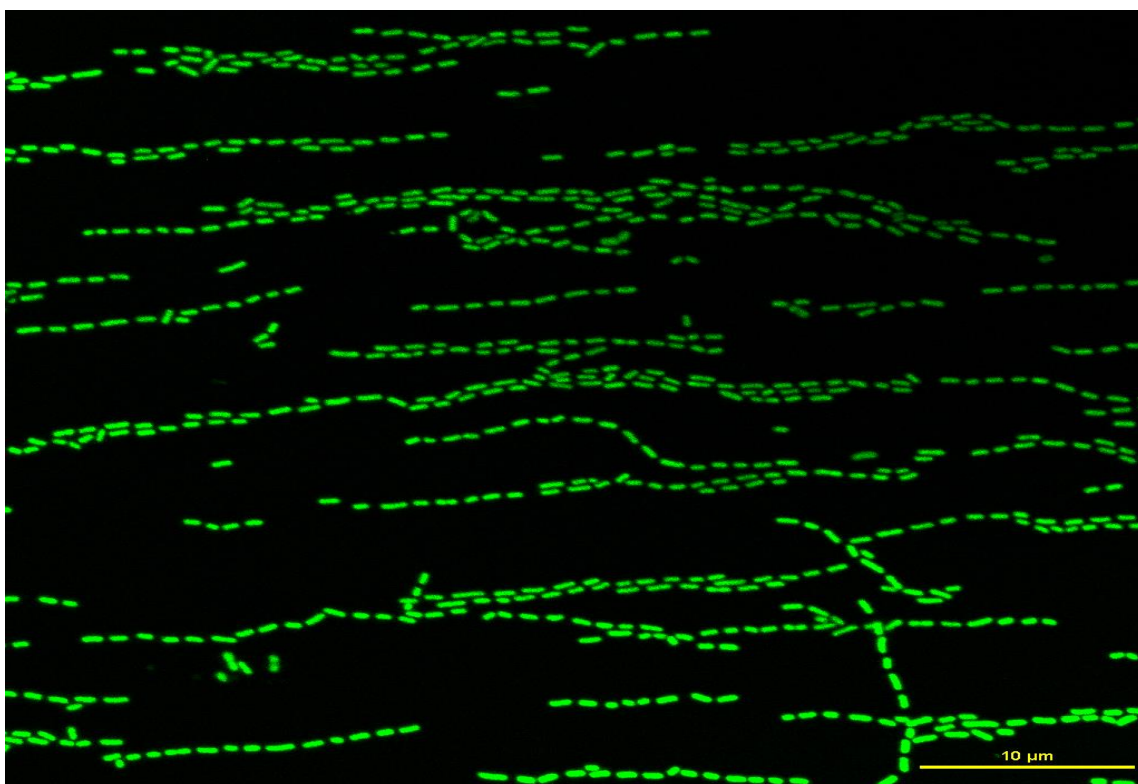


FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Inorgánica



BACTERIAS MAGNÉTICAS BIOMIMÉTICAS. APLICACIONES BIOMÉDICAS



Miguel Ángel Martín Marcos

24/07/2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Miguel Ángel Martín Marcos
ISBN: 978-84-9125-222-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40698>

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Inorgánica



PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**BACTERIAS MAGNÉTICAS
BIOMIMÉTICAS. APLICACIONES
BIOMÉDICAS**

Miguel Ángel Martín Marcos

Granada, junio 2014

BACTERIAS MAGNÉTICAS BIOMIMÉTICAS. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Miguel Ángel Martín Marcos
para aspirar al título de Doctor por la
Universidad de Granada

Fdo. Miguel Ángel Martín Marcos

LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL:

D. José Manuel Domínguez Vera
Catedrático del Departamento de Química Inorgánica
Universidad de Granada

y

D^a. Natividad Gálvez Rodríguez
Profesora titular del Departamento de Química Inorgánica
Universidad de Granada

El doctorando Miguel Ángel Martín Marcos y los directores de la Tesis José Manuel Domínguez Vera y Natividad Gálvez Rodríguez garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Julio de 2015

El Doctorando

Fdo.: Miguel Ángel Martín Marcos

Los Directores de la Tesis

Fdo.: José Manuel Domínguez Vera

Catedrático del Departamento de
Química Inorgánica. Universidad de
Granada.

Fdo.: Natividad Galvez Rodríguez

Profesora titular del Departamento de
Química Inorgánica. Universidad de
Granada.

Los resultados del trabajo de investigación realizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación de 3 artículos y una patente cuyos indicios de calidad son:

- Martin Miguel, Carmona Fernando, Cuesta Rafael, Rondon Deyanira, Galvez Natividad, Dominguez-Vera Jose M. (2015) Artificial Magnetotactic Bacteria. Living Magnets at Room Temperature. **Advanced Functional Materials**, 24(23), 3489-3493

INDICIOS DE CALIDAD:

Datos del Journal Citation Reports

- Impact Factor: 11,805
 - Categorías (incluyendo N° de revistas y posición revistas):
MATERIALS SCIENCE, MULTIDISCIPLINARY, 256 revistas,
posición 12
 - Cuartil: Primer cuartil
 - Número de citas recibidas: 5
-
- Elsa Valero, Miguel Martín, Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, Johannes Raff, Mohamed L. Merroun and Jose M. Dominguez-Vera (2015).
Nanopatterning of Magnetic CrNi Prussian Blue Nanoparticles Using a Bacterial S-layer as Biotemplate. **Inorganic Chemistry**. DOI:
10.1021/acs.inorgchem.5b00555

INDICIOS DE CALIDAD:

Datos del Journal Citation Reports

- Impact Factor: 4,762
- Categorías (incluyendo N° de revistas y posición revistas):
CHEMISTRY, INORGANIC & NUCLEAR, 45 revistas, posición 4
- Cuartil: Primer cuartil

- Probiotic Bacteria comprising metals, metal nanoparticles and uses thereof. P8748EP00 P8748PC00, Application No.: PCT/EP2014/063246, Publication No.: WO 2014/206969.
- Fernando Carmona, Miguel Martín, Natividad Gálvez, José M. Domínguez-Vera. (2014). Bioinspired magneto-optical bacteria. **Inorganic Chemistry**. Volumen: 53 Número: 16 Páginas: 8565-8569

INDICIOS DE CALIDAD:

Datos del Journal Citation Reports

- Impact Factor: 4,762
- Categorías (incluyendo N^o de revistas y posición revistas):
CHEMISTRY, INORGANIC & NUCLEAR, 45 revistas, posición 4
- Cuartil: Primer cuartil
- Número de citas recibidas: 2

A la memoria de
mis padres y tía

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, en el grupo BIONANOMET (FQM-368) con la financiación del MINECO (proyecto CTQ2012-32236) y BIOSEARCH Life S. A. (contrato 3023 Proyecto PostBIO de la Agencia Idea de la Junta de Andalucía).

Pues llega ese momento que todo becario teme que llegue, ¿la defensa de su tesis?, no, ¡los agradecimientos!. Es la única parte de la tesis que todo el mundo lee, de ahí su importancia.

Después del tsunami acontecido en los últimos tiempos en mi vida, y que ha golpeado sin piedad lo más profundo de mi ser tambaleando mi alma como jamás en mi vida antes, hasta dejarme KO; siento que las palabras de agradecimiento que aquí pueda escribir no van a poder expresar todo el afecto que le tengo a tanta gente que estuvo presente durante tan doloroso proceso...Sabéis quién sois, y que estaré en deuda con vosotros el resto de mi vida.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Josema y Nati. gracias Josema, contigo empezó este viaje. Has sido el pilar que ha dado lugar a todo esto. Gracias por la constancia, el tesón, la motivación, el conocimiento, las palabras de aliento, la cercanía, el afecto, la comprensión, la paciencia, la humildad, la pasión por el trabajo, el amor por la investigación...podría dedicar un capítulo entero de esta tesis sólo a agradecerte todo lo que has hecho por mí y aún me quedaría corto...Gracias de corazón. Eres un reflejo en el que mirarse.

Gracias Nati por tu comprensión, disponibilidad, dulzura, calma y generosidad. Gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado, ha sido una suerte poder conocerte. Siempre os llevaré en mi corazón.

Gracias Rafa, por tu cercanía, amabilidad, por hacer más llevaderas las largas horas de trabajo en Linares con buen humor (y unas cervecitas) y por tus impresionantes diseños de imágenes. Hago extensible mi agradecimiento a Ruperto y a todos los miembros del laboratorio de Linares qué tan bien se portaron conmigo.

Gracias también a mis compañeros de laboratorio, Ana, Rocío, Fernando y Manu. Gracias por los buenos ratos en el laboratorio, por esos desayunos irrepetibles, por

esas tapas entre risas, siempre con más risas que tapas y por vuestra, siempre disponible, ayuda.

Gracias Fernando por enseñarme como “respiraban” las bacterias y el funcionamiento del laboratorio cuando llegué. Gracias Ana por tus correcciones de la tesis, cuando ya mi ojo no daba para más y por poner a mi disposición tus grandes conocimientos y buen hacer en el labo. Gracias Rocio (Rodonete, mejor) por ofrecerte a ayudarme siempre. Gracias Victor por tu buen rollo siempre en el labo y por contarnos con total naturalidad todas esas asombrosas cosas que sólo a ti te pasan ...eres un crack. Gracias Melissa por tus sabrosos creps y tu amabilidad infinita. Gracias Manu, por introducirme en el mundo de la escalada, por llamar mi atención para observar “las cosas bonitas de la facultad” y por todos los desayunos y comidas hablando de “nuestras cosas”. La vida en ocasiones golpea con fuerza y eso, desgraciadamente, tú lo sabes bien. Gracias por todo tu apoyo en los momentos más difíciles de mi vida, sabes que siempre me tendrás ahí para cualquier cosa que necesites. Eres grande, muy grande!!!.

Quiero dar las gracias muy especialmente a la profesora D^a. Purificación Sanchez. Gracias por tus palabras siempre amables y por esa visión positiva de las cosas que siempre me has transmitido.

Gracias al Profesor D. Enrique Colacio, a quien le tengo un gran afecto, por todas las palabras de ánimo que siempre me ha dedicado en los malos momentos y, a quién le proceso un tremendo respeto por sus conocimientos y su saber estar...Un ejemplo a seguir.

Gracias al Profesor D. José Ruiz; Pepe, como todos le llamábamos dando muestras de su cercanía. Una de esas personas que el destino nos arrebató mucho antes de lo que debía, privándonos de su compañía, apoyo, buen humor y sobre todo de su amistad. ¿Cómo es posible que te haya echado de menos en tantos momentos, habiéndote conocido tan poco tiempo?. Me hubiera ayudado tanto hablar contigo en esos malos momentos...siempre sabías qué aconsejar. Nunca olvidaré tus consejos...Una pérdida que duele.

Gracias al resto de miembros de docentes y compañeros del departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, especialmente a Migue Galindo, Carmen Maldonado, Juanma Herrera, Antoñillo, Belén, Antonio Mota y Jorge por vuestro sincero apoyo en uno de los momentos más complicados de mi vida.

Gracias a Antonio de la Torre y a Mari Carmen, por su excelente trabajo que nos hace el nuestro más fácil.

Gracias a BIOSEARCH S. A. y muy especialmente a la Dras. D^a. Mónica Olivares y Deyanira Rondón, que han estado en el origen de esta “aventura.” Gracias también a D. Santiago De la Escalera, D. Alberto Garach y D^a. Raquel Criado y a todos los miembros de su laboratorio de investigación por su estrecha colaboración.

Gracias al Profesor D. Francisco Santoyo y al Dr. D. Mariano Ortega, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada por los análisis de los EPS realizado en su departamento.

Gracias a la Dra. D^a. Lucía Gutierrez por las medidas de magnetismo *in vivo* recogidas en esta tesis y por su cercanía y buena disponibilidad para la colaboración.

Gracias a todos los miembros de la sala de becarios: Elena, Sara, Ismael, Kiko, Silvia, Noelia, Elo, Natalia, Ismael (siempre con su banda en la cabeza...quiac!!). Espero que algún día (no muy lejano) hagamos esa barbacoa... anytime, anywhere...but with you all. Sois los mejores compañeros de sala que tengo (bueno y los peores, no tengo otros...!!!).

Gracias Elena por aguantarme en mis momentos de enajenación y hastío provocado por ese proceso enfermizo por el que todo becario debe pasar, llamado Tesis (y por las cervezas)...ya me entenderás.

Gracias Sara por tu amabilidad y por hacer más llevaderas las largas horas en la sala.

Gracias Fran (Radioquímica), por tus charlas distendidas los fines de semana en la sala de becarios haciéndome más amenas las duras horas de escritura.

Gracias Marlen por tu ayuda con el Word en mis momentos de pánico.

Gracias Kiko, por dejarme participar en tu peña de futbol. Siempre la recordaré por ser la peña donde “colgué mis botas”, nunca olvidaré ese descenso del rio verde donde “saltamos al vacio”.

Gracias Victor Karim, por tu buenísimo rollo siempre, por tu sonrisa tornada siempre en carcajada y por supuesto por prestarme el nitrógeno líquido siempre que lo necesité.

Gracias Fran (carbones) a ti también por prestarme el nitrógeno líquido cuando lo necesité.

Gracias Carmen Montoro por saber comprender, posiblemente mejor que nadie, mi dolor y por dedicarme palabras de aliento, apoyo y de amistad.

Gracias a Cala y Juanra por aguantarme en esos complicados momentos en los que uno se siente en una especie de burbuja espacio-temporal, donde todo se va volviendo borroso con el paso del tiempo (y los cubatas). Cada momento con vosotros (y con Pepe) los guardo como oro en paño.

La vida te pone en el camino a muchas personas, la mayoría pasan de largo. Otros permanecen algún tiempo y luego desaparecen. Pero sólo las que tú eliges (y ellos) te acompañan hasta el final del camino. Gracias a Edimburgo por poner en mi camino a Borja. Contigo quiero (y sé que lo haré) hacer el camino hasta el final (pero tú te mueres antes, vale).

Gracias Mirtha por levantarme el ánimo en mis horas más bajas. Por ayudarme, entenderme, consolarme, animarme y por enseñarme lo mejor de Valencia...tú. Una suerte tenerte como amiga.

Gracias al gañan más gañan de todos los gañanes. Gracias Raúl, en realidad no sé por qué te doy las gracias si tú no has tenido nada que ver en esta tesis. Bueno, ya que estamos, seguiré. Gracias por pertenecer a ese pequeñito grupo de personas a las que puedo llamar AMIGO. Seguiremos teniendo muchas más vivencias juntos, no te vas a librar tan fácilmente de mi, "In conclusión...son of a bitch".

Gracias a Rocio y a Gustavo, a Gustavo y a Rocio. Tanto monta, monta tanto...Gracias por todo vuestro apoyo y amistad y por hacerme tito sin ser vuestro hermano. Os quiero.

Gracias a Mohamed del CIC del PTS, por tantas y tantas horas de microfotografías en el TEM, por tus consejos, sugerencias y por esos partidos de basket y paddle, y por tratarme como un amigo más que como un usuario.

I want to express my thankfulness to all the people from Italy I worked with in Verona.

Thank Professor Pasquina Marzola for being so kind and pleasant with me during my stay in Verona.

Thank Silvia for treating me so nicely, for your patient and for showing me how to manage myself in the lab, and of course for that spectacular party-dinner at your's.

Thank Pietro for acquiring and analysing the MRI images and for the good time we spend together...A great guy!!

Thank Elena for your very good work with mice.

Thank Chiara for your sense of humor (special) and for making my time in the lab funnier and less tiring.

Thank so much Stefano, my friend. Thank you for being the way you are (...nothing else to say!!). I am sure I will see you again (the sooner the better). And also thank Simone, I do not why, but thank you. I will never forget the walk around (and around, and around, and around...) the city when we were discussing about "batmans". Also thank Giorgiano!!!. You two are the best photographers I ever met (and the only ones). This is only the starting point of our friendship. This is the best part of making a PhD, knowing people like you two and establish a friendship that will last forever. Thank you in deep guys!!!.

Gracias a Jose Ángel, Ismael, Sergio, Juanma, Jesús y al resto de mis amigos de Jerez, mi segunda familia. Por hacerme sentir que siempre están ahí y por demostrármelo.

Gracias a mis hermanos y mi familia por su apoyo incondicional. ¡Pase lo que pase, siempre estaremos unidos!. Os amo.

RESUMEN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

RESUMEN

La producción de nanopartículas asistida por microorganismos es una ruta sintética de enorme potencial, tanto a nivel de laboratorio como industrial. Se trata de una “green-chemistry” que no requiere condiciones de alta presión y/o temperaturas elevadas ni el uso de reactivos tóxicos para el medio ambiente y además puede ser escalable a nivel industrial.

Además, una ventaja adicional con respecto a los métodos tradicionales es el hecho que en tanto que las nanopartículas son sintetizadas por un organismo vivo, las condiciones metabólicas de dicho organismo pueden ser monitorizadas externamente, lo que suele conducir a una librería de nanopartículas de tamaño y forma diferentes. Y puesto que las propiedades de las nanopartículas son tremendamente dependientes de su tamaño y forma, el uso de microorganismos nos puede permitir en definitiva disponer de una factoría continua para la obtención de nanopartículas con diferentes propiedades.

A pesar del interés en la síntesis de nanopartículas mediante microorganismos, se trata de un área relativamente poco explorada y de hecho, la mayoría de los resultados se limitan a la síntesis de nanopartículas de metales nobles, de forma muy especial, oro. Sin embargo, la capacidad de muchos microorganismos por transformar la materia y/o incorporarla a su estructura abre un abanico enorme de posibilidades que van más allá de ser “una vía más” de sintetizar nanopartículas metálicas mediante reducción de sus correspondientes iones metálicos.

Por todo ello, se ha pretendido en esta tesis doctoral explorar las enormes posibilidades ofrecidas por ciertas familias de bacterias como *Bacillus sphaericus* JG-A12 o *Lactobacillus fermentum* para poder diseñar nuevos materiales con aplicaciones en distintas áreas relevantes como la biomedicina o la ciencia de materiales.

La estructura y contenido de esta tesis doctoral es la siguiente:

En la **introducción**, hemos presentado a los actores principales de esta tesis doctoral. Presentamos unas breves pinceladas de conceptos básicos usados en esta

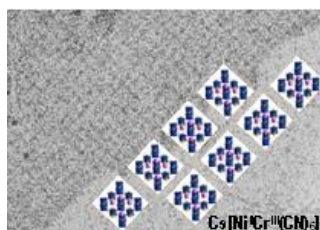
Tesis como el de biofilm, S-layer, probiótico, biomineralización, etc. y ponemos la lupa en algunas cepas bacterianas con capacidad de sintetizar nanopartículas metálicas de forma natural y artificial.

Una atención especial reciben las bacterias magnetotácticas, debido a su enorme importancia en esta tesis, ya que nos hemos fijado en su funcionalidad para mimetizar un sistema con una amplia variedad de aplicaciones, tanto en la industria farmacéutica a modo de suplemento de hierro para anémicos, como en biomedicina como agente de contraste para RMI.

En los **materiales y métodos**, explicamos la manera en la que hemos realizado los experimentos, dedicando un capítulo completo a materiales y métodos.

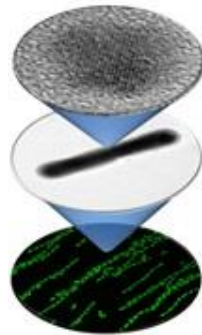
En el **capítulo uno**, hemos abordado una nueva aproximación para la formación de “nano-patterning” de materiales basadas en el uso de S-layer como bioplataforma donde depositar de forma ordenada nanopartículas magnéticas.

Para ello hemos hecho uso de la S-layer de *Bacillus sphaericus* JG-A12 como biotemplate para la deposición de nanopartículas de un derivado de azul de Prusia $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ (Nanopatterning of Magnetic CrNi Prussian Blue Nanoparticles Using a Bacterial S-Layer as a Biotemplate, *Inorganic Chemistry* 2015, 10.1021/acs.inorgchem.5b00555). Hemos podido demostrar que las nanopartículas se depositan siguiendo el patrón estructural de la S-layer y además que sus propiedades magnéticas se mantienen.

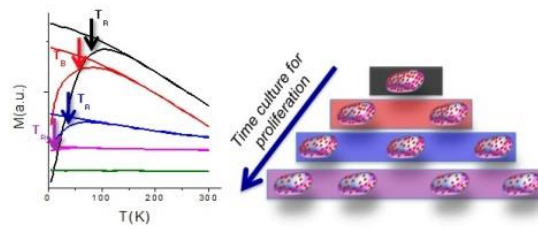


En el **capítulo dos**, hemos diseñado un sistema compuesto de bacterias probióticas ácido lácticas de la cepa *Lactobacillus fermentum* y nanopartículas de óxido de hierro (maghemita). La incorporación, a nivel del biofilm externo de *Lactobacillus fermentum*, de miles de nanopartículas de maghemita, hace que la bacteria en su conjunto se comporte como un imán. Un imán vivo. El primer

ejemplo de un imán vivo sintetizado en un laboratorio (Artificial Magnetic Bacteria: Living Magnets at Room Temperature, *Advanced Functional Materials*. 2014, 3489–3493). La presencia de las nanopartículas de maghemita en la bacteria probiótica constituyen un sistema ideal para vehicular las nanopartículas magnéticas al aparato digestivo y poder detectar diversas patologías intestinales mediante MRI debido a la capacidad de las bacterias de anidar en el intestino humano. Las bacterias se rodean de una enorme cantidad de partículas de maghemita lo que facilita la interacción dipolar entre ellas y el aumento de sus propiedades magnéticas. De hecho, estas “bacterias magnéticas artificiales” se comportan como un imán a temperatura ambiente y se ordenan en presencia de un campo magnético externo.



En el **capítulo tres**, hemos querido explotar una propiedad singular de las bacterias magnéticas artificiales como es el hecho de que son un imán vivo a temperatura ambiente. En tanto que es un organismo vivo, pueden proliferar y llevar a cabo la división celular con el consiguiente reparto del material magnético entre las bacterias resultantes. Hemos realizado un estudio de las propiedades magnéticas en función del tiempo. No existen estudios de este tipo en la bibliografía. Hemos demostrado que la proliferación bacteriana conduce lógicamente a un menor número de partículas magnéticas por bacteria y hace que la interacción dipolar entre ellas sea menor (por encontrarse a mayor distancia). Esto tiene como consecuencia final el descenso de la temperatura de bloqueo del sistema, pasando de ser un imán a un sistema superparamagnético a temperatura ambiente.



En el **capítulo cuatro**, con el objetivo de dar un paso más y explorar los límites de los sistemas creados en nuestro laboratorio, hemos querido aprovechar el potencial de las nanoestructuras creadas para diferentes aplicaciones. En este sentido, hemos explotado la enorme capacidad de las bacterias probióticas *Lactobacillus fermentum* por incorporar nanopartículas de maghemita como una nueva vía para el suplemento de hierro (“Probiotic Bacteria comprising metals, metal nanoparticles and uses thereof”, P8748EP00 P8748PC00, Application No.: PCT/EP2014/063246, Publication No.: WO 2014/206969). El hecho de que las bacterias sigan siendo viables después de la incorporación de nanopartículas de maghemita y la enorme cantidad de hierro que se logra acumular por bacteria hace que el sistema sea útil en la industria de nutrición como probiótico para suplemento de hierro. La optimización de la síntesis a nivel industrial llevada a cabo en los laboratorios de Biosearch SA han permitido obtener formulaciones con una viabilidad apropiada de 10^{10} CFU y con concentraciones de Fe de 2-14 mg/ml. Ensayos preliminares en ratas han puesto de manifiesto que estas bacterias magnéticas artificiales son capaces de recuperar los niveles de Fe en ratas con anemia inducida. Asimismo, hemos logrado hacer un seguimiento de la biodistribución del hierro y su degradación intestinal haciendo uso de las curvas de susceptibilidad magnética AC en fase y fuera de fase de los diferentes tejidos aislados. De estos estudios se ha concluido que las partículas sufren degradación a nivel del intestino delgado y que son eliminadas vía fecal sin una degradación completa. Estos datos preliminares van a permitir diseñar nuevos experimentos con la idea de optimizar la dosis para el empleo de estas bacterias magnéticas artificiales como suplementos de hierro para anemia.



