 279 (3-4), 383-391.
- Shinano, H., Sakai, M. (1975). "Effect of magnesium ion concentration on the types of crystals deposited by marine bacteria in seawater" *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 41, 913.
- Singh, R., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P.K., Chakrabarty, D. (2010). "Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system". *Bioresource Technology*, 101 (9), 3025-3032.
- Sokolova-Dubinina, G.A., Deriugina, Z.P. (1967). "On the role of microorganisms in the formation of rodokhrozite in Punnus-Jahrvi Lake | [Rol' mikroorganizmov v obrazovanii rodokhrozita v ozere Punnus-larvi.]". *Mikrobiologiya*, 36 (3), 435-442.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K. (2002). "Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria". *Chemosphere*, 48 (4), 427-435.
- 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), 1-8.
- Stutzer, O. (1912). "Origin of sulfur deposits" *Economic Geology*, 7, 733-743.
- Suess, E. (1979). "Mineral phases formed in anoxic sediments by microbial decomposition of organic matter". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 43 (3), 339-352.
- Sun, X.-F., Wang, S.-G., Zhang, X.-M., Paul Chen, J., Li, X.-M., Gao, B.-Y., Ma, Y. (2009). "Spectroscopic study of Zn²⁺ and Co²⁺ binding to extracellular polymeric

Introducción general

- substances (EPS) from aerobic granules". *Journal of Colloid and Interface Science*, 335 (1), 11-17.
- Talaro, K.P., Talaro, A. (2002). "Foundations in microbiology". McGraw-Hill College, Blacklick, Ohio, U.S.A, 834 pp.
- Taoka, A., Umeyama, C., Fukumori, Y. (2009). "Identification of iron transporters expressed in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*" *Current Microbiology*, 58 (2), 177-181.
- Tazaki, K., Asada, R., Lindenmayer, Z.G., Shirotori, T., Vargas, J.M., Nowatzki, C.H., Coelho, O.W. (2009). "Life inhabits rocks: Clues to rock erosion from electron microscopy of pisolite at a UNESCO heritage site in Brazil". *International Journal of Earth Sciences*, 98 (1), 227-238.
- Thompson, J.B., Ferris, F.G. (1990). "Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water". *Geology*, 18 (10), 995-998.
- Tourney, J., Ngwenya, B.T. (2009). "Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism". *Chemical Geology*, 262 (3-4), 138-146.
- Tsutsumi, H. (2008). "Reduction of manganese dioxide in the sediment and its negative impact on the physiology of clams on two sandy tidal flats, Midori River Tidal Flat and Arao Tidal Flat, in Ariake Bay". *Plankton and Benthos Research*, 3 (2), 64-71.
- Tunali, S., Çabuk, A., Akar, T. (2006). "Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil". *Chemical Engineering Journal*, 115 (3), 203-211.
- Tunnicliffe, V. (1992). "Hydrothermal vent communities of the deep sea". *American Scientist*, 80, 336-349.
- Urrutia, M.M. (1997). "General bacterial sorption processes". In *Biosorbents for metal ions* (Eds. Wase, J., Forster, C.), CRC Press, London, 226 pp.
- Uslu, G., Tanyol, M. "Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: Effect of temperature". *Journal of Hazardous Materials*, 135 (1-3), 87-93.

Introducción general

- Van Der Wal, A., Norde, W., Zehnder, A.J.B., Lyklema, J. (1997). "Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 9 (1-2), 81-100.
- Vasconcelos, C., McKenzie, J.A. (1997). "Microbial mediation of modern dolomite precipitation and diagenesis under anoxic conditions (Lagoa Vermelha, Rio De Janeiro, Brazil)". *Journal of Sedimentary Research*, 67 (3), 378-390.
- Vasconcelos, C., McKenzie, J.A., Bernasconi, S., Grujic, D., Tien, A.J. (1995). "Microbial mediation as a possible mechanism for natural dolomite formation at low temperatures". *Nature*, 377, 220-222.
- Velásquez, L., Dussan, J. (2009). "Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*". *Journal of Hazardous Materials*, 167 (1-3), 713-716.
- Vetriani, C., Chew, Y.S., Miller, S.M., Yagi, J., Coombs, J., Lutz, R.A., Barkay, T. (2005). "Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent". *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (1), 220-226.
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y.-S. (2008). "Bacterial biosorbents and biosorption". *Biotechnology Advances*, 26 (3), 266-29.
- Volesky, B. (2001). "Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century". *Hydrometallurgy*, 59 (2-3), 203-216.
- Volesky, B. (2003). "Sorption and biosorption". Bv Sorbex Inc, Montreal, 316 pp.
- Volesky, B. (2007). "Biosorption and me". *Water Research*, 41 (18), 4017-4029.
- Wacey, D., Wright, D.T., Boyce, A.J. (2007). "A stable isotope study of microbial dolomite formation in the Coorong Region, South Australia". *Chemical Geology*, 244 (1-2), 155-174.
- Wahyudi, A.T., Takeyama, H., Okamura, Y., Fukuda, Y., Matsunaga, T. (2003). "Characterization of aldehyde ferredoxin oxidoreductase gene defective mutant in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303 (1), 223-229.
- Waksman, S.A. (1932). "Principles of soil microbiology". William and Wilkins, Baltimore, 894 pp.

Introducción general

- Walsh, M.T., Murru, F.L. (1987). "Urogenital sinus calculi in a sand tiger shark (*Odontaspis taurus*)". *Journal of wildlife diseases*, 23 (3), 428-431.
- Wang, J., Chen, C. (2009). "Biosorbents for heavy metals removal and their future". *Biotechnology Advances*, 27 (2), 195-226.
- Warren, L.A., Maurice, P.A., Parmar, N., Ferris, G.F. (2001). "Microbially mediated calcium carbonate precipitation: Implications for Interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants". *Geomicrobiology Journal*, 18 (1), 93-115.
- Warthmann, R., van Lith, Y., Vasconcelos, C., McKenzie, J.A., Karpoff, A.M. (2000). "Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments". *Geology*, 28, 1091-1094.
- Williams, B.G., Patrick, W.H. Jr. (1971). "Effect of E_h and pH on the dissolution of strengite". *Nature*, 234, 16-17.
- Winogradsky, S. (1887). "Über Schwefelbakterien". *Botanische Zeitung*, 45, 489-600.
- Winogradsky, S. (1888). "Über Eisenbakterien". *Botanische Zeitung*, 46, 261-276.
- Wolicka, D., Borkowski, A. (2007). "The geomicrobiological role of sulphate-reducing bacteria in environments contaminated by petroleum products". *Geomicrobiology Journal*, 24 (7-8), 599-607.
- Xie, S., Yang, J., Chen, C., Zhang, X., Wang, Q., Zhang, C. (2008). "Study on biosorption kinetics and thermodynamics of uranium by *Citrobacter freundii*". *Journal of Environmental Radioactivity*, 99 (1), 126-133.
- Zamora, M.L.L., Zielinski, J.M., Moodie, G.B., Falcomer, R.A.F., Hunt, W.C., Capello, K. (2009). "Uranium in drinking water: Renal effects of long-term ingestion by an aboriginal community". *Archives of Environmental and Occupational Health*, 64 (4), 228-241.
- Zappfe, C. (1931). "Deposition of manganese". *Economic Geology*, 26, 799-832.
- Zhang, J.-h., Min, H. (2010). "Characterization of a multimetal resistant *Burkholderia fungorum* isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 371–374.

Introducción general

- Zhou, M., Liu, Y., Zeng, G., Li, X., Xu, W., Fan, T. (2007). "Kinetic and equilibrium studies of Cr (VI) biosorption by dead *Bacillus licheniformis* biomass". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (1), 43-48.
- Zhou, W., Wang, J., Shen, B., Hou, W., Zhang, Y. "Biosorption of copper (II) and cadmium (II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72 (2), 295-302.
- Ziagova, M., Dimitriadis, G., Aslanidou, D., Papaioannou, X., Litopoulou Tzannetaki, E., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). "Comparative study of Cd (II) and Cr (VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas sp.* in single and binary mixtures". *Bioresource Technology*, 98 (15), 2859-2865.
- Zimmerley, S.R., Wilson, D.G., Prater, J.D. (1958). "Cyclic leaching process employing iron oxidizing bacteria" US patent 2,829,964.

Introducción general

Capítulo 2. Objetivos

Objetivos

Objetivos

Dentro de las diversas líneas de investigación, que en el campo de la geomicrobiología se vienen desarrollando en nuestro Grupo de Investigación, se llevó a cabo en el año 2004 una campaña de aislamiento de bacterias marinas, a fin de ampliar este tipo de estudios a bacterias procedentes de este hábitat. Entre las diversas cepas aisladas, una de ellas, la denominada MAH1, llamó la atención debido, especialmente, a que, de una parte, presentaba la capacidad de producir carbonatos con alto contenido en magnesio y, de otra, mostraba una notable tolerancia a metales pesados, lantánidos y actínidos. Por ello pareció de gran interés llevar a cabo un estudio en profundidad con esta bacteria, partiendo de su caracterización y siguiendo con la investigación de su posible implicación en la precipitación de carbonatos, en la captación de lantánidos y actínidos, así como de la incorporación de los mismos en alguno de los minerales que fuese capaz de precipitar.

Con esta finalidad se propusieron los siguientes objetivos generales para esta tesis doctoral:

1. Caracterización e identificación de la cepa bacteriana MAH1, aislada del Mar de Alborán.
2. Teniendo en cuenta que la producción bacteriana de calcita, aragonito y vaterita en medios no hipersalinos ha sido descrita por diferentes autores, pero que la producción bacteriana de dolomita sólo ha sido descrita en condiciones de hipersalinidad y, habida cuenta de la importancia del denominado “problema de la dolomita” y sus implicaciones: Investigar la capacidad de producción de carbonatos ricos en Mg por esta bacteria en diferentes condiciones de cultivo.
3. Investigar los mecanismos de interacción de uranio como representante de actínidos hexavalentes con la cepa MAH1, tanto en percloratos como en agua de mar, mediante el uso de una metodología multidisciplinar combinando técnicas de química húmeda, espectroscopia y microscopia.

Objetivos

4. Determinar la especiación química de los lantánidos trivalentes (lantano y europio), como análogos inactivos de los actínidos trivalentes (curio, americio), asociados con la cepa MAH1.

***Capítulo 3. Caracterización
de la cepa MAH1***

Caracterización de la cepa MAH1

3.1. Introducción

El género *Idiomarina*, perteneciente a la familia *Idiomarinaceae* (Ivanova *et al.*, 2004) y englobado dentro de las *Gammaproteobacterias*, fue propuesto por Ivanova *et al.* (2000) y comprende hasta el momento ocho especies distintas aisladas de diversos habitats: *Idiomarina abyssalis* e *Idiomarina zobellii*, descritas por Ivanova *et al.* (2000) y ambas aisladas aproximadamente a 4500 metros de profundidad en el océano pacífico, *Idiomarina baltica*, aislada de aguas someras del Mar Báltico por Brettar *et al.* (2003), *Idiomarina loihiensis*, encontrada por Donachie *et al.* (2003) en muestras obtenidas de corrientes hidrotermales submarinas en Hawaii, *Idiomarina fontislapidosi* e *Idiomarina ramblicola* descritas por Martínez-Cánovas *et al.* (2004) y aisladas de suelo y agua en zonas hipersalinas de Málaga y Murcia respectivamente, *Idiomarina seosinensis* (Choi y Cho, 2005, salinas de Corea) y, por último, *Idiomarina insulisalsae* (Taborda *et al.*, 2009). Además, existen una serie de bacterias, como *Pseudoidiomarina homiensis* (Kwon *et al.*, 2006, aislada de arena de playa en Corea) y *Pseudoidiomarina salinarum* (Yoon *et al.*, 2007, aislada de unas salinas en Corea), que, si bien pertenecen al género *Pseudoidiomarina*, podrían pasar a pertenecer al género *Idiomarina* próximamente según lo propuesto por Taborda *et al.* (2009). En este sentido, *Pseudoidiomarina homiensis* y *Pseudoidiomarina salinarum* ya pertenecían, al ser descritas, al género *Idiomarina* hasta que Wen Dar *et al.*, 2009, propusieron su traslado al género *Pseudoidiomarina*. La diferencia entre ambos géneros radica principalmente en que las bacterias pertenecientes a las *Pseudoidiomas* son inmóviles en su mayoría, con prostecas en algunos casos, y con diferencias en el porcentaje de algunos ácidos grasos minoritarios como son el C_{15:1} isoF, el C_{13:0} iso y el C_{18:1} ω7c. Por último, en algunos casos, son capaces de tener respiración anaeróbica mediante la reducción de nitratos como aceptor final de electrones (Wen Dar *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo descrito anteriormente, las especies de la familia *Idiomarinaceae*, en general, se caracterizan por encontrarse distribuidas en una amplia gama de habitats, desde salinas hasta zonas profundas del océano pacífico, y además pueden crecer en un amplio rango de pH, temperatura y

Caracterización de la cepa MAH1

concentraciones de cloruro sódico, lo que puede deberse precisamente a poseer una composición de ácidos grasos muy característico y único, ya que estos son cruciales en la adaptación a diversas temperaturas (Klein *et al.*, 1999) y salinidad (López *et al.*, 1998). Efectivamente, poseen un alto porcentaje de ácidos grasos ramificados de tipo iso entre los que cabe destacar el C_{15:0} iso, el C_{17:0} iso y el C_{17:1}ω_{9c} iso como componentes mayoritarios. Esta característica es poco común dentro de las *Proteobacterias*, aunque existen algunas excepciones como *Marinobacter lutaoensis* (Shieh *et al.*, 2003) o algunas bacterias de la rama de las *Xanthomonas* (Finkmann *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se aborda la caracterización de una bacteria referida como cepa MAH1, aislada del Mar de Alborán, y perteneciente a la colección de cultivos de nuestro laboratorio, mediante el uso de pruebas bioquímicas y genéticas. El Mar de Alborán comprende la zona más occidental del Mediterráneo, desde el Cabo de Gata al Estrecho de Gibraltar, y se caracteriza por ser una zona de gran productividad biológica. Esto se debe al desnivel existente entre la cuenca mediterránea y atlántica permitiendo un flujo de agua superficial atlántica entrante compensada con un flujo de aguas Mediterráneas en sentido contrario sobre el fondo del Estrecho. Aunque la masa de agua atlántica no es de especial riqueza biológica al tratarse de agua superficial, su menor salinidad y temperatura, convierten a este flujo en el motor de la dinámica del Mar de Alborán originando dos zonas de alta productividad biológica: el giro occidental del Mar de Alborán y el frente Almería-Oran (asociado al giro oriental del Mar de Alborán). Estos giros, junto con la ayuda de la topografía del fondo marino, y las condiciones meteorológicas y atmosféricas originan procesos de convergencia y divergencia de las masas de agua creando estas zonas de importante productividad (Bárcena *et al.*, 2004).

3.2. Material y métodos

3.2.1. Medios de cultivo

- **Medios para el crecimiento y mantenimiento de la cepa**

Para el crecimiento y mantenimiento de la cepa MAH1 se utilizó un Medio Marino (MM) desarrollado en nuestro laboratorio, y cuya composición detallamos a continuación:

Medio Marino (MM y MMs)	
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
Agar (solo MMs)	20 g
Agua de mar filtrada	1000 ml

También se utilizó el medio comercial “Marine Broth” (DIFCO). Su composición se describe a continuación:

Medio “Marine Broth” (MB y MBs¹)			
Peptona	5 g	Bicarbonato sódico	0,16 g
Extracto de levadura	1 g	Bromuro de potasio	0,08 g
Citrato férrico	0,1 g	Cloruro de estroncio	34 mg
Cloruro de sodio	19,45 g	Acido bórico	22 mg
Cloruro de magnesio	5,9 g	Silicato de sodio	4 mg
Sulfato de sodio	3,24 g	Fluoruro de sodio	2,4 mg
Cloruro de calcio	1,8 g	Nitrato de amonio	1,6 mg
Cloruro de potasio	0,55 g	Fosfato disódico	8 mg
Agar ¹	20 g	Agua destilada	1000 ml

- **Medios para la caracterización fenotípica**

Para la caracterización fenotípica de la cepa MAH1 se utilizaron diversos medios de cultivo, alguno de ellos modificando la cantidad presente de NaCl para ensayar el crecimiento de la cepa en ellos. A continuación se detallan cada una de las pruebas con su medio correspondiente y la modificación realizada:

- **Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl**

Este medio fue suplementado con cloruro sódico para alcanzar unas concentraciones comprendidas entre el 0,6 % y 23 % (% p/v).

Medio "Tryptona y Soja Agar" (TSA)	
Tryptona	17 g
Peptona de soja	3 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Dextrosa	2,5 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

- **Actividad gelatinasa y amilasa**

La hidrólisis de la gelatina e hidrólisis de almidón se comprobaron en medio MM y MMs, respectivamente. Para el primer caso el medio se suplementó con gelatina (12 %) y para el segundo caso con almidón (2 %).

- **Hidrólisis del ADN**

Se utilizó el medio comercial de la casa Sharlau, suplementado con NaCl hasta alcanzar una concentración de 2 %.

Medio "DNasa Agar"	
Triptosa	20 g
ADN	2 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

- **Actividad de la lecitinasa y la lipasa**

Se utilizó el medio Agar yema de huevo (Egg Yolk Agar) descrito por McClung en 1947. Al igual que los medios anteriores descritos, fue suplementado con cloruro sódico (2 %).

Caracterización de la cepa MAH1

Medio "Agar yema de huevo"			
Peptona	40 g	Sulfato magnésico	0,1 g
Cloruro sódico	2 g	Fosfato sódico	5 g
Fosfato potásico	1 g	Agar	25 g
Dextrosa	2 g	Agua destilada	1000 ml
Solución de yema de	110 ml		

La solución de yema de huevo se preparó añadiendo a la yema de huevo su equivalente en peso de solución salina.

- Reducción de nitratos y producción de nitrógeno N₂

Para esta prueba se utilizó agua de peptona, cuya composición describimos a continuación:

Medio Agua de peptona	
Peptona de carne	1 g
Cloruro sódico	0,5 g
Agua destilada	100 ml
pH 7,2	

A este medio se le añadió 1,5 g de NaCl extra para alcanzar la concentración del 2 % necesaria para un crecimiento óptimo de la bacteria y KNO₃ al 0,2 %.

- Prueba del rojo de metilo, Voges-Proskauer y crecimiento en Mackonkey

Para estas pruebas preparamos los medios MR-VP y agar Mackonkey (Scharlau) suplementándolos con NaCl (hasta alcanzar una concentración del 2 %).

Medio MacKonkey	
Peptona	20 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	5 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Medio MR-VP	
Peptona	5 g
Glucosa	5 g
Tampón fosfato	1000 ml
pH 7,2	

3.2.2. Caracterización fenotípica de la bacteria MAH1

La forma y coloración de las colonias se estudió en medio MBs y MMs tras 48 horas de crecimiento a 28 °C, mientras que la morfología y tamaño de la bacteria, así como la existencia de posibles estructuras como prostecas, fimbrias o flagelos, se estudió a partir de un cultivo de 24 horas de crecimiento. Para este último caso, las bacterias fueron cultivadas en medio MM a 28 °C y posteriormente una alícuota se preparó para su observación por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y otra alícuota para su observación por microscopía electrónica de barrido (SEM) siguiendo los protocolos que describimos a continuación:

- Tinción Negativa para TEM.

Una alícuota de 25 µl de muestra se colocó en una rejilla con película soporte (formvar) durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados con agua ultrapura y, por último, se contrastó con acetato de uranilo (0,5-2 %) en solución acuosa durante 1 minuto. Las muestras una vez preparadas fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM 902.

- Preparación de muestras para SEM.

En primer lugar la muestra fue fijada añadiendo el fijador a 1 ml de suspensión de bacterias. Para ello se desarrolló, en colaboración con el servicio de preparación de muestras biológicas del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, un fijador especial para bacterias marinas cuya composición se detalla a continuación:

Fijador para bacterias marinas	
Glutaraldehido	4 %
Tampón Cacodilato	0,2 M
CaCl	0,1 %
Sacarosa	0,4 M

Este fijador tiene la característica de poseer una osmolaridad de 1205 mOsM, siendo muy parecida a la del agua de mar, con lo que se previene el colapso de las células al añadir el fijador.

Caracterización de la cepa MAH1

Una vez fijada, la muestra fue postfijada con tetróxido de osmio al 1 % en solución acuosa durante 1 hora (4 °C y en oscuridad). A continuación se lavó con agua destilada (3 lavados de 10 min) y se deshidrató en un gradiente de etanol (50, 70, 90 y 3x100 %, 10 min en cada uno). Por último la muestra se desecó por el método del punto crítico (Anderson, 1951) con dióxido de carbono en un desecador Polaron CPD 7501 (Quorum Technologies Ltd, UK) y se recubrió con carbón en un evaporador Hitachi (Hitachi Group Ltd, Saitama, Japón). Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido ZEISS DSM 950.

La movilidad fue estudiada en un cultivo fresco de 24 horas mediante observación en un microscopio Olympus BX-61 equipado con un controlador Olympus BXUCB y una fuente de alimentación Olympus U-RFL-T (Olympus, Hamburg, Germany).

El crecimiento de la bacteria a diferentes concentraciones de NaCl se estudió en medio TSA, anteriormente descrito, incubando las placas a una temperatura de 28 °C. El efecto del pH se comprobó en medio MB ajustando el pH entre 4 y 9,5, los tubos fueron incubados a 28 °C y en agitación. El crecimiento a diferentes temperaturas (2, 10, 28, 37, 40, 42, 43 y 45 °C) se realizó en medio MMs y con las placas selladas con parafilm para evitar la desecación de estas.

La reacción de la oxidasa fue comprobada según lo descrito por Kovacs (1956). La presencia de catalasa se determinó añadiendo H₂O₂ a una colonia depositada sobre un portaobjetos (Tindall *et al.*, 1997). Se considera una reacción positiva el viraje de las colonias a un color azul/violáceo para el primer caso, y la aparición de burbujas para el segundo; ambas pruebas se realizaron a cultivos de 48 horas. La hidrólisis de la gelatina y la actividad DNasa fue comprobada en los medios anteriormente descritos tras 48 horas de incubación, la licuación del medio y la aparición de un halo traslúcido alrededor de las colonias después de adicionar HCl 1 M, respectivamente, se consideran resultados positivos para estas pruebas. La hidrólisis de almidón se revela mediante la adición a la placa de medio MMs de unas gotas de solución de yodina. La actividad de la lecitinasa y lipasa se estudió en el medio agar yema

Caracterización de la cepa MAH1

de huevo. La aparición de zonas opacas alrededor de las colonias se considera un resultado positivo del test para el caso de la actividad lecitinasa, y, para el caso de actividad lipasa, la prueba se considera positiva tras examinar la placa de petri con una iluminación oblicua y detectar la aparición de un brillo aceitoso/iridiscente o por la aparición de una capa perlada sobre y alrededor de las colonias. Para detectar la producción de nitritos en el agua de peptona modificada se le adicionaron al medio tras 24 horas de cultivo, unas gotas de solución de ácido sulfanílico al 0,8 % y de α -naftilamina al 0,5 % (ambas en ácido acético 5 N). La producción de nitrógeno N_2 se detecta por la presencia de gas en las campanas de Durham presentes en los tubos, mientras que la producción de nitritos se revela por el viraje del medio a un color rojo intenso (Skerman, 1967). La producción de indol se comprobó en medio agua de peptona, tras 24 horas de incubación a 28 °C, mediante la adición del reactivo de Kovac (1928). El cambio de color del reactivo de Kovac se considera como positivo para la presencia de la enzima triptofanasa. Para la prueba del rojo de metilo y Voges-Proskauer se utilizó rojo de metilo y el reactivo de Barrit (1936) además del medio anteriormente descrito. Un viraje del color del medio a rojo para la prueba del rojo de metilo y a rosado para la prueba de Voges-Proskauer, tras la adición de los reactivos, indica que la bacteria realiza la fermentación ácido-mixta y butilenglicólica, respectivamente. El crecimiento en Mackonkey se comprobó en el medio anteriormente descrito.

Para el estudio de otras actividades enzimáticas como la fosfatasa alcalina o ácida se utilizó las tiras API ZYM (Biomerieux, Inc.), las tiras se inocularon a partir de una suspensión de la bacteria en solución salina (0,9 % de NaCl) con una densidad óptica entre 0,5 y 0,6 y se incubaron a 28 °C. La lectura del test se realizó a las 24 horas de incubación.

Por último, para estudiar el uso de diferentes sustratos por la cepa MAH1 se utilizaron las tiras API 50CH (Biomerieux, Inc.), para el uso de sustratos en aerobiosis y en anaerobiosis, y la prueba Biolog GN2 (Biolog Inc.) para el uso de sustratos en aerobiosis. En el primer caso la cepa se cultivó en medio 50CH/BE (Biomerieux, Inc.) suplementado con NaCl al 2 %, se incubó a 28 °C durante 24 horas y posteriormente se distribuyó en los pocillos a razón

Caracterización de la cepa MAH1

de 20 µl por pocillo. Para la prueba de uso de sustrato en anaerobiosis, además, se adicionó parafina siguiendo las indicaciones del fabricante. En el segundo caso, un cultivo en fase exponencial y con una densidad óptica entre 0,3 y 0,4 se resuspendió en solución salina, se inoculó el Biolog a partir de esta solución a razón de 125 µl por prueba y se incubó a 28 °C. La lectura de los resultados se realizó a las 24 y 48 horas de incubación en ambos casos.

La susceptibilidad a antibióticos se ensayó siguiendo lo descrito por Bauer *et al.* en 1966 en medio MMs. Los antibióticos ensayados fueron: amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol y kanamicina, a una concentración de 25, 10, 30 y 30 µg, respectivamente.

Por último, el estudio del contenido en ácidos grasos, lípidos polares, estructura del peptidoglucano y composición en azúcares de la pared fue realizado por el doctor B.J. Tindall en el servicio de identificación del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ) en Braunschweig, Alemania.

3.2.3. Análisis filogenéticos basados en la secuenciación del gen ARNr 16S

La secuenciación completa del gen ARNr 16S se realizó en el Centro de Investigación de Dresden-Rossendorf (Alemania) en el transcurso de una estancia subvencionada mediante el Subprograma de Acciones Integradas del Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Educación y Ciencia. Este estudio se realizó de la forma que detallamos a continuación.

El ADN se obtuvo a partir de 2 ml de un cultivo en fase exponencial en medio MB mediante el uso del kit de extracción de ADN NucleoBond AXG 100 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos del gen ARNr 16S fueron amplificados usando los siguientes cebadores: 16S7-27:F (5'-AAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'), 16S1492-1513:R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') para los extremos del gen y el 16S342F (5'-CTACGGGAGGCAGCAGTGGG-3') para la zona intermedia del gen. El producto obtenido de la amplificación se limpió mediante el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) y se secuenció en un

secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Foster City, California, USA). Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas disponibles en el GenBank mediante análisis por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y, posteriormente, alineadas con el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Para el estudio de la relación filogenética de la cepa MAH1 con otras bacterias, se procedió a la construcción del árbol filogenético, basándonos en la secuencia del gen ARNr 16S, mediante el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) usando el método “neighbor-joining” (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon mediante el método “maximum composite likelihood” (Tamura *et al.*, 2004). Por último, la topología y robustez del árbol fue determinada mediante un test bootstrap de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

3.2.4. Hibridación de ADN y contenido en G+C

El ADN se extrajo usando una prensa francesa (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA), a fin de romper las células, y se purificó por cromatografía en hidroxapatita, según lo descrito por Cashion *et al.*, (1977). La hibridación de ADN se llevó a cabo según el método descrito por De Ley *et al.*, (1970), considerando las modificaciones descritas por Huss *et al.*, (1983), usando un espectrofotómetro modelo Cary 100 Bio UV/VIS y equipado con un termostato Peltier para el control de la temperatura *in situ* (Varian Inc., Palo Alto, USA).

El ADN, para comprobar el contenido en G+C, se hidrolizó con nucleasa P1 y posteriormente los nucleótidos se desfosforilaron con fosfatasa alcalina bovina tal como lo describe Mesbah *et al.*, (1989). Los desoxirribonucleótidos así obtenidos se analizaron por cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC) (Shimadzu Corp., Japón) bajo las siguientes condiciones: temperatura 45 °C, 10 µl de muestra, solvente 0,3 M (NH₄) H₂PO₄/acetonitrilo, 40:1 (v/v), pH 4,4, 1,3 ml/min. Estos estudios fueron realizados por el servicio de identificación del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ) en Braunschweig, Alemania.

3.3. Resultados

La cepa MAH1 aislada de aguas superficiales del Mar de Alborán, es una bacteria aerobia, gram negativa, con forma de bacilo recto o ligeramente curvado y con un alto grado de pleomorfismo, ya que, aunque sus dimensiones generales oscilan entre 0,6-2 μm de largo y 0,3-0,5 μm de grosor, pueden dar lugar a formas más alargadas y curvadas. Poseen movilidad mediante un flagelo polar como podemos observar en la Figuras 3.1 D y 3.1 E. Las colonias tanto en medio MB como en MM tienen una coloración beige-amarillo, ligeramente convexas y de un tamaño que oscila entre 0,5 y 2 mm (Figura 3.1 F). Las colonias aparecen entre las 24 y 48 horas de incubación a 28 °C. La cepa MAH1 produce polímeros extracelulares y, frecuentemente, forma agregados.

La bacteria creció bien a concentraciones comprendidas entre 0,7 % y 20 % de NaCl, con un crecimiento óptimo a una concentración del 2 % de NaCl. Por otra parte, el crecimiento se produjo a pHs comprendidos en el intervalo de 5 a 9,5, ambos inclusive, y, posteriormente, al realizar las curvas de crecimiento se encontró que no había diferencias significativas en el crecimiento a los diferentes pH, salvo a pH 5 que fue algo mas lento como puede apreciarse en la Figura 3.2. Por lo que respecta a la temperatura de crecimiento, la cepa MAH1 creció en un rango de temperatura entre 2 °C y 43 °C, siendo óptimo el crecimiento en el rango de temperatura 28 °C - 37 °C.

En cuanto a las pruebas bioquímicas, dieron como resultado que la bacteria era catalasa y oxidasa positiva, pudiendo hidrolizar el ADN y la gelatina. Por otro lado los resultados fueron negativos para pruebas como la reducción de nitrato (tanto para la producción de nitrógeno gaseoso como nitritos), hidrólisis del almidón, actividad de la lecitinasa y lipasa, prueba del indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, y crecimiento en MacConkey. La utilización de sustratos por el sistema API 50CH, resultó negativo para todos los sustratos tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, mientras que el sistema Biolog GN2 en aerobiosis resultó ser positivo para el uso de las siguientes fuentes de carbono: ácido α -cetobutírico, ácido α -cetovalérico, ácido propiónico, L-alaninamida y L-serina, y dando una baja respuesta a la

Caracterización de la cepa MAH1

utilización del tween 80, D-arabitol, α -D-glucosa, β -metil-D-glucósido, ácido acético, ácido β -hidroxibutírico, ácido γ -hidroxibutírico, ácido succínico, L-alanina, L-alanilglicina, ácido glicil-L-glutámico, L-ornitina y ácido L-piroglutámico. Para el estudio de actividades enzimáticas se utilizó el sistema API ZYM dando positivo a la presencia de las enzimas fosfatasa alcalina y ácida, esterasa (C4), esterasa lipasa, leucina arilamidasa, cisteína arilamidasa, α -quimiotripsina y naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa, siendo negativo para el resto. La resistencia a antibióticos dio como resultado que la cepa MAH1 era resistente a ampicilina, kanamicina y amoxicilina.

Algunos de estos resultados son mostrados y comparados con datos bibliográficos de bacterias cercanas filogenéticamente en la Tabla 3.1.

El análisis de los ácidos grasos muestra una predominancia de los pertenecientes al tipo iso destacando el C_{15:0} (29,01 %), el C_{17:0} (12,63 %) y el C_{17:0} ω 9c (12,23 %) que en conjunto comprenden más del 50 % de los ácidos graso presentes (Tabla 3.2).

Por otro lado, la cepa MAH1 mostró la presencia del ácido meso-diaminopimélico, componente que sólo se ha descrito para dos tipos de peptidoglucanos, el A1 γ y el A4 γ . El peptidoglucano A4 γ sólo se ha encontrado en bacterias muy alejadas filogenéticamente a la cepa antes mencionada, por lo que se considera que puede ser excluido como componente de ésta, quedando por tanto determinado que el componente de la pared bacteriana a estudio es el A1 γ . Los lípidos polares encontrados fueron difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, aminolípidos y glicolípidos. Los azúcares componentes de la pared fueron mayoritariamente la glucosa y la ribosa.

En relación a los estudios de secuenciación e hibridación, la secuenciación del gen ARNr 16s (1400 pb) dio como resultado que la cepa MAH1 posee un 100 % de homología con *I. loihiensis* L2TR (DSM 15497) descrita por Donachie *et al.* (2003), mientras que los estudios de hibridación ADN-ADN, dio como resultado que la cepa MAH1 tiene un porcentaje de hibridación del 96,1 % con la bacteria antes mencionada. Por ultimo, hay que mencionar que el contenido en G+C fue del 48,2 mol%.

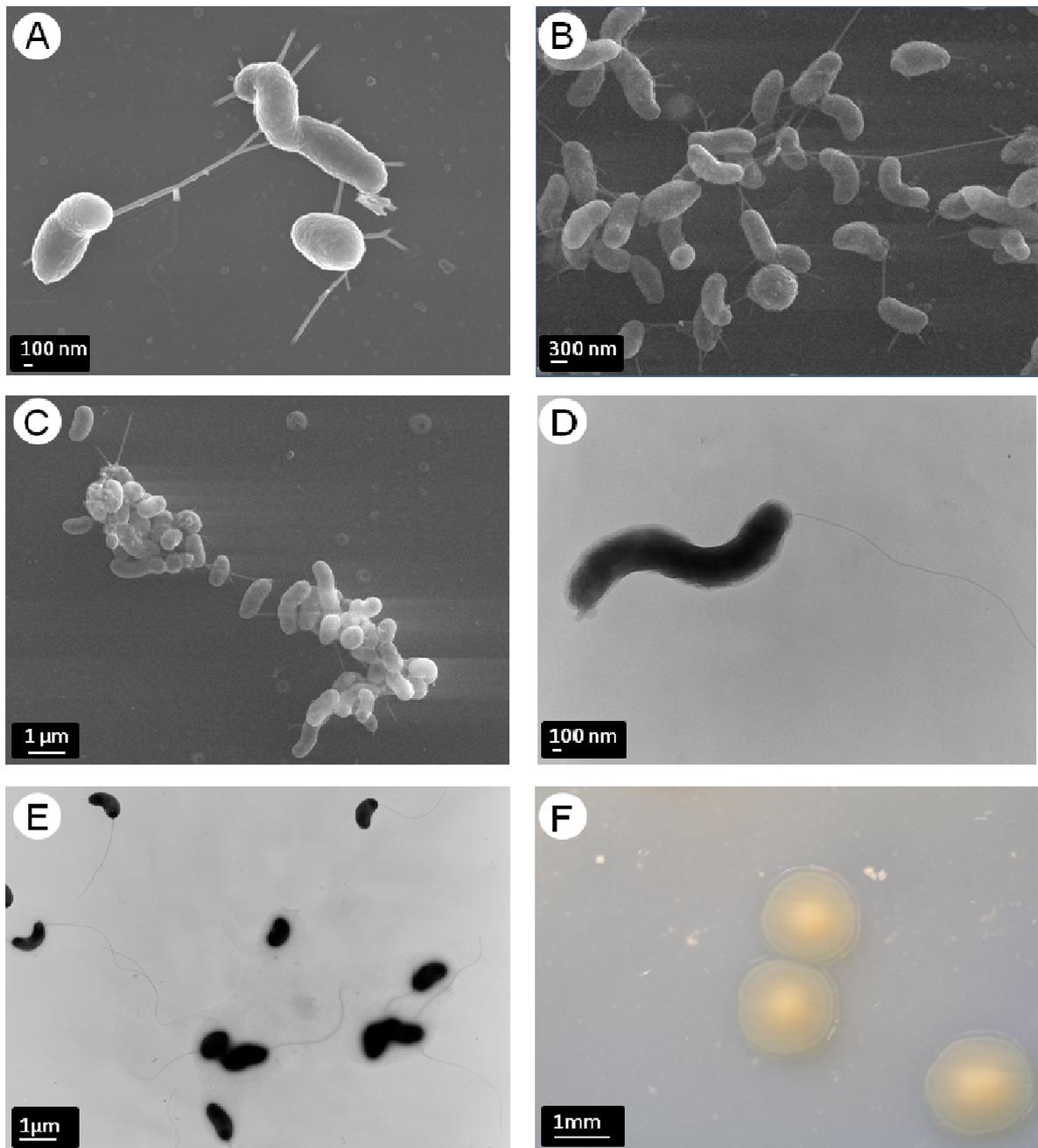


Figura 3.1. Imágenes de la cepa MAH1. (A, B, C) Fotografías mediante Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). (D, E) Fotografías mediante Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM). (F) Fotografía mediante microscopio óptico de las colonias a las 48 horas de incubación.

Caracterización de la cepa MAH1

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Flagelo/posición	Uno, polar	Uno, polar o subpolar	Uno, polar	Uno, polar	Uno, polar o subpolar	Uno, polar	Uno, polar	Uno, polar	Uno, polar
Longitud celular (µm)	0,6-2	0,7-1,8	1-1,8	0,7-1,6	1-1,8	3-4	2-3	1-1,9	0,7-2,0
Diámetro celular (µm)	0,3-0,5	0,35-0,45	0,7-0,9	0,4-0,7	0,7-0,9	0,75	0,75	0,3-0,6	0,4-0,6
Contenido en G+C (mol%)	48,2	47,4	50,4	49,9	48	46	48,7	45	45,1
Crecimiento en NaCl (% p/v)	0,7-20	0,5-20	0,6-15	1-10	1-10	0,5-20	0,5-15	1-20	1-15
Óptimo de NaCl (% p/v)	3-6	7,5-10	3-6	3-6	3-6	3-5	3-5	7-10	3-5
Rango de temperatura (°C)	2-42	4-46	4-30	8-46	4-30	4-45	15-40	4-40	4-45
Óptimo de temperatura (°C)	28-37	ND	20-22	30-40	20-22	32	32	30-35	25-30
Rango de pH	5-9,5	ND	5,5-9,9	ND	5,5-9,5	5-10	5-10	6-10	6-9
Biolog GN2:									
Tween 40	-	+	-	+	-	+	+	+	-
Tween 80	+/-	+	-	+	-	+	+	+	+
Dextrina	-	+	+	-	-	ND	ND	-	-
Glucógeno	-	+	+	-	+	ND	ND	+	-
Metil piruvato	-	+	+	-	-	ND	ND	-	-
Monometil succinato	-	+	+	-	+	ND	ND	-	-
Maltosa	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ácido acético	-/+	+	+	+	-	-	-	-	-
Ácido <i>cis</i> -aconítico	-	+	-	-	-	ND	ND	-	-
Ácido cítrico	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ácido α -cetobutírico	+	+	+	+	+	ND	ND	+	-
Ácido α -cetoglutárico	-	+	-	-	-	ND	ND	-	-
Ácido α -cetovalérico	+	-	+	+	+	ND	ND	+	-
Ácido D-L láctico	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ácido malónico	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ácido propiónico	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.1. Características generales de la cepa MAH1 y de otras especies relacionadas. 1, Cepa MAH1 (este trabajo); 2, *I. loihiensis* (Donachie *et al.*, 2003); 3, *I. abyssalis* (Ivanova *et al.*, 2000); 4, *I. baltica* (Brettar *et al.*, 2003); 5, *I. zobellii* (Ivanova *et al.*, 2000); 6, *I. fontislapidosi* (Martínez-Cánovas *et al.*, 2004); 7, *I. ramblicola* (Martínez-Cánovas *et al.*, 2004); 8, *I. seosinensis* (Choi and Cho 2005); 9, *P. homiensis* (Kwon *et al.*, 2006; Wen Dar *et al.*, 2009). ND: No Determinado.

Caracterización de la cepa MAH1

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Biolog GN2:									
Acido succinico	+/-	-	+	-	+	-	-	+	-
Mio-Inositol	-	+	ND	ND	ND	-	-	-	-
L-Arabinosa	-	+	-	+	-	-	-	-	-
L-Alanina	+/-	+	+	-	+	-	-	+	-
L-Alanil-glicina	+/-	-	+	-	+	ND	ND	+	-
Glicerol	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Glucosa 6 fosfato	-	-	+	-	-	ND	ND	-	-
L-Alaninamida	+	-	+	-	+	ND	ND	+	-
L- Serina	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornitina	+/-	-	-	-	+	ND	ND	-	-
API ZYM:									
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	ND	+	+	+	+
Esterasa (C4)	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+
Esterasa lipasa (C8)	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+
Lipasa (C14)	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+
Valina arilamidasa	-	-	+	-	ND	ND	ND	-	+
Cisteína arilamidasa	-	+/-	+	+	ND	ND	ND	-	+
Tripsina	-	+	-	-	ND	ND	ND	-	+
Fosfatasa ácida	+	+	+	+	ND	+	+	+	+
Susceptibilidad a:									
Ampicilina(10 µg)	-	ND	-	ND	-	+	+	ND	ND
Kanamicina (30 µg)	-	ND	-	ND	-	+	-	ND	ND
Cloranfenicol (30 µg)	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND
Amoxicilina (25 µg)	-	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND
Estreptomicina (10 µg)	ND	ND	+	ND	-	+	-	ND	ND
Sulfamida (250 µg)	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	ND	ND
Tobramicina (10 µg)	ND	ND	ND	ND	ND	+	-	ND	ND
Hábitat	Mar de Alborán (Superficie)	Corriente hidrotermal submarina, Hawaii	Océano Pacífico noroeste (Profundidad)	Mar Báltico Central (Superficie)	Océano Pacífico noroeste (Profundidad)	Zona hipersalina (Málaga España)	Curso de agua hipersalino (Murcia, España)	Salinas (Seosin, Corea)	Arena de playa (Pohang, Corea)

Tabla 3.1. Continuación.

Caracterización de la cepa MAH1

Ácidos grasos (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Saturados:									
C _{10:0}	0,22	0,20	-		-				
C _{11:0}	0,06	-	<1,00		<1,00				
C _{12:0}	0,32	0,30	<1,00		<1,00				
C _{13:0}	-	-	<1,00		<1,00				
C _{14:0}	0,78	0,80	-		-	1,92	0,61	0,50	
C _{15:0}	-	0,50	-		-				
C _{16:0}	6,95	7,60	6,30	4,80	4,60	11,73	7,38	8,90	9,00
C _{17:0}	0,96	0,80	<1,00		<1,00	0,62	1,69	0,80	
C _{18:0}	2,20	1,60	1,80	0,90	0,80	4,94	3,00	3,90	4,80
Total	11,49	11,80		5,70		19,21	12,68	14,10	13,80
Monoinsaturados:									
C _{11:0 iso}	1,69	2,00	-	2,50	-	2,77	3,43	3,20	1,80
C _{13:0 iso}	1,51	1,80	1,00	0,80	1,10	0,92	1,46	-	
C _{14:0 iso}	0,19	0,20	<1,00		<1,00				
C _{14:1 ω5c}	0,12	-	<1,00		<1,00			1,40	
C _{14:1 ω7c}	-	-	<1,00		<1,00				
C _{15:0 iso}	29,01	32,60	33,70	36,90	40,60	26,75	24,79	17,10	19,30
C _{15:0 anteiso}	0,38	0,30	<1,00		<1,00	0,62	1,16	-	
C _{15:1 iso F}	1,70	1,30	2,30	1,50	1,60	1,46	1,91	0,60	1,70
C _{15:1 anteiso}	-	-	<1,00		<1,00				
C _{15:1 ω6c}	0,09	0,10	<1,00		<1,00				
C _{15:1 ω8c}	-	-	1,30		1,10	-	-	-	
C _{16:0 iso}	0,70	0,50	-		-				
C _{16:0 anteiso}	-	-	<1,00		<1,00				
C _{16:1 ω7c}	6,55*	6,00	7,00	8,40	8,30	11,33*	5,21*	2,50*	7,20*
C _{16:1 ω9c}	0,40	-	<1,00		<1,00				
C _{17:0 iso}	12,63	11,00	11,90	11,20	12,50	8,83	12,92	15,20	10,90
C _{17:0 anteiso}	0,42	0,30	<1,00		<1,00				
C _{17:1 ω6c}	-	-	1,50		3,40	-	-	-	-
C _{17:1 ω8c}	0,97	0,90	0,80	0,70	1,10	0,31	1,11	-	
C _{17:1 ω9c iso}	12,23	11,90	-	10,00	-	4,04	11,03	8,80	11,90
C _{18:1 ω7c}	7,06	5,50	6,70	6,00	5,90	9,32	5,92	8,70	10,40
C _{18:1 ω7c 11-Metil}	-	-	-	1,80	-	0,93	0,18	-	
C _{18:1 ω9c}	1,33	1,00	1,40	0,90	0,90	1,13	1,22	0,80	2,50
C _{19:0 iso}	0,24	0,20	-		-				
C _{19:1 ω6c}	-	0,60	-	0,40	-			2,10	-
Total	76,52	76,20		81,10		68,41	70,34	60,4	65,7
Hidroxi:									
C _{10:0 3-OH}	0,73	0,80	-	1,20	-	2,34	1,10	1,30	1,20
C _{11:0 3-OH iso}	4,12	4,10	-	3,70	-	2,56	5,64	5,00	4,40
C _{12:0 3-OH}	0,79	0,70	-		-			1,20	
C _{13:0 3-OH iso}	3,61	3,30	-	3,20	-	1,61	2,27	4,20	3,60
C _{15:0 3-OH iso}	0,29	0,50	-		-			1,20	
C _{16:0 3-OH}	0,27	0,30	-		-				
C _{17:0 3-OH iso}	0,20	0,20	-		-				
C _{17:0 2-OH}	-	-	-		-				
Total:	10,01	9,90		8,10		6,51	9,01	12,9	9,2
Otros:									
C _{17:0 ciclo}	1,14	1,70	-	0,6	-	1,22	2,53	4,50	0,70
Total analizados	99,16	99,60		95,50		95,35	94,56	91,9	89,4

Tabla 3.2. Composición en ácidos grasos de la cepa MAH1 y de otras especies relacionadas. 1, Cepa MAH1 (este trabajo); 2, *I. loihiensis* (Donachie *et al.*, 2003); 3, *I. abyssalis* (Ivanova *et al.*, 2000); 4, *I. baltica* (Brettar *et al.*, 2003); 5, *I. zobellii* (Ivanova *et al.*, 2000); 6, *I. fontislapidosi* (Martínez-Cánovas *et al.*, 2004); 7, *I. ramblicola* (Martínez-Cánovas *et al.*, 2004); 8, *I. seosinensis* (Choi y Cho 2005); 9, *P. homiensis* (Kwon *et al.*, 2006; Jean *et al.*, 2009). - Sin detectar. *16:1 ω7c/15:0 iso 2-OH.

Caracterización de la cepa MAH1

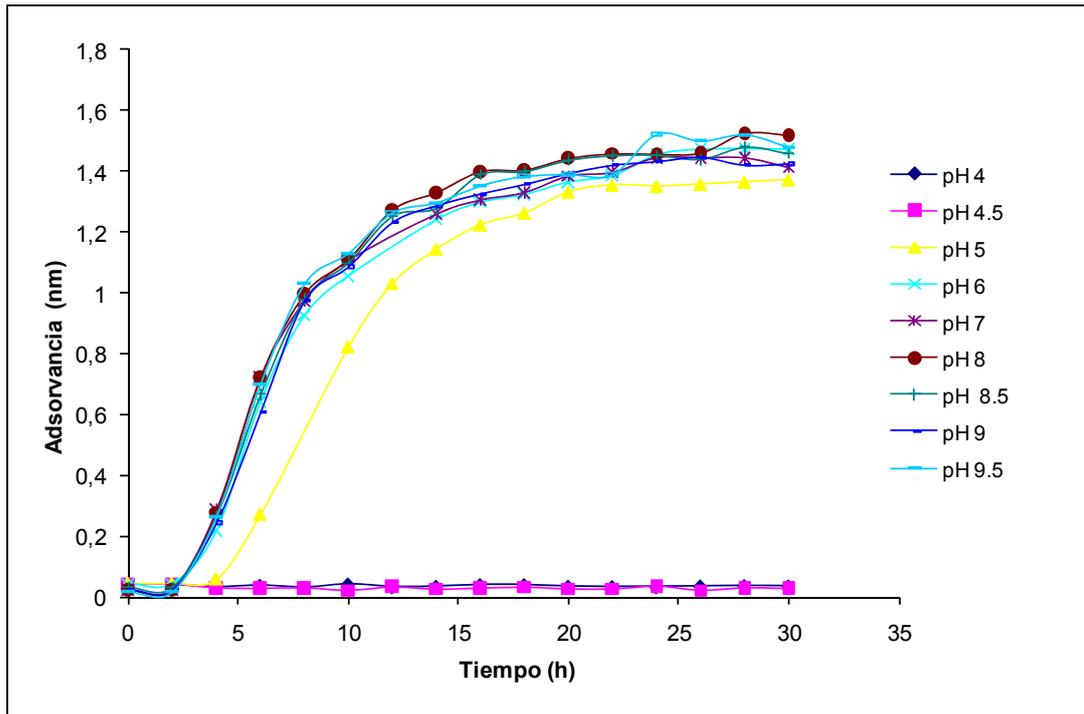


Figura 3.2. Curvas de crecimiento a diferentes pH de la cepa MAH1 en medio MB.

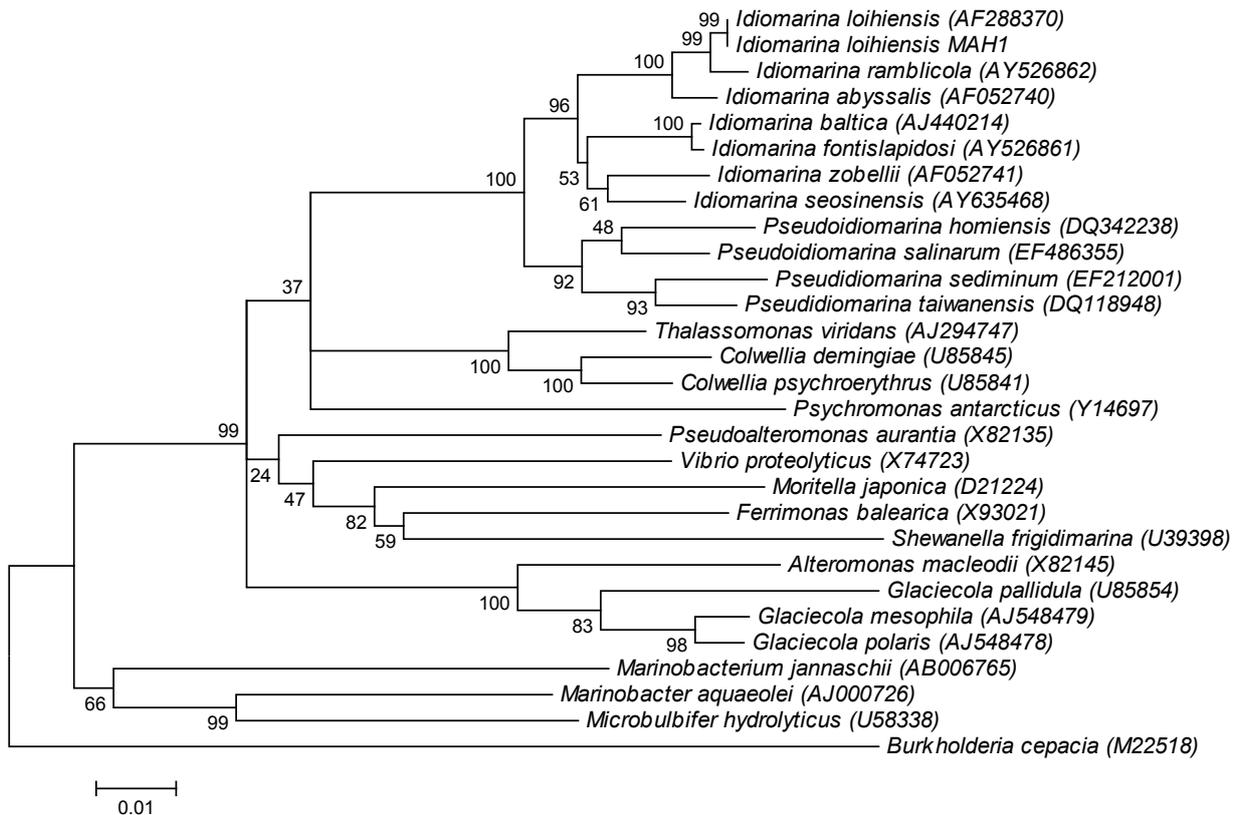


Figura 3.3. Árbol filogenético construido mediante el método "neighbor-joining" en el que se muestra la relación filogenética de *Idiomarina loihensis* MAH1 con otras bacterias.

3.4. Discusión

Como ya hemos comentado antes, la cepa MAH1 posee un alto grado de pleomorfismo, esto es similar a lo descrito por Donachie *et al.* (2003) para la cepa tipo de *I. loihiensis*, la cual tras varios días de incubación en medio MB a 30 °C, podía alcanzar dimensiones de varias decenas de micras. Esta característica no ha sido descrita para ninguna otra bacteria del género *Idiomarina*, lo que puede ser un indicio de la relación entre la cepa MAH1 y la especie antes mencionada. Por otro lado, las pruebas de utilización de sustratos indican notables diferencias entre la cepa MAH1 e *I. loihiensis*. Estas diferencias son más numerosas que las encontradas con las otras seis *Idiomarinas*. Las diferencias y similitudes entre la cepa MAH1 y diferentes bacterias relacionadas pueden observarse en la Tabla 3.1.

El análisis de los ácidos grasos muestra una predominancia de los de tipo iso, típico de la familia *Idiomarinaceae*. Los niveles totales, tanto de ácidos grasos saturados (11,49 %) como de insaturados (76,52 %), son muy similares a los encontrados en otras *Idiomarinas*, resaltando la gran similitud encontrada con *Idiomarina loihiensis* en el porcentaje de ácidos grasos totales. Al realizar la comparación para cada uno de los ácidos grasos, aunque sigue existiendo una gran semejanza entre los de MAH1 y *I. loihiensis*, si se aprecian desigualdades entre los porcentajes, pudiendo mencionar a modo de ejemplo las encontradas en los C_{18:1} ω7c (7,06 % y 5,50 %) y C_{17:0} iso (12,63 % y 11,00 %, respectivamente). También, la existencia o ausencia de ácidos grasos minoritarios como el C_{15:0} o el C_{16:1} ω9c aportan diferencias importantes entre las dos bacterias antes mencionadas. En comparación con otras bacterias del mismo género, las diferencias encontradas fueron más apreciables que con respecto a *I. loihiensis* (Tabla 3.2). La composición de ácidos grasos y su variación en respuesta a los cambios de temperatura y salinidad en diferentes bacterias ha sido objeto de estudio de numerosos investigadores. Así, sin ir muy lejos, Brettar *et al.* (2003), en sus estudios sobre *I. baltica*, ya realizaron varios experimentos con varias *Idiomarinas* para comprobar la existencia o no de dicha respuesta. Encontraron que el aumento de la temperatura conllevaba un aumento de la proporción de los ácidos grasos ramificados de tipo iso y un

descenso de los monoinsaturados, y viceversa para los descensos en la temperatura. Esto es comparable a lo descrito para otras *Gammaproteobacterias* tales como *Shewanella* (Bozal *et al.*, 2002) o *Stenotrophomonas* (Rahmati-Bahram *et al.*, 1995). Estudios similares han sido llevados a cabo por Freese *et al.* (2008) con bacterias pertenecientes a otros grupos bacterianos, tales como *Paraccocus* sp. (*Proteobacterias*), *Arcobacter* sp. (*Actinobacterias*) o *Oceanobacillus* sp. (*Firmicutes*). De estos estudios se desprende que no todas las bacterias poseen esta respuesta adaptativa e, incluso, que bacterias pertenecientes al mismo género pueden tener respuestas diferentes. Debido a esto, sería interesante comprobar si la cepa MAH1 tiene este tipo de respuesta a los cambios de temperatura al igual que *I. baltica* y otras *Idiomarinas*. Esto nos abre nuevas perspectivas para futuras investigaciones sobre este tema.

Si bien es cierto que las diferencias fenotípicas mencionadas en los párrafos anteriores (utilización de sustratos, ácidos grasos, etc.) podrían hacernos considerar a la cepa MAH1 como una nueva especie, no hay que olvidar que los resultados de la secuenciación del gen ARNr 16S dio una coincidencia del 100 % con *I. loihiensis*. Actualmente la secuenciación de este gen es mucho más rápida que la hibridación de las cadenas de ADN, con lo que se ha venido utilizando como medio para la identificación y estudio de las relaciones filogenéticas entre bacterias. Sin embargo, muchos autores han puesto en entredicho la exactitud de este método sobre todo cuando se intenta elucidar las relaciones filogenéticas entre bacterias muy cercanas, a nivel de especie y cepa. Las limitaciones que presenta ya han sido descritas por investigadores como Alexander N. Glazer o Erko Stackebrandt. De estas limitaciones podemos mencionar la existencia de microorganismos que pueden tener múltiples copias diferentes de ARNr en su genoma (ej. *Thermospora bispora bispora*) o bacterias cuyo ARNr 16s son idénticos pero que, sin embargo, a nivel del genoma completo difieren en numerosas regiones variables (Glazer y Nikaido, 2007; Stackebrandt y Goebel, 1994). Stackebrandt y Pukall (1999) ya advierten que incluso un 99,5 % de similitud entre genes es insuficiente para afiliar un aislado a una especie determinada. Por tanto si bien el análisis del gen ARNr 16S se revela como una herramienta de inestimable

Caracterización de la cepa MAH1

valor, no por ello debemos basarnos solamente en éste y obviar el resto de pruebas bioquímicas utilizadas a la hora de asignar una bacteria a un género o a una especie determinada. Por ello, para mayor seguridad de la ubicación filogenética de la cepa MAH1, se decidió realizar la hibridación ADN-ADN. Ésta, al dar como resultado una hibridación de 96,1 % con la especie tipo de *I. loihiensis*, nos indica sin lugar a dudas que la cepa MAH1 es una cepa perteneciente a la especie *I. loihiensis*, pasando por tanto a denominarse como *Idiomarina loihiensis* MAH1.

3.5. Descripción de *I. loihiensis* MAH1

Teniendo en cuenta los resultados citados y discutidos concluimos que *Idiomarina loihiensis* MAH1, aislada del Mar de Alborán, es un bacilo recto o curvado, aerobio, gram negativo que puede alcanzar entre 0,6-2 μm de largo y entre 0,3-0,5 μm de ancho, con movilidad mediante un flagelo polar y que produce colonias de color beige-amarillo ligeramente convexas y de un tamaño entre 0,5 y 2 mm en medio MM y MB. Crece bien en medios suplementados con NaCl (entre 0,7 y 20 %, óptimo 2 %) y a temperaturas entre 2 °C y 37 °C (óptimo entre 28 °C y 37 °C). También crece bien a pH comprendidos entre 5 y 9,5. Posee las actividades enzimáticas catalasa, oxidasa, gelatinasa, fosfatasa alcalina y ácida, esterasa (C4), esterasa lipasa, leucina arilamidasa, cisteína arilamidasa, α -quimiotripsina y naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa y hidroliza también el ADN. En aerobiosis es capaz de utilizar como fuente de carbono los sustratos ácido α -cetobutírico, ácido α -cetoaléxico, ácido propiónico, L-alaninamida y L-serina, y débilmente el tween 80, D-arabitol, α -D-glucosa, β -metil-D-glucósido, ácido acético, ácido β -hidroxibutírico, ácido γ -hidroxibutírico, ácido succínico, L-alanina, L-alanilglicina, ácido glicil-L-glutámico, L-ornitina y ácido L-piroglutámico. Es resistente a la ampicilina, kanamicina y amoxicilina. El ácido graso mayoritario es el C_{15:0} iso (29,01 %) seguido del C_{17:0} iso (12,63 %). El peptidoglucano que forma la pared es del tipo A1 γ , posee difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, aminolípidos y glicolípidos como lípidos polares, los azúcares mayoritarios que componen la pared son glucosa y ribosa. El porcentaje de bases G+C es del 48,2 mol %.

3.6. Bibliografía

- Anderson, T.F. (1951). "Technique for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope". Transactions of the New York Academy of Sciences, 13, 130.
- Bárcena, M.A., Flores, J.A., Sierro, F.J., Pérez-Folgado, M., Fabres, J., Calafat, A., Canals, M. (2004). "Planktonic response to main oceanographic changes in the Alboran Sea (Western Mediterranean) as documented in sediment traps and surface sediments". Marine Micropaleontology, 53(3-4), 423-445.
- Barritt, M.M. (1936). "The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol". Journal of Pathology and Bacteriology, 42, 441-454.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". American Journal of Clinical Pathology, 45 (4), 493-496.
- Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E., Jiménez, F., Guinea, J. (2002). "*Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(1), 195-205.
- Brettar, I., Christen, R., Höfle, M.G. (2003). "*Idiomarina baltica* sp. nov., a marine bacterium with a high optimum growth temperature isolated from surface water of the central Baltic Sea". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53 (2), 407-413.
- Cashion, P., Holder Franklin, M.A., McCully, J., Franklin, M. (1977). "A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA". Analytical Biochemistry, 81 (2), 461-466.
- Choi, D.H., Cho, B.C. (2005). "*Idiomarina seosinensis* sp. nov., isolated from hypersaline water of a solar saltern in Korea". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55 (1), 379-383.
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A. (1970). "The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates". European Journal of Biochemistry, 12 (1), 133-142.

Caracterización de la cepa MAH1

- Donachie, S.P., Hou, S., Gregory, T.S., Malahoff, A., Alam, M. (2003). "*Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic γ -proteobacterium from the Lo'ihi submarine volcano, Hawaii". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (6), 1873-1879.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap". *Evolution*, 39, 783-791.
- Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E., Lipski, A. (2000). "Characterization of N_2O -producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov.". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (1), 273-282.
- Freese, E., Sass, H., Rutters, H., Schledjewski, R., Rullkotter, J. (2008). "Variable temperature-related changes in fatty acid composition of bacterial isolates from German Wadden sea sediments representing different bacterial phyla". *Organic Geochemistry*, 39 (10), 1427-1438.
- Glazer, A.N., Nikaido, H. (2007). "Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology" Cambridge University Press, 13-15.
- Huss, V.A.R., Festl, H., Schleifer, K.H. (1983). "Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates". *Systematic and Applied Microbiology*, 4 (2), 184-192.
- Ivanova, E.P., Flavier, S., Christen, R. (2004). "Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: Emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. Nov.". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (5), 1773-1788.
- Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Chun, J., Matte, M.H., Matte, G.R., Mikhailov, V.V., Svetashev, V.I., Huq, A., Maugel, T., Colwell, R.R. (2000). "*Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov.". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (2), 901-907.

Caracterización de la cepa MAH1

- Klein, W., Weber, M.H.W., Marahiel, M.A. (1999). "Cold shock response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures". *Journal of Bacteriology*, 181 (17), 5341-5349.
- Kovacs, N. (1956). "Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction". *Nature*, 178 (4535), 703.
- Kovacs, N. (1928). "Eine vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien". *Zeitschrift für Immunitätsforschung, Experimentelle und Klinische*, 55, 311-315.
- Kwon, S.W., Kim, B.Y., Weon, H.Y., Baek, Y.K., Koo, B.S., Go, S.J. (2006). "*Idiomarina homiensis* sp. nov., isolated from seashore sand in Korea". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 (9), 2229-2233.
- López, C.S., Heras, H., Ruzal, S.M., Sánchez-Rivas, C., Rivas, E.A. (1998). "Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium". *Current Microbiology*, 36 (1), 55-61.
- Martínez-Cánovas, M.J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Páez, R., Quesada, E. (2004). "*Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (5), 1793-1797.
- McClung, L.S., Toabe, R. (1947). "The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of *Clostridium sporogenes* and certain species of the gangrene and botulinum groups". *Journal Bacteriology*, 53, 139-147.
- Mesbah, M., Whitman, W.B. (1989). "Measurement of deoxyguanosine/thymidine ratios in complex mixtures by high-performance liquid chromatography for determination of the mole percentage guanine + cytosine of DNA". *Journal of Chromatography*, 479 (2), 297-306.
- Rahmati-Bahram, A., Magee, J.T., Jackson, S.K. (1995). "Growth temperature-dependent variation of cell envelope lipids and antibiotic susceptibility in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36 (2), 317-326.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees". *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.

Caracterización de la cepa MAH1

- Shieh, W.Y., Jean, W.D., Lin, Y.T., Tseng, M. (2003). "*Marinobacter lutaoensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan". *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 244–252.
- Skerman, V.B.D. (1967). "A guide to the identification of the genera of bacteria" Ed. Williams & Wilkins. Co., Baltimore, 303 pp.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994). "Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 (4), 846-849.
- Stackebrandt, E. Pukall, R. (1999). "Response to Althoff *et al.* (Mar Biol 130: 529-536). Deriving taxonomic decisions from 16S rDNA: a case study". *Marine Biology*, 133, 159-161.
- Taborda, M., Antunes, A., Tiago, I., Veríssimo, A., Nobre, M.F., da Costa, M.S. (2009). "Description of *Idiomarina insulisaldae* sp. nov., isolated from the soil of a sea salt evaporation pond, proposal to transfer the species of the genus *Pseudidiomarina* to the genus *Idiomarina* and emended description of the genus *Idiomarina*". *Systematic and Applied Microbiology*, 32 (6), 371-378.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. Kumar, S. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0". *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method". *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101, 11030-11035.
- Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert, R.A., Krieg, N.R. (2007). "Phenotypic Characterization and the principles of comparative systematics". In: *Methods for General and Molecular Microbiology* (Ed Reddy C.A. *et al*), ASM press Washington, USA, 1106 pp.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice". *Nucleic Acids Research*, 22 (22), 4673-4680.

Caracterización de la cepa MAH1

- Wen Dar J., Tsung-Yen L., Chung-Yi L., Ta-Jen C., Silk Yu L., Wung Yang S. (2009). "*Pseudidiomarina marina* sp. nov. and *Pseudidiomarina tainanensis* sp. nov. and reclassification of *Idiomarina homiensis* and *Idiomarina salinarum* as *Pseudidiomarina homiensis* comb. nov. and *Pseudidiomarina salinarum* comb. nov., respectively". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 53-59.
- Yoon, J.H., Jung, S.Y., Jung, Y.T., Oh, T.K. (2007). "*Idiomarina salinarum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern in Korea" International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57 (11): 2503-2506.

Capítulo 4. Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

4.1. Introduction

Carbonate precipitation has been widely discussed for the last few decades with regard to microbial processes. Such processes have played an important role mediating carbonate production throughout the Earth's history (e.g., Knorre and Krumbein, 2000; Wright and Wacey, 2004, 2005; Dupraz and Visscher, 2005; Wright and Oren, 2005; Altermann *et al.*, 2006). In particular, precipitation of microbial dolomite has been the focus of extensive research and special attention has been paid to so-called “dolomite problem” (e.g., Vasconcelos *et al.*, 1995; Burns *et al.*, 2000; Wright and Wacey, 2004, 2005). While dolomite is relatively rare in modern natural environments, the abundance of dolomite in ancient sediments suggests that the process responsible for its precipitation in the past may have been significantly different, or operated at much larger scale. In fact, this mineral is of key importance for understanding biogeochemical processes and cycles in past and modern environments, linking the geosphere with the biosphere (e.g., Burns *et al.*, 2000; Wright and Wacey, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2006). Microbial dolomite precipitation has been related to bacterial sulphate reduction and methanogenesis (e.g., Van Lith *et al.*, 2003; Wright and Wacey, 2004, 2005; Wright and Oren, 2005; Vasconcelos *et al.*, 1995, 2006; Altermann *et al.*, 2006), and more recently aerobic respiration has also been demonstrated to induce dolomite production at the water–sediment interface (Sánchez-Román, 2007). An understanding of the microbiogeochemical processes involved in the bacterially mediated precipitation of dolomite may offer insight into how other Mg-rich carbonates form in similar environments. In this sense, recent experiments have revealed that Ca–Mg kutnahorite, a mineral with a dolomite-ordered structure, can also be precipitated by bacteria (Rivadeneira *et al.*, 2006). Kutnahorite, $\text{CaMn}(\text{CO}_3)_2$, is a calcium manganese carbonate mineral (Peacor *et al.*, 1987) member of the dolomite group. However, Ca-rich and Mg-rich phases with the kutnahorite structure have been described, suggesting a solvus in the Ca and Mg-rich and the Mn-rich members (Goldsmith, 1983; Mucci, 2004). As has been the case for dolomite, precipitation of Ca–Mg kutnahorite crystals have been obtained in hypersaline bacterial culture experiments (Rivadeneira *et al.*, 2006). Thus, available data suggest that salinity is an important factor controlling

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

microbial Mg-rich carbonate production. In this context, this work was designed to investigate the bacterial precipitation of Mg-rich carbonates at modern seawater salinities. With this objective, marine bacteria were isolated in order to check their biomineralization capability. One of the isolated strains precipitated Mg-rich carbonate. This bacterium was identified as a new strain of *the Idiomarina loihiensis* species.

Due to the widespread distribution of *Idiomarina* genus in marine and hypersaline habitats (Martínez-Cánovas *et al.*, 2004) different strains were investigated. Since 2000, when the *Idiomarina* genus was proposed by Ivanova *et al.* (2000), numerous species of *Idiomarina* have been isolated (i.e., *I. abyssalis* and *I. zobelli* from the Pacific Ocean deep-sea, Ivanova *et al.*, 2000; *I. loihiensis* from hydrothermal vents at a depth of 1296 m, Donachie *et al.*, 2003; *I. báltica* from surface water of the central Baltic Sea, Brettar *et al.*, 2003; *I. seosinensis* from hypersaline water of a solar saltern in Korea, Choi and Cho, 2005; *I. fontilapidosi* and *I. ramblicola* from a hypersaline wetland and a hypersaline rambla, respectively, Martínez-Cánovas *et al.*, 2004; *I. homiensis* from seashore sand in Korea, Kwon *et al.*, 2006) Members of *Idiomarina* share many phenotypic characteristics with other heterotrophic, oxidative, marine and halophilic members of the γ -*Proteobacteria*. Nevertheless, one eminent feature of the genus *Idiomarina* is its high content of iso-branched fatty acids, which is atypical of *Proteobacteria* with the sole exception of the *Xanthomonas* branch (Martínez-Cánovas *et al.*, 2004). They can also be distinguished from other marine bacteria by their physiological characteristics, in particular their ability to grow in a broad range of temperatures, pH values, and NaCl concentrations (Martínez-Cánovas *et al.*, 2004) Within the scope of this investigation the biomineralization capability of the isolated novel strain from surface seawater (the MAH1 strain) and three more related strains from culture collections were used for carbonate production experiments.

4.2. Experimental procedures

4.2.1. Bacterial strains

For this study, four bacterial strains belonging to the genus *Idiomarina* were used. One was isolated from a surface seawater sample (westernmost Mediterranean) within the framework of this research (strain MAH1) while the others three were obtained from bacterial-type culture collections: *I. abyssalis* (American Type Culture Collection, ATCC BAA-312), isolated from a depth of 4000–5000 m in the north-western area of the Pacific Ocean (Ivanova *et al.*, 2000); *I. loihiensis* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, DSM 15497), isolated from hydrothermal vents at a depth of 1296 m on the Loihi Seamount, Hawaii (Donachie *et al.*, 2003) and *I. baltica* (DSM 15154), isolated from surface water of the central Baltic Sea (Brettar *et al.*, 2003).

4.2.2. Culture media

For biomineralization experiments, the solid medium used was the marine medium (MM) (% w/v, yeast extract 0.5 %, triptone 1 %, purified agar–agar 2 % in seawater from the westernmost Mediterranean Sea, pH 7.6. Seawater was previously filtered with a 0.2 µm porous membrane to eliminate particulate material). For the novel strain identification, marine agar (MA) and marine broth (MB) media (DIFCO), as well as tryptic soy agar (TSA; BBL) were used. The MB medium was also used for liquid cultures and for preparing inocula. The solid media (MM and MA) were nutritive solutions solidified by agar–agar. These types of solutions, extensively used for microbial cultivation, have a structure that supports bacterial growth while allowing the nutrients and bacterial metabolites (CO₂, NH₃, etc.) to diffuse at a slow rate.

All liquid and solid media were sterilized by autoclaving for 20 min at 120 °C. The liquid medium (MB) was placed in 20 ml tubes with 5 ml per tube and the solid ones in Petri dishes at 20 ml per dish.

4.2.3. Cell-sample preparation for electronic microscopy

A 48-h-old culture in liquid medium MB was used. For transmission electron microscopy (TEM, Zeiss 10C), negative staining of MAH1 bacterium

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

with uranyl acetate (2 % for 1 min at room temperature) was prepared. For scanning electron microscopy (SEM, LEO Carl Zeiss GEMINI-1530), cell samples were bound to poly-L-Lys-coated slides (at 4 °C) and fixed in glutaraldehyde 4 % in 0.2 M cacodylate buffer with 0.4 M sucrose and 0.1 % NaCl (in order to reach an osmolality of 1205 mOsm similar to the MB medium). After this, postfixing with osmium tetroxide (1 % in the same buffer) for 1 h was performed. Following dehydration at room temperature, the samples were critical-point CO₂ dried (Polaron, CPD5501 Critical Point Drier) and coated with carbon.

4.2.4. Isolation and characterization of the novel bacterium strain MAH1

Bacterial strain MAH1 was isolated from a surface water sample of the westernmost Mediterranean Sea. The MAH1 strain was deposited in the Spanish Type Culture Collection (CECT) (<http://www.cect.org>), under reference CECT 5996. Characterization of this strain was performed by Polyphasic taxonomy that takes into account all available phenotypic and genotypic data and integrates them in a consensus type of classification, framed in a general phylogeny derived from 16S rDNA sequence analysis.

A phenotypic characterization was made and physiological and biochemical features were established according to the methods described by Mata *et al.* (2002) but using MA and MB media. Bacterial tolerance or requirement of NaCl was assayed on TSA with 0.5–23 % (w/v) NaCl at 30 °C for 10 days. The temperature range for growth was tested on MA plates incubated at 2–45 °C. The Biolog GN system (Biolog, Inc.) and the API ZYM system (bioMérieux Vitek) were used to determine the biochemical profile, following the instructions of the manufacturer. Cell morphology was visualized with TEM and SEM, from samples of the 48-h-old liquid cultures in MB medium. Chemotaxonomic analyses (DNA–DNA hybridization, DNA base composition in G + C and polar lipids pattern) were performed in the Identification Service of the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Braunschweig, Germany. The complete sequence of the 16S rDNA (1447 pb) was obtained in the Institute of Radiochemistry, Forschungszentrum Rossendorf, Germany. Phylogenetic analyses were performed using MEGA 3

(Kumar *et al.*, 2004), after multiple alignments of the data using CLUSTAL_X (Thompson *et al.*, 1997).

4.2.5. Mineral production and characterization

The four strains studied were cultivated in MB médium for 48 h at 30 °C in order to prepare inocula. Aliquots of 25 µl were streaked on the MM médium and incubated at 20 °C for 30 days. As control, plates of MM médium non-inoculated and inoculated with aliquots of 25 µl of the some bacterial cultures but autoclaved, were incubated in parallel. All plates were examined once daily with the naked eye and with optical microscopy (at a total magnification of 100) to detect any possible precipitates formed. The pH was measured at the end of the experiment using pH-indicator paper (Merck) applied directly on the cultura medium surface. To recover the precipitate formed, a needle was used for the largest crystals, and the small ones were recovered by melting the solid medium in a microwave oven (600 W for 50 s). After this, crystals were washed with distilled water to eliminate culture médium remains and cell debris. These experiments were replicated three times.

Precipitate composition and morphologies were studied by SEM (LEO Carl Zeiss GEMINI-1530), coupled with energy-dispersive X-ray (EDX) microanalysis (QX, 2000 Link, at 20 kV) on carbon-coated samples. Precipitate mineralogy was determined by X-ray diffraction (XRD) using a Bruker D8 Advance diffractometer. Scans were run from 3° to 80° 2θ and an internal standard (metallic silicon) was added to selected samples for a precise mineral identification. Diffractogram interpretations were made using X-powder software (<http://www.xpowder.com>, Martín-Ramos, 2004). This software uses least-square methods to refine the unit-cell parameters of crystalline phases to determine the exact term of any isomorphic mineral series.

4.3. Results

4.3.1. MAH1 bacterial strain characterization

This novel strain was found to be Gram-negative, chemo-organotrophic, and aerobic. It requires NaCl (0.7–20 %, optimum 2 %, thus it is a moderately halophilic or halotolerant bacterium) and grows over a range of temperatures (2–43 °C, optimum between 28 and 37 °C). Colonies of MAH1 after incubation for 48 h on MM and MA were translucent beige to yellow, 2 mm in diameter, circular, low convex, smooth, shiny, entire and mucoid. When it was cultivated in the liquid medium MB for at least one week, an abundant production of an extracellular polymeric substance (EPS) was detected (the other three bacteria used in this work also produced EPS and more or less mucoid colonies in MB and MM media, respectively).

Electron microscopy revealed that cells had a slightly curved rod shape (0.3–0.5 µm in diameter and 0.6–2 µm in long; Figure 4.1A and 4.1C) and that they were motile by a single polar flagellum (Figure 4.1A). They were visible either singly or in pairs, often forming cell aggregates (Figure 4.1 A and 4.1C).

The strain MAH1 displayed a DNA base composition in G + C of the 48.2 mol%. The similarity of the 16S rDNA sequence and of the DNA–DNA hybridization with respect to *I. loihiensis* (DSM 15497) was 100 % and 96.1 %, respectively. Polar lipids were predominantly odd-numbered and iso-branched (15 and 17). All these results clearly indicate that this strain belongs to the species *I. loihiensis* (Donachie *et al.*, 2003). The main differences between the species type (DSM 15497) and MAH1 strains are given in Table 4.1, which supports the description of MAH1 as a novel strain. The phylogenetic tree resulting from neighbour-joining is shown in Figure 4.2.

4.3.2. Mineral precipitate production

Light microscopy (at a total magnification of 100) revealed that the investigated strains precipitated some crystals in the bacterial colonies after 3–4 days of incubation with typical polyhedral or pseudo-polyhedral struvite (NH₄MgPO₄·6H₂O) morphology (Figure 4.1D). Following 7–10 days of culture

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

growth, small spheres and dumbbells were also detectable, these gradually covering the struvite crystals and increasing in abundance in the bacterial colonies. After two weeks the crystal precipitates were visible with the naked eye. These precipitates were not detected in any of the controls. The pH values of the plates inoculated with the *Idiomarina* bacteria after 30 days of the incubation was 9.0–9.3 while it was constant (7.6) in the controls.

Crystal composition and morphology were determined by EDX microanalytical data and SEM observations, respectively. These observations revealed that struvite crystals were encased by small spheres and dumbbells of Mg-rich carbonate (Figure 4.1D and 4.1G), which were also regularly distributed throughout the bacterial colonies (Figure 4.1E and 4.1F). Carbonate spheres and dumbbells appeared to start crystallizing as porous textures that evolved into smooth surfaces (Figure 4.1E and 4.1F). Dumbbells seemed to be initial morphologies that would evolve into perfect spheres (Figure 4.1E and 4.1F).

X-ray diffraction was performed for crystalline phase identification. This was done using X-powder software (Martín-Ramos, 2004) and refining the unit-cell parameters. *I. abyssalis* precipitated struvite, monohydrocalcite and Ca–Mg kutnahorite in proportions around 45 %, 15 % and 40 %, respectively. *I. baltica* precipitated Ca–Mg kutnahorite as the most abundant mineral phase, 75 %, with lesser proportions of struvite, 25 %. For *I. loihiensis*, struvite and Ca–Mg kutnahorite were also the minerals precipitated at a proportion of around 50 % each. The novel strain MAH1 precipitated abundant struvite, up to 80 % and lesser proportions of Ca–Mg kutnahorite. Despite the different proportions found in the cultures, all the strains precipitated Ca–Mg kutnahorite (Figure 4.1H).

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

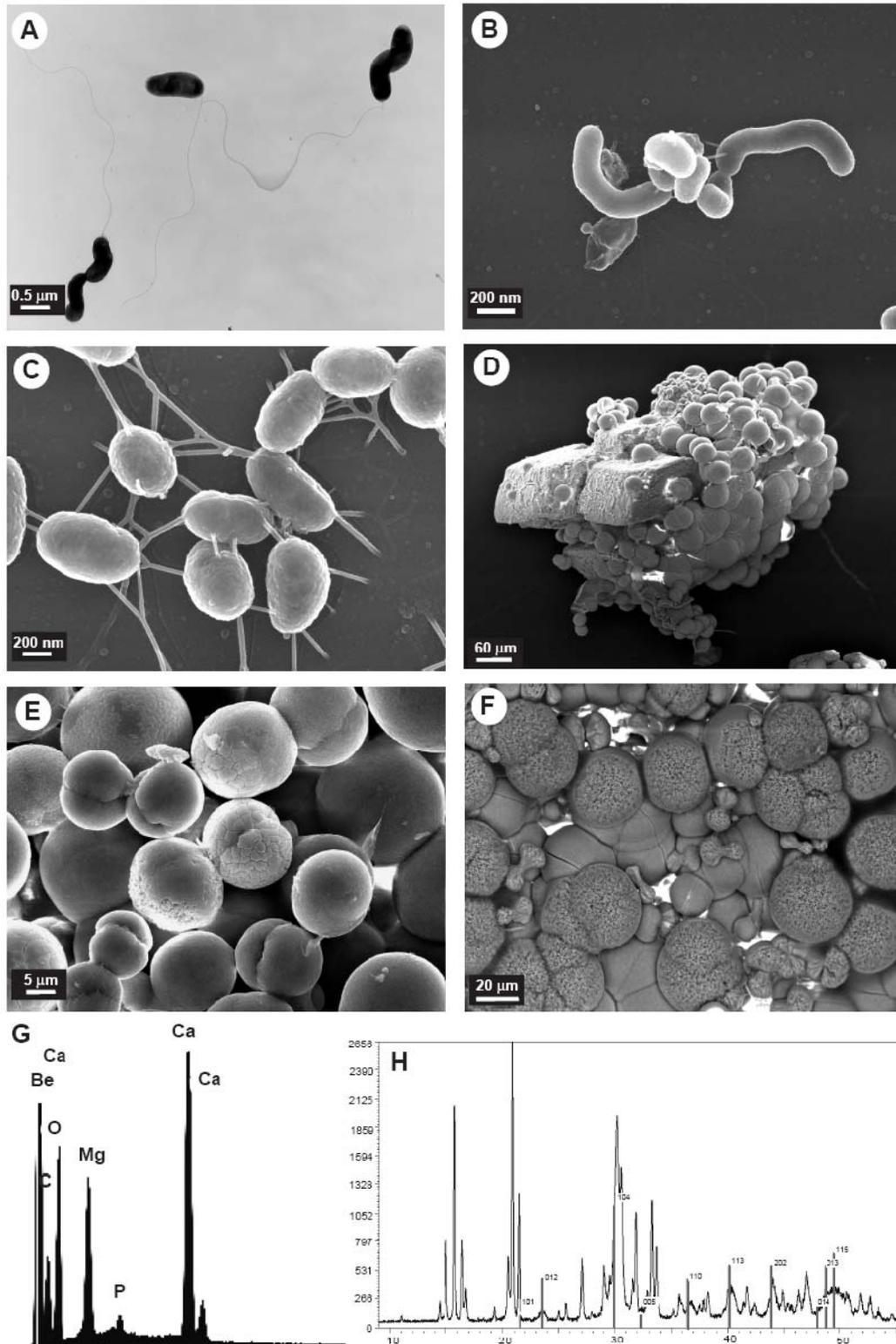


Figure 4.1. Bacterial cells of *Idiomarina loihiensis* MAH1 and crystals produced: (A) TEM micrograph of negatively stained cells. (B and C) SEM micrographs of carbon-coated cells. (D) Struvite crystal encased by kutnahorite spherules. (E) SEM micrograph showing morphologies and texture of kutnahorite. (F) Backscattered image of kutnahorite spheres and dumbbells also showing internal textures. (G) SEM–EDX microanalysis of kutnahorite crystals. (H) Representative X-ray diffractogram (intensity vs. 2θ of precipitates produced by *I. loihiensis* DSM 15497; s and k: struvite and Ca–Mg kutnahorite peaks, respectively).

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by *Idiomarina* strains at modern seawater salinities

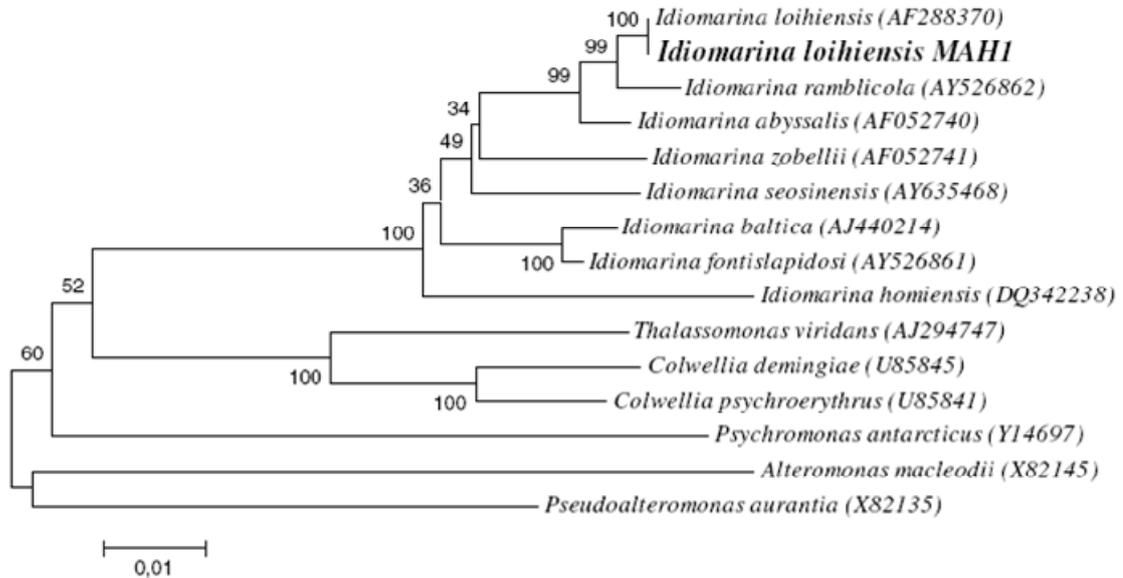


Figure 4.2. Phylogenetic tree deriving from a neighbour-joining analysis of the 16S rDNA gene sequences of the *Idiomarina* species and other species belonging to related genera of c-Proteobacteria. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

Characteristic	<i>I. loihiensis</i> MAH1	<i>I. loihiensis</i> (DSM 15497) ^a
G + C content (mol%)	48.2	47.4
NaCl range (% w/v)	0.7-20	0.5-20
NaCl optimun (% w/v)	2-6	7.5-10
Temperature range (°C)	2-43	4-46
Biolog GN2		
Glycogen	-	+
Acetic acid	+/-	+
Cis-Aconitic acid	-	+
Citric acid	-	+
D-L-Lactic acid	-	+
Malonic acid	-	+
Succinic acid	+/-	-
L-Alanine	+/-	+
L-Alanyl-glycine	+/-	-
Glycerol	-	+
L-Alaninamide	+	-
L-Ornithine	+/-	-
Fatty acid		
C_{11:0} iso	1.7	2
C_{13:0} iso	1.5	1.8
C_{15:0} iso	29	32.6
C_{17:0} iso	12.6	11

^a Data from Donachie *et al.* (2003).