Por último, hacemos un resumen del trabajo desarrollado durante esta tesis doctoral y extraemos y comentamos los resultados más significativos. Las **conclusiones**.

SUMMARY

Nanoparticles production assisted by microorganisms is a synthetic pathway of enormous potential, both at laboratory and industrial procedure. It is a "green-chemistry" which does not require high pressure and / or temperatures or the use of toxic reagents for the environment and can also be industrially scalable.

An additional advantage over traditional methods is the fact that as nanoparticles are synthesized by living organisms, metabolic conditions can be monitored externally, often leading to a library of different forms and sizes nanoparticles. As nanoparticles properties are extremely dependent on its size and shape, the use of microorganisms may allow us to have a factory for obtaining nanoparticles with different properties. Despite the interest in synthesizing nanoparticles by microorganisms, it is a relatively unexplored area and in fact, most of the results are about the synthesis of nanoparticles of noble metals, specially, gold. However, the ability of many microorganisms to transform matter and / or incorporate it into its structure opens up a huge range of possibilities going beyond being "one more way " to synthesize metal nanoparticles by reduction of its corresponding metallic ions.

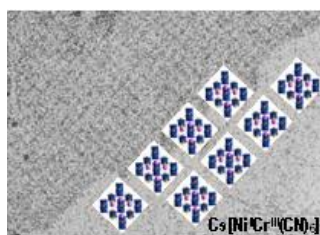
Therefore, in this thesis we have explored the enormous potential offered by certain family of bacteria to design new materials with applications in various relevant fields such as biomedicine and materials science.

The structure and content of this doctoral thesis is as follows:

In the **introduction**, the main actors of this dissertation are introduced. We add a slight touch about some basic concepts used in this doctoral thesis as biofilm, S-layer, probiotic, biomineralization, etc, and put a magnifying glass on some bacterial strains which are able to synthesise metallic nanoparticles in a natural and an artificial way. An special attention is given to magnetotactic bacterias, due to their enormous significance in this dissertation since we focused in its functionality to mimic a system with a wide range of application in many diferents fields from farmaceutical industry as an iron supplement for anemic people to biomedicine as a contrast agent to MRI.

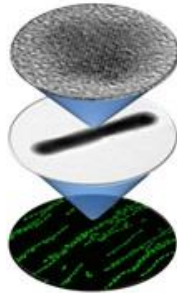
In **material and methods** section, it is explained the way we carried out our experiments, and also we present the technics used to analyses ours samples.

In **chapter one**, we have addressed a new approach for "nano-patterning" of new materials based on the use of S-layer (a bacterial protein) as a bioplatform to deposit neatly arranged magnetic nanoparticles. To do so, we've used of the S-layer from *Bacillus sphaericus* JG-A12 as biotemplate for depositing nanoparticles of a Prussian blue derivative $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ (Nanopatterning of Magnetic CrNi Prussian Blue Nanoparticles Using a Bacterial S-Layer as a Biotemplate, *Inorganic Chemistry* 2015, 10.1021/acs.inorgchem.5b00555). We have shown both nanoparticles are deposited following a structural pattern defined by the S-layer and also their magnetic properties are maintained.

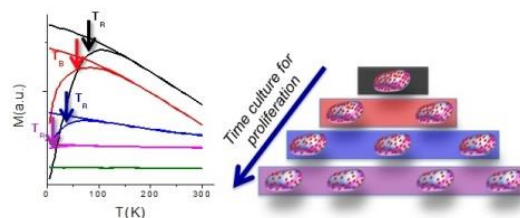


In **chapter two**, we have designed a system consisting of lactic acid bacteria probiotic strain *Lactobacillus fermentum* and nanoparticles of iron oxide (maghemite). In the external biofilm of *Lactobacillus fermentum* thousands of maghemite nanoparticles makes the whole system behaves like a magnet. A living magnet. This is the first example of a living magnet synthesized in a laboratory

(Advanced Functional Materials. Volume 2014, 3489-3493). A probiotic carrying maghemite nanoparticles is an ideal system to detect several intestinal pathologies by MRI due to the bacterial ability to nest in the human intestine. Bacteria are surrounded by an enormous amount of maghemite particles which facilitates the dipolar interaction between them and increases their magnetic properties. In fact, these "artificial magnetic bacteria" behave like a magnet at room temperature and they align with an external magnetic field.



In **chapter three**, we wanted to exploit a unique characteristic of the artificial magnetic bacteria since they are living magnets at room temperature. As they are living organisms, they can proliferate and carry out cells division resulting in the distribution of the magnetic material among bacteria. We conducted a study of the magnetic properties against time. There is no such kind of study in the literature. We have shown that bacterial growth leads to reduce magnetic particles per bacteria and makes dipolar interaction between them smaller (because of the longer distance among particles). This makes the blocking temperature to drop, changing its magnetic properties from being a magnet to a superparamagnetic system at room temperature.



In **chapter four**, to the aim of going one step further and explore the limits of the systems created in our lab, made us to harness the potential of the nanostructures created for different applications. In this sense, we have exploited the enormous capacity of the probiotic bacteria *Lactobacillus fermentum* to embed maghemite nanoparticles as a new supplement for iron (“Probiotic Bacteria comprising metals, metal nanoparticles and uses thereof, P8748EP00 P8748PC00, Application No.: PCT/EP2014/063246, Publication No.: WO 2014/206969). The fact that bacteria remain viable after incorporation of maghemite nanoparticles and the enormous amount of iron incorporated per bacteria makes this system useful for nutritional industry as a probiotic for iron supplement. Optimizing to industrial scale conducted in our laboratories have provided Biosearch S.A. formulations with an appropriated 10^{10} CFU viability and Fe concentrations of 2-14 mg/ ml. Preliminary assays in rats have shown that these artificial magnetic bacteria are able to recover rats with induced anemia to normal levels of iron. We have also managed to track iron biodistribution and its intestinal degradation using the ac magnetic susceptibility curves in phase and out of phase from different tissues isolated. From these studies it was found that particles undergo degradation in the small intestine and are eliminated via faeces without complete degradation. These preliminary data will allow to desing new assays to optimize the dose for the use of these artificial magnetic bacteria as iron supplements for anemia.



Finally, in chapter seven, it is made a summary of all the results obtained in this doctoral thesis and the most significant results are analysed. They are the **conclusions**.

ÍNDICE

Introducción.....	16
❖ Nanopartículas Generadas de Forma Artificial por Microorganismos.....	25
❖ Nanopartículas Generadas de Forma Natural por Microorganismos. Bacterias Magnetotáticas.....	31
❖ Bacterias “DIRB “ Reductoras de Hierro.....	39
❖ Organización, Composición y Función del Biofilm.....	44
❖ Probióticos: Microorganismos Saludables.....	51
❖ Rasgos y Peculiaridades de la S-Layer. Aplicaciones.....	56
❖ Referencias.....	67
Objetivos.....	74
Materiales y Métodos.....	78
Experimental.....	80
Instrumental.....	87
Referencias.....	99
Capítulo 1. Nanopatterning of Magnetic CrNi Prussian Blue Nanoparticles Using a Bacterial S-layer as Biotemplate.....	100
References.....	109

Capítulo 2: Artificial Magnetic Bacteria: Living Magnets at Room Temperature	112
References.....	122
Capítulo 3: Nanostructured Magnetism in Living Probiotic Bacteria.....	124
References.....	135
Capítulo 4: Probiotic Bacteria Comprising Metals, Metal Nanoparticles and Uses Thereof.....	136
4.1 NanoPROB. A new approach for iron supplement. First in vivo studies of biodistribution and degradation.....	192
References.....	198
Conclusiones.....	200



Introducción

En el famoso discurso de Richard Feynman (*"There is plenty of room at the botom"*, Chicago 1959), se exponía una idea revolucionaria: la manipulación directa de átomos para la creación de nuevos materiales con nuevas propiedades. Desde entonces, la ciencia ha comenzado a desarrollar primero y usar después esta moderna tecnología en una amplia variedad de aplicaciones, desde la generación de aparatos extremadamente pequeños hasta el desarrollo de una nueva generación de herramientas para identificar células diana infectadas¹.

Durante los años 90, surgieron novedosos métodos físicos y químicos para la producción de materiales mediante manipulación a nivel atómico. Estos nuevos métodos son conocidos como tecnología "nano". Hoy en día se pueden sintetizar, rutinariamente por varias rutas de síntesis, nanomateriales con una gran precisión en su morfología, tamaño y propiedades físico-químicas. Sin embargo, estos métodos presentan en numerosas ocasiones una serie de inconvenientes, especialmente cuando se tratan de escalar hasta producción industrial, como son el uso de compuestos tóxicos, la necesidad de condiciones de reacción agresivas y la generación de subproductos dañinos para el medio ambiente ²⁻⁷. Por todo ello, lo más deseado sería poder producir estos nanomateriales tecnológicos mediante métodos limpios, no tóxicos, biocompatibles y "eco-friendly".

Una de las alternativas más atractivas y eficientes para la preparación de nanomateriales es el uso de microorganismos como factorías. Organismos unicelulares tales como bacterias, algas, levaduras y hongos entre otros, son capaces de sintetizar, tanto extra como intracelularmente, nanomateriales inorgánicos "*inusuales*". Es decir, nanomateriales que no son sintetizados como consecuencia de su metabolismo regular⁸. Y en este sentido, conceptos e ideas derivadas de varios campos de la ciencia, como la física, la química, la ingeniería y la biología, emergen juntos para diseñar, a partir de microorganismos, nuevos materiales con propiedades deseadas.

La actividad microbiana es responsable de la transformación de al menos un tercio de los elementos de la tabla periódica, los cuales son el resultado de procesos de detoxificación, asimilación y disimilación, y representa la piedra angular de

muchos ciclos biogeoquímicos que implican el cambio en el estado de valencia de varios elementos⁹. Los metales juegan un papel inherentemente importante en la fisiología de los microorganismos. Metales como el hierro, cobre, sodio, potasio, calcio, magnesio, etc., son nutrientes esenciales y actúan como: i) centros de reacción durante las reacciones bioquímicas, ii) formando parte de metaloproteínas, iii) reguladores del balance osmótico, iv) procesos redox y v) estabilizadores de varias macromoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos a través de fuerzas electrostáticas¹⁰.

El interés en crear métodos de síntesis verde (Green Chemistry), respetuosos con el medio ambiente para la síntesis de nanomateriales, ha hecho que los investigadores acudan a procesos y sistemas biológicos como fuente de inspiración. Muchos microorganismos han sido ampliamente empleados para la biorremediación de metales tóxicos, donde la detoxificación ocurre bien por reducción de iones metálicos o bien por la formación de complejos insolubles, los cuales generalmente se forman como nanopartículas a nivel intracelular¹⁰⁻¹².

Algunos de los trabajos sobre acumulación de partículas inorgánicas en microbios datan de los años 60, donde fue descubierta la síntesis de: ZnS en bacterias reductoras de sulfato, Au en algas, CdS en levaduras y magnetita en bacterias magnetotácticas¹³⁻¹⁸.

Sin embargo, la síntesis dirigida de nanomateriales con el uso de microorganismos es un fenómeno relativamente reciente y poco explotado. La naturaleza ha evolucionado hacia la optimización de procesos para la síntesis de materiales bioinorgánicos a escala nano y esto ha contribuido al desarrollo de un área de investigación relativamente nueva basada en el uso de microorganismos para la biosíntesis dirigida de nanopartículas⁶.

Materiales producto de la Biomineralización.

La biomineralización es un término extremadamente amplio pero en términos generales simboliza la formación de sólidos inorgánicos (biominerales) tanto en el interior como en el exterior celular, mediante el control exhaustivo de biomacromoléculas, que determinan la nucleación del biomineral, tamaño de

grano, fase cristalina, e incluso su orientación^{8,19,20-23}. Este fenómeno genéticamente regulado está tan esparcido en el mundo biológico que la supervivencia de muchas especies depende de su habilidad para sintetizar estas matrices inorgánicas rápida y eficientemente.

Una gran variedad de biominerales son sintetizados en la naturaleza en distintos grupos de organismos incluyendo plantas, animales y microorganismos. El componente que quizá distingue principalmente a los biominerales de los minerales sintéticos es la presencia de biomacromoléculas imbricadas íntimamente con las fases minerales a distintos niveles jerárquicos. Actualmente se conocen más de 60 biominerales que forman parte de este proceso incluyendo silicatos, óxidos de hierro, carbonatos cálcicos, fosfatos cálcicos o sulfatos^{8,24,20,22,25-27}. La compleja naturaleza de los materiales bioinorgánicos formados en asociación con organismos vivos no solo se expresa a escala macro- sino que también reside a escala meso-, micro- y nanoscópica. A pesar de la complicada estructura jerárquica, es fascinante observar que los bloques más pequeños construidos en tales materiales son generalmente de una escala nanométrica. El complejo proceso de biomineralización implica una serie de eventos moleculares tales como el reconocimiento selectivo, la deposición de las sales inorgánicas por parte de las biomacromoléculas (combinación de proteínas, polisacáridos y lípidos), y la formación de una fase mineral^{24,28,20,29}.

En los microorganismos, generalmente la biomineralización de sólidos inorgánicos procede vía inmovilización de iones sobre la superficie celular microbiana, la cual también actúa como un excelente andamio. La mayoría de biomacromoléculas implicadas en el proceso de biomineralización tienen un atributo químico común: ser rico en motivos carboxílicos ($[\text{COO}^-]$), además de la presencia de grupos fosfatos y/o sulfatos ($[\text{PO}_4]^{3-}$, $[\text{SO}_4]^{2-}$)^{28,30,23}. Estos grupos funcionales de carga negativa presentes en la superficie de las células microbianas actúan como sitios excelentes para la inmovilización de iones metálicos, lo cual se cree que es el paso inicial de la formación de los biominerales^{28,23}. Después de la inmovilización de los iones inorgánicos, tiene lugar la nucleación y el crecimiento cristalino, dando como resultado la formación de un mineral altamente específico. Una exhaustiva

investigación sobre la formación de estos biominerales revela que estos iones inorgánicos son atraídos hacia la superficie reactiva microbiana, por consiguiente tiene lugar una supersaturación iónica cerca de la superficie celular, la cual es seguida por un descenso de la cantidad de energía libre requerida para la precipitación del metal que se consigue por el cambio del valor de pH o del potencial redox en la superficie celular debido al metabolismo microbiano.

Un ejemplo genuino que revela el potencial de microorganismos por llevar a cabo la síntesis de materiales es el denominado “*método biomimético*”. En él, una fuente externa de CO₂ es necesaria para realizar el proceso de biomineralización. Ciertos microorganismos utilizan atmósfera de CO₂ para la precipitación de carbonatos biogénicos bien intra- y/o extracelularmente³¹. Este mismo tipo de proceso puede llevarse a cabo sin ninguna fuente externa de CO₂, usando microorganismos que generalmente no sintetizan estos minerales de forma natural. Esto es particularmente interesante ya que el proceso es conducido hacia la formación de los biominerales carbonatados sin ninguna fuente externa de CO₂. Esto se ha podido conseguir debido a que dichos microorganismos producen CO₂ como un subproducto en el metabolismo aeróbico durante su crecimiento. Aprovechando esta característica, se han obtenido un amplio rango de carbonatos tales como CaCO₃, BaCO₃, y SrCO₃ usando microorganismos tales como hongos y actinomicetos que no generan estos productos en su metabolismo habitual.

Una aplicación sumamente interesante que tiene como proceso inherente la biomineralización, es la biorremediación. Esto es, la eliminación de metales tóxicos de un medio mediante la formación de cristales a través de microorganismos. En esta línea, se ha visto que cuando la especie del hongo *F. oxysporum* es expuesta a una solución acuosa de iones de metales pesados como Pb²⁺ y Cd²⁺, este puede convertir estos iones metálicos tóxicos en cristales de PbCO₃ y CdCO₃ de diversas morfologías³². Este tipo de procesos es de especial interés para la industria minera actual que se encuentra sometida al reto de obtención de metales a partir de menas cada vez menos puras. En este sentido, los microorganismos pueden llevar a cabo la eliminación de metales pesados “no deseados” de algunas menas mediante

un proceso de lixiviación que conduzca de forma fácil y económica al aumento de pureza del mineral final.

Mecanismos de formación de biominerales.

La biosíntesis de nanopartículas metálicas usa las proteínas de los microorganismos para la síntesis de nanopartículas tanto intra- como extracelularmente. La ruta bioquímica exacta implicada en la mayoría de estos procesos no está aún clara, pero se han detectado dos familias de proteínas ricas en cisteína que podrían ser responsables de la unión a metales pesados, la fitoquelatina (PC) y la metalotioneína (MT). Tanto PCs como MTs son proteínas conocidas por tener alta afinidad por iones metálicos blandos y formar complejos estables con Cd, Cu, Ag, Pb y Hg, etc.³³.

En este sentido, un mutante de *E. Coli* DH5 α que sobreexpresa genes de PC y/o MT es capaz de sintetizar partículas metálicas de Au, Ag, Fe, Te; bi-metálicas de CdZn, CdSe, CdTe, SeZn, CdCs, PrGd, SrGd, SrPr, FeAg, FeCo, FeMn; tri-metálicas de CdSeZn, FeCoNi, FeCoMn y multi-metálicas (CdSeZnTe, AuCdSeZn)³⁴⁻³⁷. Mediante variación de la concentración de los iones metálicos, la mayoría de las partículas sintetizadas están por debajo de los 10 nm de diámetro, mostrando propiedades interesantes como materiales semiconductores fluorescentes (Quantum Dots). Esto pone de manifiesto que la expresión de estas proteínas juega un papel determinante en la reducción y control del tamaño de estas nanopartículas.

Un estudio similar se llevó a cabo con la cepa de *E. Coli* JM109. Cuando a ésta se la dota con la capacidad de producir PCs usando el mismo gen de *S. pombe*, SpPhytochelatin, esta cepa puede sintetizar nanocristales de CdS de entre 2-6 nm de diámetro en 4 h de reacción³⁸. El tipo salvaje de *E. Coli* puede sintetizar nanocristales de CdS pero sólo después de 24h de reacción. Con las modificaciones genéticas, la expresión de PCs aumenta alrededor de 10 veces, por consiguiente se reduce el tiempo requerido para la síntesis de los nanocristales³⁹.

Control del mecanismo de biomineralización.

El control del tamaño y la forma es una de los mayores retos en la síntesis de nanopartículas. Se ha demostrado que el tamaño y la forma pueden ser controlados por afinación de los parámetros de reacción como por ejemplo la temperatura, el pH o las condiciones ambientales tales como atmosferas carentes o no de O₂, CO₂, etc.

Un ejemplo que ilustra esta dependencia tan fuerte con parámetros externos lo constituye la cepa de actinomicetos, *Actinobacter sp.*, que en presencia de iones de Au(III) y en ausencia de O₂ forman nanopartículas de Au(0) con formas esférica, triangular y hexagonal, con un tamaño aproximado de entre 30-50 nm (Figuras 1 y 2). La reacción es rápida y todo el Au(III) es reducido a nanopartículas de oro en 4 horas. A baja temperatura, la reacción es lenta y se forman nanopartículas de oro de un tamaño de unos 10 nm.

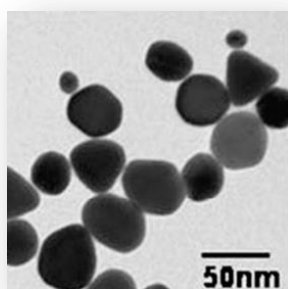


Figura 1. Imagen de TEM obtenida de nanopartículas de oro sintetizadas usando *Actinobacter sp.* en ausencia de oxígeno atmosférico.⁴⁰

Sin embargo, cuando la misma reacción se lleva a cabo en presencia de O₂, se forman nanopartículas de Au(0) de una morfología triangular y hexagonal completamente diferente, con aristas y picos mucho más marcados, con un tamaño de entre 50-500 nm. Esto ocurre por una reducción muy lenta de los iones de Au(III). Se ha observado que la citocromo oxidasa de *Actinobacter sp.*, es la proteína responsable de la reducción de los iones de Au(III) en disolución. Después de la reducción inicial y la formación de pequeñas nanopartículas esféricas de oro, la pared celular bacteriana proporciona el sitio idóneo para la nucleación y posterior crecimiento del cristal.

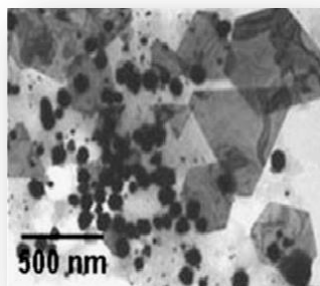


Figura 2. Imagen de TEM obtenida de nanopartículas de oro sintetizadas usando *Actinobacter sp.* en presencia de oxígeno atmosférico⁴⁰.

Asimismo, se han identificado un grupo de proteínas presentes en la pared celular de *Actinobacter sp.*, que guían el proceso de transformación de las nanopartículas esféricas a triangulares (Figura 3) ^{40,41}.

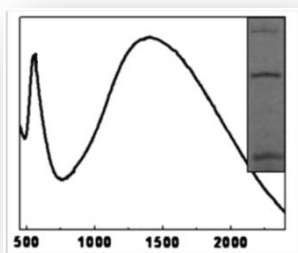


Figura 3. Espectro UV-Vis obtenido después de 15 h de reacción en la región 450-2250 nm. La figura insertada muestra la separación electroforética de las proteínas obtenidas de la superficie de los nanotriángulos de oro⁴⁰.

Otra forma de controlar el proceso de biomineralización es mediante el pH. Cuando la biomasa de *Rhodopseudomonas capsulate* se expone a iones de oro a pH neutro, se obtienen nanopartículas de oro de un tamaño de entre 10 y 20 nm. Cuando esta misma reacción es llevada a cabo a pH ácido, se forman nanopartículas de oro de forma triangular de 500 nm aproximadamente además de nanopartículas esféricas de oro. Las mismas bacterias, en otras condiciones, también pueden formar nanorods de oro⁴².

Otros ejemplos, como la formación de nanopartículas de Ag(0) asistida por *Morganella psychrotolerans* (especie tolerante al frío)⁷ y a *Plectonema boryanum* UTEX 485⁴³ ponen de manifiesto que la temperatura determina el tamaño y forma de las nanopartículas.

Es importante señalar que la dependencia de tamaño y forma de las nanopartículas con temperatura, pH, concentración, etc, es bien conocido en las síntesis de laboratorio e industrial más usuales. Sin embargo, esta dependencia se vuelve más marcada y adquiere tendencias diferentes si la síntesis de la nanopartícula se lleva a cabo en presencia de algún microorganismo. Aunque los mecanismos de acción no se conocen con exactitud, parece razonable asumir que la presencia de un organismo vivo, con un metabolismo muy cambiante según las condiciones externas, aumenta enormemente el intervalo de variabilidad de condiciones de síntesis.

❖ **Nanopartículas generadas de forma artificial por microorganismos.**

Los materiales biogénicos son sintetizados por los organismos de forma natural y son producto del funcionamiento normal del organismo. En algunos casos estos materiales son estrictamente necesarios para el desarrollo normal de la vida del organismo y en otros casos no, siendo en este último caso un producto formado por reacción de un metabolito del organismo y especies químicas del medio que lo rodea. Ejemplos genuinos de estas dos situaciones lo representan los nanocristales de magnetita sintetizada por bacterias magnetotácticas o bien nanocristales de ZnS sintetizados por algunas bacterias sulfato-reductasas como consecuencia de la reacción entre el sulfuro generado durante el proceso de reducción de sulfatos (esencial para la bacteria) y el Zn(II) que puede encontrarse eventualmente en el medio. Ambas situaciones tienen un factor en común: el material biogénico sintetizado es producto del medio que rodea al microorganismo. Sin embargo, este tipo de microorganismos pueden llevar a cabo la síntesis de otro tipo de materiales a partir de reactivos que no se encuentran habitualmente en su medio. En otras palabras, los microorganismos tienen una capacidad de hacer química más allá del entorno químico que los rodea y “puestos” en otras circunstancias químicas pueden ser también efectivos para la síntesis de otros materiales, que ni eran

necesarios para su desarrollo ni eran consecuencia de su metabolismo. Estos materiales pueden ser denominados biomiméticos.

Biosíntesis microbiana de nanopartículas biomiméticas de metales nobles (Au, Ag, Pt, Pd) y de magnetita y maghemita.

La síntesis de nanopartículas metálicas, especialmente de metales nobles, es de enorme importancia debido a sus propiedades químicas, ópticas y electrónicas^{44,45,46-51}. Los microbios han sido estudiados para ser usados en aplicaciones biotecnológicas como en la extracción mineral y la recuperación metálica^{52,53}. Bacterias, algas, levaduras y hongos de diferentes hábitats y formas nutricionales han sido empleados para la síntesis de nanopartículas metálicas tanto intra- como extracelularmente. Entre los diferentes microbios estudiados para la biosíntesis de nanopartículas, las bacterias han recibido la mayor atención, debido fundamentalmente a la facilidad para su cultivo y manipulación^{4,7,54}.

Biosíntesis microbiana de nanopartículas de Au

Los primeros estudios en este campo datan de los años 80, en los que se descubrió que la incubación de cloruro de Au(III) con la bacteria *Bacillus subtilis* daba como resultado la acumulación de nanopartículas de Au(0) con dimensiones de entre 5-25 nm sobre la pared bacteriana⁵⁵. Se postuló que los compuestos organofosfatados secretados por la bacteria jugaban un papel importante en la formación y estabilización de dichas nanopartículas octaédricas de oro *in vitro*, posiblemente funcionando como un “coating”⁵⁶.

Desde entonces, se han estudiado un buen número de ejemplos de síntesis de nanopartículas de oro con diversos microbios. *Shewanella algae*, por ejemplo, puede reducir los iones de Au(III) en condiciones anaeróbicas. Se cree que los citocromos C presentes en estos organismos reductores están implicados en la reducción del ión oro⁵⁷. También se ha especulado que la presencia de una proteína Au-reductasa en la membrana celular de *S. algae* podría estar implicada en la reducción directa de los iones de oro extracelularmente. Aunque, hasta el momento, estas hipótesis no han sido demostradas.

La cianobacteria filamentosa *Plectonema boryanum* UTEX 485 es capaz de sintetizar nanopartículas de Au(0) cuando reacciona con tiolato de Au(I) y

complejos de cloruro de Au(III). Las nanopartículas de Au(0) resultantes de 10-25 nm se depositan sobre la superficie externa de la membrana celular, mientras que partículas menores a 10 nm se forman intracelularmente. Una incubación más prolongada da como resultado la formación de láminas delgadas de partículas de Au(0) con forma triangular y hexagonal. Se cree que las nanopartículas intracelulares de oro son sintetizadas en las membranas vesiculares dentro de las células. La interacción de los componentes vesiculares (los cuales son ricos en ligandos de fósforo, sulfuros y nitrógeno) con los iones de oro daría como resultado la formación de nanopartículas de oro dentro de la célula y en el espacio periplásmico⁵⁸.

Por otra parte, el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* reacciona con los iones de Au(III) dando como resultado la formación intracelular de nanopartículas de Au(0) de 20 nm de diámetro⁵⁹.

Otras cepas bacterianas como *Ralstonia metallidurans* o *Lactobacillus* también pueden precipitar nanopartículas de Au(0) bajo las condiciones adecuadas. El mecanismo de síntesis no ha sido aclarado todavía, pero se han propuesto varias opciones para *R. metallidurans*, como el flujo catiónico, reducción catiónica, acumulación citoplasmática y formación de compuestos orgánicos. Consideraciones energéticas sugieren que *R. metallidurans* prefiere reducir las nanopartículas de oro a partir de cloruro de Au(III) para detoxificar su microambiente^{60,61}. Este resultado es de especial interés en la presente tesis doctoral puesto que en muchos de los experimentos llevados a cabo, las bacterias utilizadas han sido del género *Lactobacillus* que han desarrollado un biofilm formado en su mayor parte (aunque no exclusivamente) por extrapolisacáridos (EPS). Estos hallazgos vienen a poner de manifiesto la posibilidad de que el poder de reducción de estas bacterias, para llevar a cabo la formación de nanopartículas, no es exclusivo de la maquinaria enzimática de la bacteria sino que podría ser también consecuencia del eventual poder reductor del biofilm.

Además de bacterias, otros microorganismos eucarióticos como los hongos también son capaces de sintetizar nanopartículas metálicas de oro. Se ha demostrado, por ejemplo, que *Verticillium sp.* es capaz de sintetizar a partir de una

disolución acuosa de iones de Au(III), intracelularmente y alrededor de la membrana celular acumulaciones de nanopartículas de Au(0) de aproximadamente 200 nm, los cuales están formados por nanopartículas individuales de 8 nm aproximadamente⁶². Los métodos biosintéticos también pueden ser aplicados para el control de la forma y la síntesis de nanopartículas metálicas anisotrópicas. La especie micótica, *Colletotrichum sp.* bajo las condiciones adecuadas, produce nanopartículas de oro anisotrópicas con forma de varilla y morfología de prisma⁶³.

Biosíntesis microbiana de nanopartículas de Ag

Está bien establecido que los iones plata Ag(I) son altamente tóxicos para la mayoría de los microbios^{4,7,64}. Sin embargo, algunas cepas bacterianas son resistentes a la plata e incluso pueden acumular hasta un 25% del peso seco de su biomasa en Ag en su pared bacteriana⁶⁵.

Se ha demostrado que, *Pseudomonas stutzeri* AG 259, puede formar intracelularmente y en el espacio periplasmático nanopartículas de plata y sulfuro de plata de un tamaño desde unos 25 nm hasta 45 nm de diámetro cuando son expuestas a altas concentraciones de iones plata ^{64,66}. Se ha postulado que la formación de las nanopartículas de plata podría ser debida a la unión específica de proteínas con iones plata en la superficie celular y también podrían estar implicadas bombas de eflujo celular^{7,65}. Los análisis EDX (Energy dispersive X-ray) sugieren la presencia de nanopartículas de sulfato de plata además de las nanopartículas de plata.

Al igual que para la biosíntesis de nanopartículas de oro, existen otros microorganismos, además de bacterias, capaces de sintetizar nanopartículas metálicas de plata. Esto se ha demostrado para la cepa de levadura, MKY3³³ y para el hongo *Verticillium mycelia* que cuando es expuesto a iones de Ag(I), da como resultado el crecimiento intracelular de nanopartículas de plata^{62,67}.

El mecanismo exacto que conduce a la formación intracelular de nanopartículas de oro y plata por parte de *Verticillium sp.* no se entiende todavía completamente. Debido a que las nanopartículas se forman en la superficie del hongo y no en la disolución, se cree que el primer paso implica la captación del ion metálico a nivel

de superficie de la célula micótica, posiblemente vía interacción electrostática entre los iones y los grupos aminos y/o carboxílicos de las enzimas presentes en la pared celular del hongo, llevando a la formación de núcleos de centros metálicos, los cuales subsecuentemente crecen por reducción de los iones metálicos “*in situ*”^{62,68}.

Sastry et al., demostraron que cuando *F. oxysporum* se expone a una solución equimolar de HAuCl_4 y AgNO_3 , se obtienen nanopartículas de una aleación de Au-Ag muy estable. El NADH juega un papel muy importante en la determinación de la composición de la aleación de las nanopartículas⁶⁹. La Fig. 4A sugiere la formación de una aleación de nanopartículas de oro-plata, en vez de una estructura de metales separados tipo “core-shell”, ya que se observan bandas de UV-Visible desplazándose gradualmente desde bandas correspondientes a nanopartículas de oro hasta bandas correspondientes a nanopartículas de plata. Este cambio gradual en la aleación de las nanopartículas de oro-plata es evidente en la coloración de las disoluciones (Foto insertada en la Figura 4A). Las imágenes de TEM muestran una buena separación de las nanopartículas con agregación ocasional. Las partículas tienen un tamaño de entre 8-14 nm (Figura 4B). El contraste casi uniforme de cada partícula en las imágenes TEM sugiere que la densidad electrónica es homogénea, lo que es improbable que ocurra en el caso de estructuras tipo “core-shell” (Foto insertada en la Figura 4B).

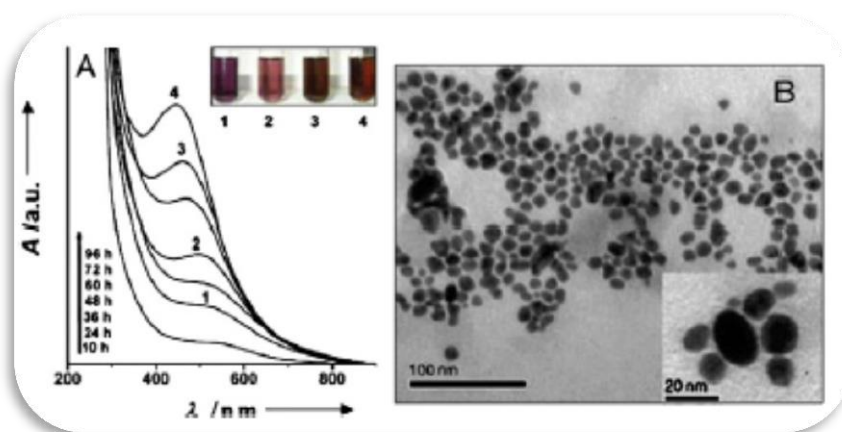


Figura 4. A) Bandas UV-Visible. Figura insertada muestra las soluciones coloidales (1-4) y B) Imágenes TEM de nanopartículas de aleación Au/Ag. La figura insertada muestra la ausencia de una estructura tipo “core-shell”⁶⁹

Biosíntesis microbiana de nanopartículas de Pt

Existe un gran interés en la síntesis de nanopartículas de platino elemental (Pt) mediante microorganismos, debido a su actividad anticancerígena⁵⁸. Es por ello por lo que se han realizado diversos intentos para su síntesis con resultados satisfactorios.

Un ejemplo lo constituye la cepa *Plectonema boryanum* que cuando reacciona con iones de Pt(IV) durante 28 días, precipitan complejos esféricos amorfos de Pt(II)-material orgánico, el cual está formado por largas cadenas tipo collar de cuentas con cobertura de material orgánico procedente de la cianobacteria. Aumentando la temperatura y el tiempo de reacción, estas estructuras con forma de cuentas se transforman en nanopartículas cristalinas de dimensiones entre 30-300 nm. También se han sintetizado nanopartículas de Pt(0) de 5 nm de diámetro en el espacio periplásmico de *Shewanella algae* a partir de una disolución acuosa de $[PtCl_6]^{2-}$ y una mezcla de gases N_2 - CO_2 durante 1 hora a pH neutro y 25 °C⁷⁰. El proceso bioquímico por el cual estas partículas son sintetizadas, permanece aún desconocido.

Biosíntesis microbiana de nanopartículas de Pd

El primer trabajo que habla de la síntesis de nanopartículas de paladio data del año 2000. Usando *Desulfovibrio desulfuricans*, se demostró la formación de nanopartículas de Pd(0) de aproximadamente 50 nm en presencia de H_2 , cuando se hace reaccionar con iones Pd(II) a pH 2-7. En este caso, la bacteria no lleva a cabo la reducción y se “limita” a ofrecerse como plataforma para la nucleación y crecimiento de las nanopartículas. Por el contrario, otro tipo de organismos, como la cianobacteria *Plectonema boryanum* UTEX 485, precipita cristales esféricos y nanopartículas elongadas de Pd(0) de 30 nm de diámetro cuando se incubaba en una solución de cloruro de Pd(II). La biomasa de cianobacterias, sólo produce nanopartículas amorfas de Pd, que son convertidas a fase cristalina por incremento de temperatura. Cuando estas bacterias se usaron en condiciones abióticas a 100 °C, solo precipita hidruro de paladio con pequeñas cantidades de nanopartículas de metal de Pd. El mecanismo exacto de biosíntesis está todavía por descubrir en ambos casos⁷¹.

Biosíntesis microbiana de magnetita y maghemita

Se han logrado sintetizar nanopartículas de magnetita mimetizando las bacterias magnetotácticas encontradas en la naturaleza. *Geobacter metallireducens*, por ejemplo, puede sintetizar nanopartículas de magnetita de forma extremadamente lenta (una semana) bajo condiciones anaeróbicas estrictas⁷¹.

Sin embargo, *Actinobacter sp* también pueden sintetizar magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en incubación con precursores de hierro disponibles bajo condiciones completamente aeróbicas⁷¹. Estas nanopartículas formadas extracelularmente muestran unas magníficas propiedades magnéticas. Existe sobreexpresión de dos proteínas inducibles en la síntesis de estas nanopartículas magnéticas en *Actinobacter sp*. Otras especies bacterianas como *Bacillus sp.*, *Aerobacter aerogenes* y *Micrococcus luteus*, no son capaces de sintetizar magnetita incluso después de una semana de incubación^{72,73}.

El genoma de algunas bacterias magnetotácticas ha sido resuelto y la proteómica pone de manifiesto que hay un conjunto de proteínas esenciales para la formación de los magnetosomas. Todos estos resultados abren grandes posibilidades para la síntesis biotecnológica y bioinspirada de magnetita, que sea comercialmente viable y en eco-friendly.

❖ **Nanopartículas generadas de forma natural por microorganismos. Bacterias Magnetotácticas.**

Las bacterias magnetotácticas son un grupo de bacterias Gram-negativas procarióticas que se alinean pasivamente y se desplazan activamente a lo largo del campo geomagnético y otros campos⁷⁴. Esta capacidad está basada en unas estructuras intracelulares específicas, los magnetosomas, los cuales, en la mayoría de las bacterias magnetotácticas, son cristales magnéticos de magnetita (Fe_3O_4) o de greigita (Fe_3S_4) de tamaños nanométricos y rodeados de membrana⁷⁵. Estos fascinantes microorganismos fueron indentificados por primera vez por Salvatore Bellini en 1963⁷⁶. Él observó al microscopio que un grupo de bacterias nadaban hacia el polo Norte terrestre y las llamó "bacterias magnetosensitivas". Once años más tarde Blakemore⁷⁷ en 1975, independientemente describió a estos organismos y acuñó el término magnetotaxis para este fenómeno y el de bacterias magnetotácticas para las bacterias. El descubrimiento de las bacterias

magnetotácticas demostró tener un serio impacto en un numero diverso de campos de investigación como la microbiología, geología, mineralogía y biomineralización, cristalografía, química, bioquímica, física, limnología y oceanografía, e incluso astrobiología⁷⁸. Las bacterias magnetotácticas producen dos tipos de minerales, óxidos de hierro y sulfuros de hierro⁷⁹. Las que producen óxidos de hierro solo biomineralizan magnetita (Fe_3O_4)⁸⁰, las que producen sulfuros de hierro biomineralizan greigita (Fe_3S_4)⁸¹, y las que producen ambos minerales, biomineralizan ambos cristales de hierro⁸². En sistemas de agua dulce, sólo se han encontrado bacterias magnetotácticas que producen óxido de hierro⁸³. También se han encontrado bacterias magnetotácticas en el lago Mono, en California, el cual es un lago cuyo pH es alcalino y donde el hierro está limitado debido a su baja solubilidad a pH elevados⁸³. Las bacterias magnetotácticas que pueden producir tanto óxidos de hierro como sulfuros de hierro están presentes tanto en lagos como en ambientes marinos⁸³.

El hierro es un elemento esencial para la formación del magnetosoma, aunque aún no está claro la relación entre la fuente de hierro y la producción del magnetosoma. Para biomineralizar magnetita, las bacterias magnetotácticas requieren varios órdenes de magnitud más de hierro que las bacterias no-magnetotácticas, alcanzando hasta un 4% de su peso seco⁸⁴. Se ha demostrado que las bacterias magnetotácticas son capaces de absorber tanto hierro férrico como ferroso⁸⁵, y en algunos casos la absorción esta mediada por sideróforos⁸⁶. Los sideróforos son queladores de hierro de bajo peso molecular, que unen y solubilizan hierro férrico⁸⁷. En *M. gryphiswaldense* el crecimiento máximo de la bacteria y del cristal de magnetita, ocurre a una concentración extracelular de 100 μM , pero ambos crecimientos están cerca de la saturación a una concentración de 15-20 μM . Concentraciones de hierro superiores a 20 μM aumentan sólo ligeramente la producción celular y el contenido del magnetosoma, mientras que concentraciones de hierro más elevadas de 200 μM inhiben el crecimiento⁸⁴. El tamaño de partícula de los magnetosomas maduros formados bajo estas condiciones limitantes de hierro es similar al tamaño de partícula de los magnetosomas maduros de bacterias sin restricción de hierro en el medio, aunque algunas propiedades físicas del cristal como la morfología o la distribución del tamaño del cristal, son significativamente diferentes⁸⁸.

Biosíntesis microbiana de nanopartículas de Greigita (Fe_3S_4)

Solamente unas cuantas cepas de bacterias magnetotácticas, como la *Magnetospirillum*⁸⁹ y algunas bacterias reductoras de sulfuro⁹⁰ son capaces de producir nanopartículas de sulfuro de hierro Fe_3S_4 . Los nanocristales de greigita son sintetizados a nivel intracelular en los magnetosomas por las bacterias magnetotácticas. Estos magnetosomas también albergan FeS de sistema cúbico y tetragonal, el cual es el precursor de las nanopartículas de Fe_3S_4 .

Es importante señalar que estas nanopartículas de greigita son exclusivas de bacterias magnetotácticas, que las sintetizan únicamente en su hábitat natural y de hecho, aún no se han conseguido sintetizar en un laboratorio⁹¹.

También se han sintetizado nanopartículas de 20 nm de diámetro de Fe_3S_4 y FeS_2 (pirita) extracelularmente bajo condiciones aeróbicas usando la bacteria *Actinobacter sp.* Los análisis de XRD de las nanopartículas sinterizadas mostraron la presencia de fases de greigita y pirita. Las enzimas sulfato reductasas de las bacterias son las responsables de la conversión del sulfato (SO_4^{2-}) en sulfuro (S^{2-}), el cual posteriormente forma un complejo con los iones de hierro para formar el sulfuro de hierro. Las nanopartículas de sulfuro de hierro son estabilizadas por cinco proteínas diferentes de bajo peso molecular⁹².

Biosíntesis microbiana de nanopartículas biogénicas de Magnetita (Fe_3O_4)

Las bacterias magnetotácticas pueden producir dos tipos de minerales: óxidos de hierro y sulfuros de hierro. Aquellas que producen óxidos de hierro, sólo forman magnetita (Fe_3O_4)⁸⁰, mientras que las que producen sulfuros de hierro sintetizan greigita⁹¹ además de algunos minerales precursores de la greigita⁹³. Mientras que las bacterias productoras de óxidos de hierro pueden ser microaerófilas estrictas, anaerobias facultativas, o anaerobias estrictas, las productoras de sulfuros de hierro son anaerobias estrictas.

Las bacterias magnetotácticas producen de forma natural en su interior cristales de magnetita y greigita, concretamente en los compartimentos denominados magnetosomas. Los magnetosomas son vesículas formadas por una invaginación de la membrana citoplasmática. En estas vesículas se produce el acúmulo de hierro, la nucleación del nanocristal de magnetita o greigita y el posterior

crecimiento de este⁹⁴. Este complejo proceso está extraordinariamente bien regulado, resultando en la síntesis de nanopartículas de magnetitas y greigita de tamaño muy homogéneo que se ordenan en forma de cadenas alineadas a lo largo del eje principal de la bacteria. De esta forma, la suma de cada uno de los momentos magnéticos de las partículas mono-dominio maximiza el momento magnético resultante de la bacteria, haciendo que toda ella se comporte como un imán que responda al campo magnético terrestre⁹⁵.

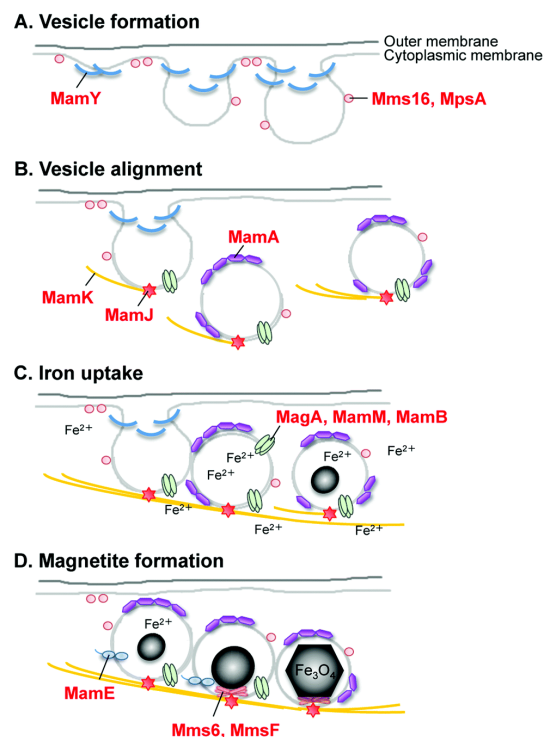


Figura 5. Mecanismo de biomineralización de magnetita en bacterias magnetotácticas

A pesar de la diversidad, estas bacterias magnetotácticas tienen importantes características en común⁷⁹:

- 1) Son todas gram-negativas. No se descarta la posibilidad de la existencia de arqueas productoras de magnetosomas pero hasta el momento no se han encontrado.
- 2) Todas son móviles, generalmente por flagelos. Podrían existir bacterias no móviles que sintetizaran magnetosomas y que por lo tanto serían magnéticas pero no magnetotácticas).
- 3) Son microaerófilas, anaerobias facultativas y/o anaerobias.

4) Todas las cepas en cultivo puro tienen un metabolismo respiratorio, salvo una excepción que puede fermentar.

5) Tienen actividad nitrogenasa y por tanto son capaces de fijar nitrógeno atmosférico.

6) Son mesófilas. Tienen un rango de temperatura de crecimiento moderado de entre 15-35 °C.

El control en la pureza, tamaño, morfología y orientación de cada nanopartícula de magnetita es total. Esto hace que le confiera a estas magnetitas unas propiedades muy singulares:

A) Morfología de las nanopartículas: la magnetita de los magnetosomas de bacterias magnetotácticas puede tener diferentes morfologías, pero, normalmente, una cepa tiene una sola morfología cristalina que le es específica⁹⁶. Aunque se han encontrado pequeñas variaciones con respecto a esta morfología específica en los cristales de algunas especies al crecer en condiciones diferentes⁹⁷. Son comunes tres tipos de morfología:

(1) cuboidales (cuboctaédricas)⁹⁸.

(2) pseudoprismáticas alongadas (casi rectangulares en el plano horizontal de la proyección)^{97,99}.

(3) con forma de diente, bala o punta de flecha¹⁰⁰.

B) Tamaño de las nanopartículas: la mayoría de los cristales se encuentran dentro de un pequeño rango de tamaños entre 30-35 nm (mínimo) y 100-120 nm (máximo) (ejes mayores). En función al tamaño podemos tener diferentes cristales magnéticos (Figura 6)^{96,101}:

- *SP (Superparamagnetic)*: Son cristales de tamaño menor de 30 nm cuya señal magnética a temperatura ambiente no es permanente en ausencia de un campo externo.

- *SMD/ SSD (Single Magnetic Domain/ Stable Single Domain)*: Son cristales de tamaño de entre 30-120 nm. Tienen un único dominio magnético y son magnéticas de forma permanente a temperatura ambiente en ausencia de un campo magnético¹⁰².

- MD (*Multidomain*): Son cristales de tamaño mayores de 120 nm. Presentan un magnetismo más débil, ya que al estar formados por varios dominios magnéticos, estos se compensan unos a otros.

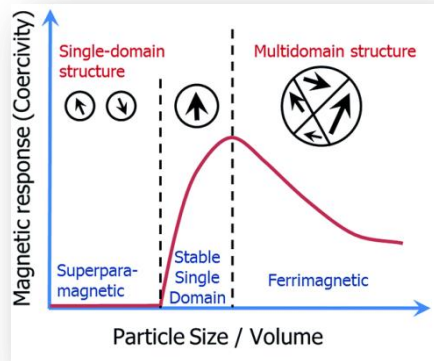


Figura 6. Esquema de las propiedades magnéticas de una partícula individual de magnetita. Las bacterias magnetotácticas son capaces de formar magnetosomas maximizando así sus propiedades magnéticas (dominio individual estable) en una cadena organizada, lo cual maximiza también su potencial para ser usado como una brújula por la célula¹⁰³.