Table 4.1. Selected phenotypic characteristics for the differentiation of *Idiomarina loihiensis* MAH1 strain nov. (Westernmost Mediterranean Sea surface) from type strain *I. loihiensis* DSM 15497 (Hydrothermal vent, Hawaii).

4.4. Discussion

As the scope of this work was to investigate the Mg-rich carbonate production by marine bacteria at seawater salinity, seawater samples were used to isolate marine bacteria. In order to explore the biomineralization potential of the marine strains at such salinity, the MM medium was prepared. Among the numerous bacteria growing in this medium, the strain MAH1 was selected and further identified because of its Mg-rich carbonate production capability. Since this novel strain was identified as *I. loihiensis*, other *Idiomarina* strains from bacterial culture collections were also cultivated in the same medium to assay the Mg-rich carbonate production. These strains, as indicated in Section 4.2.1, are representatives from diverse marine habitats.

4.4.1. Mineral precipitation by *Idiomarina* strains

According to our results, the four strains assayed produced Ca–Mg kutnahorite and struvite at seawater salinity conditions. All precipitated minerals appeared to be related to the microbial growth and were observed within the bacterial colonies. Consequently, production of these minerals can be considered biologically induced as defined by Lowenstam and Weiner (1989). Bacteria play both an active and a passive role in mineral precipitation by increasing alkalinity in the microenvironments and by providing abundant reactive sites in the EPS, cell walls and external sheaths of bacterial cells that bind dissolved mineral-forming elements. Crystals may then nucleate and grow from an oversaturated solution on the outside surface of individual cells (Wright and Oren, 2005 and references herein). The EPS matrix represents an extension for the microbial cell and functions as a chelator for cations and it can also be the template for crystal nucleation (Dupraz and Visscher, 2005).

Regarding bacterially induced carbonate precipitation, it may occur as a consequence of the bacterial presence and as a by-product of microbial metabolic processes (e.g., Knorre and Krumbein, 2000; Ben Chekroun *et al.*, 2004). Among others, two factors, that are controlled by microbial processes and physicochemical characteristics, govern precipitation: saturation index, determined by the pH, $[Ca^{2+}]$ and $[CO_3^{2-}]$, and the exopolymeric substances (Dupraz and Visscher, 2005). Subsequently, many types of bacteria may thus

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

enable such precipitation when growing in adequate media (Boquet *et al.*, 1973). In the particular case of the *Idiomarina* strains cultivated in MM medium, with amino acids and peptides (as source of carbon, nitrogen, and energy), amino acid metabolism resulted in a release of ammonia and CO₂, increasing pH and, therefore, CO_{3(aq)}²⁻ concentration. When a sufficient supersaturation with respect to a particular calcium carbonate phase is reached, the precipitation of such a phase is induced. On the other hand, it has also been suggested that specific attributes of certain bacteria promote calcium carbonate formation (Hammes *et al.*, 2003 and references herein). Precipitation of carbonates may thus be related to heterogeneous nucleation on negatively charged bacterial superficial structures. These functional groups are able to attract positive ions such as Ca²⁺, as in vitro studies have shown (e.g., Beveridge *et al.*, 1983; Thompson and Ferris, 1990). The “organic matrix-mediated biomineralization” model attempts to explain this type of nucleation (Mann, 2001). The nature of the organic matrix determines which ion is preferentially adsorbed and, consequently, which mineral phase is formed. Bacterial carbonate precipitation could therefore be strain specific. For instance, bacteria that preferentially adsorb Mg²⁺ onto their membranes induce dolomite formation, whereas calcite precipitation is induced by preferential adsorption of Ca²⁺ (Van Lith *et al.*, 2003). In this sense, a significant characteristic of the *Idiomarina* genus is its unique high content in oddiso-branched fatty acids, suggesting that this particular membrane characteristic would induce Ca–Mg kutnahorite production. In fact, this production is not related to the medium composition since other bacteria also cultivated in the MM medium did not produce this mineral. On the other hand, the role of the EPS in the carbonate precipitation and resulting morphologies has been demonstrated by several authors (e.g., Dupraz and Visscher, 2005; Braissant *et al.*, 2007; Ercole *et al.*, 2007). Subsequently, a potential EPS influence in kutnahorite production can be suggested.

Regarding sphere and dumbbell morphologies of Ca–Mg kutnahorite and monohydrocalcite precipitates, these are common to other biogenic carbonates (e.g., González-Muñoz *et al.*, 2000; Braissant *et al.*, 2003; Sánchez-Román *et al.*, 2007). Habit and morphologies of bacterial precipitates are influenced by

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

viscosity of medium (Buczynski and Chafetz, 1991). In fact, in a gellified culture médium that contains calcium and magnesium, the counter diffusion of microbial metabolites and cations contained in the culture medium produces spatial-temporal gradients of concentration that create supersaturation conditions with significant implications in the development of the morphology of the precipitates (González-Muñoz *et al.*, 2000). Buczynski and Chafetz (1991) proposed that carbonate spherules are the final stage of dumbbell growth, and Ben Chekroun *et al.* (2004) also demonstrated that vaterite spheres are the final growth stage of dumbbell fibrous-radiated aggregates.

Concerning the phosphate phase also originated in the cultures, struvite, it rarely occurs in nature but is a common product of bacterial precipitation. Robinson (1889) was the first to report the bacterial production of struvite that could be the consequence of the combination of ammonium ions produced by the metabolism of nitrogenous compound with phosphate and magnesium present in the environment. In a recent study, Sánchez-Román *et al.* (2007) have investigated the struvite production by moderately halophilic bacteria, and reported that these bacteria, belonging to 19 species from three genera, precipitated both struvite and carbonate minerals. They suggest that the moderately halophilic bacteria are more adapted for the struvite precipitation than other nonhalophilic ones. In this sense, struvite precipitation by *Idiomarina* strains confirms that seawater salinities are also suitable for struvite bacterial production, which is of special interest for investigation of conditions leading to struvite formation. Although further work is required concerning this point, obtained results suggest that bacterial metabolism provide the necessary NH_3 and CO_2 required for supersaturation and crystal precipitation. At later stages of bacterial growth, saturation index for carbonate precipitation is reached. Initial precipitation of struvite may be related to the inhibitory effect of PO_4^{3-} on the calcite precipitation (Rivadeneira *et al.*, 1985). Thus, consumption of this ion will contribute to carbonate precipitation following that of struvite.

4.4.2. Natural environments and implications of kutnahorite production

As the obtained Ca–Mg kutnahorite is a mineral with a dolomite-type ordered structure, its precipitation at seawater salinity adds interest concerning

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

the “dolomite problem”. This has been a controversial issue for over a century since it revealed to be of capital importance in past and present biogeochemical processes (e.g., Vasconcelos *et al.*, 1995; Burns *et al.*, 2000; Van Lith *et al.*, 2003; Wright and Wacey, 2004, 2005; Wright and Oren, 2005; Altermann *et al.*, 2006). It has been demonstrated that sulphate-reducing bacteria promote dolomite precipitation under anoxic conditions (e.g., Van Lith *et al.*, 2003; Vasconcelos *et al.*, 1995, 2006), and also that aerobic respiration has been related to dolomite production at the water–sediment interface (Sánchez-Román, 2007). However, most of the Mg-rich carbonate (dolomite, Mg-calcite, Ca–Mg kutnahorite) precipitation experiments to date have dealt with hypersaline environments. In this regard, the precipitation of Ca–Mg kutnahorite by the investigated *Idiomarina* strains strengthens the hypothesis that the precipitation of a carbonate with a dolomite-type-ordered structure may also occur in marine environments at standard salinity. Precipitation of “ordinary” kutnahorite (a Mn-rich carbonate) is unlikely due to Mn concentration in seawater. However, further investigation with Mn-rich media could shed light on bacterial precipitation of this mineral phase. All the results found open an exciting field in which carbonate production in natural environments can be further explored and better understood.

Ca–Mg kutnahorite precipitation within laboratory cultures has been previously reported by Rivadeneyra *et al.* (2006) using *Chromohalobacter marismortui*. As mentioned for experiments in Mg-rich carbonate production, mineral production and optimum bacterial growth occurred at high salinities. Although excess salt is relatively common in natural environments, seawater is the most widespread natural environment and it is therefore of extreme interest to demonstrate that these bacteria can induce Mg-rich carbonate precipitation. Many more bacterial groups and respective metabolism processes should be investigated in order to achieve a complete view of microbial carbonate precipitation in natural environments.

4.5. References

- Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A., Wright, D.T. (2006). "Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history". *Geobiology*, 4, 147–166.
- Ben Chekroun, K., Rodríguez-Navarro, C., González-Muñoz, M.T., Arias, J.M., Cultrone, G., Rodríguez-Gallego, M. (2004). "Precipitation and growth morphology of calcium carbonate induced by *Myxococcus xanthus*: implications for recognitions of bacterial carbonates". *Journal of Sediment Research*, 74, 868–876.
- Beveridge, T.J., Meloche, J.D., Fyfe, W.S., Murray, R.G.E. (1983). "Diagenesis of metals chemically complexed to bacteria: laboratory formation of metal phosphates, sulfides and organic condensates in artificial sediments". *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1094–1108.
- Boquet, E., Boronat, A., Ramos-Cormenzana, A. (1973). "Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a common phenomenon". *Nature*, 246, 527–529.
- Braissant, O., Cailleau, G., Dupraz, C., Verrechia, A.P.J. (2003). "Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environment: the role of exopolysaccharides and amino acids". *Journal of Sediment Research*, 73, 485–490.
- Braissant, O., Decho, A.W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K.M., Visscher, P.T. (2007). "Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals". *Geobiology*, 5, 401–411.
- Brettar, I., Christen, R., Hoffle, M.G. (2003). "*Idiomarina baltica* sp. nov., a marine bacterium with a high optimum growth temperature isolated from surface water of the central Baltic Sea". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 407–413.
- Buczynski, C., Chafetz, H.S. (1991). "Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy". *Journal of Sedimentary Petrology*, 61, 226–233.

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

- Burns, S.J., McKenzie, J.A., Vasconcelos, C. (2000). "Dolomite formation and biogeochemical cycles in the Phanerozoic". *Sedimentology*, 47, 49–61.
- Choi, D.H., Cho, B.C., 2005. *Idiomarina seosinensis* sp nov., isolated from hypersaline water of a solar saltern in Korea". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 379–383.
- Donachie, S.P., Hou, S., Gregory, T.S., Malahoff, A., Alam, M. (2003). "*Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic γ -*Proteobacterium* from the Lo'ihi submarine volcano, Hawaii". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1873–1879.
- Dupraz, C., Visscher, P.T. (2005). "Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats". *Trends in Microbiology*, 13, 429–438.
- Ercole, C., Cacchio, P., Botta, A.L., Centi, V., Lepidi, A. (2007). "Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: the role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides". *Microscopy and Microanalysis*, 13, 42–50.
- Goldsmith, J.R. (1983). "Phase relations of rhombohedral carbonates". In: *Carbonates: Mineralogy and Chemistry*, Rev. Mineral., vol. 11 (Ed. Reeder, R.J), Mineralogical Society of America, Washington, DC, 145–190.
- González-Muñoz, M.T., Ben Chekroun, K., Ben Aboud, A., Arias, J.M., Rodríguez-Gallego, M. (2000). "Bacterially induced Mg-calcite formation. Role of Mg²⁺ in development of crystal morphology". *Journal of Sediment Research*, 70, 559–564.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S.D. (2003). "Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation". *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4901–4909.
- Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Chun, J., Matte, M.H., Matte, G.R., Mikhailov, V.V., Svetashev, V.I., Huq, A., Mangel, T., Colwell, V. (2000). *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. Nov". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 901–907.

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

- Knorre, H., Krumbein, W.E. (2000). "Bacterial calcification". In: *Microbial Sediments* (Ed. Riding, R.E., Awramik, S.M), Springer, Berlin, 25–31.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004). "MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment". *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150–163.
- Kwon, S.W., Kim, B.Y., Weon, H.Y., Baek, Y.K., Koo, B.S., Go, S.J. (2006). "*Idiomarina homiensis* sp. nov., isolated from seashore sand in Korea". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2229–2233.
- Lowenstam, H.A., Weiner, S. (1989). "Biomineralization processes". In: *On Biomineralization* (Ed. Lowenstam, H.A., Weiner, S.), Oxford University Press, New York, 25–49.
- Mann, S. (2001). "Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry". Oxford University Press, Oxford.
- Martín-Ramos, J.D. (2004). "Using Xpovder – a software package for powder X-ray diffraction analysis". D.L. GR-1001/04, Spain, 105 p, ISBN: 84-609-1497-6. <http://www.xpowder.com>.
- Martínez-Cánovas, M.J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Páez, R., Quesada, E. (2004). "*Idiomarina fontislapidosi* sp nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1793–1797.
- Mata, J.A., Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Béjar, V. (2002). "Adetailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species". *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 360–375.
- Mucci, A. (2004). "The behavior of mixed Ca–Mn carbonates in water and seawater: controls of manganese concentrations in marine porewaters". *Aquatic Geochemistry*, 10, 139–169.
- Peacor, D.R., Essene, E.J., Gaines, A.M. (1987). "Petrologic and crystalchemical implications of cation order-disorder in kutnahorite [CaMn(CO₃)₂]. *American Mineralogist*, 72, 319–328.

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

- Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., Salmerón, V., Ramos-Cormenzana, A. (1985). "Bacterial precipitation of calcium carbonate in presence of phosphate". *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 171–172.
- Rivadeneira, M.A., Martín-Algarra, A., Sánchez-Navas, A., Martín- Ramos, J.D. (2006). "Carbonate and phosphate precipitation by *Chromohalobacter marismortui*". *Geomicrobiology Journal*, 23, 1–13.
- Robinson, H. (1889). "On the formation of struvite by microorganisms". *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 6, 360–362.
- Sánchez-Román, M. (2007). "Calibration of microbial and geochemical signals related to dolomite formation by moderately halophilic aerobic bacteria: significance and implication of dolomite in the geological record". Ph.D. Thesis ETH No. 16875, Switzerland.
- Sánchez-Román, M., Rivadeneira, M.A., Vasconcelos, C., McKenzie, J.A. (2007). "Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria". *FEMS Microbiology Ecology*, 61, 273–284.
- Thompson, J.B., Ferris, F.G. (1990). "Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water". *Geology*, 18, 885–998.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). "The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acid Research*, 25, 4876–4882.
- Van Lith, Y., Warthmann, R., Vasconcelos, C., McKenzie, J.A. (2003). "Microbial fossilization in carbonate sediments: a result of the bacterial surface involvement in dolomite precipitation". *Sedimentology*, 50, 237–245.
- Vasconcelos, C., McKenzie, J.A., Bernasconi, S., Grujic, D., Tien, A.J. (1995). "Microbial mediation as a possible mechanism for natural dolomite formation at low temperatures". *Nature*, 377, 220–222.
- Vasconcelos, C., Warthmann, R., McKenzie, J.A., Visscher, P.T., Bittermann, A., Van Lith, Y. (2006). "Lithifying microbial mats in Lagoa Vermelha, Brazil: modern precambrian relics?". *Sedimentary Geology*, 185, 175–183.

Ca–Mg kutnahorite and struvite production by Idiomarina strains at modern seawater salinities

- Wright, D.T., Oren, A. (2005). "Nonphotosynthetic bacteria and the formation of carbonates and evaporites through time". *Geomicrobiology Journal*, 22, 27–53.
- Wright, D.T., Wacey, D. (2004). "Sedimentary dolomite – a reality check". In: *The Geometry and Petrogenesis of Dolomite Hydrocarbon Reservoirs* (Ed. Braithwaite, C.J.R., Rizzi, G., Darke, G.), Special Publication 235. Geological Society, London, 65–74.
- Wright, D.T., Wacey, D. (2005). "Precipitation of dolomite using sulphatereducing bacteria from the Coorong Region, South Australia: significance and implications". *Sedimentology*, 52, 987–1008.

***Capítulo 5. Estudios sobre la
interacción del uranio con
Idiomarina loihiensis MAH1***

5.1. Introducción

Durante las últimas décadas, los niveles de metales pesados y radionucléidos, incluyendo uranio, se han visto incrementados en la naturaleza debido, en gran medida, a actividades humanas como la minería, acuicultura e industria nuclear (Mendiguchia *et al.*, 2006; Courrat *et al.*, 2009). En el caso del mar Mediterráneo, estos radionucléidos entran por deposición a través de la atmosfera (debido sobre todo a pruebas nucleares llevadas a cabo, principalmente, en los años 50 y 60, y accidentes como el de Chernobyl en 1986), el transporte de materiales radiactivos y la circulación de submarinos nucleares (Periañez, 2006; Garcia-Orellana *et al.*, 2009). Papucci *et al.* (1996) estimaron que la deposición en el mar Mediterraneo a lo largo de 40 años (1956-1996) fue de 12 PBq y 0,12 PBq de ^{137}Cs y $^{239,240}\text{Pu}$, respectivamente, debido, principalmente, a la realización de pruebas nucleares.

La contaminación de suelos y de medios acuáticos (ríos, aguas subterráneas y océanos) por estos elementos conlleva un riesgo para la salud humana (Moore, 1990; Ewan & Pamphlett, 1996; Malik, 2004; Poggio *et al.*, 2009). Por este motivo se ha originado un incremento en la búsqueda de nuevas tecnologías que puedan prevenir la acumulación de estos contaminantes en el medioambiente y remediar zonas ya contaminadas. Hoy día estas tecnologías se basan en la utilización de: I) ósmosis inversa, II) electrodiálisis, III) resinas de intercambio iónico, IV) precipitación química, V) biosorción* y bioacumulación (Zhao *et al.*, 1999; Ahalya *et al.*, 2003; Gadd, 2009). De todas ellas, los procesos de biosorción y bioacumulación, a diferencia de los métodos físicos y químicos, tienen la ventaja de ser económicamente más baratos, ya que la inversión en energía y logística es mucho menor. Además, existen numerosos materiales fáciles de obtener que pueden ser utilizados en estos procesos (biomasa de algas, hongos y bacterias, desechos orgánicos industriales, etc.) (Choi *et al.*, 2009).

Muchos de los estudios sobre interacciones de metales pesados con microorganismos se han llevado a cabo con biomasa de algas debido, en parte, a su estructura macroscópica, que es muy conveniente para la producción de partículas destinadas a la biosorción, además de ser un material de fácil

producción, y barato, y porque se ha demostrado que tiene una alta capacidad de biosorción (Sandau *et al.*, 1996; Vieira and Volesky, 2000; Vijayaraghavan *et al.*, 2004; Basha *et al.*, 2008). Otros materiales utilizados han sido la cáscara de cacahuete, el exoesqueleto de cangrejos, desechos industriales como diferentes tipos de lodos, productos de la agricultura y biomasa microbiana (de microorganismos viables y no viables) (Park *et al.*, 2007; Dahiya *et al.*, 2008). En relación a los microorganismos, los estudios se han centrado en bacterias aisladas de sitios contaminados (tanto suelos como aguas naturales), lodos de minas y hábitats extremos, debido a la resistencia adquirida por los microorganismos presentes en estos hábitats a algunos metales pesados (Suzuki & Banfield, 2004; Pollmann *et al.*, 2006; Haferburg & Kothe, 2007). Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios sobre sorción de metales pesados (Iyer *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008) y, más específicamente, sobre sorción de uranio (Acharya *et al.*, 2009) por bacterias aisladas de ambientes naturales no contaminados.

En este sentido, los objetivos de este trabajo son dos, en primer lugar estudiar los mecanismos de interacción de uranio con *Idiomarina loihiensis* MAH1 usando una metodología multidisciplinar, combinando métodos de tolerancia, química húmeda (cinética e isothermas de sorción), métodos espectroscópicos y microscópicos y, en segundo lugar, determinar el papel de esta bacteria marina en los procesos geomicrobianos (Ej. biomineralización de uranio) ocurridos en ambientes marinos mediante el uso de métodos de especiación química tanto espectroscópicos como microscópicos.

Los métodos espectroscópicos empleados abarcaran XAS (del inglés “X-ray Absorption Spectroscopy”, espectroscopia de absorción de rayos X) que comprendería EXAFS (del inglés “Extended X-ray Absorption Fine Structure”, espectroscopia de absorción de estructura fina de rayos X) y XANES (del inglés “X-ray Absorption Near Edge Structure”, absorción de rayos X cerca de la estructura de borde) y TRLFS (del inglés “Time-Resolved Laser-induced Fluorescence Spectroscopy”, espectroscopia de fluorescencia inducida por láser en tiempo resuelto). En cuanto a los métodos microscópicos se incluye TEM (del inglés “Transmission Electron Microscopy”, microscopia electrónica de

transmisión) y HREM (del inglés “High Resolution transmission Electron Microscopy” microscopía electrónica de transmisión de alta resolución) acoplado a un sistema de EDX (del inglés “Energy dispersive X-ray”, energía dispersiva de rayos X).

Idiogramina loihiensis MAH1 (González-Muñoz *et al.*, 2008) es una bacteria perteneciente a nuestra colección de cultivos aislada del Mar de Alborán (zona occidental del mar Mediterráneo) que destaca, entre otras características, por su alta tolerancia a los cambios de concentración de NaCl y por su gran producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, del inglés “Extracellular Polymeric Substance”). Esta última característica la convierte en un buen candidato para nuestros estudios, ya que el EPS microbiano puede estar formado por una amplia variedad de sustancias (carbohidratos, proteínas, ácido urónico, etc.) (Comte *et al.*, 2006) que confieren una gran capacidad de unión a metales y otras partículas con carga (Quigley *et al.*, 2002; Bhaskar & Bhosle, 2006).

5.2. Material y métodos

5.2.1. Microorganismo

Para la realización de este trabajo se ha utilizado la bacteria *Idiomarina loihiensis* MAH1 perteneciente a nuestra colección de cultivos y originaria del Mar de Alborán. Además, para el estudio de la tolerancia al uranio, se utilizaron bacterias cercanas filogenéticamente: *I. loihiensis* L2TR (DSMZ 15497), *I. baltica* OS145 (DSMZ 15154) e *I. abyssalis* KMM227 (ATCC BAA-312).

5.2.2. Medios de cultivo y soluciones empleadas

- **Medio para el crecimiento y mantenimiento de las cepas**

Para el mantenimiento de las cepas y para la obtención de biomasa se utilizó el medio comercial “Marine Broth” (DIFCO). Su composición se describe a continuación:

Medio “Marine Broth” (MB y MBs ¹)			
Peptona	5 g	NaHCO ₃	0,16 g
Extracto de levadura	1 g	KBr	0,08 g
C ₆ H ₅ O ₇ Fe	0,1 g	SrCl ₂	34 mg
NaCl	19,4 g	H ₃ BO ₃	22 mg
MgCl ₂	5,9 g	Na ₂ SiO ₃	4 mg
Na ₂ SO ₄	3,24 g	NaF	2,4 mg
CaCl ₂	1,8 g	NH ₄ NO ₃	1,6 mg
KCl	0,55 g	Na ₂ HPO ₄	8 mg
Agar ¹	20 g	Agua destilada	1000 ml

MBs: Variante solida del medio MB

- **Solución madre de uranio**

Se preparó una solución 1 M de nitrato de uranilo [UO₂(NO₃)₂ · 6H₂O] disolviendo la cantidad correspondiente de nitrato de uranio en una solución de perclorato sódico 0,1M (NaClO₄ · H₂O) a pH 4. Posteriormente esta solución se esterilizó mediante filtración (filtros millipore de 0,45 µm de poro) y conservó a 4 °C. A partir de esta solución, se prepararon soluciones a diferentes concentraciones y pHs para la realización de los diferentes experimentos.

- **Medio para el estudio de la tolerancia al uranio**

El medio utilizado, para la determinación de la tolerancia al uranio, fue un medio bajo en fosfatos que denominamos LBT:

Medio LBT	
Triptona	2 g
Solución de sales	10 ml
Agar	2 g
Agua destilada	100 ml

La solución de sales se preparó según lo descrito por Rodríguez-Valera *et al.* (1981).

Solución de sales	
NaCl	51,3 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	9 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	13 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2 g
KCl	1,3 g
NaCO ₃ H	0,05 g
NaBr	0,15 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,7 ml
Agua destilada	1000 ml

El FeCl₃ · 6H₂O se preparó como una solución al 0,5 % p/v en agua destilada para posteriormente añadir 0,7 ml a la solución de sales. Esta solución se esterilizó mediante filtración (filtro de 0,45 µm de diámetro de poro)

Una vez preparado y esterilizado el medio (121 °C, 15 min), se le adicionó la solución de nitrato de uranio. Las concentraciones utilizadas para este estudio fueron las siguientes: 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 4 mM y 8 mM.

5.2.3. Preparación de la biomasa para los diferentes experimentos

Para la obtención de biomasa, se cultivaron las bacterias en matraces con medio MB, en agitación a 28 °C durante 24 horas. Posteriormente la bacteria se recogió por centrifugación (12000 rpm, 20 min) y el pellet obtenido

se lavó dos veces con perclorato sódico 0,1 M para retirar los restos de medio de cultivo (excepto para el estudio de la tolerancia al uranio que se lavó con una solución de NaCl al 1 %). Finalmente el pellet se resuspendió en la misma solución de lavado ajustando la densidad óptica a 0,530 aproximadamente ($\lambda = 620$ nm).

5.2.4. Determinación del peso seco

Aunque todos los experimentos de contacto bacteria/uranio se llevaron a cabo utilizando biomasa húmeda, se necesitó determinar el peso seco para poder calcular posteriormente la cantidad de uranio fijado por gramo de biomasa seca y para poder ajustar los datos experimentales obtenidos a los diferentes modelos matemáticos.

Para determinar el peso seco, una vez preparada la suspensión bacteriana según el apartado 5.2.3, se distribuyó en tubos a razón de 25 ml y se centrifugó (8000 rpm, 10 min). El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de solución salina (NaCl 0,9 %) y se transfirió a tubos eppendorf (previamente secados y pesados). Se volvió a obtener la biomasa por centrifugación (10000 rpm, 10 min) y se secó en una estufa a 70 °C. Pasadas 24 horas se pesó en una balanza de precisión Sartorius LA 120S. A la densidad óptica ajustada, a 25 ml del cultivo corresponden 6,5 mg de biomasa seca.

5.2.5. Estudio de la tolerancia al uranio

La tolerancia al uranio se estudió mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del uranio. La CMI se define como la concentración mas baja del metal que inhibe el crecimiento del microorganismo y la formación de colonias (Rossbach *et al.*, 2000). Para ello, placas con medio LBT y preparadas a las concentraciones deseadas de uranio (por triplicado) se dividieron en 4 sectores. Cada sector se inoculó con 2 μ l de la suspensión de cada bacteria ensayada, preparadas según el apartado 5.2.3. Las placas se incubaron a 28 °C y se revisaron periódicamente durante dos semanas.

5.2.6. Cinética de sorción del uranio

A partir de la solución madre de nitrato de uranilo 1 M se preparó una solución de contacto a una concentración de 0,5 mM en perclorato sódico 0,1 M y pH 4,3. Aproximadamente 6,5 mg de biomasa seca se recogieron por centrifugación (8000 rpm, 10 min) y se resuspendieron en 10 ml de la solución de contacto. Se realizaron 3 replicas por cada tiempo de contacto ensayado (5, 10, 20, 30, 60 min, 24, 48 y 72 h) que se incubaron a 28 °C en agitación.

Tras el periodo de contacto, se centrifugó y se tomó del sobrenadante 1 ml para determinar la cantidad de uranio presente mediante Espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS, del inglés “Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry”). La cantidad de metal fijado por gramo de biomasa seca se determinó mediante un balance de masa del metal según la ecuación (Volesky 1990):

$$(1) q = \frac{V (C_i - C_f)}{m}$$

Donde q son los mg de uranio fijados por gramo de biomasa seca, V es el volumen de la muestra en litros, C_i y C_f son las concentraciones inicial y final del metal en la solución (mgL^{-1}) y m la cantidad de biomasa seca (g). Este mismo proceso se utilizó para realizar la cinética de sorción a pH 2 y 3.

5.2.7. Isotermas de sorción del uranio

Para la realización de las isotermas de sorción, se prepararon soluciones de trabajo a 3 pHs diferentes (2, 3 y 4,3) y a seis concentraciones para cada pH (0,015; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25 y 0,5 mM). El proceso fue similar al descrito en el apartado anterior, el tiempo de contacto fue de 48 horas y, al igual que con el tiempo para la determinación de la cinética, se prepararon 3 réplicas por tratamiento. Por último, tras determinar la cantidad de uranio fijado mediante la ecuación anteriormente descrita, se procedió al análisis de los datos obtenidos mediante el uso de los modelos matemáticos de Langmuir (1918) (2), Freundlich (1906) (3), Temkin (1940) (4) y Dubinin-Radushkevich (1947) (5), reflejados en las ecuaciones siguientes:

$$(2) q_e = q_{max} \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (3) q_e = K_F C_e^{(1/n)}$$

$$(4) q_e = \frac{RT}{b} \ln (a C_e)$$

$$(5) q_e = q_{max} \exp \left\{ -B \left(RT \ln \left[1 + \frac{1}{C_e} \right] \right)^2 \right\}; \quad \varepsilon = RT \ln \left[1 + \frac{1}{C_e} \right]$$

En las que q_e es la cantidad de metal fijado en el equilibrio, q_{max} la capacidad máxima de sorción de la monocapa saturada, K_L la constante de sorción en el equilibrio (l/mg), K_F una constante relacionada con la capacidad de sorción, C_e la concentración del metal en el equilibrio (mg/l), n una constante relacionada con la intensidad de la sorción, R la constante de los gases (8.314 J/mol^oK), T la temperatura absoluta (°K), b la constante de Temkin (kJ/mol), a la constante de la isoterma de Temkin (l/g), B la constante de la isoterma de Dubinin-Radushkevich y ε el potencial de Polanyi. Para este último modelo también se calculó la energía libre de sorción (E) (kJ/mol) mediante la ecuación (6).

$$(6) E = (2B)^{-0,5}$$

Para determinar si el proceso de sorción fue favorable, no favorable, lineal o irreversible, se estudió el factor de separación (R_L) mediante la siguiente ecuación (7):

$$(7) R_L = \frac{1}{(1 + K_L C_0)}$$

Donde C_0 es la concentración de metal inicial y K_L la constante de sorción en el equilibrio del modelo de Langmuir (Kiran y Kaushik, 2008).

5.2.8. Espectroscopia de absorción de rayos X (XAS)

- **Preparación de las muestras**

Para los análisis por XAS, se recogió por centrifugación (8000 rpm, 10 min) el equivalente a 50 mg de biomasa seca. El pellet se resuspendió en 80 ml de solución de contacto de uranio preparada en perclorato sódico 0,1 mM (0,5 mM, pH 4,3) y se incubó en agitación durante 48 h. Tras las 48 h de contacto, la biomasa se recogió por centrifugación, se lavó con perclorato sódico 0,1 M y

se recogió nuevamente en tubos eppendorf (previamente secados y pesados) para su secado a 70 °C. Por último la biomasa seca se pulverizó en un mortero.

Este mismo proceso se realizó para preparar muestras a pH 2 y 3.

- **Análisis de las muestras por XAS**

Los espectros de absorción de rayos X del sub-nivel L_{III} del uranio se recogieron en la línea de luz, ROBL (Rossendorf beamline), situado en las grandes instalaciones europeas de radiación sincrotrón (ESRF, European Synchrotron Radiation Facility) en Grenoble, Francia, mediante un monocromador de doble cristal Si (111) y espejos de platino para el centrado y eliminación de armónicos superiores. Los datos se recogieron en el modo de fluorescencia mediante un detector de Germanio (Ge) de 13 elementos (Camberra). La energía se calibró midiendo el espectro de transmisión del nivel K de una lámina de itrio (Y) y definiendo el primer punto de inflexión a 17,038 eV. Las oscilaciones de EXAFS se extrajeron de los datos sin tratar, promediados mediante la eliminación del pre-borde, usando un polinomio de primer orden, seguido de la eliminación de la absorción atómica μ_0 por técnicas de ajuste “spline” y normalizados mediante una función “Victoreen”. Se aplicó una corrección de tiempo muerto. La energía de ionización, E_0 , del electrón U L_{III} , se determinó arbitrariamente a 17,185 eV para todos los espectros calculados. Los espectros de EXAFS se analizaron según los procedimientos estándar usando el programa EXAFSPAK (Pickering y George, 1995). Las funciones de fase y de amplitud de difusión teóricas usadas para el análisis de los datos se calcularon usando el programa FEFF8 (Ankudinov *et al.*, 1998) mediante un modelo que contenía fragmento de dos moléculas, meta-autunita y triacetato de uranilo (Merroun *et al.*, 2005).

5.2.9. Espectroscopia de fluorescencia inducida por laser en tiempo resuelto (TRLFS)

- **Preparación de las muestras**

Para los análisis por TRLFS se prepararon muestras disolviendo el uranio en dos tipos de solventes (o soluciones “background”), perclorato sódico

0,1 M y agua de mar. Las muestras se prepararon de manera similar a las muestras para el XAS, aunque para los análisis por TRLFS sólo fueron necesarios 12 mg de biomasa seca y, por tanto, el volumen de suspensión utilizado y de solución del metal fueron menores. Además, cada muestra se analizó en sólido y en líquido.

1. Muestras de uranio en perclorato sódico 0,1 M

Se prepararon soluciones de contacto de nitrato de uranilo 0,5 mM en perclorato sódico 0,1 M a los tres pH mencionados anteriormente. A continuación se obtuvo la cantidad de biomasa necesaria por centrifugación y se resuspendió en las soluciones de contacto. A las 24 horas de contacto, se tomaron muestras de 3 ml, para el análisis de los complejos uranio-*I. loihiensis* MAH1 en suspensión (muestra líquida). Se centrifugaron (8000 rpm, 10 min), se lavaron con perclorato sódico 0,1 M al pH correspondiente, se volvieron a resuspender y se midieron por TRLFS. Tras 48 horas de contacto el resto de las muestras se lavaron y se traspasaron a tubos eppendorf para su secado a 70 °C, y posterior molido y análisis por TRLFS (muestra sólida).

2. Muestras de uranio en agua de mar

En este caso, las soluciones de contacto de nitrato de uranilo (concentraciones de 0,01; 0,05 y 0,1 mM), se prepararon en agua de mar. Al igual que las muestras preparadas en una solución de contacto de perclorato sódico, se tomaron muestras a las 24 horas y a las 48 horas para su análisis por TRLFS.

- **Análisis de las muestras por TRLFS**

Las medidas por espectrometría de fluorescencia inducida por láser en tiempo resuelto se realizaron en la unidad de radioactividad del centro de investigación Dresden-Rossendorf en Dresden (Alemania). Como fuente de excitación se utilizó un haz pulsado de cuarto armónico generado por un láser de neodimio en un cristal de itrio-aluminio-granate (Nd:Yag) (GCR 190, Spectra Physics, Usa). El pulso del láser (velocidad de repetición 20Hz, 5 mJ por pulso) incidía directamente sobre la muestra. Para determinar el espectro de emisión,

la fluorescencia emitida en un determinado ángulo fue recogida por una fibra que propagó la luz a un espectrógrafo (M1235, EG&G, USA) equipado con un dispositivo intensificador de cargas interconectadas (ICCD)

El tiempo de retardo, entre el pulso del láser y el primer espectro ($t=0$), se corrigió mediante un generador externo de retardo, mientras que, para la medida de los espectros de fluorescencia en función del tiempo, se utilizó un generador de retardo interno. El “gate width” de la cámara se programó a 50 μ s mientras que el “step width” del generador de retardo interno se hizo a 10 μ s. La longitud de onda de excitación fue de 266 nm y se recogió el espectro comprendido entre 450 y 600 nm.

Tanto las bandas de emisión, como los tiempos de vida de los complejos de uranio formados por la bacteria se analizaron mediante el programa Origin 8.0 (OriginLab Ltd., USA). Para el primer caso se utilizó el módulo Peakfitting ajustando los picos del espectro a un modelo teórico de función de tipo Gauss. Para el segundo caso, se realizó un análisis de curvas no lineales utilizando ecuaciones de caída exponencial de 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} orden.

5.2.10. Localización celular del uranio fijado por *I. loihiensis* MAH1 microscopia TEM y microscopia HREM acoplada EDX

Las muestras se prepararon utilizando soluciones de contacto preparadas en perclorato sódico 0,1 M (0,5 mM de nitrato de uranilo a pH 4,3; 3 y 2) y en agua de mar (0,5; 0,1; 0,05 y 0,01 mM de nitrato de uranilo). Para ello se desarrolló, en colaboración con el servicio de preparación de muestras biológicas del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, un fijador especial para bacterias marinas cuya composición se detalla a continuación:

Fijador para bacterias marinas	
Glutaraldehido	4 %
Tampón cacodilato	0,2 M
CaCl	0,1 %
Sacarosa	0,4 M

Este fijador tiene la característica de poseer una osmolaridad de 1205 mOsM, siendo muy parecida a la del agua de mar, con lo que su utilización evita el colapso de las células al añadir el fijador. Las muestras una vez fijadas (4 h a 4 °C), se lavaron con tampón cacodilato 0,1 M (3 lavados de 20 min a 4 °C). A continuación, se postfijaron con tetróxido de osmio al 1 % en agua (60 min, 4 °C), se lavaron en agua destilada (3 lavados de 5 min a temperatura ambiente) y se deshidrataron en un gradiente de etanol para su posterior inclusión en resina EMBED 812. Una vez obtenidos los bloques se procedió a la realización de cortes ultrafinos de 50-70 nm de espesor en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S con cuchilla de diamante. Estos cortes se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo según Reynolds (1963) en una atmósfera exenta de CO₂, durante 5 minutos. Por último las muestras se recubrieron con carbón.

Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión C. Zeiss EM 902 y un microscopio electrónico de alta resolución modelo Philips CM 200. Los análisis por EDX se realizaron a 200 kV con un tiempo de exposición de 100 s. Para el estudio de difracción de electrones se utilizó este mismo microscopio, en el modo de difracción, con una cámara de 1000 mm y un tiempo de exposición de 15 a 20 s.

5.2.11. Cálculo de la especiación del uranio en agua de mar

La especiación teórica del uranio, preparado en agua de mar, se estudió mediante el programa Visual Minteq 3.0 (Gustafsson *et al.*, 2009). Los datos que suministrados al programa fueron: Calcio, 412 ppm; magnesio, 1291 ppm; sodio, 10768 ppm; potasio, 399 ppm; cloruro, 19353 ppm; amonio, 0,03 ppm; nitratos, 0,29 ppm; alcalinidad, 141 ppm; sulfatos (SO₄⁻²), 2712 ppm; pH 7,2; temperatura, 25 °C; pe 8,451.

5.3. Resultados

Se estudió la tolerancia al uranio tanto de *Idiomarina loihiensis* MAH1 como de bacterias cercanas filogenéticamente a esta (*I. loihiensis*, *I. báltica* y *I. abyssalis*). Este ensayo se realizó en un medio bajo en fosfatos para evitar la precipitación del uranio en forma de fosfatos de uranio. Los ensayos mostraron que *I. loihiensis* MAH1, al igual que las otras bacterias del mismo género ensayadas, toleró hasta concentraciones de 4 mM de uranio, tal y como se muestra en la Tabla 5.1. Estos resultados de tolerancia fueron comparados con datos bibliográficos de otras bacterias, tanto aisladas de zonas contaminadas por metales pesados, como cercanas filogenéticamente a estas últimas. La tolerancia mostrada por *I. loihiensis* MAH1 no es solamente similar a la de algunas de estas bacterias aisladas de zonas contaminadas, sino que además, en algunos casos, es muy superior, tal y como puede observarse en los valores de tolerancia obtenidos para *Sphingomonas* sp SW 366 y *Microbacterium oxydans* SW 3 (Brottka, 2003). Todos estos resultados pueden verse en la Tabla 5.1.

Bacteria	CMI del uranio (mM)	Referencia
<i>Idiomarina loihiensis</i> MAH1	8	Este trabajo
<i>Idiomarina abyssalis</i>	4	Este trabajo
<i>Idiomarina báltica</i> OS 145	8	Este trabajo
<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR	8	Este trabajo
<i>Microbacterium oxydans</i> SW 3 (1)	4	Kathrin Brottka, 2003
<i>Sphingomonas</i> sp SW 366 (1)	2	Kathrin Brottka, 2003
<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSMZ 5190 (1)	8	Kathrin Brottka, 2003
<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSMZ 7136 (2)	8	Kathrin Brottka, 2003
<i>Pseudomonas migulae</i> CIP105470 (2)	4	Kathrin Brottka, 2003
<i>Micrococcus luteus</i> W-20 (3)	0,05	Haferburg <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces acidiscabies</i> W-12 (3)	0,1	Haferburg <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus</i> Sp. W-28 (3)	0,1	Haferburg <i>et al.</i> , 2007
<i>Microbacterium</i> Sp. S15-M4 (4)	4	Nedelkova <i>et al.</i> , 2007
<i>Microbacterium</i> Sp. S15-M2 (4)	4	Nedelkova <i>et al.</i> , 2007

Tabla 1. CMI del uranio de diferentes especies de *Idiomarina* y de otras bacterias. (1) Bacterias aisladas de aguas contaminadas con uranio, (2) bacterias tipo relacionadas con bacterias aisladas de ambientes contaminados, (3) bacterias aisladas de muestras de suelos recogidas en zonas afectadas por minas de uranio y (4) bacterias aisladas de aguas subterráneas cercanas a zonas de almacenamiento de radionucléidos.

En relación a la cinética de sorción, esta puso de manifiesto la buena capacidad de fijación de uranio por parte de la bacteria ensayada. La cantidad de uranio fijada fue de 58, 132 y 197 mg/g biomasa seca para los pHs 2, 3 y 4,3 respectivamente. Además, para los ensayos realizados a pHs 3 y 4,3, la

sorción máxima se alcanzó pasados los 60 minutos de incubación, mientras que para el ensayo a pH 2 la sorción se alcanzó a los 60 minutos (Figura 5.1).

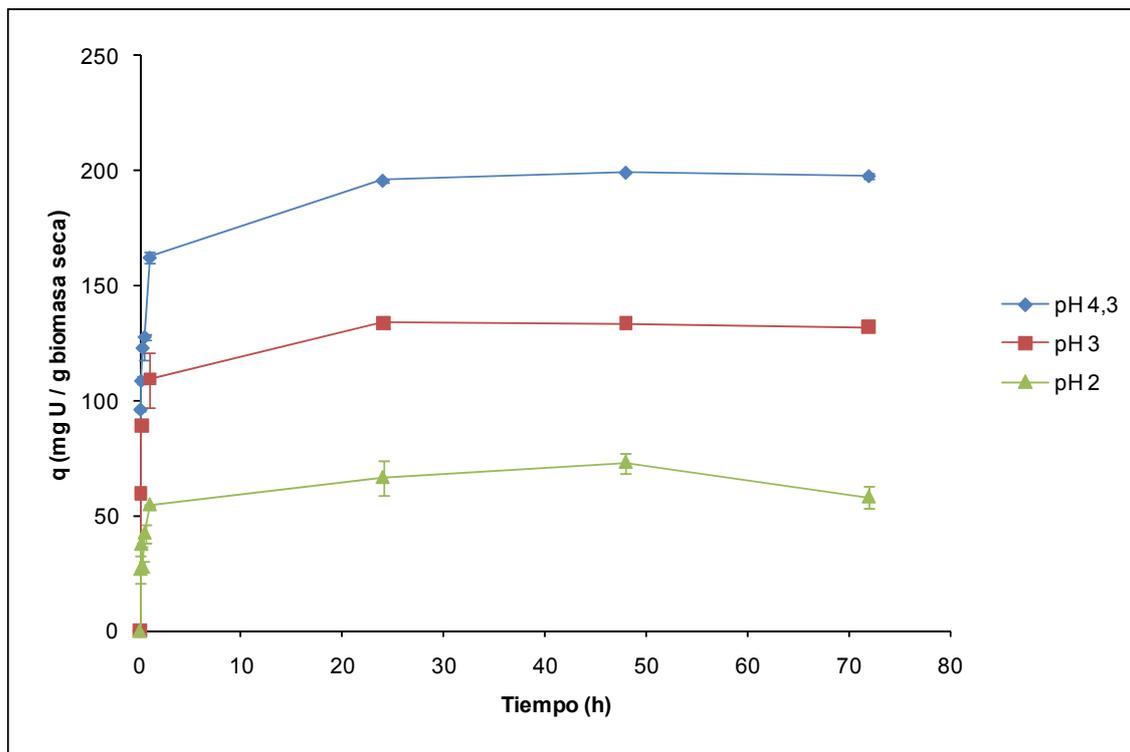


Figura 5.1. Cinética de sorción del uranio por *I. loihiensis* MAH1 a diferentes pHs

Las isotermas de sorción dieron una idea de la capacidad de sorción de la bacteria a diferentes concentraciones y pHs. Además, al correlacionar los datos experimentales mediante diferentes modelos matemáticos (Langmuir, Freundlich, Temkin y Dubinin-Radushkevich) es posible realizar predicciones sobre la capacidad de sorción, así como, tener una idea aproximada del tipo de proceso ocurrido. En este sentido los resultados obtenidos mostraron que la capacidad máxima de sorción fue similar en los tres pHs ensayados a concentraciones bajas (0,015 – 0,06 mM), mientras que a altas concentraciones fue a pH 4,3 donde se alcanzó el mejor nivel de sorción (179 mg/g de biomasa seca), tal como puede verse en las Figuras 5.2 y 5.3 y en concordancia con los resultados obtenidos en la cinética de sorción. Por otro lado, la mejor correlación de los datos experimentales a pHs 2 y 3 se obtuvo mediante el modelo matemático de Langmuir, mientras que a pH 4,3 la mejor correlación se obtuvo con el modelo de Temkin.

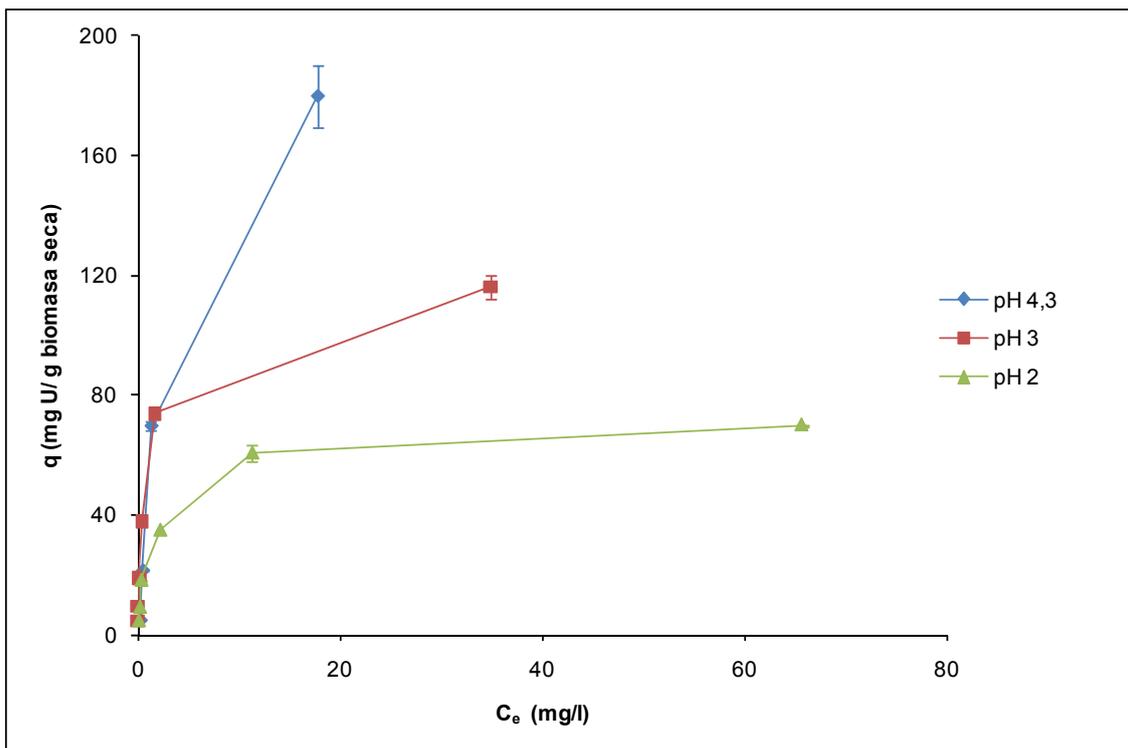


Figura 5.2. Isotermas de sorción del uranio por *I. loihiensis* MAH1 a diferentes pHs.

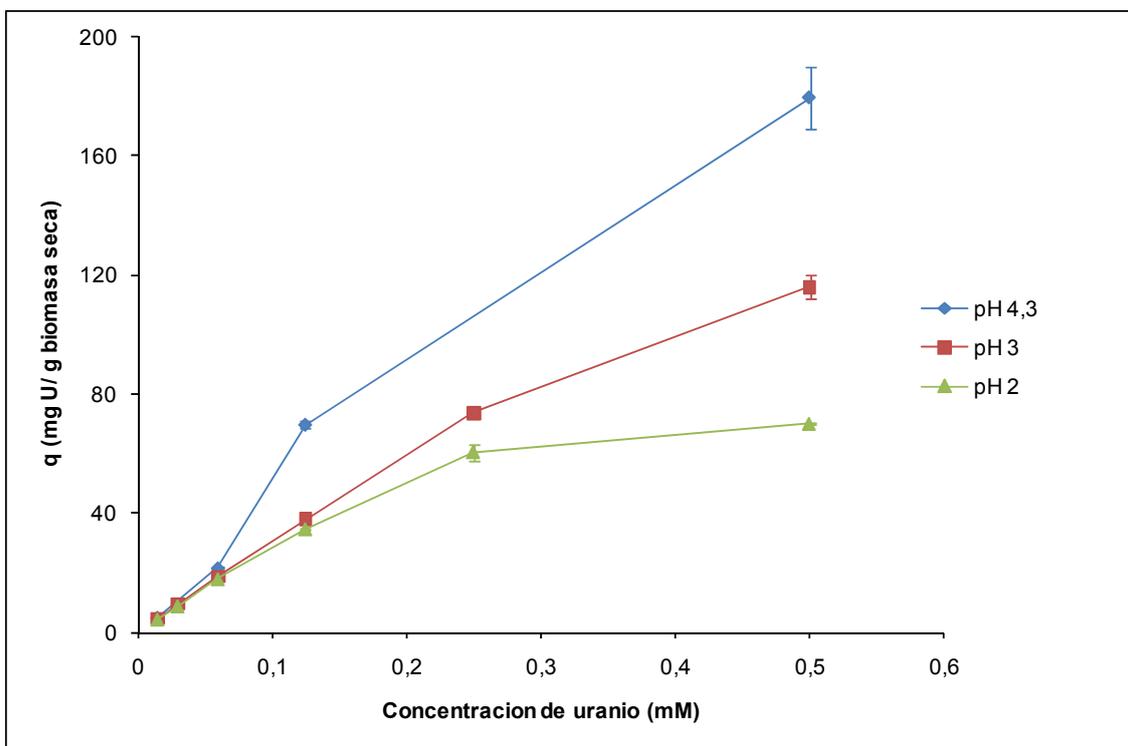


Figura 5.3. Cantidad de uranio fijado en función de la concentración de uranio inicial y del pH.

Estudios sobre la interacción del uranio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

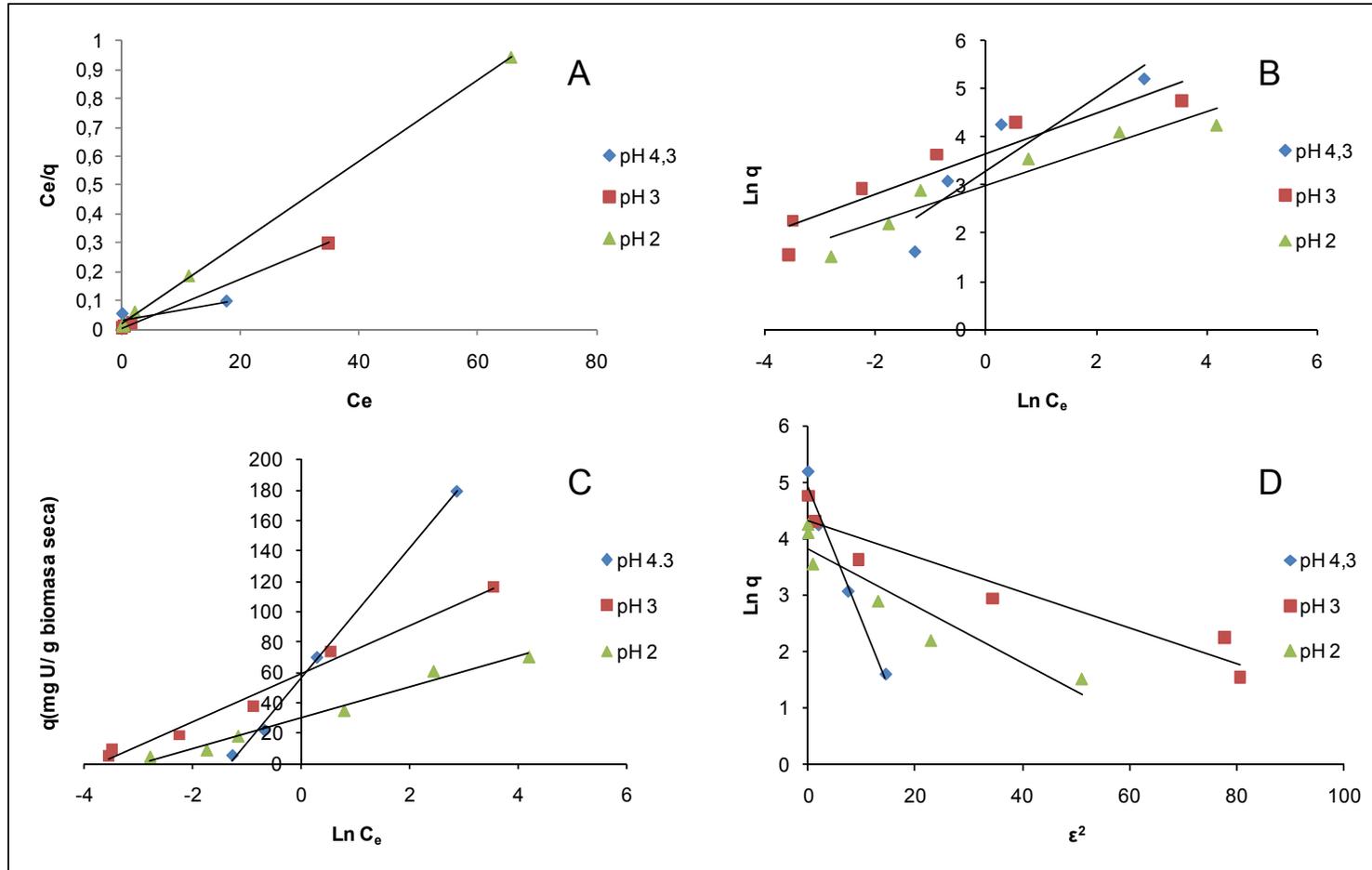


Figura 4. Isotermas de Langmuir (A), Freundlich (B), Temkin (C) y Dubinin-Radushkevich (D) de la fijación del uranio por *I. loihiensis* MAH1.

También se estudiaron los datos experimentales mediante el modelo de Freundlich y el modelo de Dubinin-Radushkevich, con este último modelo dio una buena correlación con los datos obtenidos a pH 3 y 4,3. El ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos matemáticos, así como los diferentes parámetros de cada uno, pueden verse en la Figura 5.4 y en la Tabla 5.2. La energía libre de sorción calculada para los 3 pHs estudiados fue cercana a $0,3 \text{ kJmol}^{-1}$ (Tabla 5.2). Por último los valores de R_L así como la forma de la curva que se obtiene al representar R_L frente a C_0 (Figura 5.5), confirmaron claramente la sorción favorable del uranio por parte de *I. loihiensis* MAH1.

		R^2	q_{\max} (mg)	K_L (l/mg)	
Langmuir	pH 4,3	0,7645	263,15	0,1237	
	pH 3	0,9997	117,64	1,4409	
	pH 2	0,9995	71,48	0,696	
		R^2	K_f	n	
Freundlich	pH 4,3	0,83	26,961	1,2998	
	pH 3	0,8827	39,075	2,3792	
	pH 2	0,917	19,656	2,5859	
		R^2	a	b (kJ/mol)	
Temkin	pH 4,3	0,9978	3,672	0,059	
	pH 3	0,9846	43,302	0,166	
	pH 2	0,9813	19,471	0,25	
		R^2	B	q_{\max}	E (kJ/mol)
D-R	ph 4,3	0,9807	0,237	139,82	0,318
	pH 3	0,9165	0,031	74,343	0,34
	pH 2	0,8846	0,05	46,09	0,361

Tabla 5.2. Principales parámetros de los modelos matemáticos utilizados para el tratamiento de los datos de las isotermas de sorción. R^2 = coeficiente de correlación; q_{\max} = capacidad máxima de sorción; K_L = constante de sorción en el equilibrio; K_f = constante relacionada con la capacidad de sorción; n= constante relacionada con la intensidad de la sorción; a y b= constantes del modelo de Temkin; B= constante de la isoterma de Dubinin-Radushkevich; E= Energía libre de sorción.

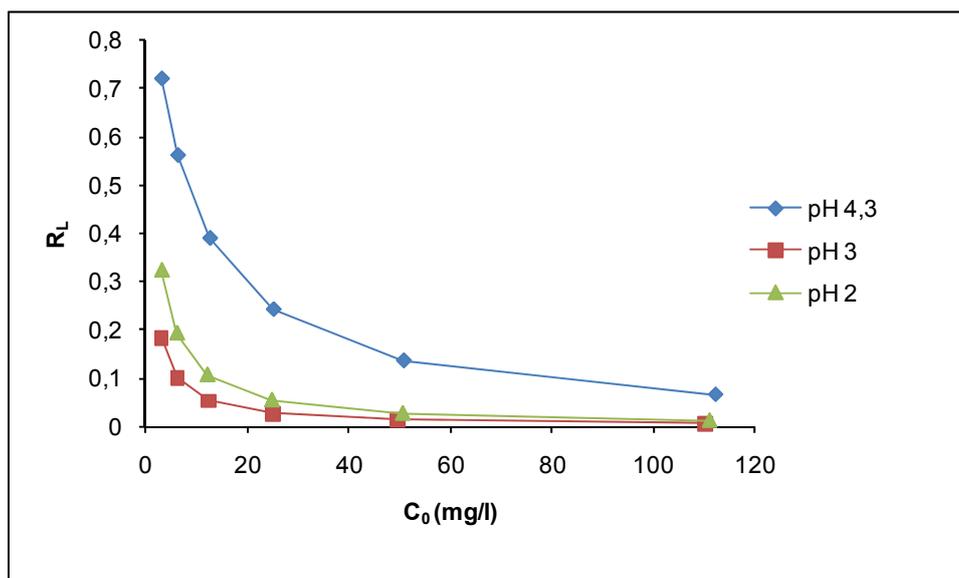


Figura 5.5. Factor de separación R_L frente a la concentración inicial de metal a pHs 2, 3 y 4,3

A fin de conocer la localización celular del uranio fijado, así como el estado de las células, se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM y HREM) acoplada a microanálisis por rayos X (EDX) para el caso de la HREM. Se observó que a pHs 3 y 4,3 el uranio se encontró localizado en la pared e interior celular en forma acicular, y, para la muestra a pH 4,3, en muy baja cantidad en el EPS. En la figura 5.6 puede verse la localización del uranio fijado. A pH 2 no se pudo determinar la localización del uranio. Las células se encontraban muy deterioradas a los tres pHs estudiados. Por otro lado, de las muestras preparadas en agua de mar con uranio, solamente se pudo determinar la localización del uranio en la preparada a mayor concentración (0,5 mM). En esta muestra el uranio se localizó en la pared celular en forma de gránulos densos y, minoritariamente, en forma de agujas (Figura 5.6 y 5.7). Destacar que el pico de silicio que aparece en los diferentes microanálisis es debido al propio detector del sistema EDX y no que se encuentre silicio en las muestras.

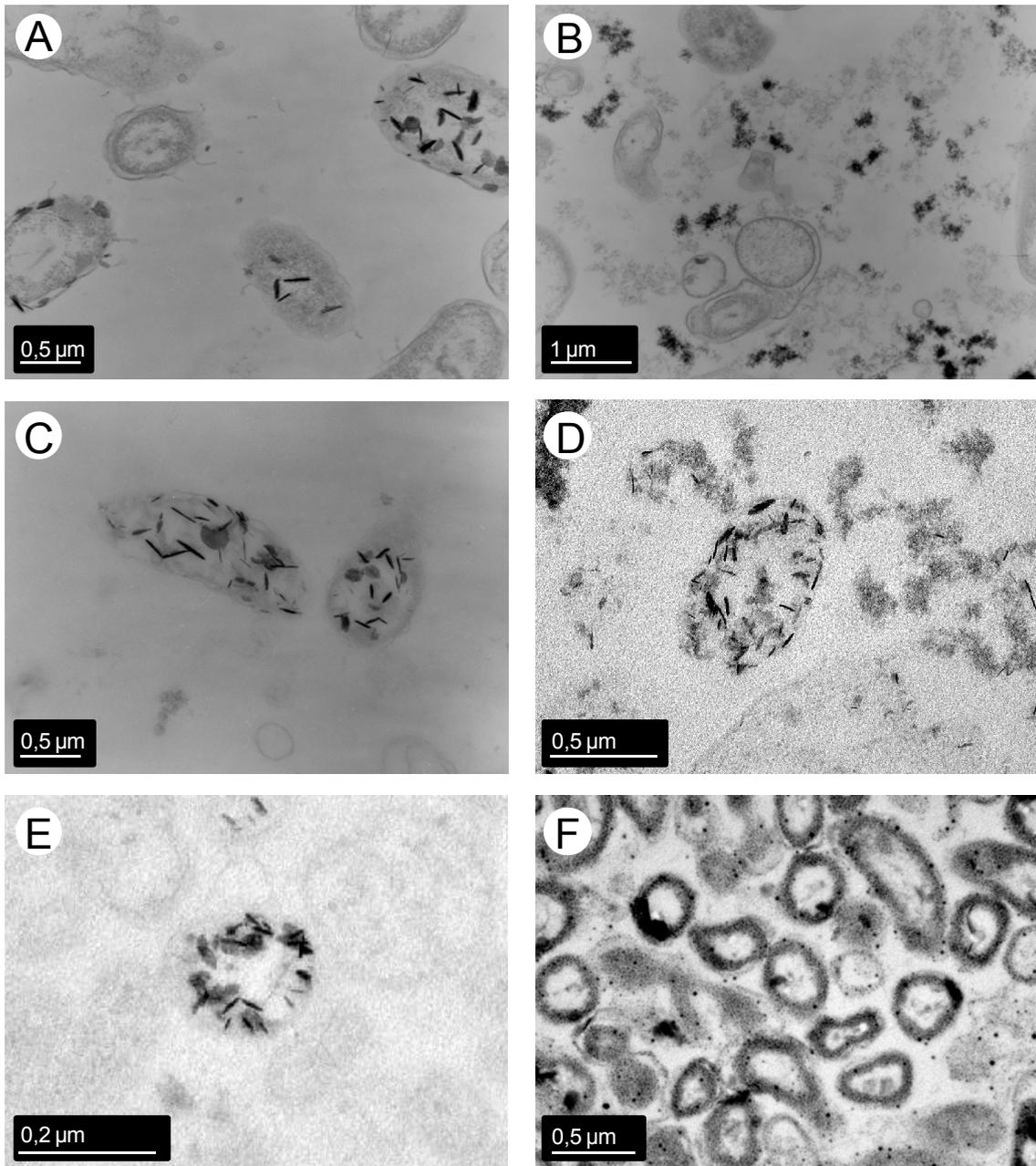


Figura 5.6. Fijación de uranio por *I. loihiensis* MAH1. Depósitos de uranio en la pared y en el interior celular a pH 4,3 (A, TEM; D, HREM) y 3 (C, TEM; E HREM). Depósitos de uranio en el EPS a pH 4,3 (B, TEM; D, HREM). Depósitos en pared celular en muestras preparadas en agua de mar (F).

Estudios sobre la interacción del uranio con Idiomarina loihiensis MAH1

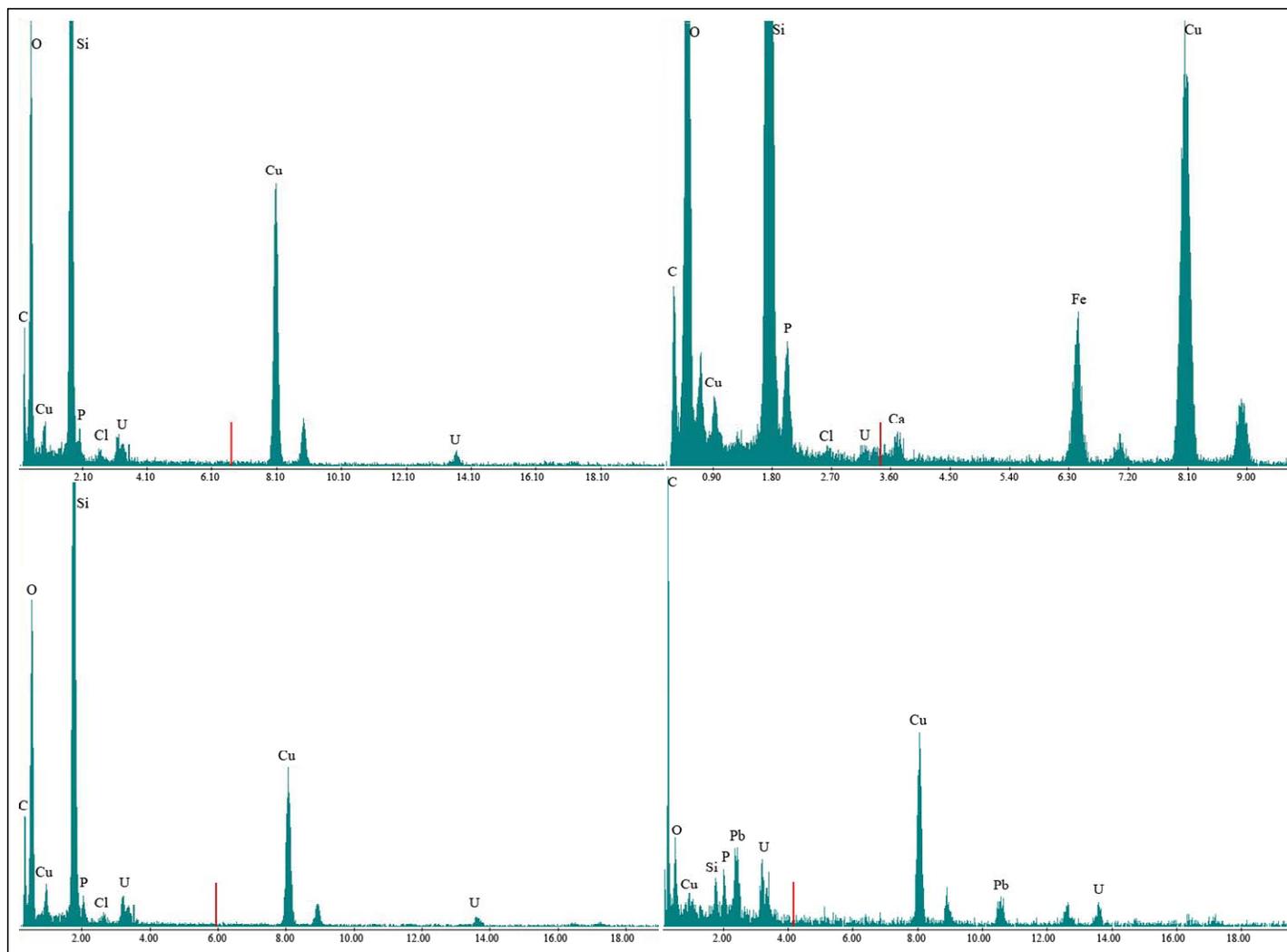


Figura 5.7. Análisis EDAX de los acúmulos de uranio en el interior celular a pH 3 y 4,3 (A,C) y en el EPS a pH 4,3 (B). Análisis de acúmulos en la pared en muestras preparadas en agua de mar (D)

El uso de la espectroscopia de fluorescencia inducida por láser en tiempo resuelto sirvió para determinar las propiedades fluorescentes (tiempos de vida y bandas de emisión de fluorescencia) de los complejos de uranio formados por *I. loihiensis* MAH1 bajo diferentes condiciones físico-químicas (tipo de solución “background” utilizada, concentraciones y pHs de las soluciones del metal). En la Figura 5.12, como ejemplo de lo anteriormente mencionado, se encuentran representados los espectros de emisión de fluorescencia bajo diferentes condiciones de concentración de uranio y de solución “background” utilizada.

En los ensayos utilizando como solución “background” perclorato sódico (muestras secas y en suspensión), las bandas de emisión de fluorescencia principales para los tres pHs ensayados fueron cercanos a 498 nm, 518 nm y 540 nm, mientras que se determinaron cuatro tiempos de vida para cada uno de los pHs (Figuras 5.8A y 5.9 izquierda, Tabla 5.3). Para las muestras estudiadas en suspensión los tiempos de vida difirieron ligeramente debido a la presencia de moléculas de agua que atenuaron los tiempos obtenidos en las muestras secadas (Figuras 5.8B y 5.9 derecha, Tabla 5.3). Por otra parte, en los ensayos realizados utilizando como solución “background” agua de mar (muestras secas y en suspensión) se determinó que las bandas de emisión de fluorescencia principales fueron cercanas a 501 nm, 522 nm y 544 nm para las concentraciones de 0,01 mM y 0,05 mM de uranio, mientras que para la muestra de 0,1 mM de uranio las bandas de emisión de fluorescencia estuvieron algo más desplazadas (503 nm, 524 nm y 546 nm) (Figura 5.10A, Tabla 5.3). El estudio del tiempo de vida de la fluorescencia mostró la existencia de 2 especies para las concentraciones de uranio de 0,01 mM y 0,05 mM mientras que, para la concentración más alta de uranio, se determinaron 3 especies (Figura 5.11 izquierda, Tabla 5.3). En los ensayos realizados con la muestra en suspensión, los tiempos de vida difirieron notablemente de los anteriormente mencionados (Tabla 5.3), debido principalmente a la presencia en solución de carbonatos de uranio tal como puede verse en la especiación ($\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$ (aq), 59,2 %; $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{-2}$, 36,6 %; $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{-4}$, 3,4 %), característicos en soluciones con pHs altos, y a la presencia de diversas sales presentes en el agua de mar.

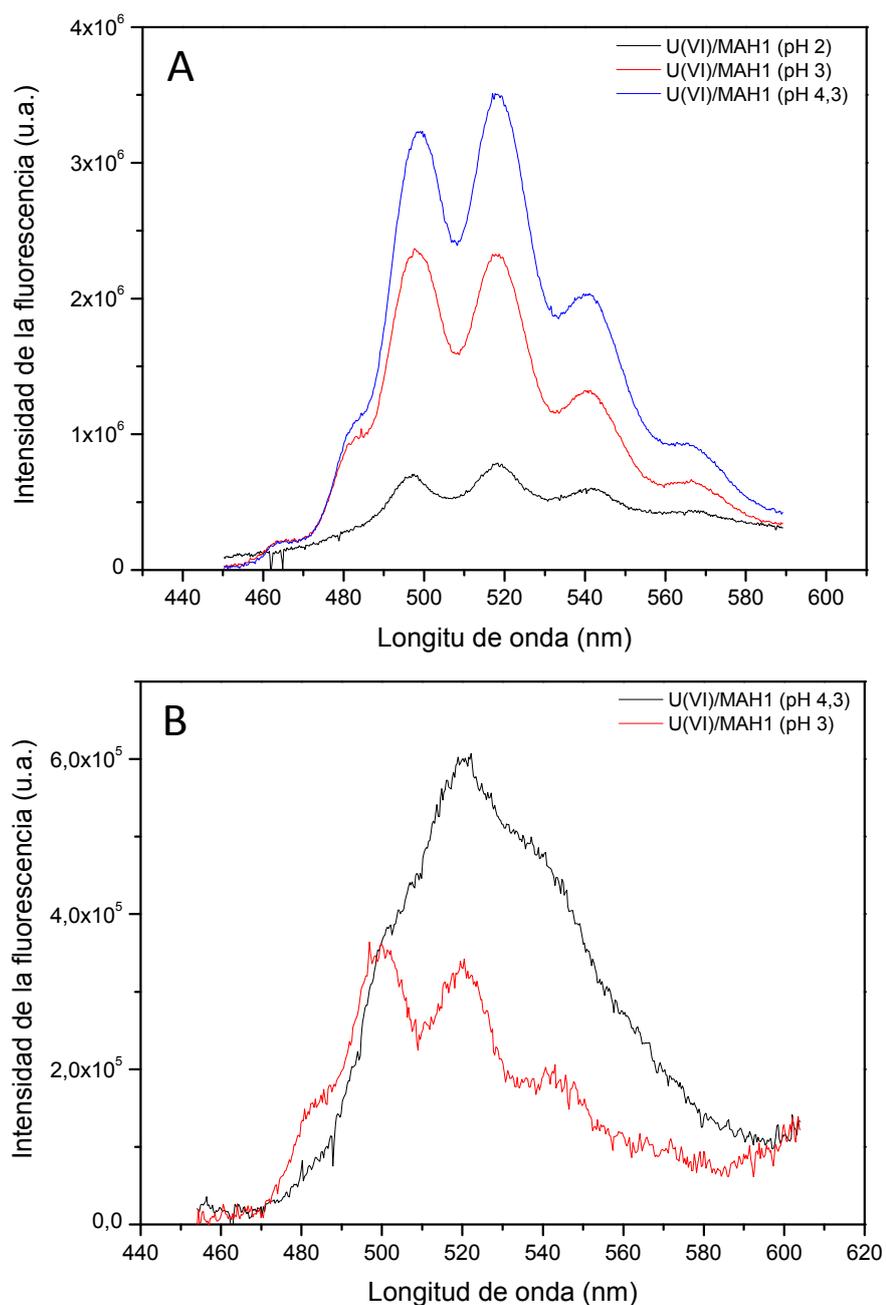


Figura 5.8. Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos de uranio-*I. loihiensis* MAH1 en muestras preparadas usando como solución de contacto perclorato sódico 0,1 M y posteriormente analizadas en seco (A) y en suspensión (B).

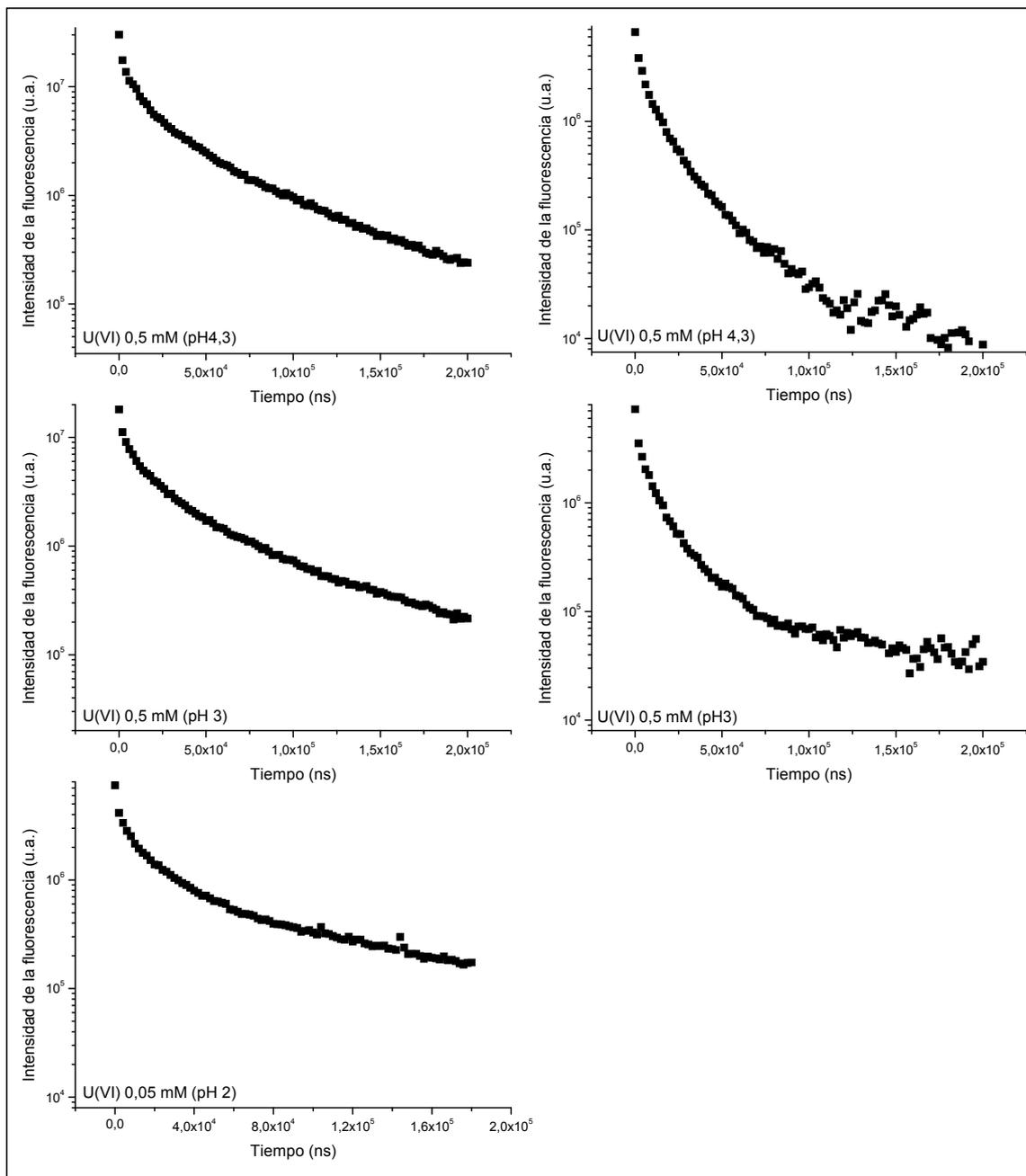


Figura 5.9. Disminución exponencial de la intensidad de la fluorescencia de los complejos de uranio-*I. loihiensis* MAH1 en muestras preparadas usando como solución de contacto perclorato sódico 0,1 M y posteriormente analizadas en seco (izquierda) y en suspensión (derecha).

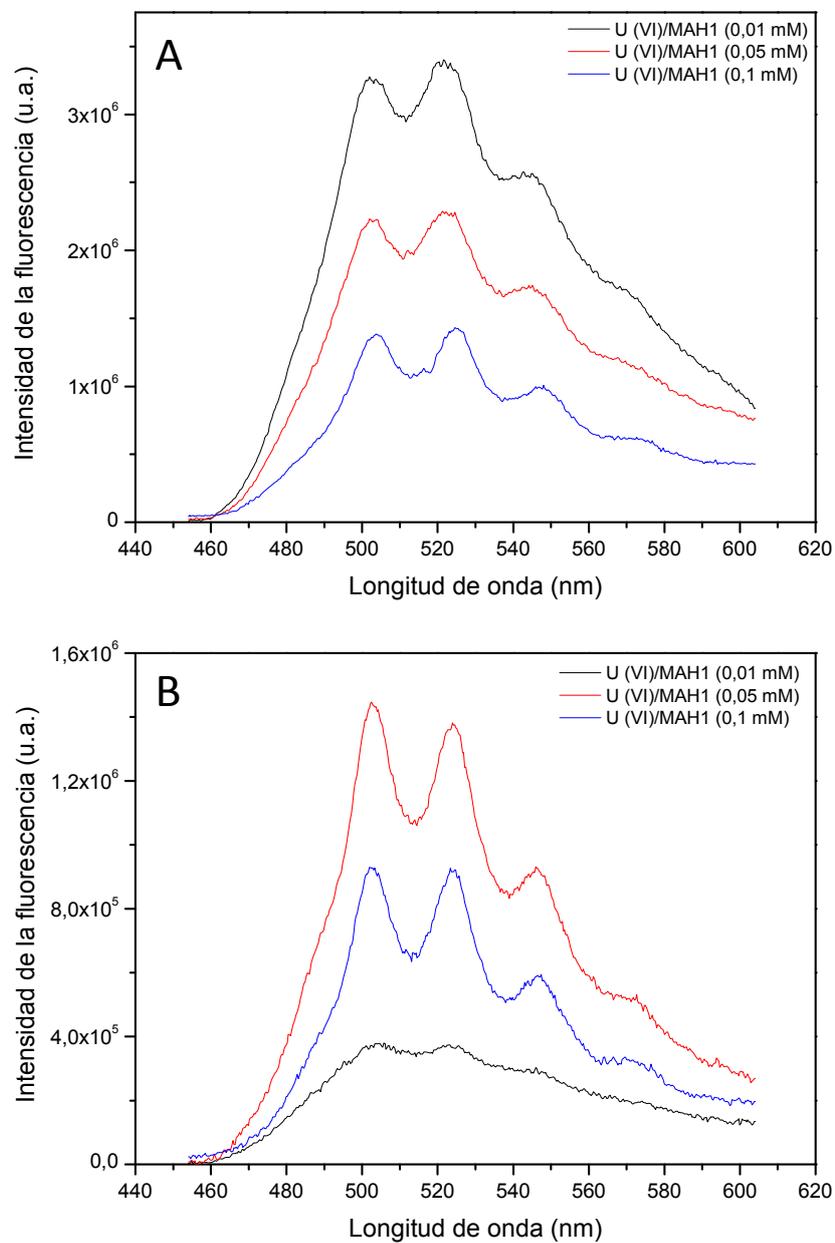


Figura 5.10. Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos de uranio-*I. loihiensis* MAH1 en muestras preparadas usando como solución de contacto agua de mar y posteriormente analizadas en seco (A) y en suspensión (B).

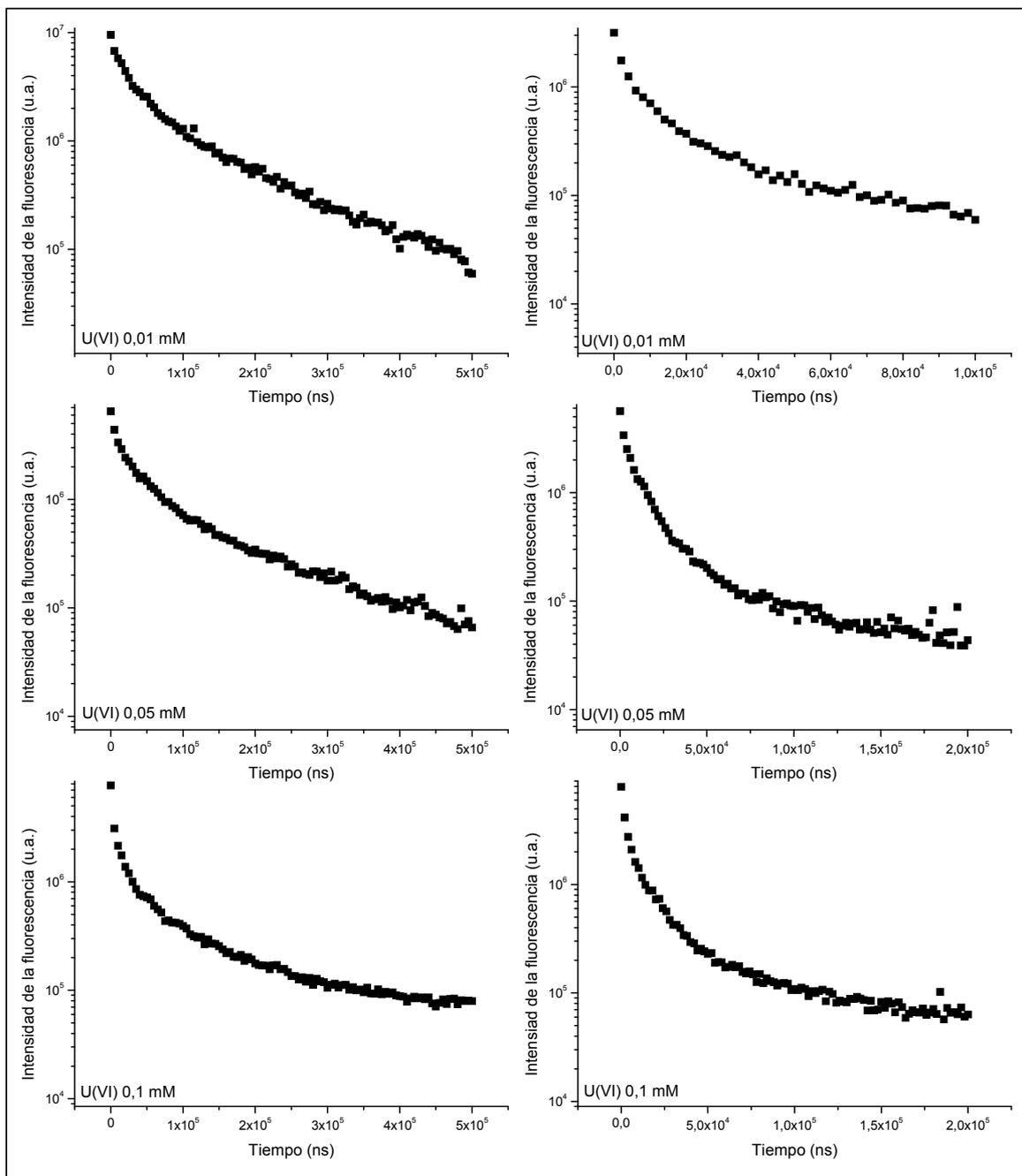


Figura 5.11. Disminución exponencial de la intensidad de fluorescencia de los complejos de uranio-*I. loihiensis* MAH1 en muestras preparadas usando como solución de contacto agua de mar y posteriormente analizadas en seco (izquierda) y en suspensión (derecha).