C) Estructura cristalina de las nanopartículas: Los cristales de magnetita de las bacterias magnetotácticas tienen una gran perfección estructural sin apenas defectos cristalinos según se ha observado por diferentes técnicas, como Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución, difracción de electrones de área seleccionada y tomografía de electrones^{98,99}.

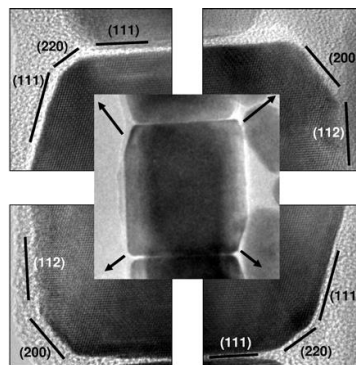


Figura 7. Imagen de TEM de alta resolución (HRTEM) de los magnetosomas de una bacteria magnetotáctica recogida en el lago Itaipu, Brasil. Se puede observar simetría en los planos reticulares incluso entre las caras más pequeñas de los lados opuestos de las diagonales del cristal^{85,86}.

D) Alineamiento de las cadenas de magnetosomas: El alineamiento de la cadena de los magnetosomas de *gryphiswaldense* MSR-1 es un complejo proceso guiado por multitud de enzimas. En este proceso destacan dos proteínas, MamK y MamJ, sin las cuales el proceso no tiene lugar¹⁰⁴. De esta forma, como los cristales de los magnetosomas se orientan a lo largo del eje de la cadena y el momento del dipolo magnético de la cadena (y de la célula) es la suma algebraica de los momentos individuales de los cristales de la cadena, la célula maximiza su momento magnético dipolar alineando los magnetosomas, y se comporta toda ella como un único imán (Figura 8).

MamK: Subunidades poliméricas de MamK forman el filamento magnetosómico. El filamento magnetosómico se extiende a lo largo del eje mayor de la magnetobacteria^{105,106}.

MamJ: Es la proteína implicada en el anclaje del magnetosoma al filamento magnetosómico. La eliminación del gen *mamJ* evita la formación de la cadena del magnetosoma y los magnetosomas se agregan sin patrón alguno dentro de la célula¹⁰⁶.

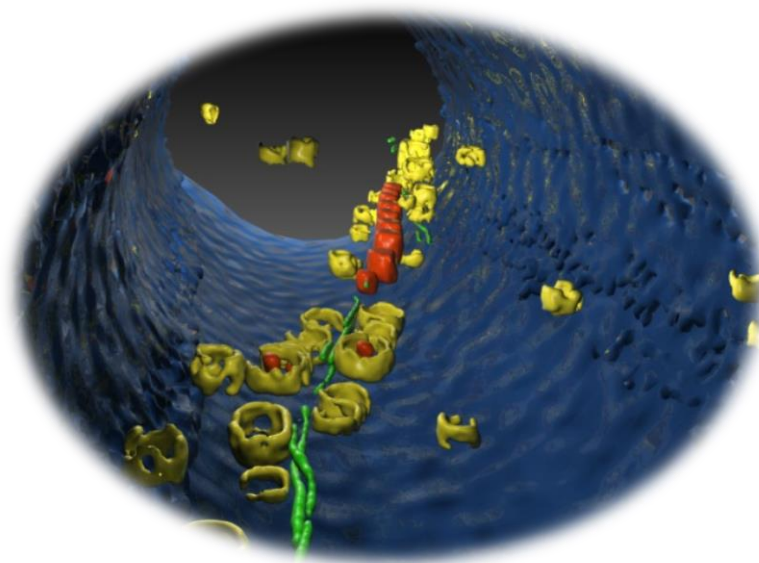


Figura 8. Tomografía crioelectrónica de una bacteria magnetotáctica: reconstrucción tridimensional del interior de una célula de *Magnetospirillum gryphiswaldense*. La membrana celular es azul, los cristales del magnetosoma son rojos, y las vesículas que lo rodean, amarillas. La imagen deja claro que la membrana vesicular y los cristales del magnetosoma “maduro” están enhebrados como perlas a lo largo de una estructura filamentosa (verde, MamK), muy similar al citoesqueleto¹⁰⁷.

Fenómeno de aeromagnetotaxis.

El hábitat de las bacterias magnetotácticas es una zona microaeróbica relativamente estrecha, llamada “interfase óxica-anóxica” (OAI). Esta zona se encuentra en una columna de agua o en sedimentos que tengan un gradiente vertical de estratificación química. Es precisamente en esta interfase donde la bacteria encuentra la concentración de oxígeno óptima para su crecimiento. Para encontrar la OAI en una columna de agua, una bacteria no magnetotáctica tendría que “buscar” en las tres direcciones del espacio, sin embargo, gracias a que, en las bacterias magnetotácticas, la célula entera se comporta como un imán por el alineamiento de los magnetosomas, la célula sólo tiene que nadar a lo largo de las líneas de campo magnético terrestre. De esa manera, reduce la búsqueda de la zona OAI a una sola dimensión espacial. Este fenómeno es conocido como aeromagnetotaxis (Figura 9)⁹⁵.

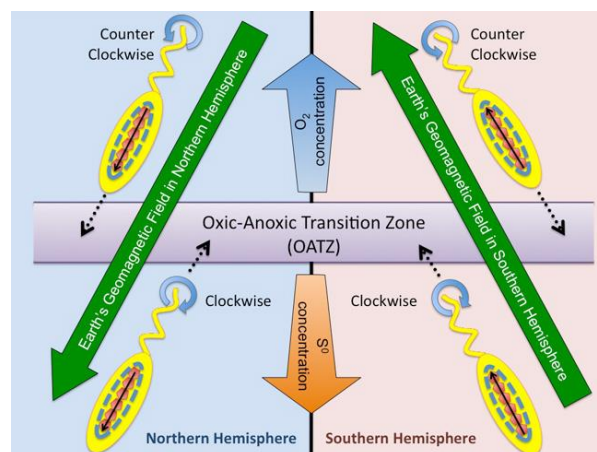


Figura 9. Diagrama mostrando cómo las bacterias magnetotácticas usan la magnetotaxis para nadar hacia la OAI (OATZ) en el hemisferio norte y en el sur.

La OAI es la parte de la columna de agua o de sedimentos donde las bacterias encuentran sus preferencias de concentraciones de oxígeno. Las líneas de puntos negros muestran la dirección en la que las bacterias nadan. Las líneas de puntos sólidas muestran el alineamiento de las nanopartículas de magnetita con el campo geomagnético terrestre. Las flechas circulares azules muestran la rotación de los flagelos (en la dirección de las agujas del reloj o en contra de las agujas del reloj), lo que permite a la bacteria nadar hacia atrás o hacia delante dentro de una columna de agua. El oxígeno está en una alta concentración en la parte más alta del diagrama, correspondiendo a la interfase aire-agua. Mientras que la concentración de sulfuro es máxima en la parte más baja del diagrama, correspondiendo con cierta profundidad en la columna de agua o sedimento¹⁰⁸.

❖ Bacterias reductoras de hierro. DIRB.

Este tipo de bacterias sintetizan nanopartículas de magnetita a partir de Fe(III), en particular óxido de Fe(III). Esto obliga al microorganismo a ser capaz de reducir de forma controlada parte del Fe(III) disponible y de crear un ambiente químico en el que el Fe(II) resultante del proceso de reducción pueda reaccionar con el óxido de Fe(III) para generar magnetita. Para llevar a cabo este proceso completo es necesaria una cercanía entre las especies químicas que reducen el Fe(III) con la superficie donde finalmente nuclea y se forma la magnetita. Esto se consigue a través del biofilm^{109,110}. Este biofilm está formado por la agrupación de las células microbianas dentro de su matriz de EPS (extrapolisacáridos). Los EPS son un requisito “*sine qua non*” para la transferencia electrónica necesaria para llevar a cabo el proceso redox y por otra parte, el andamiaje que es en sí su estructura sirve de superficie nucleante¹¹¹. El espectro infrarrojo y los estudios proteicos sobre el biofilm de *Shewanella* indican que los EPS contienen 58 proteínas, de las cuales, 20 son redox-activas y podrían contribuir a la reducción metálica y a la conductividad del biofilm¹¹². Como modelo para explicar las estrategias de reducción microbiana de Fe(III) a Fe(II), se utilizan las especies *Shewanella sp.* y *Geobacter sp.* La especie *Shewanella Sp.* es anaerobia facultativa, capaz de la oxidación parcial del lactato asociada a la reducción de los aceptores de electrones tanto solubles como de fase sólida¹¹³. Tienen un sistema respiratorio versátil que utiliza diversos aceptores electrónicos como los óxidos metálicos de: Fe(III), Mn(IV), S⁰, sulfitos, nitratos, O₂, Cr(VI), y U(VI) o compuestos metálicos orgánicos: DMSO, Oxido de N-trimetilamina, etc.; pero tienen una capacidad limitada para utilizar fuentes de carbono simple como acetato, lactato, formato, glucosa como donores electrónicos¹¹⁴⁻¹¹⁶. *Geobacter metallireducens* es la primera especie aislada del genero *Geobacter*¹¹⁷ y la primera especie geobacter que encuentra aplicación en biorremediación y en sistemas bioelectroquímicos^{118,119}. El genoma de *Geobacter Sulfurreducens* ha sido completamente secuenciado¹²⁰ y por ello es considerado un buen modelo de organismo para este género. En contraste con *Shewanellad sp.*, la especie *Geobacter sp.* es un anaerobio estricto el cual puede oxidar completamente la fuente de carbono asociado a la reducción del Fe(III).

Existen cuatro mecanismos para la transferencia electrónica entre la célula bacteriana y el Fe(III): Reducción por contacto directo, reducción a través de

sideróforos. (transportadores directos), reducción a través de transportadores electrónicos (transportadores indirectos), transferencia electrónica directa vía nanowire. Los estudios realizados sobre los mecanismos de transferencia electrónica desde las *Geobacter sp.* hacia el óxido de Fe(III) sólido, revelan que a *G. Metallireducens* les falta el sistema de transporte electrónico o los sideróforos y que por tanto son incapaces de solubilizar Fe(III), aunque la adición de quelatantes de Fe(III) estimulan la solubilización y por consiguiente la reducción de Fe(III)^{121,122}. Por tanto la transferencia electrónica hacia el Fe(III) en *Geobacter sp.* ocurre por contacto directo entre la superficie externa de la célula y el Fe(III)¹²²⁻¹²⁵. En el genoma de *Geobacter sulfurreducens* existen 111 genes para la síntesis de sendos citocromos C, con al menos 30 de ellos que son citocromos de la membrana externa (OM). Pero solo cuatro de los citocromos de la membrana externa son los que juegan un papel importante en la reducción férrica: OmcB, OmcS, OmcE, OmcZ. La ruta exacta de transferencia electrónica desde el periplasma hasta la OM todavía no se conoce claramente¹²⁶, pero el citocromo PpcA (un citocromo soluble con tres grupos hemo) parece servir como proteína intermediaria en la transferencia electrónica¹²⁷. Además de los citocromos C, las proteínas de la membrana externa (Omp), también son esenciales para la transferencia electrónica durante la reducción del Fe(III)^{123,126,128}. OmpJ es una porina específica de la familia *Geobacteraceae* responsable de la reducción del Fe(III), tanto solubilizado como insoluble en el óxido de partida. *Shewanella oneidensis MR-1*, es considerada como el organismo modelo para entender la bioquímica que existe detrás de esta “respiración extracelular”. Tiene un sistema de transporte con más de 40 miembros, que incluye: Grupos multi-hemo (parte no proteica de la hemoglobina) citocromos-C, quinonas, deshidrogenasas y proteínas Fe-S¹²⁹⁻¹³². La reducción del hierro puede realizarse mediante distintos mecanismos:

- A) Transferencia electrónica directa: la reducción de metales y electrodos en *Shewanella sp.* ocurre a través de un grupo de proteínas que atraviesan la membrana de la célula.
- B) Transferencia electrónica indirecta: se refiere al mecanismo de transporte electrónico en donde unos compuestos redox-activos solubles transportan

los electrones desde la superficie celular hacia la superficie del óxido de Fe (III)^{133,134}. Estos transportadores electrónicos pueden ser exógenos (sustancias húmicas y compuesto sulfúricos)^{135,136} o endógenos (como el Flavín Adenín Dinucleótido o FAD).

- C) A través de moléculas transportadoras de electrones: las riboflaminas mononucleótidas (FMN)^{137,138}, concretamente el FAD, es la forma que puede entrar en el espacio periplásmico¹³⁹. Se han identificado 7 genes que codifican sendas proteínas responsables de la biosíntesis del flavin de la especie *Shewanella sp.* El mecanismo exacto por el cual las flavinas sintetizadas atraviesan la membrana interna es desconocido.
- D) A través de los nanowire (también llamados “pilis”): son estructuras polipeptídicas no flagelares eléctricamente conductoras^{140,141}. “Msh” y “Pil” son los dos principales sistemas de secreción de nanowires en *Shewanella sp.*

Todos estos mecanismos de reducción microbiana de hierro están esquemáticamente descritos en la siguiente figura.

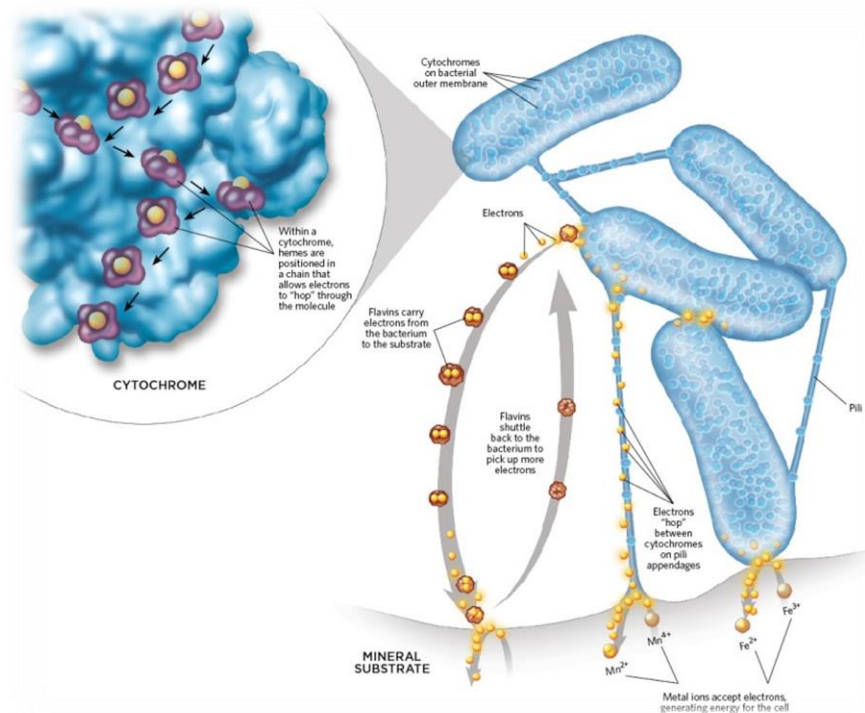


Figura 10. La bacteria shewanella genera energía para su supervivencia transportando electrones hacia la superficie de minerales cercanos. Los citocromos sobre la superficie de las membranas externas bacterianas contienen un número de grupos hemos que aceptan y donan electrones, permitiendo a la carga fluir a lo largo de la membrana. Los citocromos también se alinean a lo largo de apéndices celulares denominados pili que pueden conducir la carga hacia otros microbios o hacia el sustrato mineral. Las bacterias emplean moléculas de flavina como transportadores electrónicos, recolectando electrones en la superficie celular y llevándolos al aceptor electrónico más cercano.

Control de la biorreducción de Fe(III). Biodisponibilidad de Fe(III)

La velocidad y la extensión de la biorreducción del óxido de Fe(III) por parte de las DIRB está influenciado por la cristalinidad, tipo de superficie química, área de superficie disponible y tamaño de las partículas del óxido de Fe(III). La literatura proporciona evidencias de que la velocidad de biorreducción es más elevada para Fe(III) amorfo que para Fe(III) cristalino en el orden: Óxido férrico hidratado (Fe(III) amorfo) > Goetita > Hematites¹⁴². Las partículas de tamaño más pequeño con mayor área de superficie tienen una actividad de biorreducción de Fe(III) más elevada. Existe una relación lineal entre el área de superficie y la velocidad de biorreducción de Fe(III)^{142,143}. La disminución de la velocidad de biorreducción del

óxido de Fe(III) puede ser atribuida a la absorción/precipitación del Fe(II) biogénico, el cual bloquea los sitios reactivos para el Fe(III)¹⁴².

La formación de precipitados secundarios de Fe(II) como Fe₂O₃, FeCO₃, Fe₃(PO₄)₂, etc., sobre la superficie del óxido de Fe(III) también parece ser un agente importante en el cese de la biorreducción de Fe(III)^{144,145}. Se han hecho intentos para mantener el Fe(III) sólido en disolución, mediante la adición de ligandos como citratos, EDTA (ácido etildiaminotetraacético) y NTA (Ácido Nitrilotriacético) los cuales o bien, se acomplejan con el Fe(III) y por consiguiente se solubiliza en la superficie del óxido, o bien se acompleja con el Fe(II) biogénico, retardando su absorción en las células DIRB o en la superficie del óxido de Fe(III)^{121,145}. La adicción de materia orgánica como el ácido húmico, las riboflavinas, el AQDS (Antraquinona-2,6-disulfonato), la ferrozina, el metilviológeno y el azul de metilo, aumentan la biorreducción del óxido de Fe(III) debido a los grupos funcionales de quinona de los transportadores electrónicos abióticos¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. La presencia de algunos compuestos en fase sólida como la alúmina, el caolín, el cuarzo y los silicatos laminares aumentan la actividad de la biorreducción del Fe(III), ya que se comportan como sumideros de Fe(II), lo cual reducen la superficie de pasivación (formación de una película inerte sobre la superficie mineral) en células DIRB/superficie de óxido de Fe(III) y por consiguiente aumenta la reducción de Fe(III)¹⁴⁵. Altas concentraciones de fosfatos (≥ 4 mM) en el medio de cultivo disminuye la actividad de la biorreducción de Fe(III) por la formación de precipitados con exceso de Fe(II) biogénico como Fe₃(PO₄), identificado como vivianita (también llamada azul de Prusia nativo)^{144,148,149}. Además de la influencia del Fe(II) biogénico sobre la extensión de la biorreducción de Fe(III), otros muchos factores aparecen como reguladores de la actividad de biorreducción de Fe(III), como: el tipo y la concentración de los donores electrónicos, la composición del medio, las reacciones geoquímicas post-biorreducción, estructura, propiedades termodinámicas y físico-químicas de superficie del óxido en fase sólida y otros factores fisiológicos como el estado de los metabolitos y el crecimiento de las DIRB¹⁴⁹.

❖ **Organización, Composición y Función del Biofilm.**

Los microorganismos han sido tradicionalmente estudiados, caracterizados e identificados como células planctónicas individuales¹⁵⁰⁻¹⁵². Sin embargo, el crecimiento bacteriano de células aisladas rara vez se da en la naturaleza. Habitualmente crecen en grupos o colonias y para ello generan un biofilm que les ofrece cobertura, protección y reserva alimenticia, a la vez que les sirve para mantener una comunicación entre las células, consiguiendo, de esta manera, una coordinación precisa para actuar como una única unidad ante cualquier evento. En 1940, Heukelekian and Heller identificaron que el crecimiento y la actividad de microbios marinos se mejoraba por la presencia de una superficie sobre la cual se pudieran adherir¹⁵³. El término biofilm fue acuñado y descrito en 1978¹⁵⁴, cuando Antonie van Leeuwenhoek puso de manifiesto la existencia del denominado biofilm bacteriano estudiando agregados microbianos sobre la superficie de dientes^{150,155,156}. Como se ha mencionado anteriormente, el biofilm constituye el ambiente habitual para la mayoría de células microbianas en habitats tanto naturales como artificiales. El “cemento” esencial del biofilm, es una mezcla de exopolisacáridos (EPS) secretados por las células. Dentro de estas estructuras hay, células, agua, iones y productos solubles de alta y baja masa molecular¹⁵⁷. En muchos biofilms, los exopolisacáridos hidratados podrían estar en un estado semi-sólido. El componente mayoritario en la matriz del biofilm es agua (hasta un 97%)¹⁵⁸, y las características del disolvente están determinadas por los solutos disueltos en él. Se pueden encontrar diferentes grupos de poblaciones bacterianas en casi todos los ambientes húmedos donde hay disponibilidad de nutrientes y sea posible la unión a una superficie¹⁵⁹. Las bacterias pueden desarrollar biofilms sobre muchas superficies diferentes, tales como, barro, tejidos vivos o sistemas de canalización de aguas potables o industriales^{150,160}. La existencia de EPS en tal rango de ambientes sugiere que estos microorganismos son capaces de responder a su ambiente y cambiar sus EPS y sus habilidades de adhesión, dependiendo de las propiedades de la superficie sobre la cual se adhieren¹⁶¹. Es importante resaltar que la estructura exacta de cualquier biofilm es una característica única del propio microorganismo y del ambiente en el cual se desarrolla. El enorme número de microorganismos capaces de formar biofilm o interactuar con otros para formarlo, junto con un amplio rango de polisacáridos producidos por cada uno de

ellos, dan lugar a un número prácticamente infinito de combinaciones. Estos aspectos han atraído la atención de la comunidad científica y ha hecho emerger un área científica que apunta a ser protagonista en campos tan importantes y diferentes para la sociedad actual como son las infecciones bacterianas o los materiales bioinspirados¹⁶². La cantidad de EPS sintetizados dentro del biofilm depende en gran medida de la disponibilidad de los sustratos de carbono (tanto dentro como fuera de la célula) y del balance entre carbono y otros nutrientes limitantes. La presencia de exceso de sustratos de carbono disponibles y las limitaciones en otros nutrientes, como nitrógeno, potasio o fosfatos, promueven la síntesis de EPS. El lento crecimiento bacteriano observado en la mayoría de los biofilms puede también aumentar la producción de EPS¹⁶³. Los EPS también contribuyen a la estabilidad mecánica de los biofilms¹⁶⁴, permitiéndoles resistir considerables fuerzas de cizallamiento. En algunos polímeros, la interacción con iones puede producir geles relativamente rígidos los cuales son menos deformables por las fuerzas de cizallamiento, por consiguiente se producen biofilms mucho más estables. Como señala Stoodley et al., 1999¹⁶⁵, las condiciones nutricionales y físicas afectan enormemente a la naturaleza de los biofilms. La estructura del biofilm está determinada por la concentración de EPS¹⁶⁶. Los EPS son esencialmente largas cadenas de polisacáridos con masa molecular del orden de $0.5-2.0 \times 10^3$ KDa, que se pueden asociar entre ellas. Estas forman finas hebras unidas a la superficie de las bacterias y estas hebras, a su vez, forman complejos entramados alrededor de la célula. Enlaces de hidrógenos, interacciones iónicas e interacciones electrostáticas son las fuerzas dominantes implicadas en estas uniones¹⁶⁴. En bacterias Gram-negativas, la mayoría de los EPS son neutros o polianiónicos debido a la presencia de ácidos urónicos (ácido D-glucurónico, es el más común, aunque también se encuentran ácidos D-galacturónico y D-manurónico) o piruvatos unidos a grupos acetales. La presencia de estos mejora sus propiedades aniónicas, permitiendo por tanto la asociación a cationes divalentes tales como Ca^{2+} o Mg^{2+} y aumentando así su fuerza de unión. También la presencia de moléculas inorgánicas en el medio, tales como fosfatos o sulfatos, pueden conferirle un estado polianiónico a los EPS¹⁶⁷. La composición y estructura de los EPS determina su conformación primaria lineal. La configuración secundaria frecuentemente toma forma de agregados en hélices. En algunos de estos

polímeros, la composición del núcleo central, formado por enlaces 1,4- β - or 1,3- β , le confiere una alta rigidez, como se observa en la celulosa de xanthan de *Xanthomonas campestris*. La celulosa forma interacciones por puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilos de las cadenas de polisacáridos resultando en una unión tan fuerte hace que se puedan excluir las moléculas de agua, formándose así estructuras impermeables. Otros tipos de uniones en las cadenas de exopolisacáridos resultan en estructuras más flexibles. Como por ejemplo en los dextranos que tienen enlaces 1,2- α - or 1,6- α -¹⁶⁸. Cuando las interacciones iónicas son las implicadas en la unión entre las cadenas se obtienen estructuras algo más solubles en disolventes acuosos, resultando en la formación de geles tanto fuertes como débiles dependiendo del grado de interacciones producidas¹⁶⁹. Los EPS pueden, por tanto, formar varios tipos de estructuras dentro de un biofilm. Sin embargo, dentro de los biofilms los EPS no existen solos, sino que pueden interactuar con un amplio rango de especies moleculares, como lectinas, proteínas, lípidos, etc., así como con otros polisacáridos. La estructura terciaria resultante forma una red de exopolisacáridos y otras macromoléculas, en la que las células y los productos celulares son atrapados¹⁶⁹.