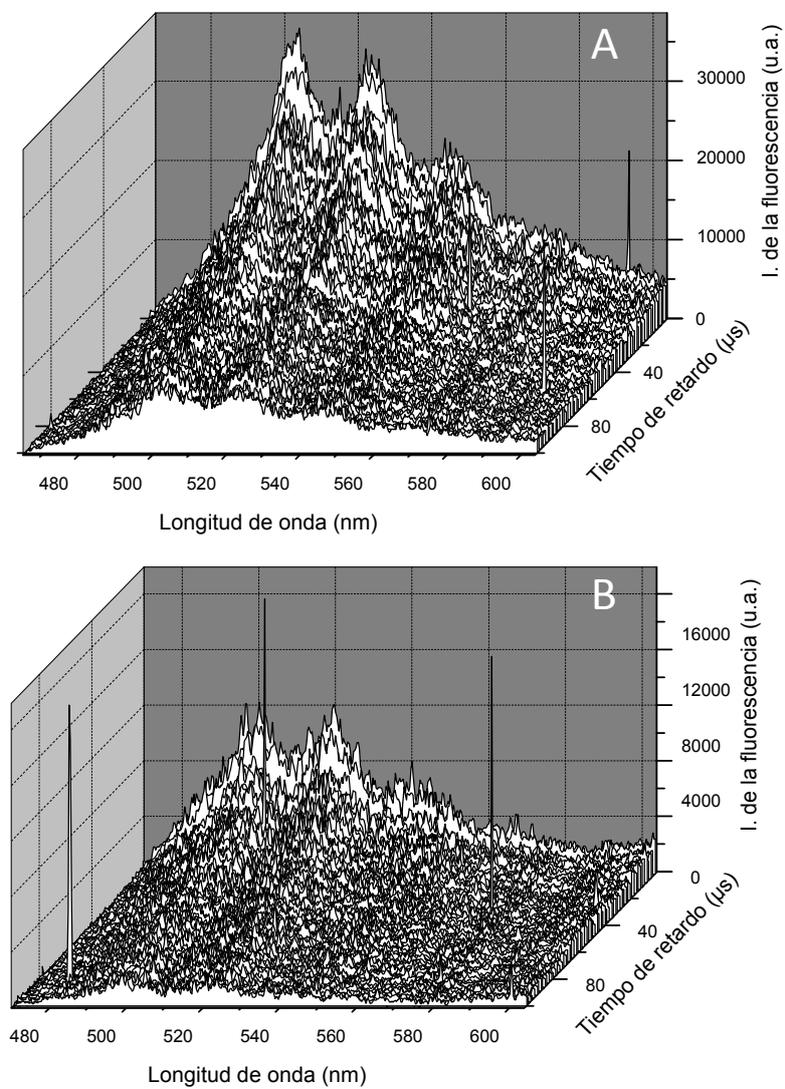


Figura 5.12. Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos de uranio formados por *I. loihiensis* MAH1 a tiempo resuelto. (A) $[U]=0,05$ mM en agua de mar, (B) $[U]=0,5$ mM en perclorato sódico pH 3.

Estudios sobre la interacción del uranio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

Especie	Bandas de emisión (nm)					Tiempos de vida (μ s)				Referencia
						t_1	t_2	t_3	t_4	
UO ₂ ²⁺	471,40	487,90	509,10	532,70	558,70	1,8 ± 0,1				Günther (2007)
UO ₂ OH ⁺	480,70	497,30	518,40	541,30	566,40	32,8 ± 2,0				Eliet (1995)
Fosfatos Inorgánicos										
UO ₂ PO ₄ ⁻		502,00	524,00	548,00	574,00					Bonhoure (2007)
(UO ₂) _x (PO ₄) _y	488,00	503,00	523,70	546,90	572,50					Brendler (1996)
Carbonatos										
Mg ₂ [UO ₂ (CO ₃) ₃] · 18H ₂ O	487,70	506,90	527,60	551,40	578,30	17,9 ± 0,5				Amayri (2005)
Ca ₂ [UO ₂ (CO ₃) ₃] · 10H ₂ O	482,90	502,70	524,50	545,40	571,50	145,0 ± 5,0				Amayri (2005)
Liebigita	483,10	502,70	524,10	545,90	571,90	313,0 ± 10,0				Amayri (2005)
Sr ₂ [UO ₂ (CO ₃) ₃] · 8H ₂ O	488,80	502,80	522,90	545,40	569,20	77,0 ± 1,0				Amayri (2005)
Ba ₂ [UO ₂ (CO ₃) ₃] · 6H ₂ O	487,70	507,30	528,90	552,20	570,50	16,3 ± 0,4				Amayri (2005)
Na ₂ Ca[UO ₂ (CO ₃) ₃] · 6H ₂ O	486,10	505,40	526,70	549,60	573,90	65,2 ± 0,6				Amayri (2004)
Ca ₂ [UO ₂ (CO ₃) ₃] (en solución)	484,00	504,00	524,00			0,04 ± 0,01				Bernhard (2001)
CaMg[UO ₂ (CO ₃) ₃] · 12H ₂ O	488,90	509,20	531,00	554,70	578,90	59,4 ± 0,1				Amayri (2005)
Aminoácidos										
UO ₂ HPTTr	484,00	502,00	523,00	547,00	573,00	0,5 ± 0,1				Günther (2008)
Fosfatos										
Autunita	488,60	504,00	524,20	548,00	573,90	5,1 ± 0,3				Geipel (2000)
Metaautunita	491,30	501,80	522,90	546,90	572,20	0,7 ± 0,1				Geipel (2000)
Saleeita	489,00	501,10	522,10	545,70	570,90	2,25 ± 0,2				Geipel (2000)
Ranunculita	491,40	501,20	521,90	545,50	570,50	1,9 ± 0,1				Geipel (2000)
LPS										
R-O-PO ₃ H-UO ₂ ⁺ pH 2,5	480,40	497,20	518,90	542,40	567,30	8,3 ± 0,6				Barkleit (2008)
R-O-PO ₃ -UO ₂ pH 4	481,50	498,10	519,60	542,90	567,50	1,2 ± 0,4				Barkleit (2008)
[R-O-PO ₃] ₂ -UO ₂ ²⁻ pH 7	483,60	499,70	521,00	544,30	568,90	13,3 ± 1,4				Barkleit (2008)
Bacterias										
<i>B. sphaericus</i>		501,90	523,90	545,80	571,10					Panak (2000)
<i>I. loihiensis</i> ([UO ₂ ²⁺] = 0,01 mM) (S)	482,66	501,27	522,22	543,64	564,66	23,5 ± 0,8	132,0 ± 4			Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> ([UO ₂ ²⁺] = 0,05 mM) (S)	482,17	501,07	522,28	544,63	566,98	17,6 ± 0,8	118,0 ± 4			Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> ([UO ₂ ²⁺] = 0,1 mM) (S)	487,70	503,61	524,17	546,29	569,24	2,2 ± 0,10	12,9 ± 3,2	83,0 ± 16,0		Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> ([UO ₂ ²⁺] = 0,01 mM) (L)	486,65	502,43	522,46	543,55	567,25	1,9 ± 0,3	10,5 ± 1,0	72,3 ± 10,3		Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> ([UO ₂ ²⁺] = 0,05 mM) (L)	486,64	502,65	523,43	545,15	567,89	2,2 ± 0,3	11,5 ± 0,9	51,6 ± 16,4		Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> ([UO ₂ ²⁺] = 0,1 mM) (L)	487,16	502,75	523,36	545,86	569,58	2,5 ± 0,1	13,8 ± 0,9	74,2 ± 26,1		Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> (pH 4,3) (S)	465,18	481,60	498,16	518,30	540,77	1,0 ± 0,1	5,8 ± 0,3	26,6 ± 0,7	93,7 ± 3,6	Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> (pH 3) (S)	465,35	481,06	497,70	518,22	540,64	1,1 ± 0,1	5,6 ± 0,4	22,9 ± 0,4	97,5 ± 1,4	Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> (pH 2) (S)	481,04	497,45	518,09	540,91	565,93	0,8 ± 0,0	5,5 ± 0,3	26,6 ± 5,3	103,0 ± 9,3	Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> (pH 4,3) (L)	482,71	499,38	519,77	541,53	564,21	0,8 ± 0,1	3,4 ± 0,9	14,3 ± 3,2	60,0 -100,0	Este trabajo
<i>I. loihiensis</i> (pH 3) (L)	482,17	499,96	518,38	539,67	562,45	0,7 ± 0,1	3,4 ± 0,7	15,2 ± 4,5	60,0 - 100,0	Este trabajo

Tabla 5.3. Bandas de emisión y tiempos de vida de diferentes complejos de uranio. (S) Muestras seca, (L) muestra en suspensión.

La espectroscopia de absorción de rayos X o espectroscopia por EXAFS se empleó para determinar los parámetros estructurales de los complejos de uranio formados por las células de *I. loihiensis* MAH1, en una solución de contacto o “background” de NaClO_4 , a una concentración de uranio de 0,5 mM y a valores de pH de 2, 3, y 4,3.

Se empleó dos modelos para modular los espectros de EXAFS de las 3 muestras, en primer lugar se utilizó la meta-autunita, y en segundo lugar un modelo que incluye a fragmentos de la meta-autunita y de complejos de U con tres moléculas de ácido acético. Estos modelos están representados en la Figura 5.13. El primer modelo se usó para modular las muestras a pH 2 y 3, mientras que el segundo se empleó para la muestra a pH 4,3.

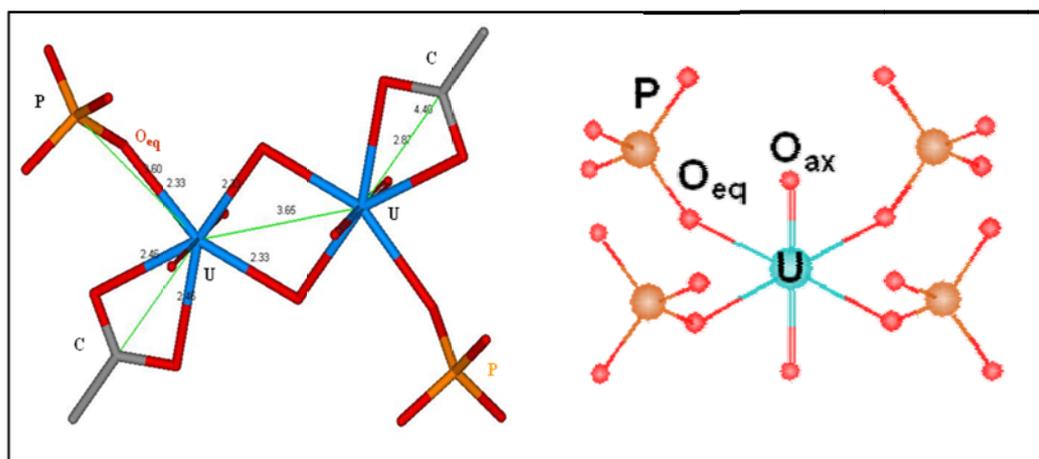


Figura 5.13. Los dos modelos empleados para modular los espectros de EXAFS de las muestras estudiadas en este trabajo. Modelo 1, fragmentos de meta-autunita y de complejos de uranio con tres moléculas de ácido acético (izquierda), Modelo 2, meta-autunita (derecha).

En las tres muestras (pH 2, 3, 4,3), el uranio se coordinó a dos átomos de oxígeno en el plano axial (primer pico en las correspondientes transformadas de Fourier), a una distancia de 1,76-1,78 Å, y a 4-5 átomos de oxígeno en el plano ecuatorial (segundo pico) a una distancia de 2,34-2,36 Å. La presencia de estos dos átomos de oxígeno en el plano axial indicó que el estado de oxidación del uranio fue de U(VI) y por lo tanto no ocurrió una reducción de este elemento. El segundo pico (con una distancia de 2,34-2,36

Å) es característico de los enlaces entre U y grupos fosfato de un modo “monodentate binding mode” (Hennig *et al.* 2001; Merroun *et al.* 2003; 2005) lo que demostró la implicación de grupos fosfatos en la coordinación de este elemento en las tres muestras estudiadas. Sin embargo, en el caso de la muestra a pH 4,3, el valor del parámetro “Debye-Waller factor” (Tabla 5.4) fue alto (0,014 Å²), lo que indicó la presencia de dos diferentes tipos de átomos de oxígenos en el plano ecuatorial, el primer enlace “U-Oeq₁” de corta distancia procedente de los grupos fosfatos y un segundo enlace más largo que podría pertenecer a los grupos carboxilos. Estos resultados fueron confirmados por el hecho de que el espectro de EXAFS de esta muestra es similar a la de los complejos de uranio formados por la capa S de la cepa JG-A12 de *B. sphaericus* donde el uranio estaría coordinado tanto a grupos carboxilo como a grupos fosfato. Además los estudios TRLFS de esta muestra demostraron también la implicación de estos dos grupos funcionales bacterianos. El espectro de la muestra a pH 4,3 contenía un pico que corresponde a un enlace U-C a una distancia de 2,91 Å y que corresponde al carbono de los grupos carboxilos. En el caso de las muestras a pH 2 y 3 los valores del parámetro “Debye-Waller factor” (0,008-0,009 Å²) fueron normales y por lo tanto indicó la implicación de un solo tipo de ligando donador de oxígeno, en este caso perteneciente a grupos fosfato. En las tres muestras, las transformadas de Fourier presentaron un pico a una distancia de 3,59-3,60 Å² que corresponde en los tres casos a la interacción de uranio con el fósforo de los grupos fosfatos.

Los espectros de EXAFS, y sus correspondientes transformadas de Fourier, de los complejos de uranio formados por esta bacteria, a valores de pH de 2, 3, y 4,3, están representados en la Figura 5.14. Además, esta figura incluye como referencias los espectros de EXAFS de algunos compuestos de uranio tales como los complejos de U formados por las capas S de *Bacillus sphaericus* JG-A12, meta-autunita (Ca(UO₂)₂(PO₄)₂ · 6 H₂O) y complejos de U/fructosa-6-fosfato (como representante de complejos de uranio con fosfatos orgánicos). Los parámetros estructurales de los complejos de uranio formados por esta bacteria están resumidos en la Tabla 5.4.

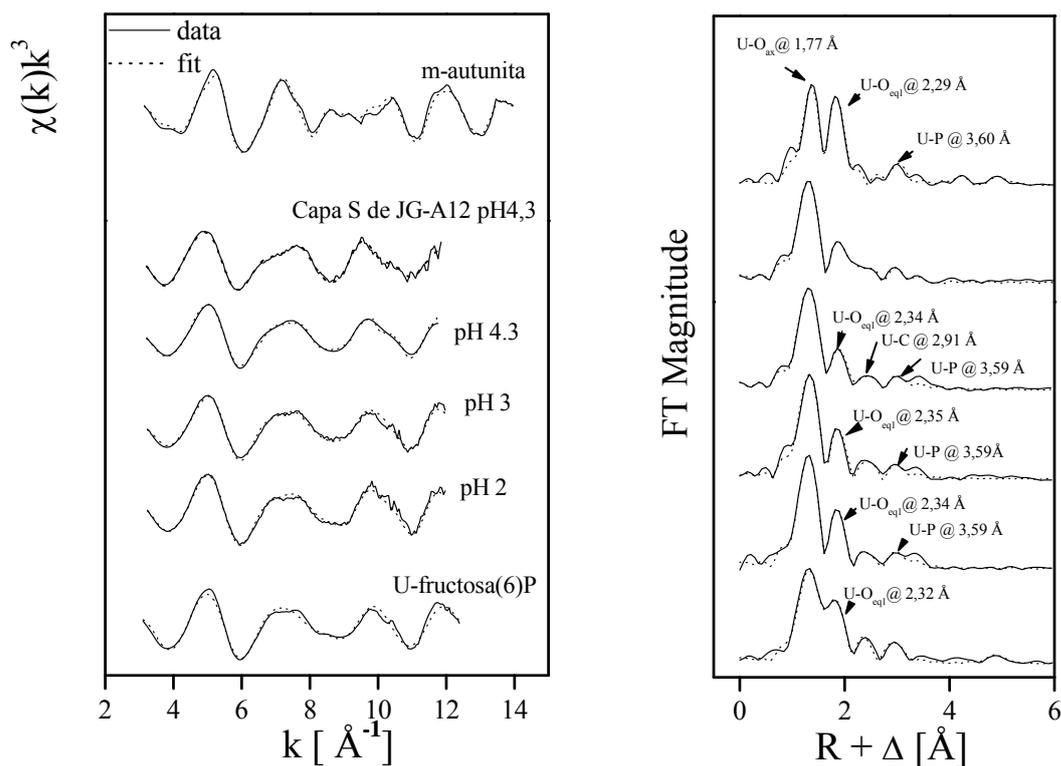


Figura 5.14. Espectros de EXAFS (izquierda) de los complejos de uranio formados por *I. loihiensis* MAH1 y sus correspondientes transformadas de Fourier (derecha) a pH 2, 3 y 4,3. En esta figura se incluye también los espectros de EXAFS y FT de los compuestos usados como referencias (m-autunita y U-fructosa (6) P) así como los complejos de uranio formados por la capa S de *Bacillus sphaericus* JG-A12.

Muestra	Esfera de coordinación	N ^a Distancia radial del enlace)	R (Å) ^b	σ ² (Å ²) ^c	ΔE (eV)
pH 2	U-O _{ax}	2,0 ^d	1,76	0,0022	-13,8
	U-O _{ax} (MS)	2,0 ^d	3,52	0,0044	
	U-O _{eq1}	4,4(6)	2,34	0,0098	
	U-O _{eq2}	0,9(2)	2,85	0,0038 ^d	
	U-P	2,7(2)	3,59	0,004 ^d	
	U-O _{eq1} -P (MS)	11,6	3,73 ^e	0,004 ^d	
pH 3	U-O _{ax}	2,0 ^d	1,77	0,0026	-12,0
	U-O _{ax} (MS)	2,0 ^d	3,54	0,0052	
	U-O _{eq1}	3,2 (6)	2,35	0,008	
	U-O _{eq2}	1,2 (2)	2,87	0,0038 ^d	
	U-P	1,7 (2)	3,59	0,004 ⁴	
	U-O _{eq1} -P (MS)	3,4	3,70	0,004 ⁴	
pH 4,3	U-O _{ax}	2,0 ^d	1,77	0,003	-10,5
	U-O _{ax} (MS)	2,0 ^d	2,54	0,006	
	U-O _{eq1}	4,0 (6)	2,34	0,014	
	U-C	1,5 (2)	2,91	0,0038 ^d	
	U-P	2,1 (2)	3,59	0,004 ^d	
	U-O _{eq1} -P (MS)	4,2	3,70	0,004 ^d	

^a Los errores en el número de coordinación es de hasta ± 25% y la desviación estándar calculada mediante el programa EXAFSPAK se da entre parentesis

^b Error en la distancia de ±0.02 Å

^c Factor de Debye-Waller

^d Valor mantenido constante durante el proceso de calculo

Tabla 5.4. Parámetros estructurales de los complejos de uranio formados por *I. loihiensis* MAH1 a pH 2, 3 y 4,3.

5.4. Discusión

En la actualidad, muchos de los estudios realizados sobre la interacción entre metales pesados y microorganismos son estudios enfocados a la búsqueda de microorganismos con una alta tolerancia a determinados metales, que puedan ser útiles para la bioremediación de zonas contaminadas. Así, la búsqueda de estos microorganismos se centra, casi inevitablemente, en dichas zonas contaminadas ya que, como algunos autores han resaltado, los microorganismos tolerantes a metales pesados suelen ser aislados de zonas en las que existe una alta cantidad de metales debido a que estos producen una respuesta adaptativa en los microorganismos presentes (Van Nostrand *et al.*, 2007; Stoppel y Schlegel, 1989). Sin embargo, los estudios centrados en microorganismos aislados de zonas naturales no contaminadas son escasos (Acharya *et al.*, 2009). En este trabajo, estudiamos la interacción del uranio con *I. loihiensis* MAH1, bacteria aislada del Mar de Alborán y no de una zona contaminada que, como hemos mencionado en los resultados, posee una buena tolerancia al uranio. *I. loihiensis* MAH1 tolera hasta concentraciones de 4 mM de uranio (Tabla 5.1). Este valor es superior a los valores encontrados por algunos autores al estudiar la tolerancia de bacterias aisladas de muestras de suelos recogidas en zonas afectadas por minas de uranio (Haferburg *et al.*, 2007) y en muestras de aguas subterráneas recogidas en zonas de almacenamiento de residuos radiactivos (Nedelkova *et al.*, 2007). En concreto, Haferburg *et al.* obtuvieron tolerancia a valores de 0,02 mM y de 0,05 mM para *M. luteus* y *S. acidiscabies*, respectivamente, mientras que Nedelkova *et al.* obtuvieron para diferentes bacterias del género *Microbacterium* una tolerancia de 2 mM. En todos los casos fueron bacterias que por su zona de aislamiento deberían estar sometidas a esta presión adaptativa que hemos mencionado anteriormente, mientras que nuestra bacteria a estudio no, lo cual es sorprendente y nos hace preguntarnos cual podría ser el motivo de la misma. En este sentido, cabe decir que durante los diversos experimentos realizados, se observó una gran producción de EPS por *I. loihiensis* MAH1, lo cual, en principio, podría ser una explicación de esta tolerancia como ya se ha propuesto para otras bacterias (Bitton y Freihof, 1977; Merroun *et al.*, 2001). Sin embargo, como hemos observado mediante los análisis por EDX (muestras

utilizando como solución “background” agua de mar), el uranio no se fijó en el EPS, mientras que se encuentran notables acúmulos en la pared como se discute más adelante (Figura 5.6). Por ello, no es clara la relación que pueda haber en el caso de *I. loihiensis* MAH1 entre la producción de EPS y el grado de tolerancia mostrado. Otra explicación a esta tolerancia podría encontrarse en la cercana relación filogenética de esta cepa con la cepa tipo *I. loihiensis* L2TR (Donachie *et al.*, 2003). Esta bacteria fue aislada de corrientes hidrotermales submarinas (volcán submarino Loihi, Hawaii), zonas en las que existe una gran cantidad de metales en solución que pueden ejercer una fuerte presión adaptativa. En este sentido, Hou *et al.*, (2004) describieron en *I. loihiensis* L2TR la existencia de genes de transporte y resistencia a algunos metales como el arsénico o el cadmio, lo que podría estar relacionado con la resistencia al uranio. Por tanto, sería interesante investigar la presencia o no de los mismos, tanto en nuestra bacteria como en otras cercanas, lo que podría ser indicativo de un carácter que evolucionó de un ancestro común bajo ese tipo de presión selectiva. Otros autores justifican la resistencia a metales pesados mediante otros procesos como la bioacumulación intracelular o la impermeabilidad de la pared celular (Shashank *et al.*, 2002), alguno de los cuales no se podría descartar para nuestra bacteria. En el caso de la impermeabilidad, se ha visto que el uranio solamente se localiza en el interior cuando la membrana se encuentra muy deteriorada, como ya mencionaremos más adelante, con lo que podría considerarse como una de las razones a esta tolerancia.

Además de una notable tolerancia al uranio, la cinética e isotermas realizadas revelaron una buena capacidad de sorción del uranio por parte de la bacteria estudiada. Como ya hemos mencionado anteriormente, la cinética de sorción realizada a pH 2, 3 y 4,3 dio como resultado que la bacteria captaba un máximo de 58, 132 y 197 mg de uranio/g biomasa seca (Figura 5.1), respectivamente. Tsuruta (2002) estudió la adsorción del uranio por diferentes microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) a pH 5,8. Este autor encontró que de las bacterias estudiadas, las gram positivas podían fijar más cantidad de uranio (debido a los ácidos teicoicos de la pared que aportarían numerosos grupos fosfato ionizados) que las gram negativas. Según estos resultados, nuestra bacteria a estudio, al ser gram negativa, no alcanzaría (y de hecho

ocurre así) la capacidad de sorción que una gram positiva; no obstante, comparándola con las bacterias gram negativas estudiadas por Tsuruta, podemos decir que la capacidad de sorción es bastante alta. En cualquier caso, esta comparación hay que tomarla con precaución, ya que Tsuruta realizó sus ensayos a pH 5,8 y nosotros hemos trabajado a pHs 2, 3 y 4,3. Como varios autores han puesto de manifiesto, a partir de pH 5, la capacidad de sorción del ion UO_2^{+2} decrece en gran medida debido a la formación de compuestos estables de hidróxidos y carbonatos de uranio (Tsuruta 2004; Gorman-Lewis *et al.*, 2005), por lo que la capacidad de sorción a pH 5,8 teóricamente debe ser menor que a pH 5 y, posiblemente, que a pH 4,3.

Por otro lado, como puede verse en las Figuras 5.2 y 5.3, la cantidad del metal fijado fue superior en los pHs más altos. El efecto del pH en los procesos de sorción ya ha sido discutido por numerosos autores. Vianna *et al.* (2000), estudiando la sorción de diferentes metales por *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* y *Bacillus lentus*, llegaron a la conclusión de que, en sus organismos a estudio, la sorción del metal era debida a un proceso de atracción electrostática entre las cargas negativas presentes en los grupos fosfato y la carga positiva del metal y que, por tanto, un cambio en el pH afectaría a los posibles sitios de unión de los iones metálicos. Mapolelo y Torto (2004), llegaron a una conclusión similar aduciendo que el descenso en la capacidad de adsorción, de los diferentes metales ensayados, por *S.cerevisiae* era debido al aumento de la afinidad de los protones por los sitios de unión de la superficie de la levadura conforme descendía el pH, afinidad mayor que la presentada por los metales estudiados. Por tanto, según lo mencionado anteriormente y atendiendo a la diferencia de sorción encontrada a los 3 pHs estudiados, es muy probable que las cargas electrostáticas generadas en la superficie de *I. loihiensis* MAH1 jueguen un papel crucial en la interacción con el uranio.

Para poder entender algo más en profundidad los procesos ocurridos en la sorción del uranio, se procedió al estudio de las isothermas de sorción mediante diversos modelos matemáticos (Figura 5.4, Tabla 5.2). Los modelos de Temkin y de Langmuir fueron los que mejor representaron los datos

experimentales obtenidos a pH 2 y 3, mientras que a pH 4,3 los mejores modelos fueron los de Temkin y D-R. Mediante el ajuste de los datos experimentales a los modelos de Temkin y, y la obtención de los parámetros b , en la ecuación de Temkin, y E , para el modelo de D-R, se concluyó que ambos parámetros eran inferiores a 8 kJmol^{-1} (Tabla 5.2). Un valor situado entre 8 y 16 kJmol^{-1} indica que el proceso de sorción ocurre mediante intercambio iónico, mientras que valores inferiores a 8 kJmol^{-1} indican que el proceso de sorción ocurre mediante fuerzas físicas débiles tales como fuerzas de van der Waals y otras interacciones iónicas débiles, es decir, un proceso de adsorción (Aydin y Aksoy, 2009). Una de las condiciones del modelo de Langmuir es que todos los sitios de unión al metal poseen las mismas características de unión (en este sentido el modelo de Temkin y D-R son menos restrictivos). Por tanto, al ajustarse bien los datos experimentales de los pHs 2 y 3 al modelo, podría indicarnos una posible similitud entre los sitios de unión al metal, es decir, que la mayoría de las uniones son a un tipo de grupo específico (fosfato o carbonato o hidróxido, etc.), mientras que a pH 4,3 posiblemente exista más de un grupo funcional que interactúe con el metal, o incluso que exista algún otro proceso además de la adsorción. Además utilizando la constante K_L del modelo pudimos calcular el parámetro R_L (Figura 5.5). Los valores de R_L indicaron que el proceso de sorción fue un proceso favorable. Esto es así ya que, mientras valores de R_L comprendidos entre 0 y 1 indican que el proceso es favorable, valores superiores a 1 indican una sorción desfavorable y valores iguales a 1 o a 0 indican una sorción lineal o irreversible, respectivamente. Por último, el carácter no lineal de la gráfica tras representar R_L frente a C_0 confirmó el carácter favorable de la sorción (Figura 5.5) (Kiran y Kaushik, 2008).

En lo referente a la localización del uranio fijado, tanto a pH 4,3 como 3 se encontró uranio fijado a la pared celular y en el interior (Figura 5.6). Por una parte, el uranio fijado a la pared probablemente se encuentra unido mediante interacciones electrostáticas a grupos fosfato o, tal y como muestran los microanálisis por EDX realizados (Figura 5.7). De otro lado, el uranio encontrado en el interior celular probablemente es debido al aumento de permeabilidad o rotura de la membrana a consecuencia principalmente de factores como el bajo pH utilizado, la diferencia de osmolaridad entre la

solución “background” utilizada ($\text{NaClO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1M) y el agua de mar (medio natural de la bacteria) o a la propia toxicidad del metal bajo estas condiciones desfavorables. Esta posibilidad ya ha sido considerada por otros autores al estudiar la acumulación intracelular de diversos microorganismos como *Streptomyces sp.* (Golab y Orlowska, 1991) y *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Merroun *et al.*, 2003). El uranio, una vez dentro de la célula, se uniría a los grupos aniónicos de los diferentes componentes citoplasmáticos o precipitaría debido a cambios químicos en la solución, como el pH (Sar *et al.*, 2004). Otra posible explicación sería la existencia de mecanismos activos que transportaran el uranio al interior celular, pero hasta la fecha, a diferencia de otros metales como el Fe o el Zn, no se conocen mecanismos que puedan transportar el uranio. Por tanto se considera que el transporte al interior celular debe ser una consecuencia de la rotura o aumento de la permeabilidad de la membrana, tal y como hemos mencionado (Merroun y Selenska-Pobell, 2008). Por otro lado, solamente a pH 4,3, se localizó uranio en el EPS a muy baja concentración. A pH 2 no se pudo determinar la localización celular debido al mal estado de las células y al bajo pH utilizado. Por último, en los ensayos realizados empleando como solución “background” agua de mar el uranio se localizó principalmente en forma de gránulos densos en la pared celular, probablemente unidos a grupos fosfato, al igual que sucedía en las muestras preparadas a pH 4,3 y 3. No se localizó uranio en el interior celular, lo que puede ser indicativo del mejor estado de las células bajo estas condiciones. Tampoco se encontró uranio fijado en el EPS. La composición del EPS bacteriano ha sido ampliamente estudiada por numerosos autores. Freire-Nordi *et al.* (2005) estudiando la fijación de metales por el EPS de *Anabaena spiroides*, analizaron la composición del EPS de esta cianobacteria, concluyendo que mayoritariamente estaba formado por carbohidratos (glucosa, manosa y ramnosa, y en menor proporción ácido urónico) y proteínas. Estos autores destacan la gran importancia medioambiental que puede tener el EPS generado por *A. spiralis* en la fijación de diversos metales. Acharya *et al.* (2009), estudiando la sorción del uranio en la cianobacteria marina *Synechococcus elongatus*, encontraron que el EPS de esta bacteria jugaba un papel importantísimo en la fijación del uranio en condiciones similares al medio

marino (pH 7). En nuestro caso, como ya hemos comentado, no se encontró uranio fijado al EPS, al estudiar la fijación en agua de mar, con lo que no parece que el EPS generado por *I. loihiensis* juegue un papel tan importante en la fijación de este elemento como en el caso de *S. elongatus*.

Los datos extraídos de los análisis por TRLFS de las muestras preparadas utilizando como solución “background” perclorato sódico claramente indican la unión del uranio a grupos fosfato y carboxilo, principalmente. Las bandas de emisión obtenidas mediante TRLFS a pH 2, 3 y 4,3 en muestras secas (Figura 5.8 A, Tabla 3), son similares a las encontradas por Barkleit *et al.* (2008) y Günther *et al.*, (2008) al estudiar la especiación del uranio unido al LPS de *Pseudomonas aeruginosa* y unido a biomasa de *Chlorella vulgaris* (pH3) respectivamente. En el primer estudio, asociaron estas bandas de emisión a la unión del uranio a grupos fosfatos presentes en el LPS (sin descartar la posible implicación de grupos carboxilo), destacando que estas uniones pueden formar complejos muy estables que incluso pueden llegar a dificultar la formación de otros complejos al incrementarse el pH (ej: complejos con grupos hidroxilos a partir de pH 7). En el segundo estudio, Günther *et al.* asociaron las bandas de emisión de fluorescencia a la especiación del uranio con grupos carboxilo, siendo estos los enlaces predominantes a bajos pHs, también sin excluir la posible implicación de grupos fosfato en la especiación del uranio. En nuestro caso parece clara la implicación de ambos grupos en la especiación de este radionucléido en los 3 pHs ensayados.

En relación a la posible implicación de los grupos carboxilo, la existencia en el espectro de una banda de emisión en los 465 nm (pH 3 y 4,3) (Figura 5.8A), apoya la hipótesis de la unión a estos grupos. Esta banda de emisión también ha sido encontrada por Günther *et al.* en el estudio anteriormente mencionado que, como ya hemos dicho, subraya la importancia de los grupos carboxilo en la especiación del uranio. Otros autores han asociado bandas de emisión localizadas entre 460 y 470 nm a carbonatos de uranio, Reitz *et al.* (2010), en un estudio sobre la especiación del uranio por biomasa de *Sulfolobus acidocaldarius*, y Amayri *et al.* (2005), al caracterizar diferentes

carbonatos de uranio mediante TRLFS. En nuestro caso no parece probable la precipitación de carbonatos debido al bajo pH utilizado, pero si la especiación con grupos carboxilo presentes en la superficie e interior de la célula. En este sentido, aunque no es clara la existencia de un pico a esa longitud de onda en los ensayos a pH2, no podemos descartar la implicación de grupos carboxilos al igual que en los otros dos pHs ensayados, aunque su contribución sería menor a la de los grupos fosfato debido al hecho de que a este valor de pH muchos de los grupos carboxilos estarían protonados.

El análisis del descenso de la fluorescencia (Figura 5.9 izquierda, Tabla 5.3) concluyó en la existencia de cuatro tiempos de vida (t_1 , t_2 , t_3 y t_4), correspondiente a cuatro especies de uranio, en cada uno de los 3 pHs ensayados. De estas cuatro especies encontradas, aunque es difícil su asignación a un tipo de unión u otro, es posible que el tiempo t_4 corresponda a la unión del uranio con un grupo carboxilo. Un tiempo tan alto solo ha sido encontrado en carbonatos de uranio por autores como Amayri *et al.*, (2005) o Bernhard *et al.*, (2001) Por otro lado, los tiempos t_1 , t_2 y t_3 es posible su asignación tanto a fosfatos orgánicos como a uniones a grupos carboxilo. Reitz *et al.* (2010), encontró carbonatos con tiempos de vida muy bajos (10,9 μ s), con lo que podemos sugerir que el tiempo t_2 encontrada por nosotros podría pertenecer a una unión con grupos carboxilo, al igual que los tiempos más altos.

Las muestras estudiadas en suspensión mostraron similitudes en las bandas de emisión y diferencias en los tiempos de fluorescencia en comparación con las sólidas (Figura 5.8 B y 5.9 derecha, Tabla 5.3). Tanto las pequeñas desviaciones observadas en las bandas de emisión como las diferencias de los tiempos de vida se achacaron principalmente a la presencia de moléculas de agua en las muestras analizadas en suspensión. Algunos autores ya han descrito que los tiempos de vida pueden diferir entre una misma muestra analizada en suspensión y en seco (Arnold *et al.*, 2006). Esto es debido principalmente al efecto atenuador “quenching” que producen las moléculas de agua que rodean a la molécula de U(VI) (Geipel *et al.*, 2000). Por tanto los tiempos de vida encontrados, aunque son diferentes, pueden ser

asociados a las mismas especies antes mencionadas. También destacar que de los tiempos de vida obtenidos, el tiempo t_4 no fue posible determinarlo con exactitud.

Para los ensayos realizados, utilizando como solución “background” agua de mar y posteriormente secados, las bandas de emisión (Figura 5.10 A, Tabla 5.3) de las tres concentraciones ensayadas se encuentran en el rango de los parámetros de fluorescencia obtenidos para muestras minerales. Las diferencias existentes en las bandas de emisión de la concentración 0,1 mM con las de las otras dos concentraciones fueron debidas a la existencia de una especie (t_1) que desplazó las bandas hacia la derecha. Al sustraer de los análisis los espectros correspondientes a esta especie de uranio, los valores de las bandas de emisión de fluorescencia obtenidos fueron similares a los encontrados para las concentraciones de 0,05 y 0,01 mM. Este dato sugiere la formación de un carbonato de calcio y uranio. Este carbonato podría tratarse de un carbonato doble de ambos cationes, como, por ejemplo, la liebigita ($\text{Ca}_2\text{UO}_2[\text{CO}_3]_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Amayri *et al.* 2005 ya encontraron bandas de emisión de fluorescencia similares en este tipo de carbonatos de uranio y calcio con un tiempo de vida de 145 μs , tiempo parecido al encontrado por nosotros (t_2 concentración 0,01 y 0,05). En estudios previos, Gonzalez Muñoz *et al.* (2008) han puesto de manifiesto la capacidad de esta bacteria para inducir, en agua de mar, la precipitación de minerales tales como Ca-Mg kutnahorita ($\text{Ca}(\text{Mg},\text{Mn},\text{Fe})(\text{CO}_3)_2$) y estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), por lo que no es de extrañar la producción o precipitación de otros minerales como es el caso que nos ocupa.

Los análisis del descenso de la fluorescencia (Figura 5.11 izquierda, Tabla 5.3) pusieron de manifiesto la existencia de dos especies de uranio para las concentraciones 0,01 y 0,05 mM y de tres especies de uranio para la concentración de 0,1 mM. En el caso de las dos primeras concentraciones, el tiempo t_1 podría corresponder a la unión con fosfatos orgánicos de la pared celular o a la formación de alguna otra fase mineral como metaautunita o ranunculita, aunque, en este último supuesto, si bien las bandas de emisión de fluorescencia coinciden bien, no es así con los tiempos de vida descritos por

Geipel *et al.* (2000), para el caso de la metaautunita o ranunculita, con lo que tendrían que considerarse otras posibilidades. Panak *et al.*, (2000) ya describió bandas de emisión parecidas a las obtenidas por nosotros asociándolas a uniones con grupos fosfato de la pared celular. Por otro lado la especie con tiempo t_2 posiblemente corresponda a un carbonato de calcio y uranio como ya hemos mencionado en el párrafo anterior. En el caso de los estudios a concentración 0,1 mM, las especies con tiempos t_2 y t_3 pueden ser similares a las anteriormente propuestas para las concentraciones 0,01 y 0,05. Además se encontró una especie (t_1) que, como ya hemos dicho, desplazaba las bandas de emisión. Esta especie podría ser algún fosfato inorgánico como la saleeita ($\text{Mg}[\text{UO}_2]_2[\text{PO}_4]_2 \cdot 10[\text{H}_2\text{O}]$). En este sentido Geipel *et al.* (2000) describió para este mineral un tiempo de vida de la fluorescencia similar al obtenido por nosotros, aunque las bandas de emisión de fluorescencia descritas por ellos serían demasiado parecidas a las obtenidas sin incluir esta especie en los análisis con lo que no podría producir ese desplazamiento antes mencionado.

Los resultados obtenidos para las bandas de emisión de fluorescencia en muestras en suspensión fueron similares a los obtenidos para las muestras con biomasa secada (Figura 5.10B, Tabla 5.3). Mientras que los tiempos de vida obtenidos fueron algo distintos (Figura 5.11 derecha, Tabla 5.3). Esto fue debido no solamente a la presencia de las moléculas de agua, como ya se menciona en las muestras preparadas en perclorato sódico 0,1 mM, sino también a la presencia de numerosas sales presentes en el agua de mar, así como la existencia de especies de carbonatos en solución. En este sentido en estas muestras se encontraron para las tres concentraciones tres especies de uranio que posiblemente correspondan a carbonatos o fosfatos anteriormente descritos así como a carbonato de uranio en solución.

Para determinar la naturaleza de los complejos de uranio formados por las células de la cepa MAH1, en función del pH de la solución de uranio, así como los parámetros estructurales de los mismos se ha recurrido al uso de espectroscopia de absorción de rayos X. XAS es una técnica moderna, basada en radiación sincrotrón, utilizada para determinar tanto el estado de oxidación (X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy, XANES) como identificar el

número de átomos y sus distancias en la estructura local (Extended X-ray Absorption Fine Structure, EXAFS) de los radionucléidos y lantánidos fijados por las células bacterianas. Es una de las pocas técnicas analíticas que permite aportar información en cuanto al ambiente local de los actínidos en muestras bacterianas a concentraciones muy bajas.

Los resultados obtenidos (Figura 5.14, Tabla 5.4) indican que la especiación del uranio asociado con las células de la cepa MAH1 es dependiente del pH de la solución de uranio. A valores de pH 2 y 3 el uranio está coordinado con los grupos fosfato de origen orgánico, ya que los espectros de uranio formados por las células a estos dos valores de pH presentan gran similitud con el espectro de los complejos de uranio con fosfatos orgánicos tales como U-fructosa-6-fosfato (Koban *et al.* 2005). Estos grupos fosfato proceden, probablemente, tanto de los fosfolípidos de la membrana plasmática como del LPS de la membrana externa de la pared celular. En el caso del pH 2, tanto los datos del HREM como los del TRLFS indicaron la implicación de los fosfatos orgánicos en la acumulación de uranio por esta cepa bacteriana. Sin embargo, a pH 3, la espectroscopia TRLFS llegó a identificar además de los grupos fosfatos, los carboxilos como principales sitios de unión del uranio. El hecho de que EXAFS no llegase a poner de manifiesto el papel de los grupos carboxilo en la coordinación de uranio podría explicarse probablemente por la insensibilidad de esta técnica para detectar grupos funcionales que jueguen un papel minoritario en la especiación de este radionucléido.

Los parámetros estructurales de los complejos de uranio formados por las células de MAH1 a pH 4,3 son similares a los de los complejos formados por la capa S de *B. sphaericus* JG-A12 (Merroun *et al.* 2005). En este caso el uranio estaría coordinado tanto a grupos carboxilo como a grupos fosfato. Estos resultados estarían de acuerdo con los del TRLFS.

Este trabajo demuestra el efecto del pH (2, 3, y 4,3) sobre la especiación de uranio asociado a las células de MAH1 (grupos fosfato en el caso de pH 2 y 3; y fosfato y carboxilo para el pH 4,3). Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por Kelly *et al.* (2002) que demostraron la implicación

de los grupos fosfato de la pared celular de *B. subtilis* en la coordinación del uranio a valores de pH 1,5 y grupos fosfato y carboxilo a valores de pH entre 3 y 4,5.

Esta dependencia se debe sobre todo a los cambios químicos de la pared celular de esta bacteria en función del pH ya que al aumentar el pH de la solución de contacto, ocurre una deprotonación de los grupos carboxilo (a partir del pH 3). Por lo tanto, cabe esperar que a pH 2 y 3 los grupos mayoritarios implicados en la unión del uranio sean fosfato ya que en estas condiciones los grupos carboxilo están protonados. A pH 4,3, los carboxilos pierden protones y se encuentran disponibles para la coordinación del uranio.

5.5. Bibliografía

- Acharya, C., Joseph, D., Apte, S.K. (2009). "Uranium sequestration by a marine cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* strain BDU/75042". *Bioresource Technology*, 100 (7), 2176-2181.
- Ahalya, N., Ramachandra, T.V., Kanamadi, R.D. (2003). "Biosorption of heavy metals". *Research Journal of Chemistry and Environment*, 7(4), 71-79.
- Amayri, S., Reich, T., Arnold, T., Geipel, G., Bernhard, G. (2005). "Spectroscopic characterization of alkaline earth uranyl carbonates". *Journal of Solid State Chemistry*, 178 (2 SPEC. ISS.), 567-577.
- Ankudinov, A.L., Ravel, B., Rehr, J.J., Conradson, S.D. (1998). "Real-space multiple-scattering calculation and interpretation of x-ray-absorption near-edge structure". *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, 58 (12), 7565-7576.
- Arnold, T., Utsunomiya, S., Geipel, G., Ewing, R.C., Baumann, N., Brendler, V. (2006). "Adsorbed U(VI) surface species on muscovite identified by laser fluorescence spectroscopy and transmission electron microscopy" *Environmental Science and Technology*, 40 (15), 4646-4652.
- Aydin, Y.A., Aksoy, N.D. (2009). "Adsorption of chromium on chitosan: Optimization, kinetics and thermodynamics". *Chemical Engineering Journal*, 151 (1-3), 188-194.
- Basha, S., Murthy, Z.V.P., Jha, B. (2008). "Isotherm modeling for biosorption of Cu(II) and Ni(II) from wastewater onto brown seaweed, *Cystoseira indica*". *AIChE Journal*, 54 (12), 3291-3302.
- Barkleit, A., Moll, H., Bernhard, G. (2008). "Interaction of uranium (VI) with lipopolysaccharide". *Dalton Transactions*, 21, 2879-2886.
- Bernhard G., Geipel G., Reich T., Brendler V., Amyri S., Nitsche H. (2001). "Uranyl(VI) carbonate complex formation: validation of the $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq.})$ species". *Radiochimica Acta*, 89, 511-518.
- Bhaskar, P.V., Bhosle, N.B. (2006). "Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain". *Environment International*, 32 (2), 191-198.

Estudios sobre la interacción del uranio con Idiomarina loihiensis MAH1

- Bitton, G., Freihofer, V. (1977). "Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*". *Microbial Ecology*, 4 (2), 119-125.
- Bonhoure, I., Meca, S., Marti, V., De Pablo, J., Cortina, J.-L. (2007). "A new time-resolved laser-induced fluorescence spectrometry (TRLFS) data acquisition procedure applied to the uranyl-phosphate system". *Radiochimica Acta*, 95 (3), 165-172.
- Brendler V., Geipel G., Bernhard G., Nitsche H. (1996). "Complexation in the system $UO_2^{2+}/PO_4^{3-}/OH^-$ (aq.): Potentiometric and Spectroscopic Investigations at very Low Ionic Strengths". *Radiochimica Acta*, 74, 75-80.
- Brottka, K. (2003). "Biologisierte Keramiken zur Reinigung schwermetallbelasteter Abwaesser". Tesis de diplomatura, Universidad Técnica de Dresden, Alemania.
- Choi, J., Lee, J.Y., Yang, J.S. (2009). "Biosorption of heavy metals and uranium by starfish and *Pseudomonas putida*". *Journal of Hazardous Materials*, 161 (1), 157-162.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M. (2006). "Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods". *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (1-2), 237-245.
- Courrat, A., Lobry, J., Nicolas, D., Laffargue, P., Amara, R., Lepage, M., Girardin, M., Le Pape, O. (2009). "Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81 (2), 179-190.
- Dahiya, S., Tripathi, R.M., Hegde, A.G. (2008). "Biosorption of heavy metals and radionuclide from aqueous solutions by pre-treated arca shell biomass". *Journal of Hazardous Materials*, 150 (2), 376-386.
- Donachie, S.P., Hou, S., Gregory, T.S., Malahoff, A., Alam, M. (2003). "*Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic γ -proteobacterium from the Loihi submarine volcano, Hawaii". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (6), 1873-1879.

- Dubinín, M.M., Radushkevich, L.V. (1947). "Equation of the characteristic curve of activated charcoal". Proceedings of the Academy Sciences, Physical Chemistry Section, USSR 55, 331–333.
- Eliet, V., Bidoglio, G., Omenetto, N., Parma, L., Grenthe, I. (1995). "Characterisation of hydroxide complexes of uranium(VI) by time-resolved fluorescence spectroscopy". Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 91 (15), 2275-2285.
- Ewan, K.B.R., Pamphlett, R. (1996). "Increased inorganic mercury in spinal motor neurons following chelating agents". NeuroToxicology, 17 (2), 343-350.
- Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H., Nascimento, O.R. (2005). "The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: An EPR study". Process Biochemistry, 40 (6), 2215-2224.
- Freundlich, H.M.F. (1906). "Über die adsorption in Lösungen". Zeitschrift für Physikalische Chemie, 57, 385-470.
- Gadd, G.M. (2009). "Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment". Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84 (1), 13-28.
- García-Orellana, J., Pates, J.M., Masqué, P., Bruach, J.M., Sánchez-Cabeza, J.A. (2009). "Distribution of artificial radionuclides in deep sediments of the Mediterranean Sea". Science of the Total Environment, 407 (2), 887-898.
- Geipel, G., Bernhard, G., Rutsch, M., Brendler, V., Nitsche, H. (2000). "Spectroscopic properties of uranium (VI) minerals studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS)". Radiochimica Acta, 88 (9-11), 757-762.
- Golab, Z., Orłowska, B., Smith, R.W. (1991). "Biosorption of lead and uranium by *Streptomyces* sp." Water, Air, and Soil Pollution, 60 (1-2), 99-106.
- González-Muñoz, M.T., De Linares, C., Martínez-Ruiz, F., Morcillo, F., Martín-Ramos, D., Arias, J.M. (2008). "Ca-Mg kutnahorite and struvite production by *Idiogramina* strains at modern seawater salinities". Chemosphere, 72 (3), 465-472.
- Gorman-Lewis, D., Elias, P.E., Fein, J.B. (2005). "Adsorption of aqueous uranyl complexes onto *Bacillus subtilis* cells". Environmental Science and Technology, 39 (13), 4906-4912.

Estudios sobre la interacción del uranio con Idiogramina loihiensis MAH1

- Günther A., Geipel G., Bernhard G. (2007). "Complex formation of uranium(VI) with the amino acids L-glycine and L-cysteine: a fluorescence emission and UV-Vis absorption study". *Polyhedron*, 26 (1), 59-65.
- Günther, A., Raff, J., Geipel, G., Bernhard, G. (2008). "Spectroscopic investigations of U(VI) species sorbed by the green algae *Chlorella vulgaris*". *BioMetals*, 21 (3), 333-341.
- Gustafsson, J.P., Dässman, E., Bäckström, M. (2009). "Towards a consistent geochemical model for prediction of uranium (VI) removal from groundwater by ferrihydrite". *Applied Geochemistry*, 24 (3), 454-462.
- Haferburg, G., Kothe, E. (2007). "Microbes and metals: Interactions in the environment". *Journal of Basic Microbiology*, 47 (6), 453-467.
- Haferburg, G., Merten, D., Büchel, G., Kothe, E. (2007). "Biosorption of metal and salt tolerant microbial isolates from a former uranium mining area. Their impact on changes in rare earth element patterns in acid mine drainage". *Journal of Basic Microbiology*, 47 (6), 474-484.
- Hennig, C., Panak, P.J., Reich, T., Roßberg, A., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Matz, W., Bucher, J.J., Bernhard, G., Nitsche, H. (2001). "EXAFS investigation of uranium (VI) complexes formed at *Bacillus cereus* and *Bacillus sphaericus* surfaces". *Radiochimica Acta*, 89 (10), 625-631.
- Hou, S., Saw, J.H., Lee, K.S., Freitas, T.A., Belisle, C., Kawarabayasi, Y., Donachie, S.P., Pikina, A., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Omelchenko, M.V., Sorokin, A., Wolf, Y.I., Li, Q.X., Keum, Y.S., Campbell, S., Denery, J., Aizawa, S., Shibata, S., Malahoff, A., Alam, M. (2004). "Genome sequence of the deep-sea γ -proteobacterium *Idiogramina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (52), 18036-18041.
- Iyer, A., Mody, K., Jha, B. (2005). "Biosorption of heavy metals by a marine bacterium". *Marine Pollution Bulletin*, 50 (3), 340-343.
- Kelly, S. D., K. M. Kemner, J. B. Fein, D. A. Fowle, M. I. Boyanov, B. A. Bunker, and N. Yee. (2002). "X-ray absorption fine structure determination of pH-dependent U-bacterial cell wall interactions". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 3855-3871.

Estudios sobre la interacción del uranio con Idiogramina loihiensis MAH1

- Kiran, B., Kaushik, A. (2008). "Chromium binding capacity of *Lyngbya putealis* exopolysaccharides". *Biochemical Engineering Journal*, 38 (1), 47-54.
- Koban, A., Geipel, G., Roßberg, A., Bernhard, G. (2004). "Uranyl(VI) complexes with sugar phosphates in aqueous solution". *Radiochimica Acta*, 92, 903-908
- Langmuir, I. (1928). "The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum". *Journal of American Chemistry Society*, 40, 1361-1403.
- Malik, A. (2004). "Metal bioremediation through growing cells". *Environment International*, 30 (2), 261-278.
- Mapolelo, M., Torto, N. (2004). "Trace enrichment of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*". *Talanta*, 64 (1), 39-47.
- Mendiguchía, C., Moreno, C., Manuel-Vez, M.P., García-Vargas, M. (2006). "Preliminary investigation on the enrichment of heavy metals in marine sediments originated from intensive aquaculture effluents". *Aquaculture* 254 (1-4): 317-325.
- Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S. (2001). "Interactions of three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with U(VI)". *BioMetals*, 14 (2), 171-179.
- Merroun, M., Hennig, C., Rossberg, A., Reich, T., Selenska-Pobell, S. (2003). "Characterization of U(VI)-*Acidithiobacillus ferrooxidans* complexes using EXAFS, transmission electron microscopy, and energy-dispersive X-ray analysis". *Radiochimica Acta*, 91 (10), 583-591.
- Merroun, M.L., Raff, J., Rossberg, A., Hennig, C., Reich, T., Selenska-Pobell, S. (2005). "Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12". *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5532-5543.
- Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S. (2008). "Bacterial interactions with uranium: An environmental perspective". *Journal of Contaminant Hydrology*, 102 (3-4), 285-295.
- Moore, J.N. (1990). "Hazardous wastes from large-scale metal extraction: A case study". *ESandT Contents*, 24 (9), 1278-1285.

*Estudios sobre la interacción del uranio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

- Nedelkova, M., Merroun, M.L., Rossberg, A., Hennig, C., Selenska-Pobell, S. (2007). "Microbacterium isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium". *FEMS Microbiology Ecology*, 59 (3), 694-705.
- Panak, P.J., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Geipel, G., Bernhard, G., Nitsche, H. (2000). "Complex formation of U(VI) with *Bacillus*-isolates from a uranium mining waste pile". *Radiochimica Acta*, 88 (2), 71-76.
- Papucci, C., Charmasson, S., Delfanti, R., Gasco, C., Mitchell, P. and Sanchez-Cabeza, J.A. (1996). "Time evolution and levels of man-made radioactivity in the Mediterranean Sea". En: Guegueniat, P. *et al.*, 1996. *Radionuclides in the oceans inputs and inventories* Les Editions de Physique, Les Ulis, 176–197.
- Park, D., Yun, Y.-S., Kim, J.Y., Park, J.M. (2007). "Reliable evidences that the removal mechanism of hexavalent chromium by natural biomaterials is adsorption-coupled reduction". *Chemosphere*, 70 (2), 298-305.
- Periáñez, R. (2006). "Modelling surface radioactive spill dispersion in the Alborán Sea". *Journal of Environmental Radioactivity*, 90 (1), 48-67.
- Pickering, I.J., George, G.N. (1995). "Polarized X-ray absorption spectroscopy of cupric chloride dihydrate". *Inorganic Chemistry*, 34 (12), 3142-3152.
- Poggio, L., Vrščaj, B., Schulin, R., Hepperle, E., Ajmone Marsan, F. (2009). "Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy)". *Environmental Pollution*, 157 (2), 680-689.
- Pollmann, K., Raff, J., Merroun, M., Fahmy, K., Selenska-Pobell, S. (2006). "Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications". *Biotechnology Advances*, 24 (1), 58-68.
- Quigley, M.S., Santschi, P.H., Hung, C.-C., Guo, L., Honeyman, B.D. (2002). "Importance of acid polysaccharides for ²³⁴Th complexation to marine organic matter". *Limnology and Oceanography*, 47 (2), 367-377.
- Reitz, T., Merroun M.L., Rossberg, A., Selenska-Pobell, S. (2010). "Biosorption and biomineralization of U(VI) by cells of *Sulfolobus acidocaldarius* at moderate acidic conditions". *Geobiology* (In Press).
- Reynolds, E.S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy". *Journal of Cell Biology* 17, 208.

*Estudios sobre la interacción del uranio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

- Ribeiro, J.P.N., Lopes, J.A., Fachini, A. (2008). "Cleansing contaminated seawaters using marine cyanobacteria: Evaluation of trace metal removal from the medium". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 88 (10), 701-710.
- Rodriguez Valera, F., Ruiz Berraquero, F., Ramos Cormenzana, A. (1981). "Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations". *Microbial Ecology*, 7 (3), 235-243.
- Rosbach S., Wilson T., Kukuk M., Carty H. (2000). "Elevated zinc induces siderophore biosynthesis genes and zntA-like gene in *Pseudomonas fluorescens*". *FEMS Microbiology Letters*, 191, 61-70.
- Sandau, E., Sandau, P., Pulz, O., Zimmermann, M. (1996). "Heavy metal sorption by marine algae and algal by-products". *Acta Biotechnologica*, 16 (2-3), 103-119.
- Sar, P., K. Kazy, S., D'Souza, S.F. (2004). "Radionuclide remediation using a bacterial biosorbent". *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54 (2-3), 193-202.
- Shashank, H., Savita, K., Bharathi, P.A.L. (2002). "Mercury and lead tolerance in hypersaline sulfate-reducing bacteria". *Marine Pollution Bulletin*, 44 (8), 726-732.
- Stoppel, T., Schlegel, H.G. (1989). "Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes". *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 315-328.
- Suzuki, Y., Banfield, J.F. (2004). "Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site". *Geomicrobiology Journal*, 21 (2), 113-121.
- Temkin, M.I., Pyzhev, V. (1940). "Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalysts". *Acta Physicochimica USSR* 12, 217-222.
- Tsuruta, T. (2002). "Removal and recovery of uranyl ion using various microorganisms". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94 (1), 23-28.

- Tsuruta, T. (2004). "Cell-associated adsorption of thorium or uranium from aqueous system using various microorganisms". *Water, Air, and Soil Pollution*, 159 (1), 35-47.
- Van Nostrand, J.D., Khijniak, T.V., Gentry, T.J., Novak, M.T., Sowder, A.G., Zhou, J.Z., Bertsch, P.M., Morris, P.J. (2007). "Isolation and characterization of four Gram-positive nickel-tolerant microorganisms from contaminated sediments" *Microbial Ecology*, 53 (4), 670-682.
- Vianna, L.N.L., Andrade, M.C., Nicoli, J.R. (2000). "Screening of waste biomass from *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus lentus* fermentations for removal of Cu, Zn and Cd by biosorption". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (5), 437-440.
- Vieira, R.H.S.F., Volesky, B. (2000). "Biosorption: a solution to pollution?". *International Microbiology*, 3 (1), 17-24.
- Vijayaraghavan, K., Jegan, J.R., Palanivelu, K., Velan, M. (2004). "Copper removal from aqueous solution by marine green alga *Ulva reticulata*". *Electronic Journal of Biotechnology*, 7 (1), 68-78.
- Volesky, B. (1990). "Removal and recovery of heavy metals by biosorption". En: Volesky, B. *et al.*, 1990. *Biosorption of heavy metals*, CRC Press, Boca Raton, Fla, 7-44.
- Zhao, M., Duncan, J.R., Van Hille, R.P. (1999). "Removal and recovery of zinc from solution and electroplating effluent using *Azolla filiculoides*". *Water Research*, 33 (6), 1516-1522.

***Capítulo 6. Estudios sobre la
interacción del lantano y europio
con *Idiomarina loihiensis* MAH1***

6.1. Introducción

Los grupos de los lantánidos (o REEs, del inglés “Rare earth elements”) y actínidos se encuentran formados por una serie de elementos cuyo uso se ha extendido rápidamente durante los últimos años. En el caso de los lantánidos, han proliferado mucho los estudios encaminados a su uso en la medicina, como agentes antitumorales para enfermos de cáncer (Kostova, 2005), contra la osteodistrofia renal (Malluche *et al.*, 2008) o para el tratamiento de la hiperfosfatemia en enfermos renales (Szeki y Hutchison, 2009). También se han utilizado en la industria agraria, como fertilizantes en forma de $\text{REE}(\text{NO}_3)_3$ (Tyler y Olsson, 2005; D'Aquino *et al.*, 2009) y en la fabricación de muchos objetos de la vida cotidiana tales como cristales, cerámicas, bombillas y materiales fluorescentes. En el caso de los actínidos, el desarrollo de su uso ha estado más relacionado con las industria de la energía y la armamentística (Gavrilescu *et al.*, 2009), aunque tienen importancia, en menor medida, en otras ramas como en la medicina o, al igual que algunos lantánidos, en la fabricación de cerámicas y cristales.

Si bien hoy día se discute tanto el posible impacto medioambiental como el posible efecto perjudicial de los lantánidos en el ser humano (Feng *et al.*, 2006; Damment *et al.*, 2007), sí que se conoce ampliamente el efecto de los actínidos en este sentido. Desde el punto de vista de la salud humana, el uranio se ha asociado a daños renales (World Health Organization, 2005) y a diferentes tipos de cáncer como el de pulmón (Schubauer-Berigan *et al.*, 2009), y el contacto con torio, plutonio, americio o curio, se considerado como factor de riesgo en relación al cáncer (Canu *et al.*, 2008; Sokolnikov *et al.*, 2008) debido, en gran medida, a la emisión de partículas alfa y partículas beta que provocan (Nankawa *et al.*, 2006; Lee *et al.* 2009). Además se ha demostrado que el curio [Cm(III)] puede sustituir al calcio en numerosos procesos fisiológicos (Evans, 1983). Desde el punto de vista medioambiental, muchos de estos elementos pueden pasar a la atmosfera (Kulkarni *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 2009) y a los acuíferos para, en última instancia desembocar en ríos y océanos (Singer *et al.*, 2009).

En los ambientes acuáticos, la distribución y concentración de los elementos traza disueltos, entre los que se pueden incluir tanto lantánidos como actínidos, se encuentra sujeta entre otros factores (como el pH y E_H) a las interacciones de estos elementos con las partículas suspendidas (Kuss *et al.*, 2001). En este sentido las bacterias y otros microorganismos juegan un papel fundamental, ya que son capaces de influenciar y regular las condiciones químicas de los ambientes locales en los que se desarrollan. Haese (2000) incluso ha llegado a mencionar que en muchos microambientes los flujos y ciclos de los iones metálicos están controlados exclusivamente por las actividades biológicas. Este control afecta incluso a actínidos y lantánidos, aun cuando estos no son necesarios para las funciones celulares y su química difiere de otros metales más comunes y, de hecho, su especiación y distribución, tanto en fases sólidas como en solución, se ve afectada por las bacterias (Francis, 1998; Lloyd *et al.*, 2001; Fredrickson *et al.*, 2004; Lloyd and Renshaw, 2005; Suzuki and Banfield, 2005). Una mejor comprensión de los mecanismos mediante los que las bacterias pueden influir en los ciclos de estos elementos, y en su movilización y/o inmovilización, parece indispensable para poder evaluar el posible impacto medioambiental de vertidos de estos elementos en ambientes acuáticos así como el posible riesgo para humanos, plantas y animales. Por tanto, se hace necesario la realización de estudios en mayor profundidad sobre la especiación de lantánidos y actínidos en estos ambientes, así como de su interacción con los microorganismos presentes en ellos y capaces de influir en la biodisponibilidad y, por tanto, capaces de reducir el su posible impacto en el medioambiente. Muchos estudios se han llevado a cabo sobre las interacciones de microorganismos con actínidos hexavalentes, [ej. uranio (VI)] (Merroun *et al.* 2001; 2003; 2005; 2006). Sin embargo, las investigaciones de la especiación de actínidos trivalentes (curio, americio, etc.) asociados con bacterias son muy escasas debido a la dificultad que supone la manipulación de estos elementos radioactivos que requiere el uso de laboratorios especializados y con las licencias oportunas. Para superar estas dificultades se recurre a los estudios de interacciones microbianas con lantánidos trivalentes que se usan como análogos inactivos de los actínidos trivalentes.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

En este sentido, el objetivo del presente trabajo es estudiar diferentes aspectos de la interacción de los lantánidos trivalentes (lantano y europio) con la bacteria *Idiomarina loihiensis* MAH1, aislada del Mar de Alborán, (González-Muñoz *et al.*, 2008) con vistas entender mejor los mecanismos de interacción de bacterias de ambientes naturales con estos elementos, y actínidos análogos, y del posible impacto de la contaminación de estos elementos sobre los microorganismos de ambientes naturales. Con esta finalidad se eligió esta bacteria debido a la amplia distribución que presenta el género *Idiomarina* en diversos ambientes marinos (zonas de volcanes submarinos, superficie y profundidades oceánicas, arena de playas y salinas), así como por la presencia de algunas características fenotípicas que la hacen una buena candidata para ensayos de sorción de metales pesados. En cuanto al lantano y el europio se han elegido como análogos inactivo de los actínidos trivalentes tales como el curio (Cm) o el americio (Am) (Kazy *et al.*, 2006), presentes en los desechos radioactivos resultantes de las industrias nucleares cuyos vertidos, en ocasiones, van a parar al mar. En este sentido, el europio, además de poseer propiedades químicas similares a la del curio y otros actínidos trivalentes, tiene la ventaja de presentar también propiedades luminiscentes similares, siendo por tanto un buen candidato a la hora de su uso en estudios con espectroscopia TRLFS (del inglés “Time-Resolved Laser-induced Fluorescence Spectroscopy”, espectroscopia de fluorescencia inducida por láser en tiempo resuelto).

Para llevar a cabo estos objetivos se ha utilizado una metodología multidisciplinar, combinando estudios de tolerancia y sorción, con microscopia electrónica de transmisión de alta resolución (HREM, del inglés “High Resolution transmission Electron Microscopy”) acoplado a microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX, del inglés “Energy dispersive X-ray”) y espectroscopia TRLFS. La espectroscopia TRLFS es una herramienta muy útil que ha sido utilizada en la determinación del estado químico y especiación de elementos con propiedades de fluorescencia (Stephan *et al.*, 2005; Günther *et al.*, 2008; Skerencak *et al.*, 2009), así como para la determinación del entorno de coordinación de las moléculas de un metal, con propiedades de fluorescencia (Eu⁺³, Cm⁺³, etc.), fijado a una superficie sólida o a una bacteria

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis**
MAH1

en presencia de agua (Ozaki *et al.*, 2006; Thakur *et al.*, 2009). Además la espectroscopia TRLFS es perfecta para la detección del europio a bajas concentraciones ya que posee un límite de detección de $8 \cdot 10^{-10}$ mol/L. Esto es de gran utilidad ya que las concentraciones de europio en el medio marino son muy bajas. Gracias a esta técnica podemos realizar ensayos en condiciones similares a las encontradas en el agua de mar.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Microorganismos

La bacteria utilizada para este estudio fue *Idiomarina loihiensis* MAH1, perteneciente a nuestra colección de cultivos y aislada del Mar de Alborán. Además, para el estudio de la tolerancia al lantano, se utilizaron bacterias cercanas filogenéticamente: *Idiomarina loihiensis* L2TR (DSMZ 15497), *Idiomarina báltica* OS145 (DSMZ 15154) e *Idiomarina abyssalis* KMM227 (ATCC BAA-312).

6.2.2. Medios de cultivo y soluciones empleadas

- **Medio para el crecimiento y mantenimiento de las cepas**

Se utilizó el medio “Marine Broth” (DIFCO) para el mantenimiento de las cepas así como para la obtención de biomasa para los diferentes experimentos. Su composición se describe a continuación:

Medio “Marine Broth” (MB y MBs ¹)			
Peptona	5 g	NaHCO ₃	0,16 g
Extracto de levadura	1 g	KBr	0,08 g
C ₆ H ₅ O ₇ Fe	0,1 g	SrCl ₂	34 mg
NaCl	19,4 g	H ₃ BO ₃	22 mg
MgCl ₂	5,9 g	Na ₂ SiO ₃	4 mg
Na ₂ SO ₄	3,24 g	NaF	2,4 mg
CaCl ₂	1,8 g	NH ₄ NO ₃	1,6 mg
KCl	0,55 g	Na ₂ HPO ₄	8 mg
Agar ¹	20 g	Agua destilada	1000 ml

MBs: Variante sólida del medio MB

- **Solución madre de lantano y europio**

Se preparó una solución madre 1 M de nitrato de lantano [La(NO₃)₃·6H₂O] disolviendo la cantidad correspondiente en solución “background” de perclorato sódico 0,1 M (NaClO₄ · H₂O). La solución se esterilizó mediante filtración, con filtros millipore de 0,45 µm de poro, y se conservó hasta su uso a una temperatura de 4 °C. La solución madre se utilizó posteriormente para preparar las diferentes soluciones de contacto, según las condiciones de cada experimento. Para la preparación de la solución madre de europio se partió de

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

un preparado comercial (Merck) cuya composición es: 1g/l de Eu_2O_3 en solución acuosa 2-3 % HNO_3 . A partir de esta solución se preparó la solución madre 1mM de Eu^{+3} añadiendo la cantidad correspondiente del preparado comercial en una solución 0,1 M de HClO_4 .

- **Medio para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del lantano**

La CMI del lantano se determinó utilizando un medio bajo en fosfatos que denominamos LBT y cuya composición describimos a continuación:

Medio LBT	
Triptona	2 g
Solución de sales	10 ml
Agar	2 g
Agua destilada	100 ml

La solución de sales se preparó según lo descrito por Rodríguez-Valera *et al.* (1981).

Solución de Sales	
NaCl	51.3 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	9 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
KCl	1,3 g
NaCO_3H	0,05 g
NaBr	0,15 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,7 ml
Agua destilada	1000

El $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se preparó como una solución al 0,5 % p/v en agua destilada para posteriormente añadir 0,7 ml a la solución de sales.

Una vez esterilizado el medio (121 °C, 15 min), se adicionó la solución de nitrato de lantano hasta alcanzar las siguientes concentraciones: 0,25 mM, 0,5 mM; 1mM; 2mM; 4mM; 8mM y 16mM.

6.2.3. Preparación de la biomasa para los diferentes experimentos

La biomasa fue obtenida a partir de cultivos de 24 h de la bacteria en medio MB. La biomasa se recogió por centrifugación (12000 rpm, 20 min) y se lavó dos veces con perclorato sódico 0,1 M para retirar los restos de medio de cultivo (salvo para los experimentos de CMI del lantano, en cuyo caso se lavó con NaCl al 1 %). Por último, el pellet se resuspendió en la misma solución de lavado ajustando la densidad óptica a 0,530 aproximadamente ($\lambda = 620$ nm).

6.2.4. Determinación del peso seco

Aunque todos los experimentos de contacto bacteria/lantano se llevaron a cabo utilizando biomasa húmeda, se necesitó determinar el peso seco para poder calcular posteriormente la cantidad de lantano fijado por gramo de biomasa seca y para poder ajustar los datos experimentales obtenidos a los diferentes modelos matemáticos.

Para determinar el peso seco, una vez preparada la suspensión bacteriana según el apartado 6.2.3, se distribuyó en tubos a razón de 25 ml y se centrifugó (8000 rpm, 10 min). El pellet obtenido de cada uno de los tubos se resuspendió en 1 ml de solución salina (NaCl 0,9 %) y se transfirió a un tubo eppendorf (tubos previamente secados y pesados). Se volvió a obtener la biomasa por centrifugación (10000 rpm, 10 min) y se secó en una estufa a 70 °C durante 24 horas. A continuación se determinó el peso usando una balanza de precisión Sartorius LA 120S. A la densidad óptica ajustada, a 25 ml del cultivo corresponden aproximadamente a 6,5 mg de biomasa seca.

6.2.5. Estudio de la tolerancia al lantano

Para estudiar la tolerancia al lantano de *I. loihiensis* MAH1, y otras bacterias cercanas filogenéticamente, se procedió a determinar la CMI del lantano. Para ello, se prepararon placas de medio LBT con las concentraciones antes descritas de nitrato de lantano (por triplicado), posteriormente cada placa se dividió en 4 sectores y cada sector se inoculó con 2 μ l de las suspensiones bacterianas, preparadas según el apartado 6.2.3. Las placas se incubaron a 28 °C y se revisaron periódicamente.

6.2.6. Cinética de sorción del lantano

Para la realización de la cinética de sorción se tomaron alícuotas de 25 ml de la suspensión preparada según el apartado 6.2.3 y el pellet obtenido se resuspendió en 10 ml de la solución de contacto (solución de nitrato de lantano 0,5 mM a pH 5 y usando como solución “background” perclorato sódico 0,1 M). Los tiempos de contacto utilizados fueron 5, 10, 20, 30, 60 min, 24, 48 y 72 h, incubándose en todos los casos a 28 °C y agitación (se prepararon 3 réplicas por cada tiempo).

Tras el periodo de contacto, se centrifugaron las muestras y se tomó 1 ml del sobrenadante de cada una de ellas para, posteriormente, determinar la cantidad de lantano presente mediante Espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS, del inglés “Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry”). La cantidad de metal fijado por gramos de biomasa seca se determinó mediante un balance de masa del metal según la ecuación (Volesky 1990):

$$(1) q = \frac{V (C_i - C_f)}{m}$$

Donde q son los mg de lantano fijados por gramo de biomasa seca, V es el volumen de la muestra en litros, C_i y C_f son las concentraciones inicial y final del metal en la solución (mgL^{-1}) y m la cantidad de biomasa seca (g).

6.2.7. Isotermas de sorción del lantano

Para la realización de las isotermas de sorción se prepararon soluciones de contacto a 3 pHs diferentes (2, 3 y 5), utilizando seis concentraciones distintas (0,015; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5 mM) para cada pH. El proceso de preparación de las muestras fue similar al descrito en el apartado anterior. El tiempo de contacto en todos los casos fue de 48 horas, a 28 °C y agitación, realizándose 3 réplicas por cada tratamiento. Por último, tras determinar la cantidad de lantano fijado mediante la ecuación anteriormente descrita, se procedió al análisis de los datos obtenidos mediante el uso de los modelos matemáticos de Langmuir (1918) (2), Freundlich (1906) (3), Temkin (1940)

(4) y Dubinin-Radushkevich (D-R) (1947) (5) reflejados en las ecuaciones siguientes:

$$(2) q_e = q_{max} \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (3) q_e = K_F C_e^{(1/n)}$$

$$(4) q_e = \frac{RT}{b} \ln (a C_e)$$

$$(5) q_e = q_{max} \exp \left\{ -B \left(RT \ln \left[1 + \frac{1}{C_e} \right] \right)^2 \right\} ; \varepsilon = RT \ln \left[1 + \frac{1}{C_e} \right]$$

En las que q_e es la cantidad de metal fijado, q_{max} la capacidad máxima de sorción de la monocapa saturada, K_L la constante de sorción en el equilibrio (l/mg), K_F una constante relacionada con la capacidad de sorción, C_e la concentración del metal en el equilibrio (mg/l), n constante relacionada con la intensidad de la sorción, R la constante de los gases (8,314 J/mol °K), T la temperatura absoluta (K), b la constante de Temkin (kJ/mol), a la constante de la isoterma de Temkin (l/g), B la constante de la isoterma de Dubinin-Radushkevich y ε el potencial de Polanyi. Para este último modelo también se calculó la energía libre de sorción (E) (kJ/mol) mediante la ecuación:

$$(6) E = (2B)^{-0.5}$$

Para determinar si el proceso de sorción fue favorable, no favorable, lineal o irreversible, se estudió el factor de separación (R_L) mediante la siguiente ecuación:

$$(7) R_L = \frac{1}{(1 + K_L C_0)}$$

Donde C_0 es la concentración de metal inicial y K_L la constante de sorción en el equilibrio según el modelo de Langmuir (Kiran y Kaushik, 2008).

6.2.8. Efecto del pH

El efecto del pH se estudió utilizando una solución de contacto de nitrato de lantano 0,5 mM (a pH 2, 3, 4, 5 y 6, usando como solución background perclorato sódico 0,1 M). La biomasa se preparó según lo descrito en el apartado 6.2.3 y el pellet obtenido (de 25 ml de la suspensión) se resuspendió

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

en 10 ml de las soluciones de contacto y se incubó en agitación a 28 °C durante 48 h (3 replicas por cada pH). Por último se retiró la biomasa de la solución y se determinó la cantidad de metal presente en la solución mediante ICP-MS. La cantidad de metal fijado por gramo de biomasa seca se determinó mediante la ecuación (1).

6.2.9. Espectroscopia de fluorescencia inducida por láser en tiempo resuelto (TRLFS) de los complejos de europio-*I. loihiensis* MAH1

- **Preparación de las muestras**

Para la preparación de las muestras a analizar mediante TRLFS se utilizaron dos tipos de soluciones de contacto:

1. Muestras preparadas en perclorato sódico

Se prepararon soluciones de contacto de óxido de europio a las siguientes concentraciones y pHs: 0,01 mM (pH 3, 5 y 7) y 0,5 mM (pH 2, 3 y 5) en solución acuosa de perclorato sódico 0,1 M. La biomasa fue preparada tal y como se describió en el apartado 6.2.3; se recogió la biomasa, se resuspendió en 10 ml de la solución de europio y se puso en agitación a 28 °C, al igual que en la realización de la cinética e isotermas. Tras un periodo de 24 horas se procedió a extraer 1 ml para su análisis por TRLFS. Esto mismo se repitió a las 48 horas de incubación.

2. Muestras preparadas en agua de mar

El proceso fue similar al descrito en el punto 1 de este apartado, salvo el hecho de que las soluciones de óxido europio (0,01 y 0,1 mM) se prepararon en agua de mar.

- **Análisis de las muestras por TRLFS**

Las medidas por TRLFS se realizaron en la unidad de radioactividad del centro de investigación Dresden-Rossendorf en Dresden (Alemania). Como fuente de excitación se utilizó un haz pulsado generado por un láser Nd:Yag-OPO (Inlite Continuum Inc., Santa Clara, Usa). El espectro de emisión de la fluorescencia se recogió mediante un sistema óptico multicanal compuesto de

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

un monocromador (Oriel MS 257), un espectrógrafo con diferentes rejillas y una cámara ICCD (CCD intensificado) (Andor iStar). La longitud de onda del haz utilizado fue de 395 nm. El espectro de fluorescencia del europio se recogió desde los 570 a 640 nm.

Las bandas de emisión y los tiempos de vida de los espectros obtenidos fueron analizados mediante el programa Origin 8.0 (OriginLab Ltd., USA). Para el análisis de las bandas de emisión se utilizó el módulo Peakfitting ajustando los picos del espectro a un modelo teórico de función de tipo Lorentz. Para el de los tiempos de vida se realizó un análisis de curvas no lineales utilizando ecuaciones de disminución exponencial de 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} orden. El número de moléculas de agua de la esfera de coordinación de europio fue calculado siguiendo la siguiente ecuación (8) (Kimura *et al.*, 1996):

$$(8) nH_2O \pm 0.5 = 1.07 \cdot \frac{1}{\tau}$$

Donde n es el número de moléculas de agua y τ el tiempo de vida.

6.2.10. Estudio de la localización celular del lantano y europio fijado por *I. loihiensis* MAH1 mediante microscopia HREM acoplado a análisis por EDX

Para este estudio se prepararon muestras de biomasa de *I. loihiensis* MAH1 del mismo modo que se ha descrito en los apartados anteriores, que se pusieron en presencia de lantano y de europio (0,5 mM, pHs 2, 3, y 5 para ambos metales), utilizando como solución de contacto perclorato sódico 0,1 M. Además, en el caso del europio también se ensayó a concentración 0,1 mM en agua de mar. El tiempo de contacto para todas las muestras fue de 48 h, a 28 °C y agitación, transcurrido el cual se recogió 1 ml de cada muestra para su fijación. Para llevar a cabo esta fijación se desarrolló, en colaboración con el servicio de preparación de muestras biológicas del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, un fijador especial para bacterias marinas, cuya composición se detalla a continuación:

Fijador para bacterias marinas	
Glutaraldehido	4 %
Tampón cacodilato	0,2 M
CaCl	0,1 %
Sacarosa	0,4 M

Este fijador tiene la característica de poseer una osmolaridad de 1205 mOsM, siendo muy parecida a la del agua de mar, con lo que su utilización previno el colapso de las células, colapso que ocurre al añadir un fijador convencional. Las muestras se fijaron (4 h a 4 °C) y posteriormente se lavaron en tampón cacodilato 0,1 M (3 lavados de 20 min a 4 °C). El pellet, una vez fijado y lavado, se postfijó con tetróxido de osmio al 1% en agua (60 min, 4°C), se lavó en agua destilada (3 lavados de 5 min a temperatura ambiente) y se deshidrató en un gradiente de etanol para su posterior inclusión en resina EMBED 812. Una vez obtenidos los bloques se procedió a la realización de cortes ultrafinos de 50-70 nm de espesor en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S con cuchilla de diamante. Estos cortes se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo según Reynolds (1963) en una atmosfera exenta de CO₂, durante 5 minutos. Por último las muestras se recubrieron con carbón.

Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de alta resolución modelo Philips CM 200. Los análisis por EDX se realizaron a 200 kV con un tiempo de exposición de 100s. Para el estudio de difracción de electrones se utilizó este mismo microscopio en el modo de difracción con una cámara de 1000 mm y un tiempo de exposición de 15 a 20s.

6.2.11. Cálculo de la especiación del europio en diferentes condiciones

La especiación teórica del europio, preparado tanto en la solución de agua de mar como en la solución de perclorato sódico 0,1 mM, se estudió mediante el programa Visual Minteq 3.0 (Gustafsson *et al.*, 2009). Para el caso de la especiación del europio en agua de mar los datos que se suministran al programa son: Calcio, 412 ppm; magnesio, 1291 ppm; sodio, 10768 ppm;

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis**
MAH1

potasio, 399 ppm; cloruro, 19353 ppm; amonio, 0,03 ppm; nitratos, 0,29 ppm; alcalinidad, 141 ppm; sulfatos (SO_4^{-2}), 2712 ppm; pH 7,2; temperatura, 25 °C; pe 8,451.

6.3. Resultados

En relación a la tolerancia al lantano de la bacteria *I. loihiensis* MAH1 así como de otras bacterias cercanas filogenéticamente utilizando un medio bajo en fosfatos para evitar la precipitación del metal, los resultados obtenidos claramente muestran que tanto *I. loihiensis* MAH1 como las bacterias cercanas filogenéticamente poseen una tolerancia notable al lantano (Tabla 6.1), muy parecida, por otro lado, a la obtenida para otros metales, como por ejemplo para el uranio (Capítulo 5). En cuanto al lantano, la bacteria puede tolerar hasta concentraciones de 4 mM en el medio de cultivo empleado.

Bacteria	CMI del lantano (mM)	Referencia
<i>Idiomarina loihiensis</i> MAH1	8	Este trabajo
<i>Idiomarina abyssalis</i>	4	Este trabajo
<i>Idiomarina báltica</i> OS145	8	Este trabajo
<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR	8	Este trabajo
<i>Myxococcus xanthus</i> 422	2,5	Jroundi 2004

Tabla 6.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del lantano para diferentes especies de *Idiomarina* y de *M. xanthus*.

El estudio de la cinética de sorción del lantano a pH 5 y la influencia del pH nos dio una idea de la capacidad de sorción del lantano por esta bacteria y del efecto del pH sobre el proceso (Figura 6.1 y 6.2). *I. loihiensis* MAH1 fijó aproximadamente 55 mg de lantano/ g biomasa seca tras 72 horas de contacto con el metal, valor muy parecido al encontrado por otros autores para otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Texier *et al.*, 1999). Este valor de sorción se alcanzó pasados los 60 minutos de incubación. En referencia al efecto del pH, como puede verse en la Figura 6.2 la capacidad de sorción disminuyó al bajar el pH. Dicho con mayor precisión, *I. loihiensis* MAH1 fijó 15, 23 y 53 mg/gr a pHs 2, 3 y 4, respectivamente. Además se estudio la capacidad de sorción a pH 6 que, al igual que a pH 4, resultó ser menor que a pH 5 (43 mg/g). Por tanto, aunque la diferencia de fijación entre el pH 4 y 5 no es muy pronunciada, podemos concluir que el pH 5 es el pH óptimo para la sorción del lantano.

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

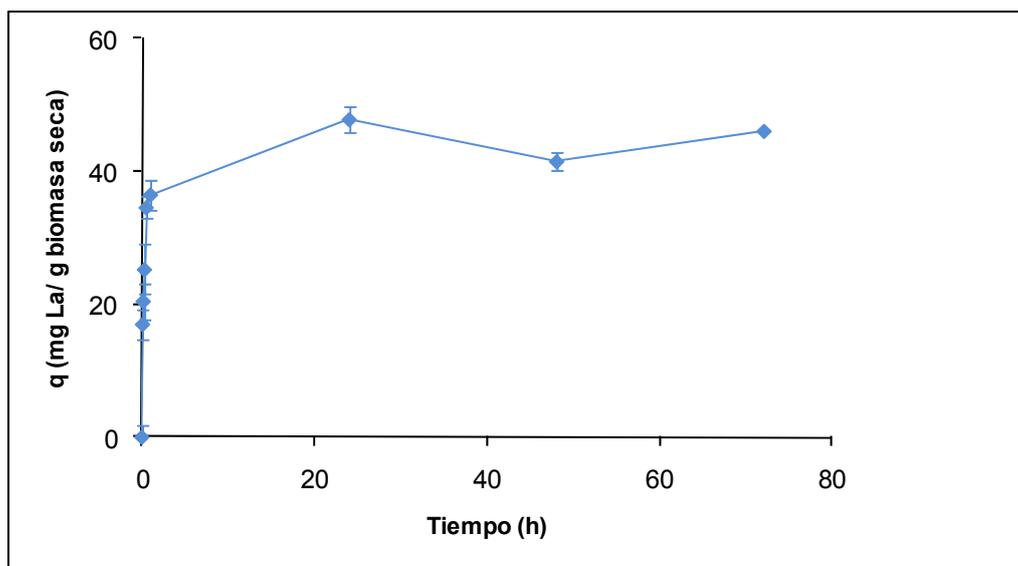


Figura 6.1. Cinética de sorción del lantano por *I. loihiensis* MAH1 a pH 5.

El efecto del pH fue corroborado por los resultados obtenidos al realizar las isotermas de sorción (Figura 6.3 y 6.4). Según las isotermas, la capacidad de sorción es muy similar a pH 2, 3, y 5 a bajas concentraciones (0,015 – 0,06 mM), mientras que a concentraciones de lantano superiores esta similitud desaparece. Tanto a pH 2 como pH 3 los datos se ajustaron correctamente a los modelos de Langmuir, Freundlich y Temkin, mientras que a pH 5 los datos no pudieron ajustarse a ninguno de los modelos matemáticos utilizados.

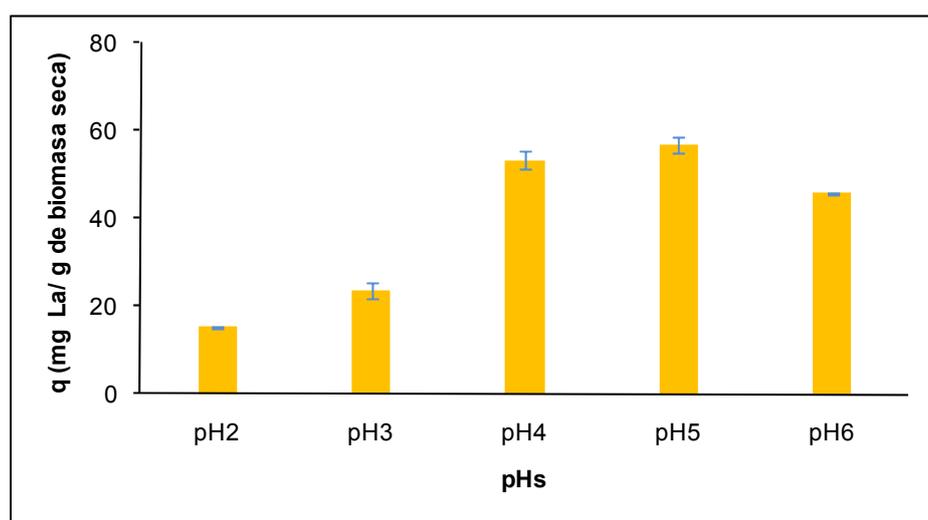


Figura 6.2. Cantidad de lantano fijado en función del pH utilizado.