Una comparación del alginato de bacterias con el de algas da una clara idea de la relación entre estructura y función de los polisacáridos. Los alginatos consisten en residuos de ácido urónico unidos por enlaces glucosídicos β -(1-4) o α -(1-4).

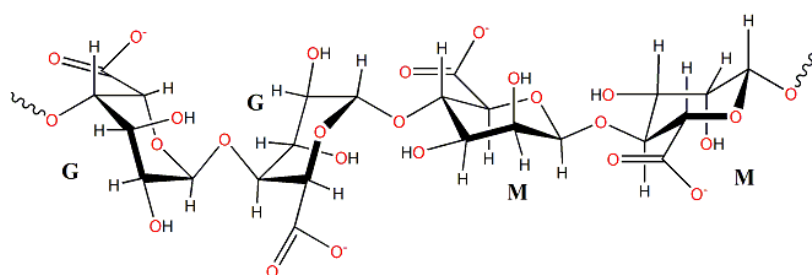


Figura 11. Representación esquemática del Alginato. (M): β -D-manuronato and (G): su epímero C-5, α -L-guluronato

Los alginatos se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β -(1-4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α -(1-4). Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión

calcio, formándose una estructura dimérica. Este modelo fue propuesto por Grant en 1973 ("egg-box model") para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas.

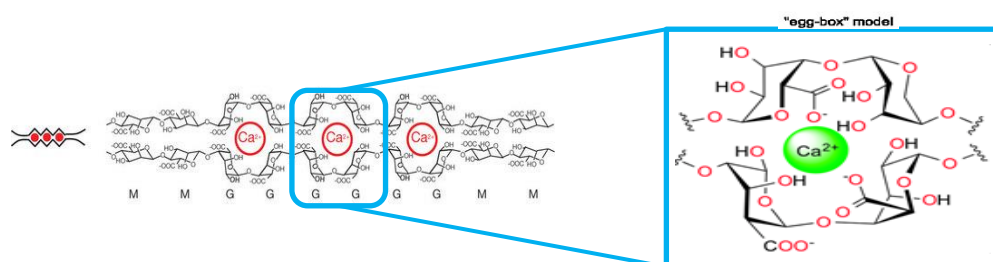


Figura 12. En presencia de calcio, el alginato puede formar una estructura conocida como "caja de huevos". En esta estructura, los iones de calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico.

Los polisacáridos de algas forman geles rígidos, no deformables debido a la interacción altamente específica con iones Ca^{2+} o Sr^{2+} , una propiedad que es ampliamente usada en biotecnología para la inmovilización de células y enzimas. Esto no se observa en alginatos procedentes de bacterias¹⁷⁰. Modelos informáticos de muchos EPS cuya estructura ha sido totalmente elucidada, revelan que todos los grupos cargados están en el exterior de las cadenas de la molécula y pueden, por lo tanto, interactuar con los iones y otras moléculas cargadas¹⁷¹. El crecimiento de un biofilm es el resultado de un proceso complejo que implica el transporte de moléculas orgánicas e inorgánicas y células microbianas a la superficie, una adsorción a la superficie y finalmente una unión irreversible ayudada por la producción de EPS¹⁷². Debido a su complejidad, la formación de los biofilms está regulada en diferentes fases mediante diversos mecanismos^{173,174}. Aunque los EPS pueden promover la adherencia a una gran variedad de sustratos, la producción de EPS no es por sí misma sinónimo de adhesión. La hidrofobicidad de la superficie celular, la presencia de flagelos o fimbrias (cilios) y el grado de producción de EPS y otros factores principales condiciona profundamente el ratio y grado de unión de las células microbianas a diferentes superficies¹⁵⁰. Los microorganismos se unen más rápidamente a superficies hidrofóbicas y no polares que a superficies hidrofílicas^{150,160}. Los tres tipos de fuerzas implicadas en este proceso son interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de dispersión de

London^{160,164}. Estas fuerzas de unión contribuyen a la estabilidad general de la matriz del biofilm¹⁶⁰. Diferentes componentes de los EPS también influyen en la extensión a la cual los microorganismos pueden adherirse tanto en superficies hidrofílicas como hidrofóbicas. La formación de los EPS conduce a la unión irreversible en diferentes tipos de superficies^{150,175,176}.

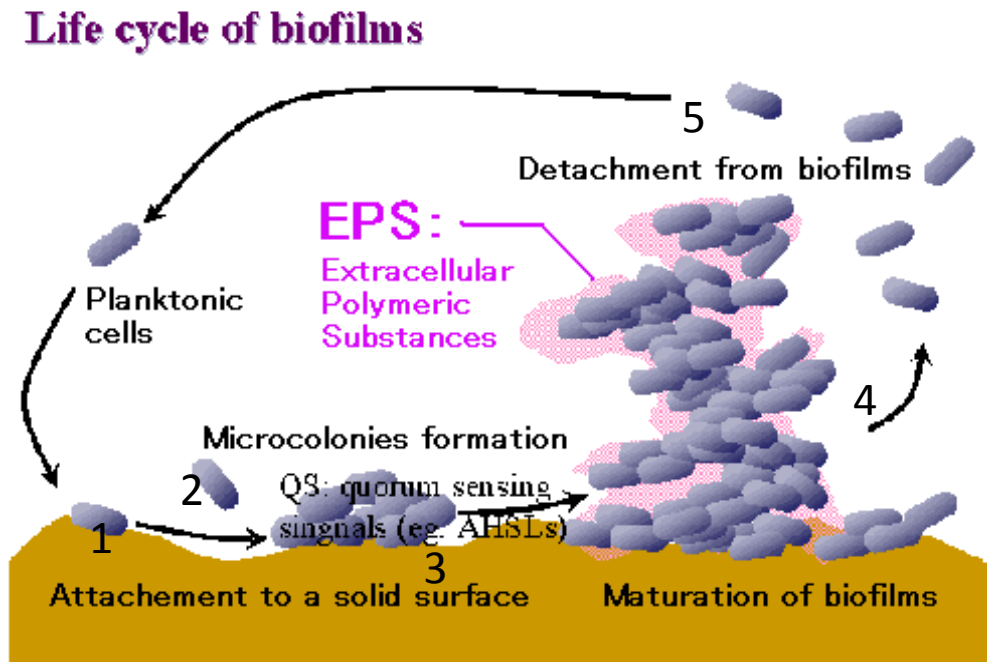


Figura 13. Ciclo de vida del Biofilm. 1. Adsorción de moléculas orgánicas. Acondicionamiento de la superficie. 2. Adhesión reversible. 3. Adhesión irreversible. Comunicación célula-célula y producción de EPS. 4. Maduración del biofilm. 5. Desprendimiento de células.

AHSLs: n-acyl homoserine lactones

El mecanismo regulador más estudiado que controla la producción de EPS, la formación del biofilm y su maduración, es la regulación “Quorum sensing (QS)” o autoinducción^{150,173,174,177,178}. QS permite a las bacterias mantener una comunicación célula-célula e implica la producción, liberación y detección de señales químicas que permiten a las células microbianas actuar de manera conjunta ante un determinado estrés, regulando la expresión genética de una manera dependiente de la densidad celular¹⁷⁹.

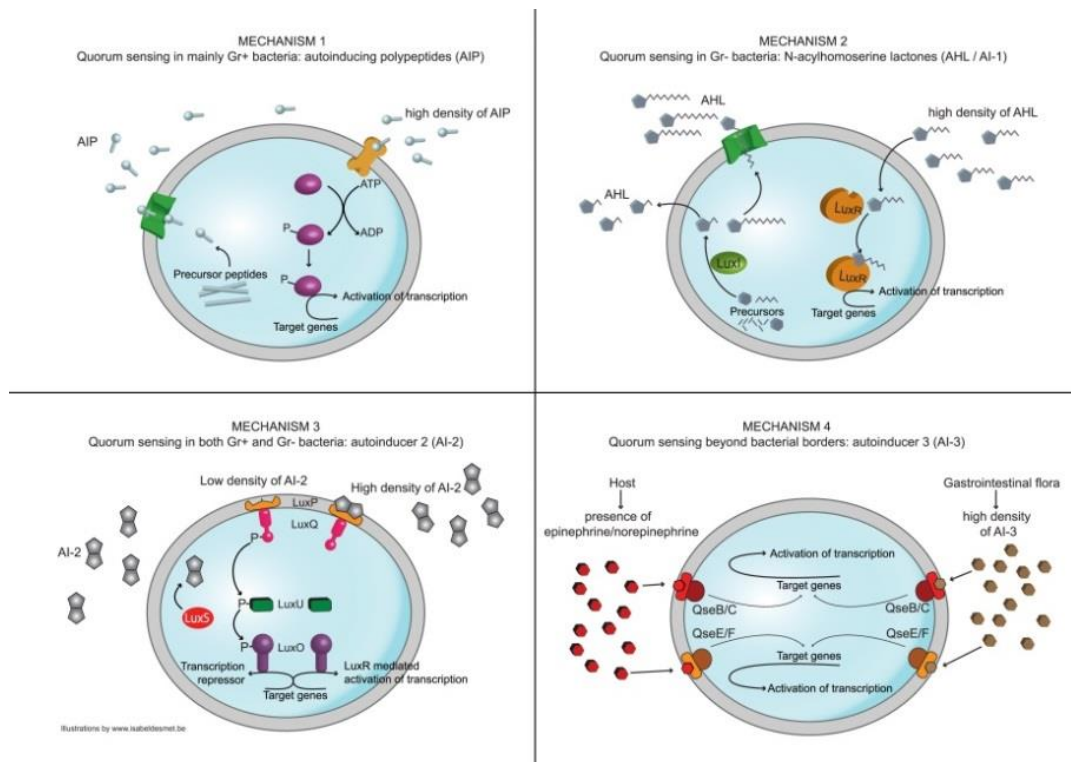


Figura 14. En los llamados organismos simples, la ruta de señales de transducción influye cómo la célula responde a su ambiente. En el “Quorum Sensing”, los microbios liberan y detectan la concentración de mensajeros químicos en áreas cercanas para comunicarse con otras células, determinar la densidad poblacional local, y regular rutas específicas en respuesta a esta densidad de población. Sin embargo un tipo de célula es capaz de percibir sólo un tipo de señal química. Este tipo de comunicación es importante tanto para las células individuales como para la población bacteriana local, porque esto les permite coordinar rápidamente su comportamiento para responder a los estímulos externos. Algunos tipos de necesidades colectivas son: la adaptación a diferentes niveles de nutrientes en el ambiente, la defensa contra otros microorganismos competitivos, el evitar materiales tóxicos, y la invasión o infección de un huésped. Este modo especial de comunicación en ciertos microorganismos les permite coordinar el comportamiento de su comunidad local entera, dándoles algunos rasgos similares de organismos multicelulares más avanzados y sugiriendo un punto común en la historia de la evolución-el desarrollo de estos métodos de comunicación en bacterias pueden haber sido el primer paso en la evolución hacia organismos multicelulares.

Los exopolisacáridos (EPS) sintetizados por células microbianas varían ampliamente en su composición de unas especies a otras y de igual modo varían sus propiedades físicas y químicas. Los componentes químicos de los EPS varían

dependiendo del tipo de sustrato sólido sobre los que crecen las células. El modo de unión también difiere en función del sustrato, y por consiguiente dará como resultado la expresión de genes diferentes de EPS¹⁸⁰. Un buen ejemplo de esto lo constituyen los EPS producidos por *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre sustratos de pirita, sulfuros y sulfato de Fe(II)^{180,181}. Los exopolímeros producidos por *A. ferrooxidans* crecidas sobre pirita son azúcares neutros de glucosa, ramnosa, fucosa, xilosa y manosa, y ácidos grasos saturados en C12-C20, así como algunos residuos de ácido glucurónico y complejos de iones de Fe(III)¹⁸².

A. ferrooxidans produce altos niveles de EPS y posee una gran concentración de complejos de iones de Fe(III). Como la presencia de iones férricos es un prerrequisito para la unión a la pirita, las células con más hierro se adhieren más rápidamente (y en un número mayor) que las células con concentraciones de hierro más bajas¹⁸³. Las células crecidas sobre pirita producen también unos niveles de EPS mayores que las crecidas en sulfuros o en sulfatos de Fe(II). Además, *A. ferrooxidans* contiene gran cantidad de complejos de iones de Fe(III) dentro de sus EPS demostrándose así una interacción electrostática más fuerte con la pirita que en células con concentraciones de iones férricos más bajas. Los EPS producidos por *A. ferrooxidans* crecidas en sulfuros contienen una concentración más alta de lípidos, ácidos grasos libre y fósforo, pero una concentración más baja de azúcares (solo glucosa y pequeñas trazas de ácido glucurónico) y no poseen complejos de Fe(II) u otros grupos de carga positiva comparados con las crecidas en pirita^{180,182}. La composición de los EPS producidos por *A. ferrooxidans* crecidas en sulfato de Fe(II) es muy parecida a la crecida en pirita^{180,182,184}. Por último, hay que destacar que la formación del biofilm juega un papel muy importante en la infección inmunitaria y en la protección contra agentes antimicrobianos^{156,185}. Por ejemplo, los *Staphylococcus epidermidis* Gram-positivos y las *P. aeruginosa* Gram-negativas son los patógenos más prevalentes implicados en las infecciones clínicas crónicas^{162,185}. Su crecimiento y proliferación dentro del biofilm proporciona protección frente a los antibióticos y también les proporciona un mecanismo de defensa para el huésped mediante la lenta o nula penetración de los diferentes agentes a través del biofilm^{156,162}. Otros géneros de bacterias patogénicas asociadas al biofilm son *Escherichia*, *Legionella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and

Vibrio^{156,162,186}. Los biofilms protegen a la comunidad microbiana del estrés ambiental^{160,161} y gracias a él, las bacterias desarrollan resistencia a bacteriófagos, amebas, productos bacteriocidas, respuestas inmunológicas del hospedador y antibióticos en ambientes naturales e industriales¹⁵⁶.

❖ **Probióticos: Microorganismos Saludables.**

Según FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/ World Health Organization), se define probiótico como el alimento que ha sido enriquecido con microorganismos y/u otras sustancias y que administrado en las cantidades apropiadas se consigue obtener una mejora en la salud (2001).

Estructura celular: entre los probióticos conocidos se encuentran bacterias Gram-positivas (*Lactobacilos*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterias*) y Gram-negativas (*E.Coli*) y levaduras (*Saccharomyces*). El término Gram-positivo y Gram-negativo hace referencia al resultado de la tinción de Gram. Las Gram-positivas se tiñen de azul oscuro/violeta y las Gram-negativas no se tiñen de azul oscuro/violeta, quedando coloreadas de color rosáceo. Su tinción es producto del tipo de cubierta o pared que poseen las bacterias. Esto sirve como una manera de diferenciación morfológica bacteriana¹⁸⁷.

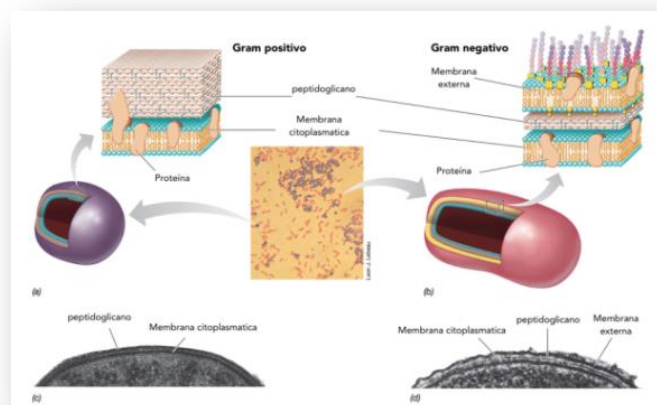


Figura 15. Esquema de la pared bacteriana de Gram positivas y Gram negativas¹⁸⁸.

Función biológica/Aplicaciones en alimentación: entre los beneficios en la salud del organismo hospedador cabe destacar los siguientes:

- A. Inmunomodulación.
- B. Efecto directo sobre otros microorganismos.
- C. Acción inhibitoria contra genotoxinas.

Los probióticos podrían tener efecto sobre la prevención o terapia de las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD = Infectious Bowel Diseases) o incluso en la erradicación de células neoplásicas del organismo hospedador. Es importante remarcar que un solo probiótico no tiene por qué exhibir todas las propiedades beneficiosas mencionadas anteriormente para ser considerado como tal. Dependiendo de las propiedades metabólicas, del tipo de molécula expresada en su superficie y de los componentes secretados, una cepa probiótica mostrará unas propiedades beneficiosas u otras.

A. Inmunomodulación: los probióticos pueden influir en el sistema inmunitario del hospedador mediante metabolitos que secretan al medio, algunos componentes de su pared bacteriana (peptidoglicanos) y/o su DNA. Todos los efectos inmunomoduladores promueven el fortalecimiento de la barrera epitelial intestinal¹⁸⁹ y poden conseguirse incluso con bacterias probióticas muertas¹⁸⁷. Las principales células diana son las células epiteliales del intestino y las células inmunológicas asociadas al intestino. La interacción directa de los probióticos con las células epiteliales por simple adhesión puede disparar una cascada de señales que conduce a la inmunomodulación. Asimismo, la liberación de metabolitos solubles dispara también una cascada de señalización en células inmunológicas, o en células epiteliales que posteriormente afectan a las células inmunológicas¹⁹⁰⁻¹⁹². Los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen sus efectos inmunomodulatorios son tan diversos como la supresión de la activación de la IL-8¹⁹², la inhibición de la ubiquitinación^{193,194}, la activación de los receptores TLR-2 de las células huésped¹⁹⁵, producción de defensinas y criptidinas¹⁸⁹ o la inhibición de la apoptosis de las células epiteliales intestinales¹⁹⁶.

Esta modulación del sistema inmune innato es adecuado para mantener alejado a patógenos y comensales del epitelio intestinal.

B. Efecto directo sobre otros microorganismos: los probióticos producen ciertas sustancias antimicrobiales, como bacteriocinas, ácidos grasos de cadena corta (ácido láctico), peróxido de hidrógeno y los ácidos biliares deconjugados. La reutenina (una bacteriocina) es un antibiótico de amplio espectro sintetizado por *Lactobacillus reuteri* ATCC55730, activo no solo contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sino también contra hongos, levaduras, protozoos y virus¹⁹⁷. Los ácidos biliares deconjugados son derivados de las sales biliares. Muestran una potente acción antimicrobiana. El cómo sobreviven los probióticos a sus propios metabolitos antimicrobianos, sigue siendo un misterio sin resolver. Estos ejercen sus efectos por:

- I. Competición por recursos limitados. El hierro es un elemento esencial en casi todas las bacterias excepto para los *lactobacillus*. Ellos no necesitan hierro en su habitat natural¹⁹⁸. Esto es una ventaja crucial para la competición con otros microorganismos que dependen de hierro.
- II. Efectos que impiden la adhesión al mucus intestinal. El efecto anti-adhesivo podría ser debido a la competición entre el probiótico y el patógeno por el mismo receptor o por la mayor producción de mucinas por parte del probiótico. La mucina MUC3 inhibe la adhesión de la cepa enteropatógena de E. Coli E2348/69, Salmonella, Clostridium ¹⁹⁹. Además de la exclusión competitiva, otros modos de anti-adhesión expresados por los probióticos podrían ser la degradación de los receptores de los carbohidratos, el establecimiento de un biofilm, la producción de receptores análogos y la inducción de biosurfactantes¹⁸⁷.
- III. Efectos que impiden la invasión del enterocito. *Lactobacilli*, *bifidobacterium bifidum* Bb12 y E. Coli Nissle 1917 (EcN) pueden actuar inhibiendo la invasión de varias líneas celulares epiteliales de intestino por *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* y *L. monocytogenes*. El alcance de la

inhibición depende del número de bacterias administradas y solo se observa con bacterias vivas. No es necesario un contacto directo entre el probiótico y la bacteria invasora o con las células epiteliales y por consiguiente un factor secretado, sin identificar aún, parece mediar en la inhibición de la invasión²⁰⁰⁻²⁰².

- IV. Efectos que inhiben toxinas secretadas. Posiblemente el grupo más importante de los factores virulentos de las bacterias son las toxinas. La efectividad de determinados probióticos en paliar la diarrea puede ser debida a su habilidad para proteger a las células huésped contra las toxinas. Esta protección resulta de la inhibición de la expresión de las toxinas en los patógenos. La alta concentración de ácido acético producido por la *bifidobacterium breve* Yakult es la responsable de la inhibición de la expresión de la toxina de shiga en *E. coli* (STEC) O157:H7²⁰³.

C. Acción inhibitoria contra genotoxinas: las genotoxinas son sustancias capaces de causar daño al ADN celular y por lo tanto pueden producir cáncer. Se cree que los probióticos tienen actividad anticancerígena. Si esta protección ocurre en humanos, que consumen la cantidad y especie/s adecuadas de probióticos, todavía se desconoce. Sin embargo, los probióticos son capaces de interferir con la inflamación recurrente crónica intestinal y podrían ayudar en su prevención. La habilidad para inactivar metabólicamente sustancias mutagénicas podría ser la responsable de esta propiedad. Determinados probióticos unen compuestos N-nitroso y aminas aromáticas heterocíclicas. Esto puede conducir a la reducción de los niveles de compuestos carcinogénicos y a la reducción del daño al DNA²⁰⁴. Otra manera de actividad anti-tumoral de los probióticos es mediante su habilidad de potenciar la respuesta inmune en los tejidos tumorales. Esta potenciación se consigue mediante modulación de la producción de citokinas y de la función de las células T²⁰⁵. Los peptidoglicanos de la especie *lactobacillus* reducen el crecimiento de la células cancerígenas CT26 de colon de ratones BALB/C por potenciación de la apoptosis mediante el aumento de la expresión del factor de necrosis tumoral

(TNF). Esto implica la inhibición de la ubiquitinación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y acentúa la señalización proapoptótica de la ruta MAPK^{206,207}

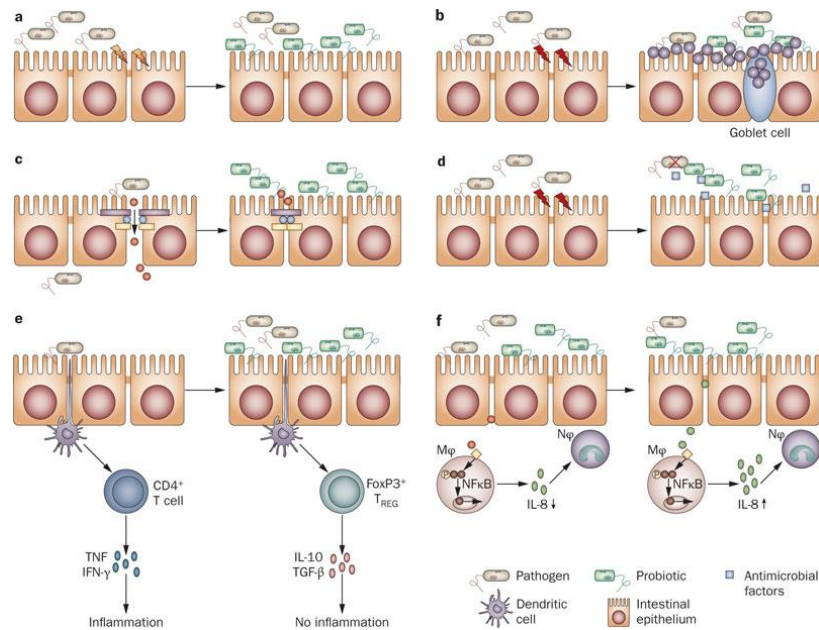


Figura 16. Los organismos probióticos pueden proporcionar unos efectos beneficiosos sobre las células del epitelio intestinal mediante numerosas vías:

- a:** Algunas cepas pueden bloquear la entrada de patógenos en las células epiteliales proporcionando una barrera física, conocida como resistencia a la colonización.
- b:** crear una barrera de mucosa causando la liberación del mucus de las células calciformes.
- c:** Otros probióticos mantiene la permeabilidad intestinal aumentando la integridad intercelular de las “tight junction” apicales, por ejemplo, por regulación de la expresión de la zona-occludens 1 (una proteína de la “tight junction”), o por prevención de la redistribución de las proteínas de las “tight junction”, de este modo paran el paso de moléculas hacia la lámina propia.
- d:** Algunas cepas probióticas han demostrado producir factores antimicrobiales.
- e:** otras cepas estimulan el sistema inmune mediante la activación de las células dendríticas, las cuales viajan a los nódulos linfáticos mesentéricos, lo cual llevan a la activación de las células T_{REG} (Célula T reguladora) y a la producción de citocinas antiinflamatorias, como la IL-10 y el TGF- β .
- f:** Algunos probióticos (o sus productos) pueden prevenir (lado izquierdo) o disparar (lado derecho) una respuesta inmune innata iniciando la producción de TNF por parte de las células epiteliales e inhibiendo (o activando) la producción de NF κ B en M ϕ (macrófagos) y disminuyendo (o aumentando) la respuesta inmune del hospedador por influencia de la producción de IL-8 y el reclutamiento de N ϕ (neutrófilos) al lugar de la lesión intestinal²⁰⁸.