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

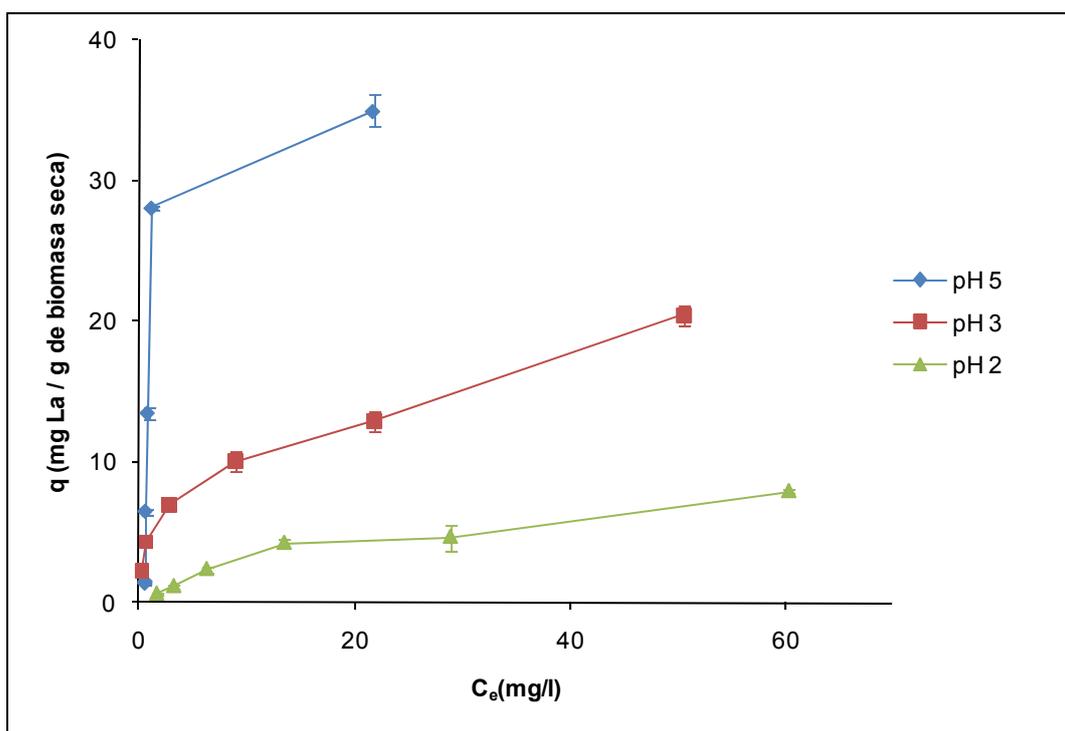


Figura 6.3. Isothermas de sorción del lantano por *I. loihiensis* MAH1 a diferentes pHs.

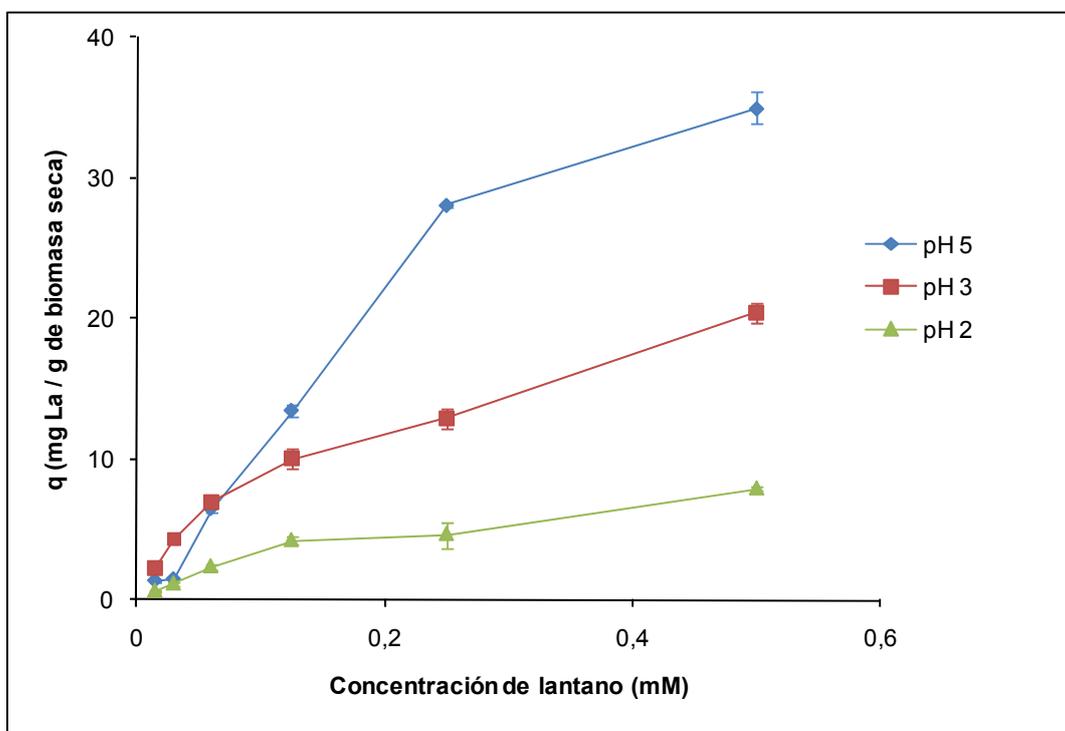


Figura 6.4. Cantidad de lantano fijado en función de la concentración de lantano inicial utilizada y del pH.

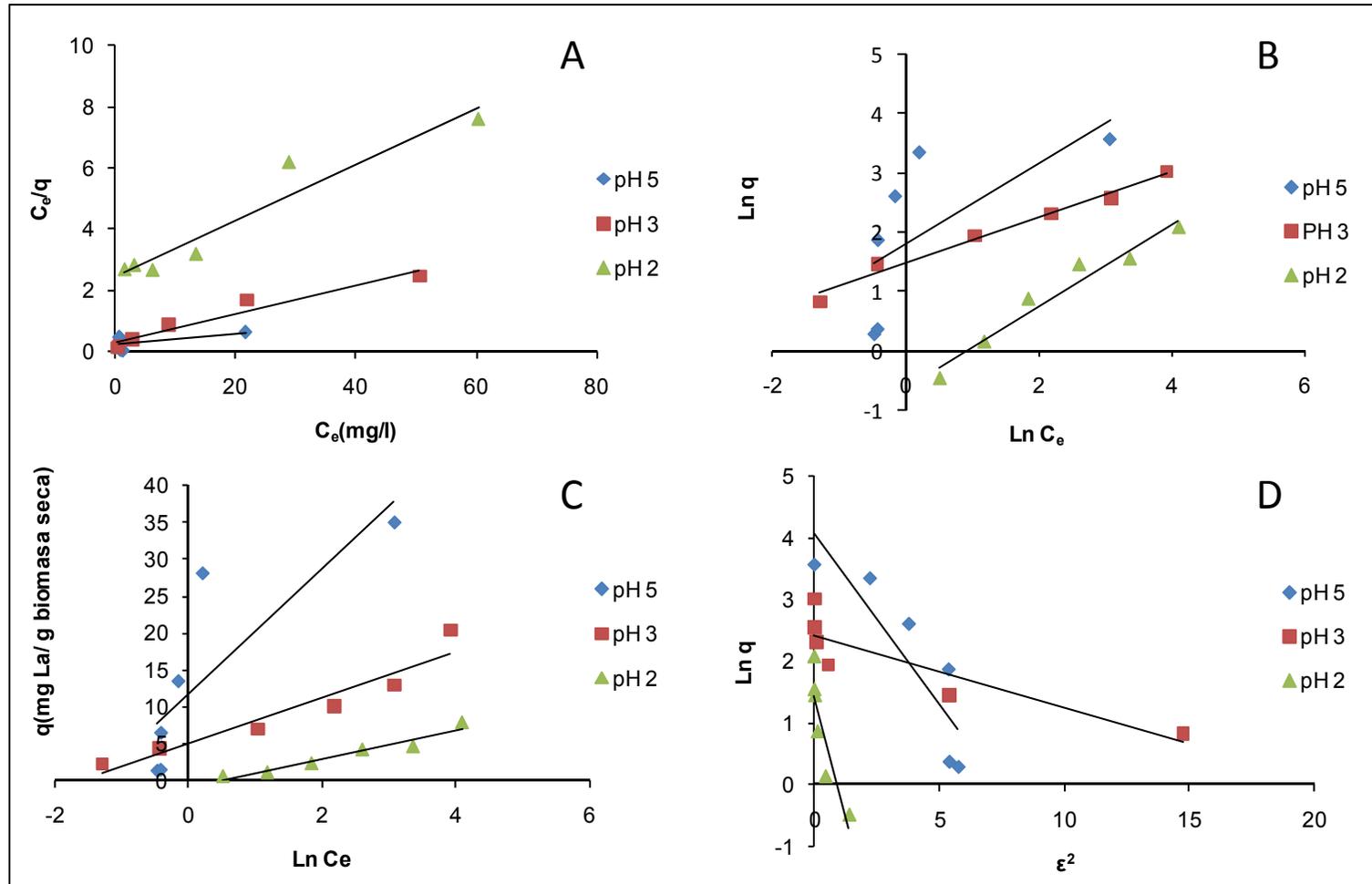


Figura 6.5. Isothermas de Langmuir (A), Freundlich (B), Temkin (C) y Dubinin-Radushkevich (D) de la fijación del lantano por *I. loihiensis* MAH1.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

El ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos matemáticos, así como los diferentes parámetros de cada uno, pueden verse en la Figura 6.5 y en la Tabla 6.2. Las isothermas de sorción mostraron que la capacidad de acumulación de lantano aumento al incrementarse la concentración del metal en la solución y el pH.

Langmuir	pH 5	R ²	q _{max} (mg)	K _L (l/mg)	
	pH 3	0,402	55,55	0,085	
	pH 2	0,940	21,27	0,162	
Freundlich	pH 5	R ²	K _f	n	
	pH 3	0,925	10,86	0,037	
	pH 2	0,436	6,043	1,472	
Temkin	pH 5	R ²	a	b (kJ/mol)	
	pH 3	0,980	4,355	2,594	
	pH 2	0,954	0,532	1,451	
D-R	pH 5	R ²	B	q _{max}	E (kJ/mol)
	pH 3	0,684	3,980	0,294	0,807
	pH 2	0,908	5,179	0,807	1,289
D-R	pH 5	R ²	B	q _{max}	E (kJ/mol)
	pH 3	0,770	0,551	58,96	0,952
	pH 2	0,780	0,117	11,33	2,067
D-R	pH 5	R ²	B	q _{max}	E (kJ/mol)
	pH 3	0,788	1,558	4,280	0,566
	pH 2	0,788	1,558	4,280	0,566

Tabla 6.2. Principales parámetros de los modelos matemáticos utilizados para el tratamiento de los datos de las isothermas de sorción. R² = coeficiente de correlación; q_{max} = capacidad máxima de sorción; K_L = constante de sorción en el equilibrio; K_f = constante relacionada con la capacidad de sorción; n = constante relacionada con la intensidad de sorción; a y b = constantes del modelo de Temkin; B = constante de la isoterma de Dubinin-Radushkevich (D-R); E = Energía libre de sorción.

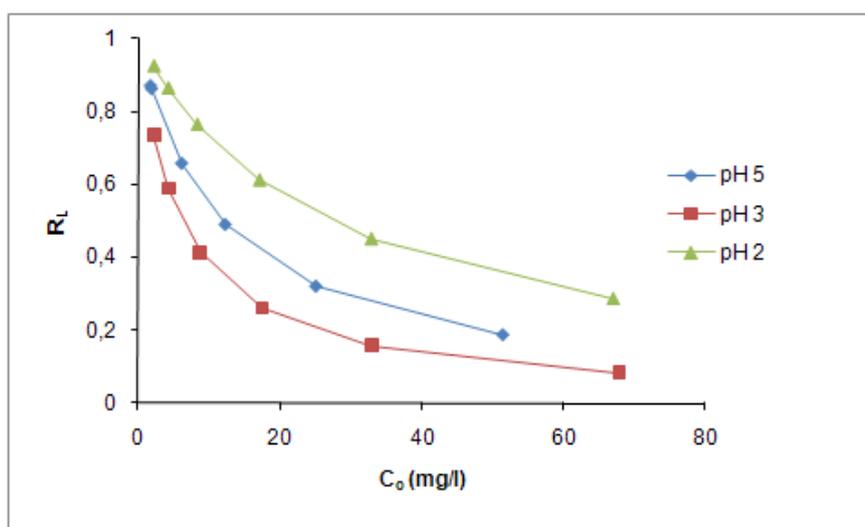


Figura 6.6. Factor de separación R_L frente a la concentración inicial de metal a pHs 2, 3 y 5.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

Para determinar la localización del lantano fijado se empleó la microscopia HREM. Los datos obtenidos mostraron que el lantano se fijó a la pared celular y al EPS en los 3 pHs ensayados. A pH 3 y 5 los acúmulos del lantano fijado tenían una morfología de hilo o aguja, mientras que a pH 2 la morfología era granular (Figura 6.7). Este lantano posiblemente está fijado a grupos fosfato de la pared celular y/o EPS, tal como puede deducirse de los microanálisis realizados (Figura 6.9) en los que existen picos de fósforo además de los del lantano. Cabe destacar que a pH 2 y 3 algunos de estos acúmulos dieron difracción de electrones lo que denota su estructura cristalina. Estos cristales posiblemente sean de fosfatos de lantano, ya que en los microanálisis aparecen picos correspondientes a fósforo (Figura 6.9). En relación al pico de silicio, que aparece en los diferentes microanálisis, hay que decir que es debido al propio detector del sistema EDX.

También se estudió la localización celular del europio (Figura 6.8 y 6.10) para poder compararlo con los datos obtenidos con el lantano. Estos estudios indican que el europio se fijó en la pared celular y en el EPS, salvo en el las muestras preparadas a pH 2 en las que sólo se observó en la pared. La localización del europio en muestras preparadas en una solución de contacto de agua de mar fue similar a la de las muestras preparadas en perclorato sódico, encontrándose, por tanto, el europio fijado en la pared celular y en el EPS. Hay que destacar que, tanto en las muestras de europio preparadas en una solución de perclorato sódico como las preparadas en agua de mar, no dieron difracción de electrones, a diferencia de las muestras de lantano.

Los estudios mediante TRLFS nos sirvieron para poder determinar los parámetros fluorescentes (tiempo de vida, Figura 6.13 y bandas de emisión de fluorescencia, Figuras 6.11 y 6.12) de los complejos de europio formados por la bacteria. Estos parámetros espectroscópicos nos aportan información en cuanto a la especiación química del europio asociado con la bacteria. Además, esta técnica espectroscópica permite calcular el número de moléculas de agua excluidas de la esfera de coordinación del europio por los grupos funcionales de la bacteria. En este sentido, como ya mencionamos en el apartado de

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

métodos, se utilizaron dos soluciones de contacto, percloratos sódico 0,1 M y agua de mar.

Para la solución de contacto de perclorato sódico, las bandas de emisión de fluorescencia se localizaron a 590 y a 615 nm, en todos los casos estudiados tanto en los controles como en las muestras experimentales); además, a pH igual o superior a 5 (en las muestras de europio con *I. loihiensis* MAH1), se localizó una banda de emisión a 578 nm aproximadamente, que puede ser asociada a la especiación del europio con grupos carboxilo o hidroxilo (Tabla 6.5, Figura 6.11). Desde el punto de vista de los tiempos de vida, por una parte, los tiempos obtenidos a pH 5 y 7 (concentraciones de europio 0,01 y 0,5 mM) son similares a los obtenidos para la especiación de europio por carbonatos ($\text{Eu}(\text{CO}_3)_2^-$) (Plancque *et al.*, 2003), mientras que los tiempos de vida obtenidos para pH 3, aunque parecen diferir de los obtenidos a pH 5 y 7, son un mezcla de la especie libre de europio (Eu^{+3}) y europio asociado a los grupos funcionales de la bacteria (Tabla 6.5). Esto se comprobó al realizar el análisis de los tiempos de vida con un modelo bi-exponencial en el que la especie libre de europio se fijó a 110 μs y la segunda especie se dejó libre. En relación a los estudios a pH 2, parece que no es posible este tipo de análisis por lo que pensamos que la coordinación del europio puede ser de una manera distinta. Destacar que el tiempo de vida obtenido para el control a pH 7 debe ser una mezcla de diferentes especies, ya que, aunque a este pH aun queda un alto porcentaje de europio libre, empiezan a formarse otro tipo de especies como iones carbonatos e hidroxilos, tal y como puede verse en la especiación del europio (Tabla 6.3).

Especie	Proporción (%)
Eu^{+3}	86,934
$\text{Eu}(\text{CO}_3)_2^-$	0,031
$\text{Eu}(\text{CO}_3)^+$	9,395
$\text{Eu}(\text{OH})_2^+$	3,26
$\text{Eu}(\text{HCO}_3)^{+2}$	0,381

Tabla 6.3. Especiación del europio (0,01 mM) en una solución de perclorato sódico 0,1 M

En el caso de los análisis de las muestras control preparadas en agua de mar a concentraciones de 0,01 mM y 0,1 mM, los tiempos de vida obtenidos,

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

(151 ± 10 y $126 \pm 1,8$ μ s, respectivamente) son comparables a los tiempos de vida de los complejos de carbonatos de Eu ($\text{Eu}(\text{CO}_3)^+$) (Plancque *et al.*, 2003). Estos resultados corroboran los resultados de los estudios teóricos de especiación de europio en estas condiciones que indicaron la formación de especies de carbonatos de europio ($\text{Eu}(\text{CO}_3)_2^-$ y $\text{Eu}(\text{CO}_3)^+$, (93 %) con un porcentaje mucho menor de hidroxilos y sulfatos de europio (Tabla 6.4).

Especie	Proporción (%)
Eu^{+3}	1,738
$\text{Eu}(\text{CO}_3)_2^-$	52,294
$\text{Eu}(\text{CO}_3)^+$	41,082
$\text{Eu}(\text{OH})_2^+$	1,088
$\text{Eu}(\text{Cl})_2^+$	0,494
$\text{Eu}(\text{SO}_4)_2^-$	0,531
$\text{Eu}(\text{SO}_4)^+$	2,643
$\text{Eu}(\text{HCO}_3)^{+2}$	0,129

Tabla 6.4. Especiación del europio (0,1 mM) en agua de mar

En el caso de las muestras bacterianas puestas en presencia de europio, a concentraciones de 0,01 mM y 0,1 mM, los tiempos de vida obtenidos, 256 y 328 μ s son superiores a los de las muestras controles. Estos resultados indican que los grupos funcionales de la bacteria juegan en este caso un papel importante en la interacción con este elemento. Estos tiempos de vida son similares a los de especies de carbonatos de europio (Tabla 6.5 A y B) así como los tiempos de vida de los complejos de europio formados por los grupos carboxilos de las células de *B. subtilis* a pH 5. Por ello, se puede concluir que tanto los grupos carboxilos bacterianos como los carbonatos precipitados por la bacteria están asociados con europio. La disminución del número de moléculas de aguas en la primera esfera de hidratación del europio es coherente con el hecho de estas interacciones. Los tiempos de vida (Figura 6.13), las bandas de emisión de fluorescencia, así como otros parámetros del análisis TRLFS, pueden verse en la Tabla 6.5 A y B.

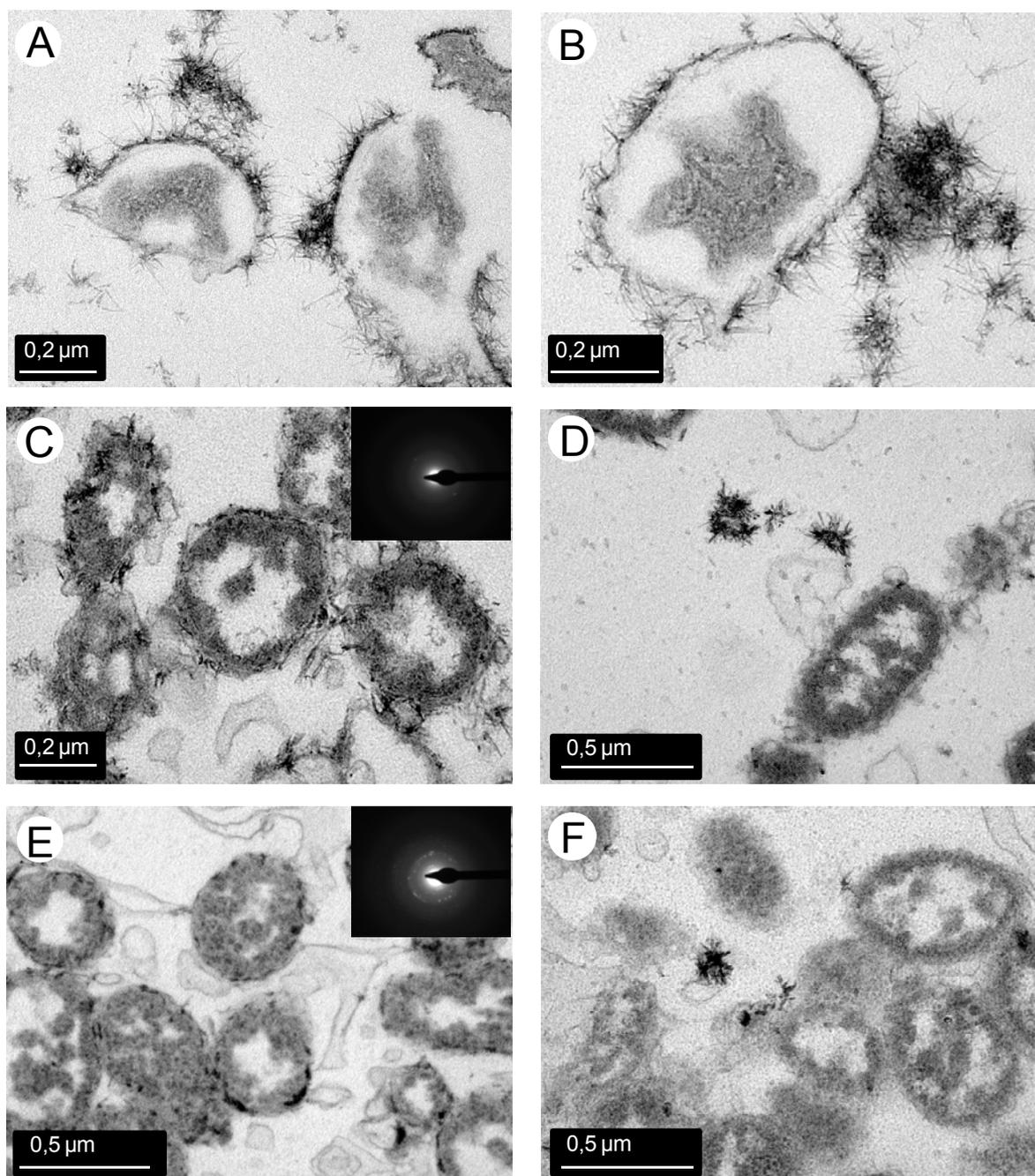


Figura 6.7. Fijación de lantano por *I. loihiensis* MAH1 y difracción de electrones de los acúmulos de lantano fijado. Acúmulos de lantano en la pared y en el EPS a pH 5 (A; B), 3 (C; D) y 2 (E; F). Difracción de electrones de acúmulos en la pared a pH 3 (C) y en el EPS a pH 2 (E)

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con Idiomena loihiensis MAH1

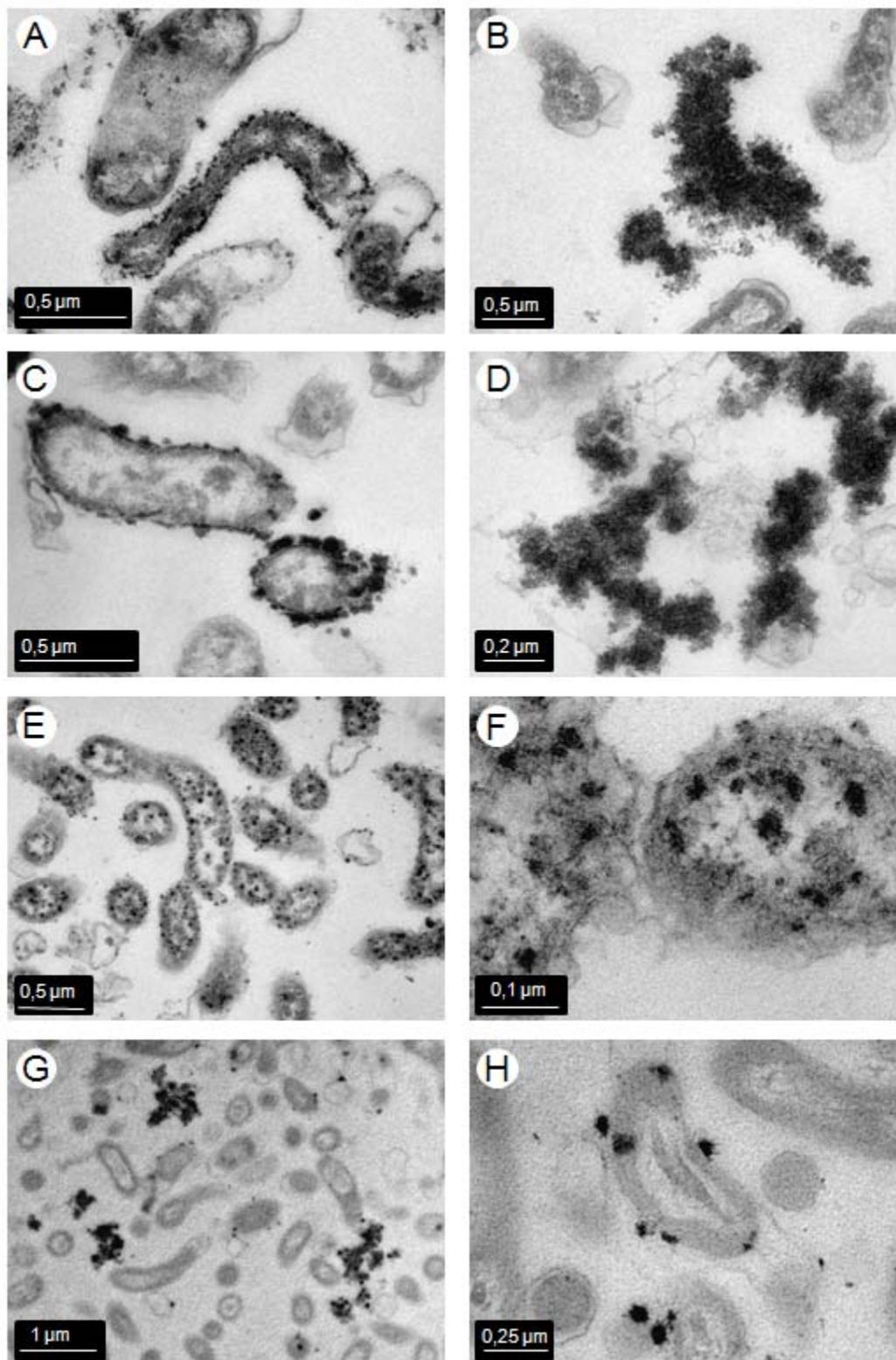


Figura 6.8. Fijación de europio por *I. loihiensis* MAH1. Acúmulos de europio en la pared y en el EPS a pH 5 (A; B). Acúmulos de europio en la pared a pH 3 y EPS (C; D). Acúmulos de europio en la pared a pH 2 (E; F) (los acúmulos en el interior de la célula corresponden a acúmulos de uranio y no de europio). Fijación del europio en el EPS (G) y en la pared (H) en muestras preparadas usando una solución de agua de mar.

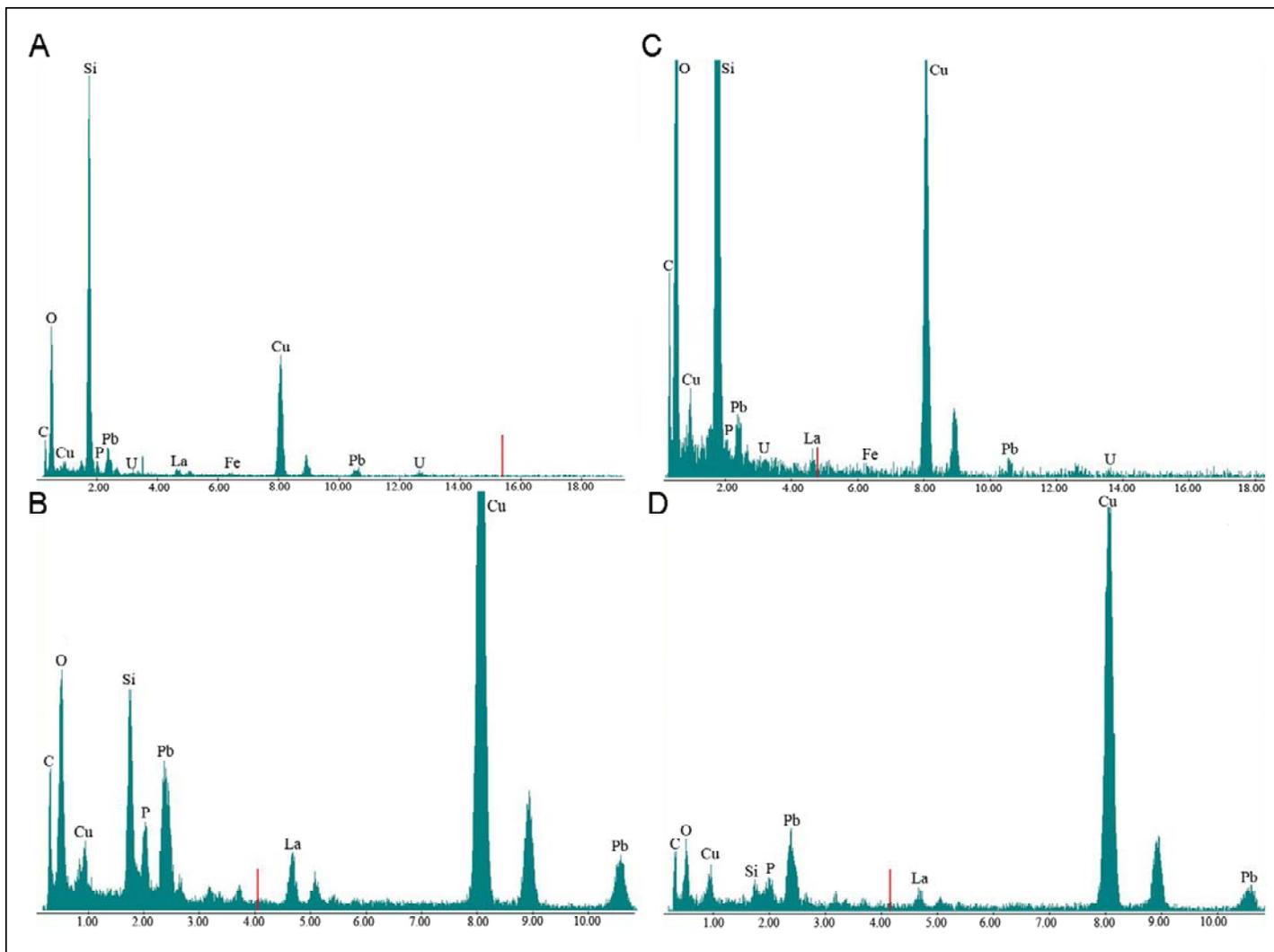


Figura 6.9. Análisis EDX de los acúmulos de lantano: (A) pH 5 en el EPS. (B) pH 5 en la pared celular. (C) pH 3 en el EPS. (D) pH 2 en la pared.

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

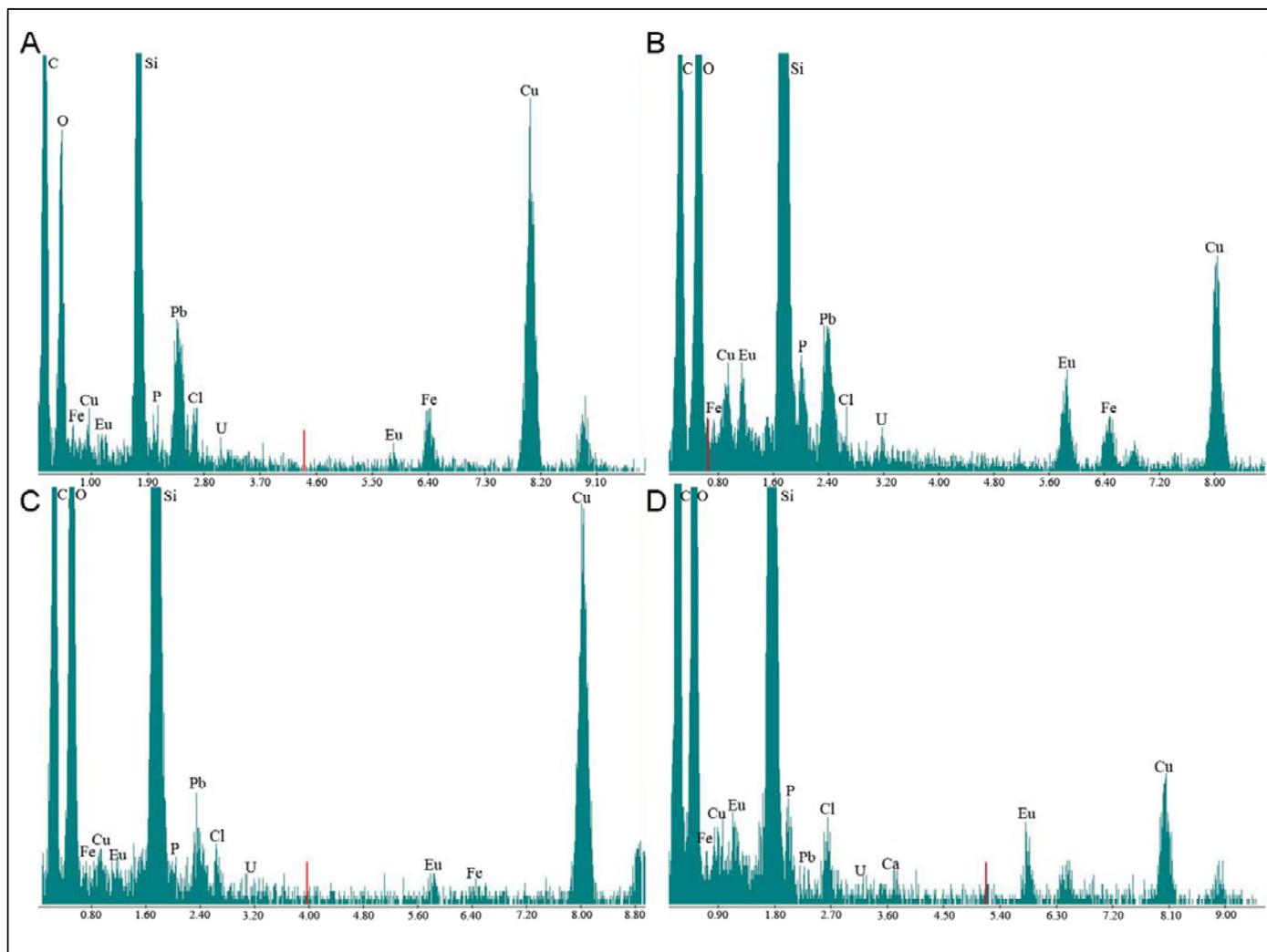


Figura 6.10. Análisis EDX de los acúmulos de europio: (A) a pH 5 en el EPS. (B) pH 3 en la pared. (C; D) Acúmulos extracelulares y en la pared (agua de mar).

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

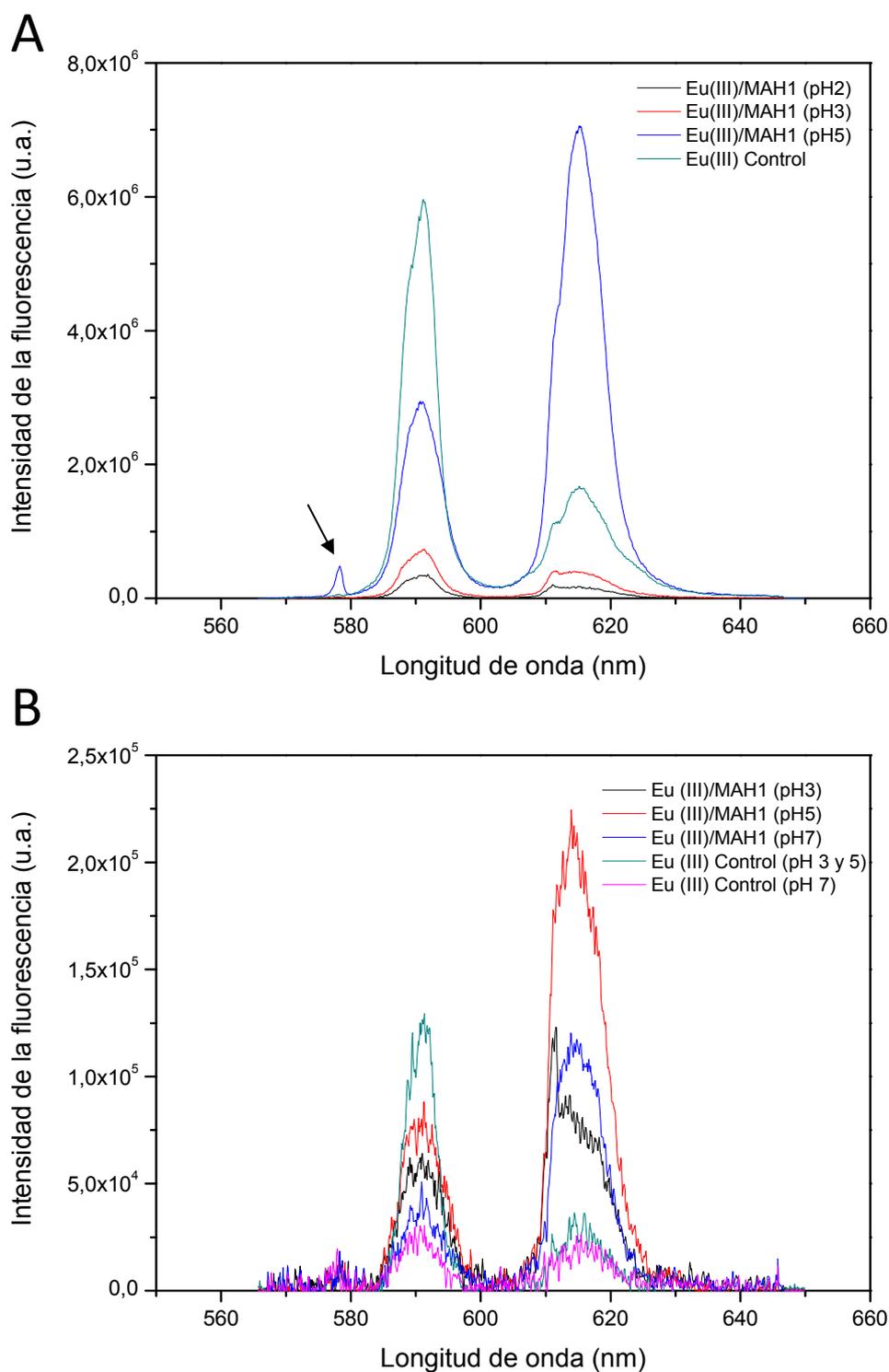


Figura 6.11. Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos de europio-*I. loihiensis* MAH1 en muestras preparadas en perclorato sódico. Concentración de Eu 0,5 mM (A) y 0,01 mM (B). Flecha: pico de emisión de fluorescencia típico en carbonatos.