❖ Rasgos y Peculiaridades de la S-Layer. Aplicaciones

Los materiales funcionales avanzados actuales que incorporan arquitecturas bien definidas de nanopartículas tienen el potencial para ser aplicados en muchas áreas, como la minituarización de aparatos nanoelectrónicos, la computación cuántica ultrarrápida, dispositivos para memorias de datos de alta densidad, biosensores químicos ultrasensibles, generación de sustratos catalíticos ultrasensibles y para la fabricación de sistemas de alto rendimiento para el crecimiento y/o unión de otros tipos de nanomateriales bio- o inorgánicos. Los métodos que se utilizan en la actualidad para preparar materiales nanoestructurados bidimensionales (2-D) incluyen: ablación con láser²⁰⁹, recubrimiento de un material con una solución coloidal seguido de una calcinación a alta temperatura²¹⁰, descomposición térmica de carbonilos de metales de transición²¹¹, fotolitografía²¹², litografía con haz de electrones (EBL)²¹³, y litografía con sonda de barrido (SPL)²¹⁴. Sin embargo, todos estos métodos tienen grandes inconvenientes²¹⁵:

- A. Los métodos no litográficos, aunque son utilizados rutinariamente a escala nanométrica (1-100 nm), no permiten un control preciso ni reproducible del tamaño ni de la estructura de las nanopartículas.
- B. La resolución de los métodos fotolitográficos convencionales está limitada por los efectos de difracción óptica, haciendo que la fabricación de tamaños por debajo de 50 nm sea extremadamente difícil.
- C. La propia naturaleza de los métodos EBL y SPL los convierte en técnicas extraordinariamente lentas y costosas.

Un método alternativo para la fabricación de nanoestructuras ordenadas es el uso de moléculas biológicas, como el DNA o las proteínas, como plantillas sintéticas^{216,217}. En particular, la posibilidad de modulación de las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de las proteínas que forman el espaciado nanométrico de la denominada S-layer^{218 219}, hacen de ella un tipo ideal de matriz para la formación de bioplantillas para la síntesis química directa de “nanoclusters” alineados de materiales inorgánicos. Muchas cepas de bacterias y arqueas contienen una matriz proteica regular en la capa más externa de su superficie²²⁰⁻²²². Estas matrices cristalinas son conocidas como “*surface layers*” o “*S-Layer*”. Y son consideradas como una de las proteínas celulares procariotas más abundantes

sobre la tierra²²³⁻²²⁵. Las S- layers están compuestas generalmente por una sola especie molecular, de proteína o glicoproteína (M_r 40 a 200 kDa).

Localización, estructura y formación de la S-layer: las S-layers se encuentran en los miembros de casi todos los grupos taxonómicos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, en arqueas, y en algunas algas verdes²²⁵⁻²²⁹. Esta extendida localización en los organismos procarionotas no siempre se ha podido observar en el laboratorio, ya que las S-layers se pierden habitualmente durante cultivos prolongados en las condiciones del laboratorio^{230,231}. Capas similares a la S-layer se han visto en cubiertas de esporas^{232,233}.

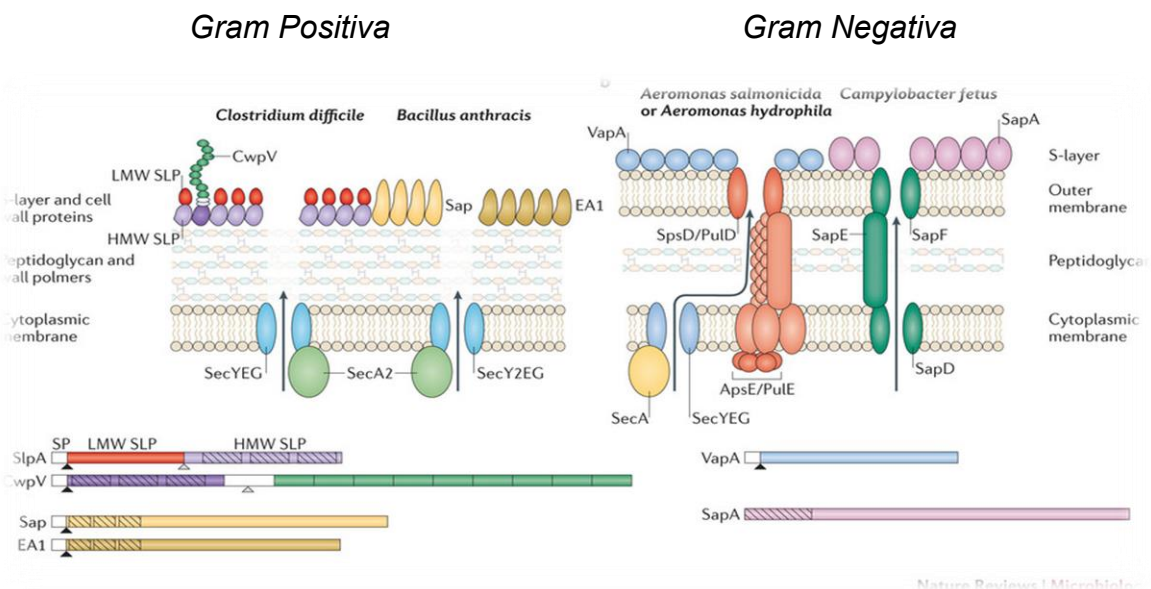


Figura 17. Secreción de las proteínas de la S-Layer : a) en bacterias Gram-positivas y b) en bacterias Gram-negativas²³⁴.

La mayoría de las S-layers tienen entre 5-25 nm de espesor, y muestran una superficie externa bastante suave y una superficie interna estriada²³⁵⁻²³⁸. Como las S-layers son ensamblajes de subunidades monomoleculares idénticas, exhiben poros idénticos en tamaños y morfología. Se pueden distinguir dos o incluso más tipos distintos de poros (generalmente entre un rango de 2-8 nm) ocupando hasta el 70% del área de la superficie celular²³⁹. Las cuadrículas de la S-layer pueden tener simetría oblicua (p1, p2), cuadrada (p4), o hexagonal (p3, p6). La simetría predominante en la mayoría de las bacterias es la hexagonal²⁴⁰. Dependiendo del tipo de cuadrícula, una unidad morfológica puede consistir en una, dos, tres, cuatro

o seis subunidades proteicas de glico-proteína, respectivamente, y muestran unos huecos centrales de aproximadamente 2.5-35 nm.

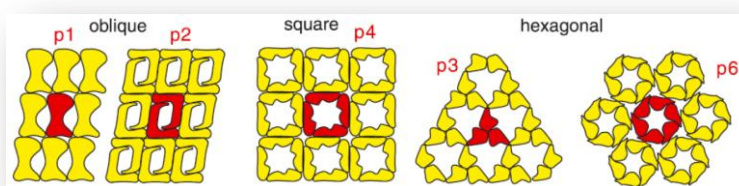


Figura 18. Dibujo esquemático ilustrando los diferentes tipos de estructuras de S-Layer. En la estructura oblicua, una unidad morfológica (roja) consiste en una (p1) o dos (p2) subunidades idénticas. Cuatro subunidades constituyen una unidad morfológica en estructura cuadrada (p4), mientras que la estructura hexagonal está compuesta por tres (p3) o por seis (p6) subunidades ²⁴¹.

Las S-layers representan un modelo único para el estudio del proceso dinámico de ensamblado de una estructura supramolecular durante el crecimiento celular y la división celular. Se han desarrollado diversos métodos para la separación de las S-layers y para su desintegración en unidades protoméricas^{222,240,242,243}. De hecho, las proteínas de la S-layer de bacterias Gram-negativas pueden ser desensambladas por aplicación de agentes quelatantes metálicos o por sustitución catiónica. Estos estudios demuestran que las subunidades individuales interaccionan unas con otras y con los componentes de la cubierta de la superficie celular a través de fuerzas no covalentes. Las subunidades aisladas de la S-layer mantienen la habilidad de recristalizar en matrices regulares en suspensión o sobre superficies después de quitar el agente usado para su aislamiento^{222,240,244-246}. Se ha demostrado que las diferencias en la carga neta de la superficie y en la hidrofobicidad entre las superficies internas y externas son las responsables de la adecuada orientación y la de incorporación de las subunidades de la S-layer sobre la superficie celular. Las S-layers son cristales de superficie cerrados dinámicos con la habilidad intrínseca de adoptar continuamente una estructura de baja energía libre durante el crecimiento y la división celular. La velocidad de síntesis de las subunidades de la S-layer parece estar estrictamente controlada²⁴⁷.

Estudio de las proteínas de la S-layer: los análisis químicos de las S-layers aisladas muestran que están compuestas de una sola especie protéica o glico-protéica con pesos moleculares relativos entre 40.000 – 200.000. Solo la S-layer de algunos organismos, como *Clostridium difficile*²⁴⁸ y *Bacillus anthracis*²⁴⁹⁻²⁵¹, está formada por dos tipos de subunidades protéicas, las cuales forman conjuntamente una cuadrícula. Parece que la proteína de la S-layer de *B. anthracis*, EA1, forma la cuadrícula principal, mientras que la segunda proteína, Sap, no parece jugar un papel relevante.

Los análisis de los aminoácidos revelan que la composición general de las proteínas de la S-layer de diferentes organismos filogenéticos son bastante similares^{240,245,252,253}. Poseen un alto contenido de aminoácidos ácidos hidrofóbicos. La lisina es el aminoácido básico predominante, el contenido de arginina, histidina y metionina es generalmente bajo y la cisteína solo es detectada en proteínas de algunas S-layer^{245,254}. Según el análisis de la secuencia peptídica, los puntos isoeléctricos (pIs) de la mayoría de las proteínas de la S-layer están en un rango de pH ligeramente ácido. Hay algunas excepciones como por ejemplo la S-layer de *Methanothermus fervidus* que tiene un pI básico de 8.4²²⁷ y para diferentes cepas de lactobacillus²⁵⁵, que poseen pls entre 9-11. Según las medidas de dicroísmo circular, aproximadamente el 20% de los aminoácidos están organizados en α -helices y el 40% en láminas β . La mayoría de los segmentos de α -helices están colocados en el extremo N-terminal de las proteínas. El resto de la secuencia proteica está formada por láminas β de pequeñas longitudes conectadas entre sí por vueltas y giros. Las proteínas de la S-layer de muchas arqueas y bacterias Gram-positivas pueden poseer cadenas de carbohidratos unidas mediante enlaces covalentes a dichas proteínas^{254,256-258}. Típicamente, la cadena de carbohidratos está compuesta por entre 20-50 unidades repetidas conteniendo pentosas, hexosas, heptosas, 6-deoxihexosas, y amino azúcares neutros similares a los LPS (Lipopolisacáridos) de las bacterias Gram-negativas²⁵⁹.

Unión de las proteínas de la S-layer a la pared celular: en bacterias Gram-positivas, la rígida pared celular está compuesta por peptidoglicanos y polímeros “secundarios” de la pared celular (pared celular secundaria), los cuales pueden ser ácidos teicoico, teicurónico, lipoteicoico, o lipoglicanos^{220,260}. Las cadenas

poliméricas de la pared celular secundaria están, o bien unidas covalentemente al tronco de peptidoglicano por enlaces fosfodiésteres, o bien unidas al motivo lipídico²²⁰. La mayoría de las funciones biológicas de los polímeros de la pared celular secundaria, tales como: la unión a cationes, el mantenimiento del sáculo de peptidoglicano de forma expandida por repulsión de cargas, la unión de protones para crear una pared celular ácida durante el crecimiento bacteriano y la división, o la provisión de una barrera física para prevenir la difusión de nutrientes y metabolitos, han sido relacionadas con su carga negativa neta²⁶¹.

Se ha reconocido la unión de motivos SLH (S-Layer Homology) conservados (formados por unos 50-60 amino ácidos) en las proteínas de la S-Layer a los componentes de la pared celular secundaria.

Función de la S-layer: como una característica general, las subunidades de la S-layer de arquea a las que les falta la capa rígida de la pared celular poseen grandes protusiones hidrofóbicas las cuales se integran en la membrana plasmática. Existe una especie de espacio periplasmático entre la membrana plasmática y la S-layer donde son secretadas macromoléculas implicadas en la degradación y el transporte de nutrientes, y el plegamiento de proteínas y en donde se podrían almacenar las proteínas sintetizadas^{237,262}. La S-layer de bacterias Gram-negativas de *A. salmonicida*, *C. fetus*, *A. serpens*, y *C. crescentus* actúan como protección ante ataques de parásitos bacterianos como *Bdellovibrio bacteriovorus*²⁶³. Una función de protección interesante ha sido descubierta en *Synechococcus* GL-24^{264,265}, una cianobacteria que es capaz de crecer en lagos con una concentración de iones de calcio y sulfatos excepcionalmente elevadas. La S-layer funciona como plantilla para la mineralización de grano fino y es continuamente mudada de la superficie celular para prevenir la obstrucción de las nuevas capas de la cubierta celular en formación.

La S-layer contribuye a la virulencia de algunos patógenos. Por ejemplo la S-layer de *A. salmonicida* dota a este organismo de una alta resistencia a la actividad bactericida de las moléculas del complemento del sistema inmune. En otras palabras, las bacterias patológicas provistas de S-layer soportan mejor las agresiones externas que intentan poner en peligro su integridad, aumentando su resistencia a la actividad bactericida del sistema inmunológico del huésped,

haciéndolas por consiguiente más virulentas. La S-layer muestra unas capacidades únicas y exclusivas a la unión a inmunoglobulinas y a proteínas extracelulares, impidiendo que éstas entren al interior del patógeno^{266,267}.

Aplicaciones de la S-layer: como el entramado de la S-layer posee poros de idéntico tamaño y morfología en un rango de entre 2-8 nm, las S-layers funcionan como tamices moleculares²⁶⁸. El poro más grande se ha encontrado en arqueas a las que le faltan la capa rígida de la pared celular con un tamaño de entre 5-8 nm^{221,229,235,238,269}. Se ha demostrado que la S-layer procedente de varias cepas de *Bacillaceae* es adecuada para la producción de membranas para ultrafiltración isoporosas con un límite de peso molecular muy bien definido^{268,270-272}.

La matriz de la S-layer contiene grupos funcionales (ácidos carboxílicos, aminas, y grupos hidróxilos) que están alineados en posiciones y orientación bien definidos. Por lo tanto, se pueden aplicar modificaciones químicas (altamente reproducibles) para la optimización de propiedades moleculares tamizadoras y para la adsorción no específica (antifouling)^{273,274}. La S-layer puede ser usada como matriz de inmovilización para la unión de monocapas de moléculas funcionales (por ejemplo, enzimas, anticuerpos, e inmunógenos) de una manera geoméricamente bien definida. Este potencial de aplicación ha sido explotado para la producción de sensores bioanalíticos, inmunoensayos, afinidad de micropartículas, y afinidad de membranas^{241,275}. Otra línea de desarrollo está directamente dirigida hacia el uso de productos de autoensamblaje en suspensión como coadyuvante contra la infección de bacterias patogénicas en la inmunoterapia antialérgica y en la infección bacteriana contra el cáncer^{254,276,277}. Finalmente, el entramado de la S-layer recristalizado en soportes sólidos (por ejemplo en placas de silicona) puede ser usado para tecnología de "lab-on-a-chip"^{244,276}, en aparatos electrónicos moleculares y en aparatos ópticos no lineales^{244,278,279}.

Aplicaciones de la S-layer integradas con nanopartículas de Au, y otros metales: con anterioridad a esta tesis se han creado diversas nanoestructuras sintéticas usando la S-layer de algunas bacterias como bioplataforma para la disposición ordenada de nanopartículas de distinta naturaleza. Algunos ejemplos de este tipo de materiales nanoestructurados lo constituyen los trabajos realizados por Hall, S.R.

et al. (2001), Bergkvist, M. et al (2004), S.S. Mark et al., (2006) donde se utiliza la S-layer de *Deinococcus radiodurans* de simetría hexagonal (p6) (También llamada HPI, Hexagonally Packed Intermediate) con un tamaño de poro central de la cara externa de 4.2 ± 0.5 nm, para albergar nanopartículas de Au con una distancia de poro a poro de la cara externa de 18.5 ± 0.7 nm. La cara interna posee un diámetro de poro central de 2.4 ± 0.4 y una distancia entre poros centrales de 18.4 ± 0.7 nm. La región central está formada por seis monómeros idénticos (cada uno de ellos con un peso molecular de 98 kDa) que a su vez forman un poro central individual (ver figura). Cada poro está rodeado de seis regiones vértices. El grosor de la HPI es de 4.6 nm^{280,281,282}.

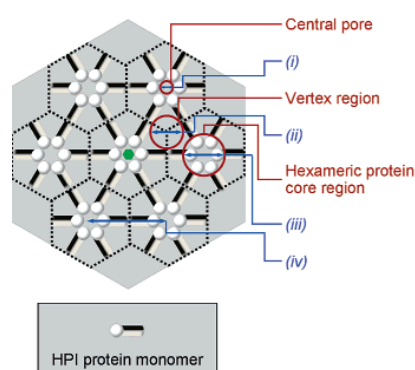


Figura 19: Esquema de la S-layer HPI. (i) Diámetro del poro central (2.2 nm); (ii) Diámetro de la región vértice; (iii) Diámetro de la región hexamérica de la proteína central; y (iv) Espaciado entre las regiones centrales adyacentes (18 nm) (“HPI lattice constant”).

En primer lugar se sintetizaron nanopartículas de Au de aproximadamente 5 nm utilizando citrato como estabilizador para prevenir la agregación de las partículas. Las partículas se usaron inmediatamente después de su síntesis, se depositaron sobre S-layer directamente. Estos autores observaron dos patrones distintos de incorporación de las nanopartículas: El primero, un patrón de gran ordenamiento que abarca la mayoría de la S-layer; y el segundo, un patrón de ordenación más azarosa. La diferencia entre estos dos patrones estructurales se debe a la diferencia intrínseca en las propiedades biofísicas y bioquímicas de las dos caras de la S-layer. Observándose un patrón diferente dependiendo de qué cara de la S-layer esté enfrentada a las nanopartículas. La incorporación de las partículas de Au en la S-layer depende de las interacciones electrostáticas de las nanopartículas entre sí y de las nanopartículas con la S-layer^{280,281,282}.

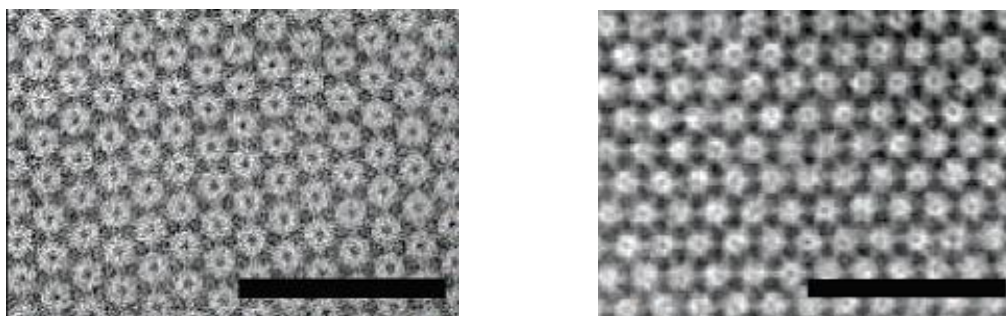


Figura 20. Izq: Imagen de TEM de de la cara interna de la S-Layer HPI. **Der:** Imagen de TEM de de la cara externa de la S-Layer HPI

La carga de la cara interior de la S-layer puede ser negativa o positiva, dependiendo del equilibrio entre los grupos amino y/o de ácidos carboxílicos expuestos. A pH ácido, la protonación de los grupos amino está favorecida y permite la interacción con nanopartículas cargadas negativamente. Aunque no hay ninguna prueba definitiva de la naturaleza del enlace entre las S-layer y las nanopartículas, en principio, esta interacción podría ser puramente electrostática, por enlaces de hidrógeno o por ambas.

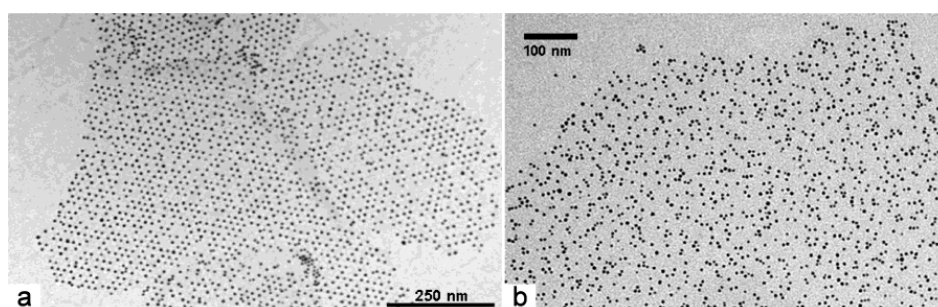


Figura 21. Imágenes TEM ilustrando los dos tipos de patrones observados cuando nanopartículas de oro de 5nm recubiertas de citrato son absorbidas sobre la superficie de la S-layer de HPI de *D. radiodurans*. (a) patrón ordenado. (b) disposición al azar.

También se han realizado estudios sobre la deposición de nanopartículas de otro tipo de materiales como semiconductores del tipo CdSe/ZnS core/shell quantum dots (QDs)²⁸¹, y metals como el uranio²⁸³.

Para el caso de la deposición de los quantum dots, se ha usado la S-layer de *Deinococcus radiodurans* (p6) y de *S. acidocaldarius* (p3). La S-layer de *S. acidocaldarius* (También llamada SAS o SASS-layer) muestra una simetría p3 con

una distancia entre poros en la cara externa de 21.6 ± 0.8 nm y un diámetro de poro central de 6.0 ± 0.8 nm. La cara interna tiene un diámetro de poro central de 5.2 ± 0.6 nm y una distancia entre poros de 21.8 ± 0.6 . El cristal 2-D de SAS puede ser considerado como hexagonal, muy parecido al del HPI S-Layer, pero al contrario de éste, cada región hexamérica en SAS está rodeada por seis regiones vértices de dos tamaños distintos. Tres regiones de tamaño grande llamadas “LV” (Large Vertex) y tres regiones pequeñas llamadas “SV” (Small Vertex). Ambas regiones muestran una simetría rotacional trigonal alrededor del eje que pasa a través del poro central (Ver figura 22). El grosor de la SAS es de 4.8 nm^{280,281,282}.

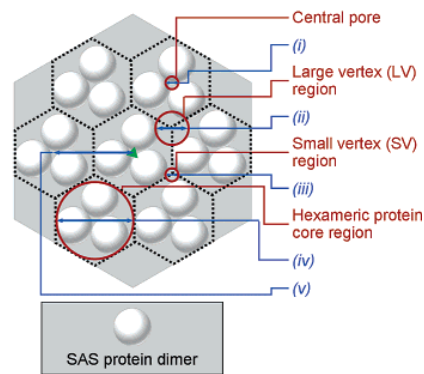


Figura 22: Esquema de la S-layer SAS. (i) Diámetro del poro central (5.4 nm); (ii) Diámetro de la región LV; (iii) Diámetro de la región SV (iv) Diámetro de la región hexamérica de la proteína central; y (v) Espaciado entre las regiones centrales adyacentes (23 nm) (“SAS lattice constant”).

Las nanopartículas de tipo quantum dots se funcionalizaron con distintos grupos tioles (cargados negativa o positivamente y de cadena larga o corta) para proporcionarles características hidrofílicas y por tanto hacerlos más solubles en agua, cosa imprescindible para no desnaturizar las proteínas que forman la S-layer una vez depositadas sobre esta²⁸⁰. Estos quantum dots se depositaron directamente sobre la S-layer.

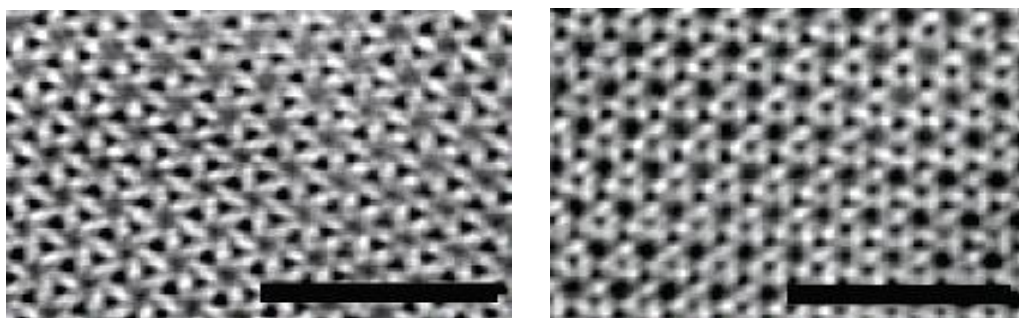


Figura 23 izq: Imagen de TEM de cara externa de la S-Layer de SAS. **Der.** Imagen de TEM de cara interna de la S-Layer de SAS.

También se ha conseguido depositar Uranio sobre la S-layer de *Bacillus sphaericus* JG-A12. En este caso el U(VI) está coordinado a grupos carboxilos de forma bidentada con una distancia media entre el átomo de U y el de C de $2.88 \pm 0.02 \text{ \AA}$ y a grupos fostatos de forma monodentada con una distancia media entre el átomo de P y el de U de $3.62 \pm 0.02 \text{ \AA}$. Las micrografías de TEM demuestran que el U se acumula sobre la superficie celular²⁸³.

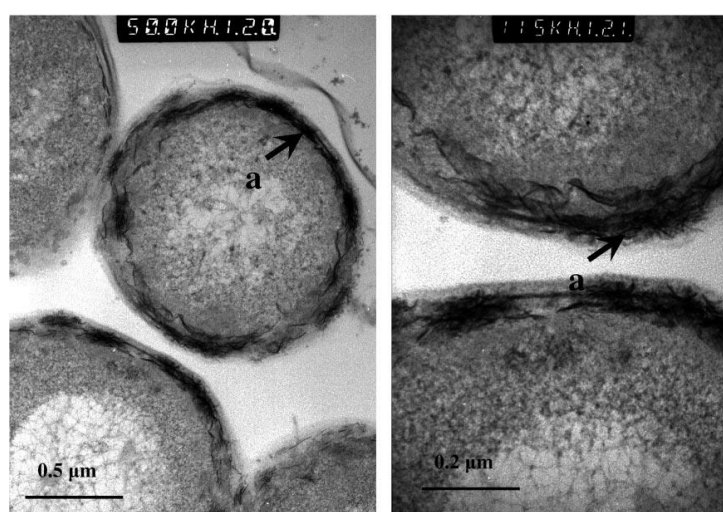


Figura 24. Micrografía electronica de transmission de una sección fina de unas células *B. sphaericus* JG-A12 tratadas con uranio. El metal acumulado esta localizado sobre la superficie celular (a).

Otro interesante ejemplo de nanopartículas depositadas sobre la S-layer bacteriana, lo constituye la síntesis de nanopartículas de Au y Pd “in situ” mediante reducción por corriente de H_2 . En este caso se usó la S-layer de *B. sphaericus* JG-

A12, la cual fue recogida de los residuos mineros cerca de la ciudad de Johanngeorgenstadt en Saxony, Alemania. Estas bacterias son capaces de acumular altas cantidades de metales tóxicos como U, Cu, Pb, Al, Cd²⁸⁴, así como metales preciosos como el oro²⁸⁵. La S-layer de *B. sphaericus JG-A12* es capaz de complejar Pd(II) de una solución de Na₂PdCl₄. El Pd(II) unido a la S-layer puede ser reducido a nanopartículas de Pd(0) mediante adición de H₂ como donador de electrones. Las nanopartículas de Pd formadas contienen entre 19-43 átomos con un diámetro entre 0.85-1nm²⁸⁵. También la reducción in situ de Au(III) a nanopartículas de Au(0) sobre la S-layer *B. sphaericus JG-A12* es posible realizarla. Para ello, la S-layer se resuspende en 40 ml de una solución de Au(III) (3 mM HAuCl₄, pH 3). El O₂ es eliminado mediante el paso de una corriente de N₂ a través de la disolución durante 15 min. La reducción de Au(III) a Au(0) se induce mediante la adición de H₂ gaseoso. Las nanopartículas sintetizadas tienen un tamaño de 1 nm aproximadamente²⁸⁶.

Referencias:

1. K. Eric Drexler. at <http://e-drexler.com/d/06/00/EOC/EOC_Table_of_Contents.html>
2. Bansal, V., Ramanathan, R. & Bhargava, S. K. *Aust. J. Chem.* **64**, 279 (2011).
3. Parikh, R. Y. *et al. PLoS One* **6**, e21401 (2011).
4. Parikh, R. Y. *et al. ChemBioChem* **9**, 1415–1422 (2008).
5. Ramanathan, R., Campbell, J. L., Soni, S. K., Bhargava, S. K. & Bansal, V. *PLoS One* **6**, (2011).
6. Sastry M; Ahmad A; Khan MI; Kumar R. (Nanobiotechnology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005). doi:10.1002/3527602453
7. Ramanathan, R. *et al. Langmuir* **27**, 714–719 (2011).
8. Simkiss K, W. K. *New york Acad. Press* (1991).
9. Stolz, J. F., Basu, P. & Oremland, R. S. *Int. Microbiol.* **5**, 201–207 (2002).
10. Bruins, M. R., Kapil, S. & Oehme, F. W. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207 (2000).
11. Aiking, H., Kok, K., Van Heerikhuizen, H. & Van 't Riet, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 938–944 (1982).
12. Stephen, J. R. & Macnaughton, S. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 230–233 (1999).
13. Temple, K. L. Syngensis of sulfide ores; an evaluation of biochemical aspects. *Econ. Geol.* **59**, 1473–1491 (1964).
14. Zumberge, J. E., Sigleo, A. C. & Nagy, B. (1978). at <http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:10432917>
15. Reese, R. N. & Winge, D. R. *J. Biol. Chem.* **263**, 12832–12835 (1988).
16. Hosea, M. *et al. Inorganica Chim. Acta* **123**, 161–165 (1986).
17. Beveridge, T. J. & Doyle, R. (1989). at <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19911957928.html;jsessionid=78457FD64FECBBB0247980F61523EE36>>
18. Blakemore, R. P., Maratea, D. & Wolfe, R. S. *J. Bacteriol.* **140**, 720–729 (1979).
19. Mann, S. (2001). at <<http://ukcatalogue.oup.com/product/9780198508823.do>>
20. Mann S, Webb J, W. R. B. C. and B. (1989). at <<http://books.google.es/books/about/Biomineralization.html?id=31cXAQAIAAJ&pgis=1>>
21. Reith, F., Rogers, S. L., McPhail, D. C. & Webb, D. *Science* **313**, 233–236 (2006).
22. Van Bommel KJC, Friggeri A, S. S. (1989).
23. Weiner S, Traub W, L. H. (Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1983).
24. Lowenstam, H. *Science (80-)*. **211**, 1126–1131 (1981).
25. Wiesner J, W. A. *Chem Phys Lett* **157**, 569–575 (1989).
26. Van Bommel, K. J. C., Friggeri, A. & Shinkai, S. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **42**, 980–999 (2003).
27. Meldrum, F. C. & Cölfen, H. *Chem. Rev.* **108**, 4332–4432 (2008).
28. Addadi, L. & Weiner, S. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **31**, 153–169 (1992).
29. Soten, I. & Ozin, G. a. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **4**, 325–337 (1999).
30. Bäuerlein, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 614–41 (2003).
31. Riebesell, U. *et al. Nature* **407**, 364–367 (2000).
32. Sanyal, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A. & Sastry, M. *Langmuir* **21**, 7220–7224 (2005).
33. Kowshik, M. *et al. Nanotechnology* **14**, 95–100 (2002).
34. Hirata, K., Tsuji, N. & Miyamoto, K. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 593–599 (2005).
35. Cobbett, C. & Goldsbrough, P. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 159–182 (2002).
36. Robinson, N. J., Whitehall, S. K. & Cavet, J. S. *Adv. Microb. Physiol.* **44**, 183–213 (2001).
37. Park, T. J., Lee, S. Y., Heo, N. S. & Seo, T. S. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 7019–7024 (2010).
38. Kang, S. H., Bozhilov, K. N., Myung, N. V., Mulchandani, A. & Chen, W. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 5186–5189 (2008).
39. Sweenwy RY, Mao C, Gao X, Burt JL, Belcher AM, Georgiou G, et al. *Chem Biol* **11**, 1553–1559 (2004).
40. Bharde A, Kulkarni A, Rao M, Prabhune A, S. M. J. *Nanosci Nanotechnol* **7**, 4369 (2007).
41. Bansal, V., Bharde, A., Ramanathan, R. & Bhargava, S. K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **179-182**, 150–168 (2012).
42. He, S., Zhang, Y., Guo, Z. & Gu, N. *Biotechnol. Prog.* **24**, 476–480 (2008).
43. Lengke, M. F., Fleet, M. E. & Southam, G. *Langmuir* **23**, 2694–2699 (2007).
44. Plowman, B. *et al. Chem. Commun. (Camb)*. 5039–5041 (2009). doi:10.1039/b910830k
45. Bansal, V., O'Mullane, A. P. & Bhargava, S. K. *Electrochem. commun.* **11**, 1639–1642 (2009).
46. Bansal, V., Li, V., O'Mullane, A. P. & Bhargava, S. K. *CrystEngComm* **12**, 4280 (2010).

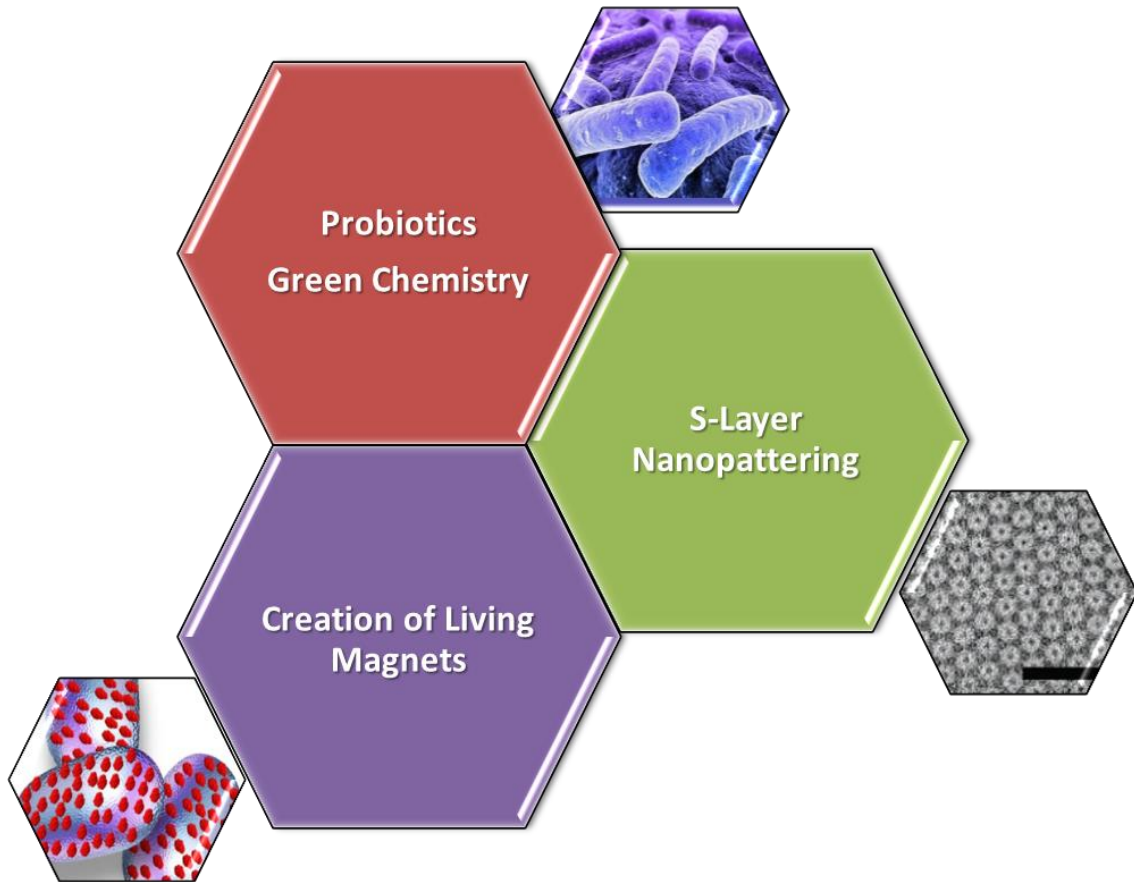
47. Jackson, P., Periasamy, S., Bansal, V. & Geso, M. *Australas. Phys. Eng. Sci. Med.* **34**, 243–249 (2011).
48. Pearson, A., O'Mullane, A. P., Bansal, V. & Bhargava, S. K. *Chem. Commun. (Camb)*. **46**, 731–733 (2010).
49. Pearson, A., O'Mullane, A. P., Bansal, V. & Bhargava, S. K. *Inorg. Chem.* **50**, 1705–1712 (2011).
50. Sabri, Y. M. *et al. Nanotechnology* **22**, 305501 (2011).
51. Sadek, A. Z. *et al. Sensors Actuators, B Chem.* **160**, 1034–1042 (2011).
52. Bansal, V., Sanyal, A., Rautaray, D., Ahmad, A. & Sastry, M. *Adv. Mater.* **17**, 889–892 (2005).
53. Mulligan CN, K. M. *Chem Technol Biotechnol* **78**, 497– (2003).
54. Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. & Parikh, R. Y. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6**, 257–262 (2010).
55. Beveridge, T. & Murray, R. **141**, 876–887 (1980).
56. Southam, G. & Beveridge, T. J. *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 4369–4376 (1996).
57. Kashefi, K., Tor, J. M., Nevin, K. P. & Lovley, D. R.. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3275–3279 (2001).
58. Lengke, M. F., Fleet, M. E. & Southam, G. *Langmuir* **22**, 2780–2787 (2006).
59. Karthikeyan S, B. T. *Environ Microbiol* **4**, 667– (2002).
60. Nair, B. & Pradeep, T. *Cryst. Growth Des.* **2**, 293–298 (2002).
61. Mergeay, M. *et al. FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 385–410 (2003).
62. Mukherjee, P. *et al. Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 3585–3588 (2001).
63. Shankar, S. S., Ahmad, A., Pasricha, R. & Sastry, M. *J. Mater. Chem.* **13**, 1822 (2003).
64. Klaus, T., Joerger, R. & Olsson, E. **96**, 13611–13614 (1999).
65. Silver, S. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 341–353 (2003).
66. Slawson, R. M., Van Dyke, M. I., Lee, H. & Trevors, J. T. *Plasmid* **27**, 72–79 (1992).
67. Mukherjee, P. *et al. Nano Lett.* **1**, 515–519 (2001).
68. Mukherjee, P. *et al. Chembiochem* **3**, 461–463 (2002).
69. Senapati, S., Ahmad, A., Khan, M. I., Sastry, M. & Kumar, R. *Small* **1**, 517–520 (2005).
70. Konishi, Y. *et al. B J. Biotechnol.* **128**, 648–653 (2007).
71. Yong, P., Rowson, N. a., Farr, J. P. G., Harris, I. R. & Macaskie, L. E. B. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 369–379 (2002).
72. Bharde, A. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9326–9327 (2005).
73. Kumar U, Shete A, Harle AS, Kasyutich O, Schwarzacher W, Pundle A, et al. *Chem Mater* **20**, (4)1484–1491 (2008).
74. Bazylnski and williams. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* **3**, 37–75 (2007).
75. Lefe`vre, Christopher T, Fernanda Abreu, U. L. & Bazylnski, and D. A. A. *Met. Nanoparticles Microbiol.* 17–36 (2011). doi:10.1007/978-3-642-18312-6
76. Jogler, C., Schuler, D. & Schüler, D. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 501–521 (2009).
77. Blakemore. (1975).
78. Bazylnski, D. A. & Schübbe, S. *Adv. Appl. Microbiol.* **62**, 21–62 (2007).
79. Bazylnski, D. a & Frankel, R. B. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 217–230 (2004).
80. Frankel, R. B., Blakemore, R. P. & Wolfe, R. S. *Science* **203**, 1355–6 (1979).
81. Heywood, B. R., Bazylnski, D. a., Garratt-Reed, a., Mann, S. & Frankel, R. B. *Naturwissenschaften* **77**, 536–538 (1990).
82. Bazylnski, D. A. *et al.* **61**, 3232–3239 (1995).
83. Faivre, D. & Schüler, D. *Chem. Rev.* **108**, 4875–4898 (2008).
84. Schüler, D. & Baeuerlein, E. *Arch. Microbiol.* **166**, 301–307 (1996).
85. Faivre, D., Böttger, L. H., Matzanke, B. F. & Schüler, D. *Angew. Chemie* **119**, 8647–8652 (2007).
86. Taoka, A., Umeyama, C. & Fukumori, Y. *Curr. Microbiol.* **58**, 177–181 (2009).
87. Sandy, M. & Butler, A. *October* **109**, 4580–4595 (2009).
88. Faivre, D., Menguy, N., Pósfai, M. & Schüler, D. *Am. Mineral.* **93**, 463–469 (2008).
89. Farina, M., Esquivel, D. M. S. & de Barros, H. G. P. L. *Nature* **343**, 256–258 (1990).
90. Watson, J. H. P., Ellwood, D. C., Soper, A. K. & Charnock, J. **203**, 69–72 (1999).
91. Mann, S., Sparks, N. H. C., Frankel, R. B., Bazylnski, D. a & Jannasch, H. W. *Nature* **343**, 258–261 (1990).
92. Bharde, A. a. *et al. Langmuir* **24**, 5787–5794 (2008).
93. Pósfai, M., Buseck, P. R., Bazylnski, D. a & Frankel, R. B. *Science* **280**, 880–883 (1998).
94. Lett, N. *et al. References and Notes 1. Science (80-).* **229**, 424–427 (2006).
95. Bazylnski, D. a & Schübbe, S. *Adv. Appl. Microbiol.* **62**, 21–62 (2007).
96. Bazylnski, D. A., Garratt-Reed, A. J. & Frankel, R. B. *Microsc. Res. Tech.* **27**, 389–401 (1994).

-
96. Meldrum, F. C., Mann, S., Heywood, B. R., Frankel, R. B. & Bazylinski, D. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **251**, 237–242 (1993).
 97. Mann, S., Frankel, R. B. & Blakemore, R. P. *Nature* **310**, 405–407 (1984).
 98. Mann, S., Moench, T. T. & Williams, R. J. P. A. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **221**, 385–393 (1984).
 99. Mann, S., Sparks, N. H. C. & Blakemore, R. P. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **231**, 469–476 (1987).
 100. Bazylinski, D. A. & Moskowicz, B. M. *Rev. Mineral.* **35**, 217–223 (1997).
 101. Diaz-Ricci, J. C. & Kirschvink, J. L. *J. Geophys. Res. Earth* **97**, 17309–17315 (1992).
 102. Bennet, M. *et al. Faraday Discuss.* (2014). doi:10.1039/C4FD00240G
 103. Komeili, A., Vali, H., Beveridge, T. J. & Newman, D. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3839–3844 (2004).
 104. Draper, O. *et al. Mol. Microbiol.* **82**, 342–354 (2011).
 105. Katzmann, E., Scheffel, A., Gruska, M., Plitzko, J. M. & Schüler, D. *Mol. Microbiol.* **77**, 208–224 (2010).
 106. Scheffel, A. *et al. Nature* **440**, 110–4 (2006).
 107. Franks, A. E., Malvankar, N. & Nevin, K. P. (2010). at <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4155/bfs.10.25?journalCode=tbfu20>>
 108. Thormann, K. M., Saville, R. M., Shukla, S., Dale, a & Spormann, A. M. *J. Bacteriol.* **186**, 8096–8104 (2004).
 109. Richter, K., Schicklberger, M. & Gescher, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 913–921 (2012).
 110. Cao, B. *et al. Environ. Microbiol.* **13**, 1018–1031 (2011).
 111. Nealson, K. H., Nealson, K. H., Scott, J. & Scott, J. *Prokaryotes* 1133–1151 (2006). doi:10.1007/0-387-30746-x
 112. Tiedje, J. M. *SNat. Biotechnol.* **20**, 1093–1094 (2002).
 113. Shirodkar, S., Reed, S., Romine, M. & Saffarini, D. *Environ. Microbiol.* **13**, 108–115 (2011).
 114. Schwalb, C., Chapman, S. K. & Reid, G. *Biochemistry* **42**, 9491–9497 (2003).
 115. Lovley, D. R. & Phillips, E. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1472–1480 (1988).
 116. Lovley, D. R., Phillips, E. J. P. & Lonergan, D. J. *Environ. Sci. Technol.* **25**, 1062–1067 (1991).
 117. Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M. & Lovley, D. R. *Science* **295**, 483–485 (2002).
 118. Methé, B. a *et al. Science* **302**, 1967–1969 (2003).
 119. Lovley, D. R. & Woodward, J. C. *Chem. Geol.* **132**, 19–24 (1996).
 120. Nevin, K. P. & Lovley, D. R. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2248–2251 (2000).
 121. Childers, S. E., Ciuffo, S. & Lovley, D. R. *Nature* **416**, 767–769 (2002).
 122. Magnuson, T. S. *et al. Biochem. J.* **359**, 147–152 (2001).
 123. Champine, J. E., Underhill, B., Johnston, J. M., Lilly, W. W. & Goodwin, S. *Anaerobe* **6**, 187–196 (2000).
 124. Reguera, G. *et al. Nature* **435**, 1098–1101 (2005).
 125. Morgado, L., Brulx, M., Pessanha, M., Londer, Y. Y. & Salgueiro, C. *Biophys. J.* **99**, 293–301 (2010).
 126. Holmes, D. E. *et al. Microbiology* **154**, 1422–1435 (2008).
 127. Myers, C. R. & Myers, J. M. *J. Bacteriol.* **174**, 3429–3438 (1992).
 128. Myers, C. R. & Myers, J. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**, 215–222 (1993).
 129. Myers, C. R. & Myers, J. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**, 15–22 (1993).
 130. Myers, C. R. & Myers, J. M. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1326**, 307–318 (1997).
 131. Gralnick, J. a. & Newman, D. K. *Mol. Microbiol.* **65**, 1–11 (2007).
 132. Brutinel, E. D. & Gralnick, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 41–48 (2012).
 133. Lovley, D. R., Holmes, D. E. & Nevin, K. P. *Adv. Microb. Physiol.* **49**, 219–86 (2004).
 134. Stams, A. J. M. *et al. Environ. Microbiol.* **8**, 371–382 (2006).
 135. Marsili, E. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3968–3973 (2008).
 136. Von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S. & Lloyd, J. R. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 615–623 (2008).
 137. Covington, E. D., Gelbmann, C. B., Kotloski, N. J. & Gralnick, J. a. *Mol. Microbiol.* **78**, 519–532 (2010).
 138. Gorby, Y. a *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11358–11363 (2006).
 139. El-Naggar, M. Y. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18127–18131 (2010).
 140. Roden, E. E. & Zachara, J. M. **30**, 1618–1628 (1996).
 141. Arnold, R. G., DiChristina, T. J. & Hoffmann, M. R. *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 1081–96 (1988).
 142. Urrutia, M. M., Roden, E. E., Fredrickson, J. K. & Zachara, J. M. *Geomicrobiol. J.* **15**, 269–291 (1998).
 143. Urrutia, M. M., Roden, E. E. & Zachara, J. M. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 4022–4028 (1999).
-