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

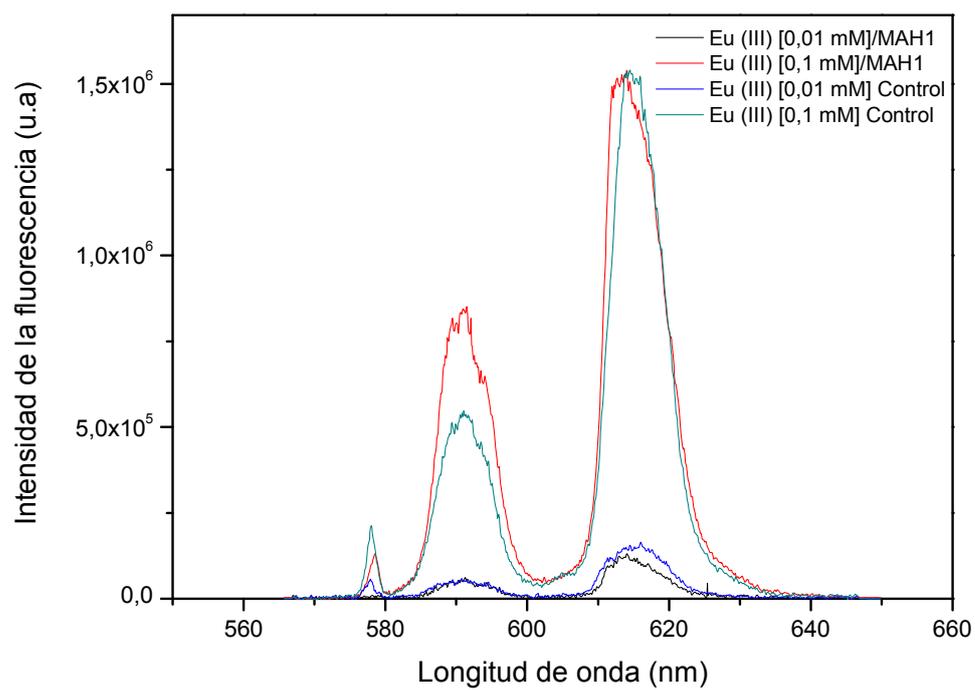


Figura 6.12. Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos de europio-*I. loihiensis* MAH1 en muestras preparadas en agua de mar

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

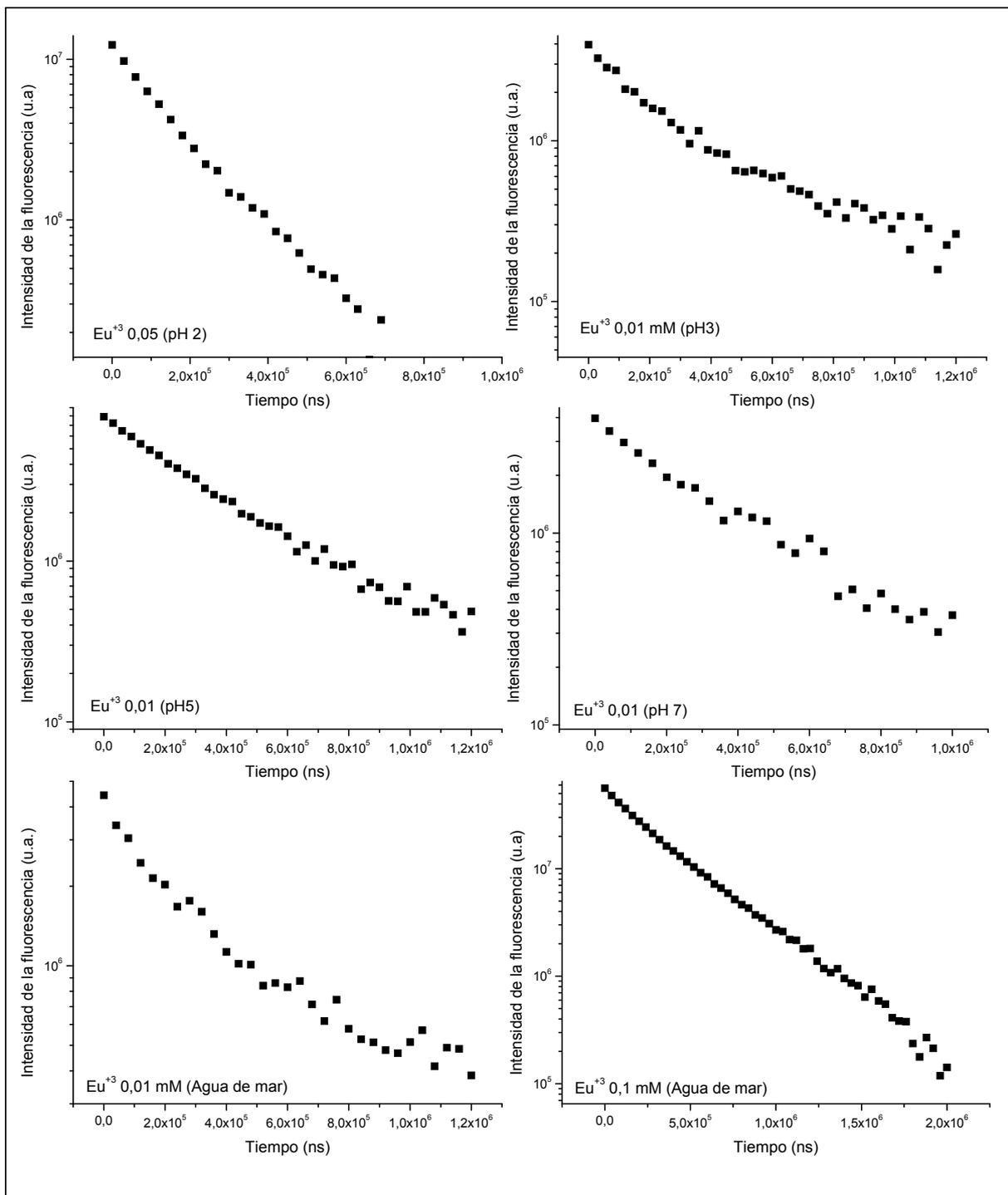


Figura 6.13. Disminución de la emisión de fluorescencia de los complejos de europio-*l. loihiensis* MAH1 en diferentes muestras

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

Especie	Bandas de emisión de fluorescencia (nm)	FWMH (nm)	Proporción (I_{590}/I_{614})	I_{rel} (590) ^c	I_{rel} (614) ^c	Tiempo de vida (μs)	Moléculas de agua
Solución: NaClO₄ 0,1M							
[Eu ⁺³] = 0,01 mM							
Eu ⁺³ // <i>loihiensis</i> MAH1 (pH 3)	590,7 - 614,0	5,8 / 8,5	1,0 / 1,5	1	1,5	245 ± 10,0	3,7 ± 0,5
Eu ⁺³ // <i>loihiensis</i> MAH1 (pH 5)	578,2 - 590,7 - 615,4	0,5 / 5,6 / 7,6	1,0 / 2,5	1	2,5	313 ± 7,0	2,8 ± 0,5
Eu ⁺³ // <i>loihiensis</i> MAH1 (pH 7)	578,3 - 590,7 - 615,0	0,7 / 5,0 / 7,1	1,0 / 3,1	1	3,1	321 ± 22,0	2,7 ± 0,5
Eu ⁺³ control (pH 5, pH 3)	590,8 - 615,4	4,6 / 7,9	3,5 / 1,0	1	0,3	111 ± 6,6	9,0 ± 0,5
Eu ⁺³ control (pH 7)	577,5 - 590,3 - 615,8	1,3 / 5,5 / 9,0	1,3 / 1,0	1	0,8	183 ± 23,0	5,2 ± 0,5
[Eu ⁺³] = 0,5 mM							
Eu ⁺³ // <i>loihiensis</i> MAH1 (pH 2)	590,7 - 614,7	4,8 / 8,6	2,0 / 1,0	1	0,5	146 ± 3,6	6,7 ± 0,5
Eu ⁺³ // <i>loihiensis</i> MAH1 (pH 3)	590,6 - 614,9	4,9 / 8,5	1,7 / 1,0	1	0,6	179 ± 5,0	5,3 ± 0,5
						(365 y 110)	
Eu ⁺³ // <i>loihiensis</i> MAH1 (pH 5)	578,2 - 590,7 - 615,3	0,4 / 5,1 / 6,5	1,0 / 2,5	1	2,5	323 ± 6,0	2,7 ± 0,5
Eu ⁺³ control (pH 2, 3 y 5)	590,7 - 615,7	4,8 / 8,3	3,5 / 1,0	1	0,3	110 ± 0,5	9,0 ± 0,5 ^a
Referencias							
^a Eu(CO ₃) ⁺	580,0 - 591,0 - 616,0		1 / 2			180 ± 20	5,0 ± 0,5
^a Eu(CO ₃) ₂ ⁻	580,0 - 592,0 - 616,0		1 / 3			290 ± 30	3,0 ± 0,5
^a Eu(CO ₃) ₃ ³⁻	580,0 - 594,0 - 617,0		1 / 4			440 ± 40	2,0 ± 0,5
^a Eu(OH) ²⁺	580,0 - 593,0 - 615,0		1 / 1			50 ± 5	
^b Eu ⁺³ / <i>Bacillus subtilis</i> pH 5						230 ± 20	4,1 ± 0,5
						730 ± 30	
^b Eu ³⁺ / A. poliacrílico						290 ± 20	3,1 ± 0,5
^b Eu ³⁺ /glicerol-2-fosfato						704 ± 30	0,9 ± 0,5

^a Planck et al. 2003, ^b Markai et al., 2003, ^c (I_{rel} = Intensidad relativa) Valor 1 para la intensidad de la banda de emisión de fluorescencia situada a 590 nm.

Tabla 6.5 A. Parámetros de fluorescencia de las diferentes muestras analizadas (solución de contacto NaClO₄) así como de algunos compuestos de referencia.

Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1

Especie	Bandas de emisión de fluorescencia (nm)	FWMH (nm)	Proporción (I_{590}/I_{614})	I_{rel} (590) ^c	I_{rel} (614) ^c	Tiempo de vida (μs)	Moléculas de agua
Solución: Agua de mar							
[Eu ⁺³] = 0,01 mM							
Eu ⁺³ // <i>I. loihiensis</i> MAH1	590,0 - 614,8	5,9 / 7,2	1,0 / 2,3	1	2,3	256 ± 12,0	3,5 ± 0,5
Eu ⁺³ control	577,8 - 590,6 - 615,5	1,1 / 6,6 / 8,1	1,0 / 3,0	1	3,1	151 ± 10,0	6,4 ± 0,5
[Eu ⁺³] = 0,1 mM							
Eu ⁺³ // <i>I. loihiensis</i> MAH1	578,4 - 590,8 - 614,9	0,4 / 5,9 / 7,6	1,0 / 1,9	1	1,9	328 ± 4,0	2,6 ± 0,5
Eu ⁺³ control	577,9 - 590,9 - 615,4	0,8 / 5,9 / 6,9	1,0 / 3,0	1	3,0	126 ± 1,8	7,8 ± 0,5
Referencias							
^a Eu(CO ₃) ⁺	580,0 - 591,0 - 616,0		1 / 2			180 ± 20	5,0 ± 0,5
^a Eu(CO ₃) ₂ ⁻	580,0 - 592,0 - 616,0		1 / 3			290 ± 30	3,0 ± 0,5
^a Eu(CO ₃) ₃ ³⁻	580,0 - 594,0 - 617,0		1 / 4			440 ± 40	2,0 ± 0,5
^a Eu(OH) ²⁺	580,0 - 593,0 - 615,0		1 / 1			50 ± 5	
^b Eu ⁺³ / <i>Bacillus subtilis</i> pH 5						230 ± 20	4,1 ± 0,5
						730 ± 30	
^b Eu ³⁺ / A. poliacrílico						290 ± 20	3,1 ± 0,5
^b Eu ³⁺ / glicerol-2-fosfato						704 ± 30	0,9 ± 0,5

^a Plancque *et al.* 2003, ^bMarkai *et al.*, 2003, ^c (I_{rel} = Intensidad relativa) Valor 1 para la intensidad de la banda de emisión de fluorescencia situada a 590 nm.

Tabla 6.5 B. Parámetros de fluorescencia de las diferentes muestras analizadas (solución de contacto agua de mar) así como de algunos compuestos de referencia.

6.4. Discusión

Los lantánidos son un grupo de elementos cuyo uso se ha extendido notablemente gracias a algunas de sus propiedades, como la emisión de fluorescencia y conductividad (Vijayaraghavan *et al.*, 2009). También se está investigando su uso como agente antitumoral y como fertilizante, aunque con esta última finalidad lleva usándose en China desde hace más de 20 años. En este sentido, algunos estudios sobre la agricultura en China han demostrado que la utilización en bajas dosis de REEs aumenta la productividad de algunos tipos de cultivos (Tyler 2005). Sin embargo se conoce muy poco sobre la toxicidad de estos elementos y en los últimos años ha habido mucha controversia al respecto. Feng *et al.*, (2006) estudiaron el efecto neurotóxico que podría producir el cloruro de lantano en ratas Wistar, encontrando que una exposición prolongada con dosis de 40 mg/kg, podría llegar a producir daños en la capacidad de aprendizaje de estas ratas. Hay que mencionar que este estudio fue duramente criticado por Damment *et al.* (2007) en una carta al editor que, posteriormente, fue defendida por He *et al.* (2007) en otra carta. Otros estudios describen la posible implicación del lantano en cardiomiopatías (Shaowu y Pin, 2005) y en cambios en la estructura mitocondrial, permeabilidad de la membrana y aumento de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Liu *et al.*, 2003). Por otro lado Damment *et al.* (2005) estudiaron la genotoxicidad en diversas bacterias y células, encontrando que a las concentraciones ensayadas no se producían efectos mutagénicos. En nuestro caso hemos estudiado la tolerancia que presenta la bacteria *I. loihiensis* MAH1 a diferentes concentraciones de nitrato de lantano obteniendo que la bacteria es tolerante a concentraciones de 4 mM de lantano (Tabla 6.1). Si bien es difícil comparar con otras bacterias, debido a la escasez de estudios existentes sobre el tema, hay que destacar que la tolerancia encontrada es similar a la encontrada para otros metales estudiados en nuestro laboratorio, como es el caso del uranio (Capítulo 5), plomo y manganeso (datos no mostrados), dos de los cuales si son considerados como tóxicos (Redy *et al.*, 2010; Al-Masri *et al.*, 2010).

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

Por otro lado el estudio de la cinética de sorción (Figura 6.1), y efecto del pH (Figura 6.2) sobre la capacidad de sorción, revelaron que *I. loihiensis* MAH1 puede fijar concentraciones de hasta 55 mg de La/g biomasa seca (0,398 mmol/g) a un pH de 5, pH que resultó ser el óptimo para la sorción. En relación a la capacidad de sorción del lantano sí que existen numerosos estudios en los que se han empleado diversas bacterias. Como ejemplos podemos citar a Texier *et al.*, (1997; 1999), que encontraron que *Mycobacterium smegmatis* y *P. aeruginosa*, tenían una capacidad de fijar lantano, en las condiciones ensayadas, de 0,046 mmol/g y 0,397 mmol/g respectivamente, o Merroun *et al.*, (2003) que describieron una capacidad de sorción de 0,99 mmol/g trabajando con *M. xanthus*. Como puede verse en estos ejemplos, *I. loihiensis* MAH1 posee una capacidad de sorción comparable a la de estas otras bacterias. En relación a la influencia del pH sobre esta capacidad, de acuerdo con los datos recogidos en la Figura 6.2, la mejor fijación se produjo a pH 5. Si se tiene en cuenta que, como ya se mencionó en el capítulo 5, existe un aumento de la afinidad de los protones por los sitios de unión presentes en la superficie de la bacteria conforme desciende el pH, compitiendo con los iones metálicos, se entiende que la capacidad de sorción sea mayor a pH 5 que a pH 2 y 3. De acuerdo con lo dicho, cabría esperar que a pHs superiores a 5 la capacidad de sorción fuera mayor, lo que de hecho no ocurre debido a que a pHs superiores a 5 el lantano presente en la solución cambia de especiación, pasando parte de los iones de La^{+3} a estar unidos a iones hidroxilo (LaOH^{+2}), pudiendo dar lugar a precipitados conforme el pH se vaya elevando. En este sentido, Sert *et al.* (2008), estudiando el efecto del pH en la capacidad de sorción del lantano por polvo de hojas de *Platanus orientalis* no realizaron ensayos con valores de pH superiores a 6 debido, precisamente, al cambio de especiación del lantano que da lugar a precipitados de hidróxido. Por otro lado, Tsuruta (2007) determinó que a partir de pH 7 (a una concentración de lantano de 0,066 mM) comienzan a aparecer precipitados de hidróxidos de lantano, quedando a este pH menos del 25 % del lantano disuelto.

La disminución de la capacidad de sorción debida a la disminución del pH fue corroborada al realizar las isotermas de sorción. Si bien, de acuerdo con estas, la capacidad de sorción es muy similar a pH 2, 3, y 5 a bajas

concentraciones (0,015 – 0,06 mM), esta similitud desaparece al aumentar la concentración de lantano en la solución de contacto (Figuras 6.3 y 6.4), señal de que los sitios de unión libres a pHs bajos no son suficientes para fijar la cantidad de lantano añadida, mientras que sí lo son a pH 5. Para poder comprender algo más en profundidad los procesos ocurridos en la sorción del lantano, se procedió al estudio de las isotermas de sorción mediante diferentes modelos matemáticos (Figura 6.5, Tabla 6.2) ya utilizados en el capítulo 5 del presente trabajo. En este sentido, a pHs 2 y 3, los datos experimentales se ajustaron bien a los modelos de Langmuir, Freundlich y Temkin, mientras que a pH 5 los datos no pudieron ser ajustados, en principio, a ninguno de los modelos ensayados. En relación a los resultados obtenidos a pH 2 y 3, el hecho de ajustarse bien los datos experimentales al modelo de Langmuir podría ser indicativo de la unión mayoritaria del lantano a un determinado ligando. Además, esta unión se produciría mediante fuerzas electrostáticas débiles, como puede deducirse de los valores de b obtenidos en el modelo de Temkin. Como ya habíamos mencionado en el capítulo 5, valores del parámetro b comprendidos entre 8 y 16 kJmol⁻¹ indican que el proceso de sorción ocurre mediante intercambio iónico, mientras que valores inferiores a 8 kJmol⁻¹ indican que el proceso de sorción ocurre mediante fuerzas físicas débiles tales como fuerzas de van der Waals y otras interacciones iónicas débiles (Aydin y Aksoy, 2009). Por tanto podríamos decir que a pH 2 y 3 el proceso ocurrido posiblemente sea un proceso de adsorción (unión a ligandos mediante fuerzas electrostáticas de carácter débil) y que este es un proceso de carácter favorable ya que los valores de R_L obtenidos a partir de la constante K_L del modelo de Langmuir, así como el carácter no lineal de la gráfica al representarlos, se encontraron entre 0 y 1 (Figura 6.6). Como ya habíamos mencionado en el capítulo 5, valores de R_L comprendidos entre 0 y 1 indican que el proceso es favorable, valores superiores a 1 indican una sorción desfavorable y valores iguales a 1 o a 0 indican una sorción lineal o irreversible, respectivamente (Kiran y Kaushik, 2008).

En relación al ajuste de los datos obtenidos a pH 5, el coeficiente de correlación para todos los modelos utilizados fue muy inferior a los obtenidos a pH 2 y 3. Es extraño que ninguno de los modelos pueda describir

satisfactoriamente el proceso a pH 5. No obstante, si sólo se tienen en cuenta las concentraciones más altas (0,06 - 05 mM) el modelo de Langmuir sí que lo describe satisfactoriamente ($R^2 = 0,98$), por lo que es posible que a bajas concentraciones el proceso ocurra de manera diferente a como lo hace a concentraciones más altas o que, a bajas concentraciones, se ponga de manifiesto algún otro proceso diferente a la sorción que pueda quedar enmascarado a las concentraciones más elevadas. Aun así se hace necesaria la aplicación y búsqueda de otros modelos matemáticos diferentes para poder dar una respuesta satisfactoria a este hecho. Al no tener en cuenta las dos concentraciones más bajas, el proceso se ajustaría bien al modelo de Langmuir, como ya hemos dicho, y tendría un coeficiente R_L que indicaría un proceso de sorción favorable, al igual que a los otros dos pHs ensayados. Al no poder haberse ajustado los datos experimentales al modelo de Temkin o D-R no pudimos determinar con exactitud el tipo de proceso que ocurre.

Desde el punto de vista de la localización del lantano fijado, este se localizó, en los tres pHs ensayados, en la pared celular y en el EPS (Figura 6.7). A pH 3 y 5 los acúmulos de lantano fijado tuvieron una morfología como de finas agujas electrodensas, mientras que a pH 2 fueron en forma de gránulos. Esta morfología en forma acicular es similar a la descrita por Merroun *et al.*, (2003) al estudiar la fijación del lantano por *M. xanthus*. En este estudio de estos autores el lantano se fijaba por toda la pared celular y capa mucosa de *M. xanthus*. Mullen *et al.*, (1989) también encontraron este tipo de morfología al estudiar la fijación de lantano en las estructuras superficiales de *P. aeruginosa*. En ambos casos se menciona la posible intervención de los grupos fosfato presentes en ambas estructuras en la fijación de este metal, y más específicamente para el caso de *M. xanthus*, en los grupos fosfato presentes en el lipopolisacárido. Es posible que en nuestro caso también se encuentren implicados grupos fosfato en la fijación de este elemento, sin embargo no podemos descartar la intervención de otros grupos funcionales. En este sentido algunos autores han resaltado la importancia, junto con los grupos fosfato, de los grupos carboxilo en la fijación de iones metálicos (Texier *et al.*, 2000; Ngwenya *et al.*, 2010)

Por otro lado, otros autores como Kazy *et al.*, (2006) han encontrado acúmulos de lantano en el interior celular al estudiar la fijación del lantano en *Pseudomonas sp.* Este hecho lo achacaron al aumento de la permeabilidad de la membrana o a la rotura de esta ya que el lantano no puede atravesar la pared celular, como ya han descrito algunos otros autores (Bayer y Bayer, 1991). En nuestro caso, todo el lantano localizado se encontró tanto en la pared como en el EPS y no hubo rastros de este elemento en el interior celular, aun cuando en muchos de los casos las células se encontraban bastante dañadas debido al bajo pH utilizado en el ensayo y/o a la solución background utilizada. Por último hay que destacar la posible formación de estructuras cristalinas de lantano a pH 2 y 3, tal y como se deduce de los difractogramas de electrones mostrados en la figura 6.7. Estas estructuras cristalinas podrían ser, según los microanálisis, de un fosfato de lantano. En este sentido, Kazy *et al.* (2006) ya describieron la formación de fosfatos de lantano por *Pseudomonas sp.* destacando que la formación de este compuesto se producía posiblemente gracias a que los grupos fosfatos de la pared ayudarían a la formación del cristal. En nuestro caso, ya hemos descrito la precipitación cristalina de carbonatos y fosfatos por parte de *I. loihiensis* MAH1 (Capítulo 4) con lo que no es de extrañar la posible precipitación de otros compuestos minerales en forma cristalina. En este sentido se sabe que el lantano puede, fácilmente, sustituir a otros cationes como el calcio o el magnesio, por lo que podemos apuntar la hipótesis de que se produjera inicialmente un fosfato de magnesio o calcio en el que luego se sustituirían estos cationes por lantano (Evans 1983; Merroun *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2009). Además de la localización del lantano, también se estudió la localización del europio para poder compararla con la del lantano (Figura 6.8 y 6.10). Y se comprobó que el europio se fijó, al igual que el lantano, en la pared celular y en el EPS, salvo en las muestras preparadas a pH 2 en las que sólo se observó en la pared. No se detectó la existencia de estructuras cristalinas en los acúmulos de europio, a diferencia de lo ocurrido con el lantano. Por otro lado también se estudió la localización del europio en muestras preparadas utilizando como solución background agua de mar. En estas muestras el europio se localizó tanto en la pared como en el EPS (Figura 6.8).

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

Por último se estudió mediante TRLFS la especiación del europio en diferentes condiciones (NaClO_4 y agua de mar) para poder comprender en más detalle los mecanismos de interacción de *I. loihiensis* MAH1 con los lantánidos trivalentes, análogos inactivos de los actínidos trivalentes y poder determinar las propiedades de fluorescencia de las especies de Eu asociadas con la bacteria. En relación a las muestras preparadas en perclorato, y a una concentración de 0,01 mM de europio, los tiempos de vida obtenidos a pH 5 y 7 corresponden a la coordinación del europio con grupos carboxilo, mientras que el tiempo de vida a pH 3 corresponde a una mezcla del europio libre y de europio unido a los grupos carboxilo de la bacteria (Tabla 6.5, Figura 6.11). Estos tiempos de vida obtenidos son muy parecidos a los encontrados por Planque *et al.* (2003) al estudiar la especiación del europio en forma de iones carbonato e hidróxido y por Markai *et al.* (2003) en la especiación del europio por *Bacillus subtilis* y compuestos de referencia (ej. ácido poliacrílico). En este último estudio y basándose, por una parte en los trabajos de Fein *et al.* (1997) sobre la fijación del aluminio por *B. subtilis* y, por otra, en los resultados obtenidos en la especiación del europio con el ácido poliacrílico (tiempo de vida y moléculas excluidas en la primera esfera de coordinación), determinaron que a un tiempo de 290 μs el europio se encontraría unido a grupos carboxilo en una proporción 1:3 (Eu : COO^-). En nuestro caso, al haber encontrado que tanto los tiempos de vida como las moléculas de agua excluidas (Tabla 6.5) son similares, a los encontrados por Markai *et al.* (2003), podríamos considerar que *I. loihiensis* MAH1 lo puede fijar, de forma similar, a los grupos carboxilos presentes en sus estructuras superficiales y EPS. Como ya habíamos comentado anteriormente, no podíamos descartar la implicación de grupos fosfatos en la especiación de este elemento con *I. loihiensis* MAH1, sin embargo parece que la especiación del europio con grupos fosfatos implicaría la existencia de tiempos de vida mucho más altos que los que hemos encontrado, por lo que parece que podemos concluir que a estos pH el europio se fija a grupos carboxilo de la pared celular y del EPS. Además, la existencia de un pico de emisión de fluorescencia a 578 nm es típica de la especiación del europio con carbonatos e hidróxidos, lo que sería un argumento más a favor de nuestra conclusión. Por otro lado, los resultados utilizando una concentración

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis* MAH1*

de 0,5 mM fueron similares a las obtenidas a la concentración anterior. En este caso, a pH 3 el valor del tiempo de vida encontrado correspondería a una mezcla de europio libre y de la especie formada por el europio y los grupos carboxilo de *I. loihiensis* MAH1, como ya habíamos mencionado anteriormente, mientras que el tiempo de vida obtenido a pH 2 correspondería a la unión a grupos carboxilo pero con una coordinación diferente a la mencionada para la obtenida a pH 3. En este caso (pH 2) el europio estaría coordinado con 7 moléculas de agua. Hay que destacar que la intensidad relativa y el valor de la proporción I_{590}/I_{614} disminuyó conforme descendió el pH (Tabla 6.5). Esto es debido a que la banda de emisión de fluorescencia a 614 nm es una banda hipersensible a los cambios en el medio, mientras que la banda a 590 nm es más estable. Los cambios en la banda situada entre 614 - 617 nm son importantes en los estudios de fijación y especiación debido a que su intensidad (en comparación con la del europio libre) aumenta en el caso de la unión a ligandos (Plancque *et al.*, 2003) (Figura 6.11).

La especiación del europio en agua de mar mostró claramente que se encuentra en forma de iones de carbonatos de europio, tal y como puede verse en la Tabla 6.3. Según esto, los tiempos de vida obtenidos en los controles, utilizando agua de mar como solución "background", podrían corresponder a una mezcla de los carbonatos $\text{Eu}[\text{CO}_3]^{2-}$ y EuCO_3^+ . En el caso de las muestras de europio con *I. loihiensis* MAH1, parece claro que la especiación es distinta a la encontrada en los controles (Tabla 6.5). En este sentido la presencia de la bacteria induce, probablemente, un cambio en la distribución de las especies presentes en la solución, posiblemente hacia un tipo concreto de ion carbonato, mediante su unión a la pared celular o al EPS.

Teniendo en cuenta, como ya hemos comentado, que *I. loihiensis* MAH1 puede participar en la precipitación de diferentes carbonatos (ej. Mg-kutnahorita), cabría pensar en la posibilidad de la precipitación de algún compuesto mineral de europio inducido por esta bacteria. En este sentido tenemos los resultados del estudio de Marquez Fernandes *et al.* (2008) quienes investigaron la incorporación de europio en calcita y los del trabajo de Schmidt *et al.* (2009) que estudiaron la sustitución de iones de Ca^{+2} del aragonito por

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis*
MAH1*

Eu⁺³. Por tanto, estos estudios, y los de otros autores sobre la especiación de europio en carbonatos, nos abren posibles vías para profundizar en el papel jugado por *I. loihiensis* MAH1 en la formación de este tipo de minerales.

6.5. Bibliografía

- Al-Masri, M.S., Amin, Y., Al-Akel, B., Al-Naama, T. (2010). "Biosorption of cadmium, lead, and uranium by powder of poplar leaves and branches". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (4), 976-987.
- Aydin, Y.A., Aksoy, N.D. (2009). "Adsorption of chromium on chitosan: Optimization, kinetics and thermodynamics". *Chemical Engineering Journal*, 151 (1-3), 188-194.
- Bayer, M.E., Bayer, M.H. (1991). "Lanthanide accumulation in the periplasmic space of *Escherichia coli* B". *Journal of Bacteriology*, 173 (1), 141-149.
- Canu, I.G., Ellis, E.D., Tirmarche, M. (2008). "Cancer risk in nuclear workers occupationally exposed to uranium-emphasis on internal exposure". *Health Physics*, 94 (1), 1-17.
- D'Aquino, L., Morgana, M., Carboni, M.A., Staiano, M., Antisari, M.V., Re, M., Lorito, M., Vinale, F., Abadi, k.M., Woo, S.L. (2009). "Effect of some rare earth elements on the growth and lanthanide accumulation in different *Trichoderma* strains". *Soil Biology and Biochemistry*, 41 (12), 2406-2413.
- Damment, S.J.P., Beevers, C., Gatehouse, D.G. (2005). "Evaluation of the potential genotoxicity of the phosphate binder lanthanum carbonate". *Mutagenesis*, 20 (1), 29-37.
- Damment, S.J.P., De Broe, M.E., D'Haese, P.C., Bramall, N., Cox, A.G., McLeod, C.W. (2007). "Incredulous effects of lanthanum?". *Toxicology Letters*, 165 (2), 112-120.
- Dubinín, M.M., Radushkevich, L.V. (1947). "Equation of the characteristic curve of activated charcoal". *Proceedings of the Academy Sciences, Physical Chemistry Section, USSR*, 55, 331-333.
- Evans, C.H. (1983). "Interesting and useful biochemical properties of lanthanides". *TIBS*, 8, 445-448.
- Fein, J.B., Daughney, C.J., Yee, N., Davis, T.A. (1997). "A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61 (16), 3319-3328.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con Idiogramina loihiensis
MAH1*

- Francis, A.J., Gillow, J.B., Dodge, C.J., Dunn, M., Mantione, K., Strietelmeier, B.A., Pansoy-Hjelvik, M.E., Papenguth, H.W. (1998). "Role of Bacteria as Biocolloids in the Transport of Actinides from a Deep Underground Radioactive Waste Repository". *Radiochimica Acta*, 82 (1), 347-354.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Balkwill, D.L., Kennedy, D., Li, S.-M.W., Kostandarithes, H.M., Daly, M.J., Brockman, F.J. (2004). "Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford Site, Washington State". *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (7), 4230-4241.
- Freundlich, H.M.F. (1906). "Über die adsorption in Lösungen". *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 57, 385-470.
- Feng, L., Xiao, H., He, X., Li, Z., Li, F., Liu, N., Zhao, Y., Huang, Y., Zhang, Z., Chai, Z. (2006). "Neurotoxicological consequence of long-term exposure to lanthanum". *Biological Trace Element Research*, 117 (1-3), 89-104.
- Gavrilescu, M., Pavel, L.V., Cretescu, I. (2009). "Characterization and remediation of soils contaminated with uranium". *Journal of Hazardous Materials*, 163 (2-3), 475-510.
- González-Muñoz, M.T., De Linares, C., Martínez-Ruiz, F., Morcillo, F., Martín-Ramos, D., Arias, J.M. (2008). "Ca-Mg kutnahorite and struvite production by *Idiogramina* strains at modern seawater salinities". *Chemosphere*, 72 (3), 465-472.
- Gustafsson, J.P., Dässon, E., Bäckström, M. (2009). "Towards a consistent geochemical model for prediction of uranium (VI) removal from groundwater by ferrihydrite". *Applied Geochemistry*, 24 (3), 454-462.
- Günther, A., Raff, J., Geipel, G., Bernhard, G. (2008). "Spectroscopic investigations of U(VI) species sorbed by the green algae *Chlorella vulgaris*". *BioMetals*, 21, 333-341.
- Haese, R.R., (2000). "The reactivity of iron". In Schulz, H.D., and Zabel, M. (Eds.) *Marine Geochemistry: Berlin (Springer)*, 233-261.
- He, X., Feng, L., Xiao, H., Li, Z., Liu, N., Zhao, Y., Zhang, Z., Huang, Y. (2007). "Unambiguous effects of lanthanum?". *Toxicology Letters*, 170 (1), 94-96.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis**
MAH1

- Hirose, K., Aoyama, M., Povinec, P.P. (2009). “ $^{239,240}\text{Pu}/^{137}\text{Cs}$ ratios in the water column of the North Pacific: a proxy of biogeochemical processes”. *Journal of Environmental Radioactivity*, 100 (3), 258-262.
- Jroundi F., (2004). “Interrelaciones entre *Myxococcus xanthus* y metales pesados: aspectos básicos y posibles aplicaciones”. Tesis doctoral del departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.
- Kazy, S.K., Das, S.K., Sar, P. (2006). “Lanthanum biosorption by a *Pseudomonas* sp.: Equilibrium studies and chemical characterization”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33 (9), 773-783.
- Kimura, T., Choppin, G.R., Kato, Y., Yoshida, Z. (1996). “Determination of the Hydration Number of Cm(III) in Various Aqueous Solutions”. *Radiochimica Acta*, 72 (2), 61-64.
- Kiran, B., Kaushik, A. (2008). “Chromium binding capacity of *Lyngbya putealis* exopolysaccharides”. *Biochemical Engineering Journal*, 38 (1), 47-54.
- Kuss, J., Garbe-Schönberg, C.-D., Kremling, K. (2001). “Rare earth elements in suspended particulate material of North Atlantic surface waters”. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65 (2), 187-199.
- Kostova, I. (2005). “Lanthanides as anticancer agents”. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 5 (6), 591-602.
- Kulkarni, P., Chellam, S., Fraser, M.P. (2006). “Lanthanum and lanthanides in atmospheric fine particles and their apportionment to refinery and petrochemical operations in Houston, TX”. *Atmospheric Environment*, 40 (3), 508-520.
- Langmuir, I. (1928). “The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum”. *Journal of American Chemistry Society*, 40, 1361-1403.
- Lee, M.H., Jeon, Y.S., Song, K. (2009) “Determination of activity concentrations and activity ratios of plutonium, americium and curium isotopes in radioactive waste samples”. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 280 (3), 457-465.
- Liu, H., Yuan, L., Yang, X., Wang, K. (2003). “ La^{3+} , Gd^{3+} and Yb^{3+} induced changes in mitochondrial structure, membrane permeability, cytochrome c release and intracellular ROS level”. *Chemico-Biological Interactions*, 146 (1), 27-37.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis**
MAH1

- Lloyd, J.R., Mabbett, A.N., Williams, D.R., Macaskie, L.E. (2001). "Metal reduction by sulphate-reducing bacteria: Physiological diversity and metal specificity". *Hydrometallurgy*, 59 (2-3), 327-337.
- Lloyd, J.R., Renshaw, J.C. (2005). "Microbial transformations of radionuclides: Fundamental mechanisms and biogeochemical implications". *Metal Ions in Biological Systems*, 44, 205-240.
- Malluche, H.H., Mawad, H., Monier-Faugere, M.C. (2008). "Effects of treatment of renal osteodystrophy on bone histology". *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 3 Suppl 3, S157-163.
- Markai, S., Andrès, Y., Montavon, G., Grambow, B. (2003). "Study of the interaction between europium (III) and *Bacillus subtilis*: Fixation sites, biosorption modeling and reversibility". *Journal of Colloid and Interface Science*, 262 (2), 351-361.
- Marques Fernandes, M., Schmidt, M., Stumpf, T., Walther, C., Bosbach, D., Klenze, R., Fanghänel, Th. (2008). "Site-selective time-resolved laser fluorescence spectroscopy of Eu³⁺ in calcite". *Journal of Colloid and Interface Science* 321, (2), 323-331.
- Merroun, M.L., Chekroun, K.B., Arias, J.M., González-Muñoz, M.T. (2003). "Lanthanum fixation by *Myxococcus xanthus*: Cellular location and extracellular polysaccharide observation". *Chemosphere*, 52 (1), 113-120.
- Merroun, M., Nedelkova, M., Rossberg, A., Hennig, C., Selenska-Pobell, S. (2006). "Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium". *Radiochimica Acta*, 94 (9-11), 723-729.
- Merroun, M.L., Raff, J., Rossberg, A., Hennig, C., Reich, T., Selenska-Pobell, S. (2005). "Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12". *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5532-5543.
- Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S. (2001). "Interactions of three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with U(VI)". *BioMetals*, 14 (2), 171-179.
- Mullen, M.D., Wolf, D.C., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., Flemming, C.A., Bailey, G.W. (1989). "Bacterial sorption of heavy metals". *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (12), 3143-3149.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis**
MAH1

- Nankawa, T., Suzuki, Y., Ozaki, T., Ohnuki, T., Francis, A.J. (2006). "Degradation of Eu(III)-malic acid complexes by *Pseudomonas fluorescens*". *Journal of Alloys and Compounds*, 408-412, 1329-1333.
- Ngwenya, B.T., Magennis, M., Olive, V., Mosselmans, J.F.W., Ellam, R.M. (2010). "Discrete site surface complexation constants for lanthanide adsorption to bacteria as determined by experiments and linear free energy relationships". *Environmental Science and Technology*, 44 (2), 650-656.
- Ozaki, T., Suzuki, Y., Nankawa, T., Yoshida, T., Ohnuki, T., Kimura, T., Francis, A.J. (2006). "Interactions of rare earth elements with bacteria and organic ligands". *Journal of Alloys and Compounds*, 408-412, 1334-1338.
- Plancque, G., Moulin, V., Toulhoat, P., Moulin, C. (2003). "Europium speciation by time-resolved laser-induced fluorescence". *Analytica Chimica Acta*, 478 (1), 11-22.
- Reddy, D.H.K., Seshaiyah, K., Reddy, A.V.R., Rao, M.M., Wang, M.C. (2010). "Biosorption of Pb^{2+} from aqueous solutions by *Moringa oleifera* bark: Equilibrium and kinetic studies". *Journal of Hazardous Materials*, 174 (1-3), 831-838.
- Reynolds, E.S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy". *Journal of Cell Biology*, 17, 208.
- Rodriguez Valera, F., Ruiz Berraquero, F., Ramos Cormenzana, A. (1981). "Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations". *Microbial Ecology*, 7 (3), 235-243.
- Schubauer-Berigan, M.K., Daniels, R.D., Pinkerton, L.E. (2009). "Radon exposure and mortality among white and American Indian uranium miners: An update of the Colorado Plateau cohort" *American Journal of Epidemiology*, 169 (6), 718-730.
- Sert, S., Kütahyalı, C., Inan, S., Talip, Z., Çetinkaya, B., Eral, M. (2008). "Biosorption of lanthanum and cerium from aqueous solutions by *Platanus orientalis* leaf powder". *Hydrometallurgy*, 90 (1), 13-18.
- Schmidt, M., Stumpf, T., Walther, C., Geckeis, H., Fanghänel, T. (2009). "Incorporation versus adsorption: Substitution of Ca^{2+} by Eu^{3+} and Cm^{3+} in aragonite and gypsum". *Dalton Transactions*, (33), 6645-6650.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis**
MAH1

- Shaowu, X., Pin, Y. (2005). "Effect of La^{3+} on myocardial potassium channels revealed by patch-clamp technique". Chinese Science Bulletin, 50 (10), 968-970.
- Singer, D.M., Zachara, J.M., Brown Jr., G.E. (2009). "Uranium speciation as a function of depth in contaminated hanford sediments - A micro-XRF, micro-XRD, and micro- and bulk-XAFS study". Environmental Science and Technology, 43 (3), 630-636.
- Skerencak, A., Panak, P.J., Hauser, W., Neck, V., Klenze, R., Lindqvist-Reis, P., Fanghänel, Th. (2009). "TRLFS study on the complexation of Cm(III) with nitrate in the temperature range from 5 to 200 °C". Radiochimica Acta, 97 (8), 385-393.
- Sokolnikov, M.E., Gilbert, E.S., Preston, D.L., Ron, E., Shilnikova, N.S., Khokhryakov, V.V., Vasilenko, E.K., Koshurnikova, N.A. (2008). "Lung, liver and bone cancer mortality in Mayak workers". International Journal of Cancer, 123 (4), 905-911.
- Stephan, H., Geipel, G., Bernhard, G., Comba, P., Rajaraman, G., Hahn, U., Vögtle, F. (2005). "Synthesis and binding properties of dendritic oxybathophenanthroline ligands towards copper(II)". European Journal of Inorganic Chemistry, (22), 4501-4508.
- Suzuki, Y., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Banfield, J.F. (2005). "Direct microbial reduction and subsequent preservation of uranium in natural near-surface sediment". Applied and Environmental Microbiology, 71 (4), 1790-1797.
- Szeki, I., Hutchison, A. (2009). "Lanthanum carbonate for hyperphosphatemia in patients with advanced CKD and patients receiving dialysis". Expert Review of Endocrinology and Metabolism, 4 (4), 307-316.
- Temkin, M.I., Pyzhev, V. (1940). "Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalysts". Acta Physicochimica USSR, 12, 217-222.
- Texier, A.C., Andrès, Y., Le Cloirec, P. (1997). "Selective biosorption of lanthanide (La, Eu) ions by *Mycobacterium smegmatis*". Environmental Technology, 18 (8), 835-841.
- Texier, A.-C., Andrès, Y., Le Cloirec, P. (1999). "Selective biosorption of Lanthanide (La, Eu, Yb) ions by *Pseudomonas aeruginosa*". Environmental Science and Technology, 33 (3), 489-495.

*Estudios sobre la interacción del lantano y europio con *Idiomarina loihiensis**
MAH1

- Texier, A.-C., Andrès, Y., Illemassene, M., Le Cloirec, P. (2000). "Characterization of lanthanide ions binding sites in the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*". *Environmental Science and Technology*, 34 (4), 610-615.
- Thakur, P., Pathak, P.N., Gedris, T., Choppin, G.R. (2009). "Complexation of Eu(III), Am(III) and Cm(III) with dicarboxylates: Thermodynamics and structural aspects of the binary and ternary complexes". *Journal of Solution Chemistry*, 38 (3), 265-287.
- Tsuruta, T. (2007). "Accumulation of Rare Earth Elements in Various Microorganisms". *Journal of Rare Earths*, 25 (5), 526-532.
- Tyler, G., Olsson, T. (2005). "Rare earth elements in forest-floor herbs as related to soil conditions and mineral nutrition". *Biological Trace Element Research*, 106 (2), 177-191.
- Vijayaraghavan, K., Mahadevan, A., Joshi, U.M., Balasubramanian, R. (2009). "An examination of the uptake of lanthanum from aqueous solution by crab shell particles". *Chemical Engineering Journal*, 152 (1), 116-121.
- Volesky, B. (1990). "Removal and recovery of heavy metals by biosorption". En: Volesky, B. *et al.*, 1990. *Biosorption of heavy metals*, CRC Press, Boca Raton, Fla, 7-44.
- World Health Organization, (2005). "World Health Organization, 2005. Uranium in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality". WHO/SDE/WSH/03.04/118 (updated June 2005).

Capítulo 7. Conclusiones

Conclusiones

Conclusiones

1. Atendiendo a los resultados obtenidos en la caracterización tanto fenotípica como genotípica de la cepa MAH1, podemos concluir que esta bacteria es una cepa perteneciente a la especie *Idiomarina loihiensis*, y que se ha denominado *Idiomarina loihiensis* cepa MAH1.

2. Se ha demostrado la capacidad de biomineralización de *I. loihiensis* MAH1 en condiciones de aguas de mar. En concreto se ha visto que es capaz de producir estruvita, Ca-Mg kutnahorita y monohidrocalcita.

3. La precipitación de Ca-Mg kutnahorita, un carbonato rico en magnesio del grupo de la dolomita, por *Idiomarina loihiensis* MAH1, supone la obtención de este mineral por primera vez en condiciones de salinidad de agua de mar, lo que es de notable interés de cara al conocido como “problema de la dolomita”.

4. Los datos sobre la interacción del uranio con *I. loihiensis*, cuando el experimento se realiza usando como solución de contacto perclorato sódico, demuestran que la bacteria posee una buena capacidad de acumular uranio mediante la unión de este radionucléido a sus grupos carboxilo y fosfato presentes tanto en la pared como en el EPS. Además, y mediante la espectroscopia por EXAFS, se ha concluido que la especiación de uranio asociada a las células de la cepa MAH1 es dependiente del pH de la solución del metal. Para el europio, en las mismas condiciones, los datos de especiación obtenidos sugieren que para este lantánido la interacción se produce mediante los grupos carboxilo presentes tanto en la pared celular como en el EPS.

5. De acuerdo con los resultados obtenidos del estudio mediante TRLFS de las muestras de la bacteria incubada en presencia de uranio (en condiciones simuladas de agua de mar), y que ponen de manifiesto la presencia de carbonatos y/o fosfatos, tanto orgánicos como inorgánicos, de este elemento, se puede sugerir la posible implicación de esta bacteria en el ciclo biogeoquímico de este actínido.

6. Con respecto al europio podemos concluir que: A) Existe un cambio de especiación provocado por la interacción bacteria/europio y B) de acuerdo con los tiempos de vida de la especie de europio encontrada y

Conclusiones

sabiendo, como queda establecido en la conclusión 2, que esta bacteria produce carbonatos se sugiere la formación de carbonatos de europio.

Conclusiones

1. According to the results obtained in the MAH1 strain's phenotypic and genotypic characterization studies, we concluded that this bacterium is a strain of *Idiomarina loihiensis* specie, and it was denominated as *Idiomarina loihiensis* MAH1.

2. The biomineralization capability of *Idiomarina loihiensis* MAH1 in seawater conditions was demonstrated. In particular, this strain can produce struvite, Ca-Mg kutnahorite and monohydrocalcite.

3. This is first work reporting the biomineralization of Ca-Mg kutnahorite, a rich magnesium carbonate of the dolomite's group, at seawater conditions. This finding will provide new and interesting insights on the issue of "dolomite problem"

4. In sodium perchlorate background solution, the interactions studies of *I.loihiensis* with uranium demonstrated that *I. loihiensis* MAH1 possess high uranium binding capability, through carboxylic and phosphate groups of the cell wall and EPS. In addition, EXAFS analysis showed that the speciation of uranium associated with the strain MAH1 is pH dependent process. In the case of the europium, and at the same conditions, the speciation data suggested that the carboxylic groups of the cell wall and EPS are the main binding sites of this lanthanide.

5. The implications of carbonates and/or phosphates, of different origin (organic and inorganic) in the binding of uranium at seawater conditions demonstrated by means of TRLFS, could give as an indication of the possible involvement of this bacteria on the biogeochemical cycle of this actinide.

6. In the case of europium we can concluded that: A) the speciation of this element change upon its interaction with bacterial cells B) this bacterium could be involved in the biomineralization of europium carbonates due to the ability of this strain to precipitate carbonates (see conclusion 2) and also due to the lifetimes of these Eu species found to be characteristics for europium carbonates.

Conclusiones