144. Royer, R. a., Dempsey, B. a., Jeon, B. H. & Burgos, W. D. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 187–193 (2004).
145. Royer, R. a., Burgos, W. D., Fisher, A. S., Unz, R. F. & Dempsey, B. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1939–1946 (2002).
146. Roden, E. E. & Urrutia, M. M. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1847–1853 (1999).
147. Zachara, J. M. *et al. Am. Mineral.* **83**, 1426–1443 (1998).
148. Donlan, R. M. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 881–890 (2002).
149. Costerton, J. W. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**, 217–221 (1999).
150. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 711–45 (1995).
151. Costerton, J. W. A. *Cit. Class.* **48**, 18 (1989).
152. Heukelekian, H. & Heller, J. *Bacteriol.* **40**, 547–558 (1940).
153. Socransky, S. S., Haffajee, a D., Cugini, M. a, Smith, C. & Kent, R. L. J. *Clin. Periodontol.* **25**, 134–144 (1998).
154. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. *Science* **284**, 1318–1322 (1999).
155. Christensen, B. E. J. *Biotechnol.* **10**, 181–202 (1989).
156. ZHANG, X., BISHOP, P. & KUPFERLE, M. *Water Sci. Technol.* **37**, 345–348 (1998).
157. Singh, R., Paul, D. & Jain, R. K. B. *Trends Microbiol.* **14**, 389–397 (2006).
158. Flemming, H. C. & Wingender, J. *Water Sci. Technol.* **43**, 1–8 (2001).
159. Ahimou, F., Semmens, M. J., Haugstad, G. & Novak, P. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2905–2910 (2007).
160. Costerton, W. & Veeh, R. *J. Clin. ...* **112**, 12 (2003).
161. Wrangstadh, M., Szewzyk, U., Ostling, J. & Kjelleberg, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2065–2072 (1990).
162. Mayer, C. *et al. Int. J. Biol. Macromol.* **26**, 3–16 (1999).
163. Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. D. & Lappin-Scott, H. M. *J. Appl. Microbiol.* **85 Suppl 1**, 19S–28S (1998).
164. Wimpenny, J. W. T. & Colasanti, R. *FEMS Microbiology Ecology* **22**, 1–16 (1997).
165. Sutherland, I. W. (1990). at
<<https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=WV1ngzpz7e0UC&pgis=1>>
166. Sutherland, I. *Pure Appl. Chem.* **69**, 1911–1917 (1997).
167. Sutherland, I. W. B. *Microbiology* **147**, 3–9 (2001).
168. Ertesvåg, H. & Valla, S. *Polym. Degrad. Stab.* **59**, 85–91 (1998).
169. Chandrasekaran, R., Lee, E. J., Thailambal, V. G. & Zevenhuizen, L. P. T. M. *Carbohydr. Res.* **261**, 279–295 (1994).
170. Beech, I. B. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **53**, 177–183 (2004).
171. Ruiz, L. M. *et al. Hydrometallurgy* **94**, 133–137 (2008).
172. Waters, C. M. & Bassler, B. L. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 319–346 (2005).
173. Van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H. & Lens, P. N. L. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2**, 9–33 (2003).
174. Romání, A. M. *et al. Microb. Ecol.* **56**, 427–436 (2008).
175. Von Bodman, S. B., Majerczak, D. R. & Coplin, D. L. *stewartii. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7687–7692 (1998).
176. Rivas, M., Seeger, M., Holmes, D. S. & Jedlicki, E. *Biol. Res.* **38**, 283–297 (2005).
177. Hooshangi, S. & Bentley, W. E. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 550–555 (2008).
178. Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K. & Sand, W. *Water Sci. Technol.* **43**, 159–167 (2001).
179. Sand, W. & Gehrke, T. *Res. Microbiol.* **157**, 49–56 (2006).
180. Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. & Sand, W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 239–248 (2003).
181. Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J. & Sand, W. *Hydrometallurgy* **71**, 83–88 (2003).
182. Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. & Sand, W. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2743–2747 (1998).
183. Vuong, C. *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 54881–54886 (2004).
184. Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 228–233 (2002).
185. Oelschlaeger, T. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57–62 (2010).
186. Wehkamp, J. *et al. Gut* **53**, 1658–1664 (2004).
187. Matsuo, K., Akamatsu, T. & Katsuyama, T. *Technology* 782–789 (1997).
188. Macpherson, A. J. & Uhr, T. *Science* **303**, 1662–1665 (2004).
189. Kamada, N. *et al. Infect. Immun.* **76**, 214–220 (2008).
190. Kelly, D. *et al. A. Nat. Immunol.* **5**, 104–112 (2004).

191. Petrof, E. O. *et al. Gastroenterology* **127**, 1474–1487 (2004).
192. Grangette, C. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10321–10326 (2005).
193. Polk, D. B. NIH Public Access. **132**, 562–575 (2011).
194. Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S. & Le Blay, G. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**, 56–64 (2008).
195. Weinberg, E. D. *Perspect. Biol. Med.* **40**, 578–583 (1997).
196. Collado, M. C., Grześkowiak, Ł. & Salminen, S. *Curr. Microbiol.* **55**, 260–265 (2007).
197. Altenhoefer, A. *et al. T. FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**, 223–229 (2004).
198. Botes, M., Loos, B., Van Reenen, C. a. & Dicks, L. M. T. *Arch. Microbiol.* **190**, 573–584 (2008).
199. Ingrassia, I., Leplingard, A. & Darfeuille-michaud, A. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2880–2887 (2005).
200. Asahara, T. *et al. Society* **72**, 2240–2247 (2004).
201. Geier, M. S., Butler, R. N. & Howarth, G. S. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1265–1269 (2006).
202. Hirayama, K. & Rafter, J. *Microbes Infect.* **2**, 681–686 (2000).
203. Sun, J., Shi, Y. H., Le, G. W. & Ma, X. Y. *World J. Gastroenterol.* **11**, 6330–6337 (2005).
204. Iyer, C. *et al. Cell. Microbiol.* **10**, 1442–1452 (2008).
205. Kawasaki, M. & Hori, M. *J. Phys. Chem. B* **107**, 6760–6765 (2003).
206. Sun, Z. *et al. ChemPhysChem* **7**, 370–378 (2006).
207. Wang, S., Kang, S. ., Nikles, D. ., Harrell, J. . & Wu, X. *J. Magn. Magn. Mater.* **266**, 49–56 (2003).
208. Xia, D., Xia, D., Brueck, S. R. J. & Brueck, S. R. J. *Nano* 1–5 (2004).
209. Grunes, J., Zhu, J., Anderson, E. a. & Somorjai, G. a. *J. Phys. Chem. B* **106**, 11463–11468 (2002).
210. Liu, X., Fu, L., Hong, S., Dravid, V. P. & Mirkin, C. a. *Adv. Mater.* **14**, 231–234 (2002).
211. Mark, S. S., Bergkvist, M., Yang, X., Angert, E. R. & Batt, C. *Biomacromolecules* **7**, 1884–1897 (2006).
212. Pinto, Y. Y. *et al. Nano Lett.* **5**, 2399–2402 (2005).
213. McMillan, R. A. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2800–2801 (2005).
214. Sleytr, U. B., Sára, M., Pum, D. & Schuster, B. *Prog. Surf. Sci.* **68**, 231–278 (2001).
215. Sára, M., Pum, D., Schuster, B. & Sleytr, U. B. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **5**, 1939–1953 (2005).
216. Archibald, A., Hancock, I. & Harwood, C. (1993). at [https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Cell wall structure%2C synthesis%2C and turnover&author=A. R. Archibald&author=I. C. Hancock&author=C. R. Harwood&publication_year=1993#0](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Cell+wall+structure%2C+synthesis%2C+and+turnover&author=A.+R.+Archibald&author=I.+C.+Hancock&author=C.+R.+Harwood&publication_year=1993#0)
217. Baumeister, W., Lembcke, G., Dürr, R. & Phipps, B. M. 283–296 (1990). at <http://pubman.mpdl.mpg.de/pubman/item/escidoc:1582794:1>
218. Beveridge, T. J. 204–212 (1994).
219. Adachi, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. & Udaka, S. *J. Bacteriol.* **171**, 1010–1016 (1989).
220. Beveridge, T.; Koval, S. *Springer.* (1993). at <http://www.springer.com/us/book/9780306445828>
221. Bingle, W. H., Nomellini, J. F. & Smit, J. *Mol. Microbiol.* **26**, 277–288 (1997).
222. Breitwieser, a., Gruber, K. & Sleytr, U. B. *J. Bacteriol.* **174**, 8008–8015 (1992).
223. Bröckl, G. *et al. Eur. J. Biochem.* **199**, 147–152 (1991).
224. Callegari, M. L. *et al. Position from. October* **12046**, (1993).
225. Baumeister, W. & Lembcke, G. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 567–75 (1992).
226. Koval, S. F. & Murray, R. *Microbiol. Sci.* **3**, 357–61 (1986).
227. Sleytr, U. B. *Int. Rev. Cytol.* **53**, 1–62 (1978).
228. Carl, M. & Dasch, G. a. *J. Autoimmun.* **2 Suppl**, 81–91 (1989).
229. Carl, M., Dobson, M. E., Ching, W. M. & Dasch, G. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8237–8241 (1990).
230. Fagan, R. P. & Fairweather, N. F. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 211–22 (2014).
231. Peters, J. *et al. J. Mol. Biol.* **245**, 385–401 (1995).
232. Peters, J., Baumeister, W. & Lupas, a. *J. Mol. Biol.* **257**, 1031–1041 (1996).
233. Phipps, B., R. Huber, and W. B. *Mol. Microbiol.* **5**, 523–528 (1991).
234. Mayr, J. *et al. Curr. Biol.* **6**, 739–749 (1996).
235. Schuster, B. & Sleytr, U. B. Europe PMC Funders Group Composite **168**, 207–216 (2010).
236. Sleytr, U. B. & Messner, P. (1996).
237. Sleytr, U. B. & Sára, M. *Trends Biotechnol.* **15**, 20–26 (1997).
238. Koval, S. F. P. *Can. J. Microbiol.* **34**, 407–414 (1988).
239. Messner, P. & Sleytr, U. B. *Adv. Microb. Physiol.* **33**, 213–275 (1992).
240. Pum, D. & Sleytr, U. B. *Trends Biotechnol.* **17**, 8–12 (1999).
241. Sára, M. & Sleytr, U. B. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **65**, 83–111 (1996).

242. Sleytr, U. B. *Nature* **257**, 400–402 (1975).
243. Pum, D., Messner, P. & Sleytr, U. B. *J. Bacteriol.* **173**, 6865–6873 (1991).
244. Takeoka, a, Takumi, K., Koga, T. & Kawata, T. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 261–267 (1991).
245. Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M. & Fouet, A. *J. Bacteriol.* **180**, 52–58 (1998).
246. Mesnage, S., Tosi-couture, E., Gounon, P. & Fouet, A. *Mol. Microbiol.* **23**, (1995).
247. Etienne-Toumelin, I., Sirard, J.-C., Dufлот, E., Mock, M. & Fouet, A. *J. Bacteriol.* **177**, 614–620 (1995).
248. Sleytr, U. B. & Beveridge, T. J. *Trends Microbiol.* **7**, 253–260 (1999).
249. Sleytr, U. B. & Messner, P. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 311–39 (1983).
250. Messner, P., F. M. Unger, and U. B. S. 1996. at
<<https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=ntAMLjCXQ6AC&pgis=1>>
251. Boot, H. J. & Pouwels, P. H. *Mol. Microbiol.* **21**, 1117–1123 (1996).
252. Messner, P. *Glycoconj. J.* **14**, 3–11 (1997).
253. Messner P, S. U. *Glycobiology* **1**, 545–551 (1991).
254. Lechner, J. & Wieland, F. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 173–94 (1989).
255. Schäffer, C., T. Wugeditsch, C. Neuninger, and P. M. *Microb. Drug Resist* **2**, 17–23 (1996).
256. Navarre, W. W. & Schneewind, O. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 174–229 (1999).
257. Herbold, D. R. & Glaser, L. *J. Biol. Chem.* **250**, 7231–7238 (1975).
258. Sára, M. & Sleytr, U. B. *J. Bacteriol.* **169**, 4092–4098 (1987).
259. Hovmöller, S., Sjögren, a & Wang, D. N. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **51**, 131–163 (1988).
260. Graham, L., N. Nanninga, and T. J. B. *Trends Biochem. Sci* **16**, 328–329 (1991).
261. Koval, S. F. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 138– 142 (1997).
262. Schultze-Lam, S. & Beveridge, T. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 447–453 (1994).
263. Beveridge, T. J., Schultzelam, S. & Harauz, G. *J. Bacteriol.* **174**, 7971–7981 (1992).
264. Doig, P., Emödy, L. & Trust, T. J. *J. Biol. Chem.* **267**, 43–49 (1992).
265. Garduno, R. a., Phipps, B. M. & Kay, W. W. *J. Bacteriol.* **177**, 2684–2694 (1995).
266. Sleytr, U. B., Messner, P., Pum, D., and Sara, M. (ed.), *Immobilised Macromolecules: Application Potentials*. Springer Series in Applied Biology, Springer-Verlag, London (1993).
267. Sára, M. & Sleytr, U. B. *J. Memb. Sci.* **33**, 27–49 (1987).
268. Sleytr, U.B., and Sara, M. United States Patent 191. (1989).
269. Weigert, S. & Sára, M. *J. Memb. Sci.* **121**, 185–196 (1996).
270. Weigert, S. & Sfil, M. *J. Memb. Sci.* **106**, 147–159 (1995).
271. Sára, M. & Sleytr, U. B. *Micron* **27**, 141–156 (1996).
272. Sleytr, U. B., Messner, P., Pum, D. & Sára, M. *Angew. Chemie Int. Ed.* **38**, 1034–1054 (1999).
273. Jahn-Schmid, B. *et al. J. Biotechnol.* **44**, 225–231 (1996).
274. Shenton, W., Pum, D. & Sleytr, U. B. *Nature* 585–587 (1997).
275. Dieluweit, S., Pum, D. & Sleytr, U. B. *Supramol. Sci.* **5**, 15–19 (1998).
276. Bergkvist, M., Mark, S. S., Yang, X., Angert, E. R. & Batt, C. *Society* 8241–8248 (2004).
doi:10.1021/jp049280l
277. Mark, S. S. *et al. Langmuir* **22**, 3763–3774 (2006).
278. Hall, S. R., Shenton, W., Engelhardt, H. & Mann, S. *ChemPhysChem* **2**, 184–186 (2001).
279. Merroun, M. L. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5532–5543 (2005).
280. Selenska-Pobell, S. *et al. FEMS Microbiol. Ecol.* **29**, 59–67 (1999).
281. Merroun, M.L., Pollmann, K., Raff, J., Scheinost, A. and S.-P. *Forschungszentrum Rossend.* **25**, (2003).
282. Merroun, M., Rossberg, a., Hennig, C., Scheinost, a. C. & Selenska-Pobell, S. *Mater. Sci. Eng. C* **27**, 188–192 (2007).
283. Anderson, G. J., Frazer, D. M. & McLaren, G. D. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **25**, 129–135 (2009).
284. Jolobe, O. M. P. *Clin. Lab. Haematol.* **22**, 79–80 (2000).
285. Jolobe, O. M. P. *Clin. Lab. Haematol.* **22**, 79–80 (2000).
286. Zhu, A., Kaneshiro, M. & Kaunitz, J. D. *Dig. Dis. Sci.* **55**, 548–559 (2010).



Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral era explorar la Nanoquímica con microorganismos como una vía para la obtención de nanoestructuras únicas, con propiedades fascinantes y con potencial para ser aplicadas en diversos campos, especialmente el biomédico.

Aunque la obtención de nanoestructuras a partir de organismos vivos es un área relativamente nueva, existe un buen número de ejemplos en bibliografía que muestran como la química de determinados microorganismos es capaz de controlar, de forma biogénica o biomimética, la síntesis de nanopartículas con tamaño, forma y organización controlada.

Hemos pretendido en este trabajo por una parte, abordar el uso de una S-layer bacteriana para crear materiales híbridos bio-inorgánicos en los que exista un control organizado de las nanopartículas metálicas para formar una nanoestructura ordenada, especialmente nanopartículas de compuestos de coordinación. No existían ejemplos de este tipo de nanoestructuras híbridas y pensamos que lograr sintetizar y caracterizar una de ellas podría significar abrir una nueva ruta hacia la preparación de materiales nanoestructurados de forma ordenada, uno de los grandes retos en Nanociencia para poder dar el salto desde el material hasta el dispositivo para diversas aplicaciones.

Por otra parte, pretendíamos utilizar bacterias vivas para la preparación de materiales magnéticos vivos. Un ejemplo en la naturaleza inspiraba nuestro trabajo: las bacterias magnetotácticas. Estos organismos sintetizan nanocristales de magnetita “single-domain” y los ordena para constituirse en un único imán, capaz de sentir el campo geomagnético.

Nuestro objetivo en este campo era poder mimetizar la funcionalidad de este tipo de bacterias magnetotácticas a partir de otras bacterias, siguiendo un enfoque que ha venido a denominarse “biomimicry”, en el que la idea final es “imitar” las propiedades y funcionalidad de un material biogénico sin necesariamente “imitar” su estructura. Alcanzar este objetivo nos permitiría contar con un material biomimético de las bacterias magnetotácticas, que pudiera tener eventualmente su funcionalidad y sus posibles aplicaciones sin los inconvenientes que presentan generalmente las bacterias magnéticas naturales: difíciles de aislar, cultivar y

producir en el laboratorio o en la industria a gran escala. Además, pretendíamos llevar a cabo estos objetivos utilizando bacterias que pudieran obtenerse en grandes cantidades, que se cultivaran sin muchos requisitos químicos y que estuvieran disponibles, lejos del uso de microorganismos “singulares”, poco abundantes, difíciles de aislar, cultivar y manipular químicamente.

Esta idea responde a nuestro objetivo de poder aplicar realmente las nanoestructuras bio-híbridas obtenidas en el campo biomédico, algo que resulta imposible cuando se trata de microorganismos especialmente singulares. De aquí, que intentáramos cumplir nuestros objetivos con un microorganismo frecuente, estable, fácil de aislar y cultivar como es el *Lactobacillus fermentum*, que es de hecho una bacteria que forma parte de nuestra flora bacteriana, jugando por tanto un papel beneficioso para la salud. Además, este organismo es producido de forma industrial por la empresa Biosearch Life, lo que facilita su disponibilidad.

Hacer nanoquímica con *L. Fermentum* para la obtención de nanoestructuras metálicas era uno de los grandes objetivos específicos de esta Tesis Doctoral. A diferencia de la mayoría de los artículos dedicados a la obtención de nanoestructuras bio-híbridas a partir de organismos vivos, en el caso de *L. Fermentum* teníamos las ventajas de su alta disponibilidad, fácil manejo para cultivar y el hecho adicional de sus propiedades beneficiosas para la salud.



Materiales y Métodos

EXPERIMENTAL

Experimental Capítulo 3

Cultivo bacteriano de *L. sphaericus* JG- A12

Las células fueron cultivadas a finales de la fase exponencial en 6 l de medio de caldo nutritivo (8 g / l, Difco), pH 7,0 en 7,5 l biorreactores (Ochs , Bovenden / Lenglern , Alemania). Todos los experimentos se realizaron en cultivo discontinuo a 30 ° C, a una velocidad de agitación de 500 rpm utilizando un agitador magnético y flujo de aire a una velocidad de 3 L / min. El crecimiento bacteriano se controló mediante la medición de densidades ópticas (OD600) a 600 nm utilizando un espectrómetro de Pharmacia Biotech Ultrospec 1000 (Amersham Biosciences , Freiburg, Alemania). Las células bacterianas se recogieron por centrifugación a 10.000 x g durante 20 min.

Preparación de la proteína de S-Layer de *L. sphaericus* JG-A12

Las células se lavaron en tampón de Tris-HCl 50 mM, 1 mM MgCl₂ • 6H₂O y 3 mM NaN₃, pH 7,5 (tampón estándar). Para la eliminación de los flagelos bacterianos, la suspensión se homogeneizó en una licuadora IKA-T8 (IKA Labortechnik, Stauffen, Alemania) a velocidad máxima durante 10 min en hielo. Las células sin flagelos se recogieron por centrifugación a 6000 × g durante 10 min a 4°C, se resuspendieron 1:1 en el tampón estándar, y se añadió DNasa y RNasa II. Las células se desintegraron en un homogeneizador 110L (Cooperación microfluídica, Newton, Massachusetts, EE.UU.) en hielo a una presión de 960 bar, con tres pases. Después de eliminar las células intactas por centrifugación a 6000 × g durante 10 min a 4°C, se lavaron dos veces los fragmentos de pared celular en el tampón estándar. Las membranas plasmáticas se solubilizaron en la solución tampón estándar con 1% de Triton X-100 durante 10 min a temperatura ambiente, y los fragmentos de pared celular restantes se lavaron dos veces. El peptidoglicano se hidrolizó mediante incubación de las muestras en una solución de tampón estándar con 0,2mg/ml de lisozima durante 6 horas a 30°C. La fracción S-layer se lavó varias veces, se resuspendió en tampón estándar y se almacenó a 4°C.

Recristalización de la S-Layer de *L. sphaericus* JG-A12

Para la solubilización de la S-Layer, se mezcló cada suspensión de proteína con una concentración de 20 mg/ml con un volumen de hidrocloreuro de guanidina, 6M en Tris 50 mM (pH 7,2) cinco veces mayor que el de la suspensión de proteína y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 6 h. Los componentes no proteicos precipitaron por centrifugación a 12.400 x g durante 60 min a 4°C. El reensamblaje de las proteínas de la S-Layer se realizó mediante dos diálisis del sobrenadante en 2l de CaCl₂ 10 mM durante 24 horas a 4°C, utilizando membranas de diálisis con un peso molecular de corte de 1000 a 50000. Las capas de S-Layer reensambladas se recogieron por centrifugación a 12.400 x g durante 60 min a 4°C, se resuspendieron en 10 mM de CaCl₂, y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Preparación de NiCr-S-Layer de *L. sphaericus* JG-A12

Se obtuvieron en disolución acuosa nanopartículas de Cs_xNi[Cr(CN)₆] siguiendo el procedimiento desarrollado por Malah et al¹, con un tamaño medio de 6 nm mediante mezcla rápida de los precursores en ausencia de especies orgánicas. Se confirmó que no había agregaciones de partículas mediante medidas de Dynamic Light Scattering (DLS). Estas nanopartículas se incubaron posteriormente con la S-Layer (1 mg/ml) durante 24 horas a 4°C. El producto resultante conteniendo la S-Layer con las nanopartículas de NiCr se purificó por centrifugación a 12.400 x g durante 60 min a 4°C. El polvo resultante se secó y se aisló. Las muestras utilizadas para la microscopía electrónica de transmisión (TEM) se prepararon diluyendo el polvo de NiCr-S-Layer con agua milli-Q.

Dynamic Light Scattering de las nanopartículas de Cs_xNi [Cr (CN) 6]

Para descartar alguna agregación en la dispersión de Cs_xNi[Cr(CN)₆] antes de la incubación con la S-Layer, las mediciones DLS se realizaron, utilizando un sistema 4700C de *Malvern Instruments*. Este sistema está equipado con un láser de helio-neón que trabaja a una longitud de onda de 632,8 nm y de 20 mW. Los experimentos se realizaron a 25°C y a un ángulo de dispersión de 90° (q = 0.018 nm⁻¹). El análisis CONTIN de la función de autocorrelación de intensidad reveló un tamaño medio de la población centrada en ~ 6 nm.

Microscopía Electrónica de Transmisión de NiCr-S-Layer de *L. sphaericus* JG-A12

Se colocó una gota de NiCr-S-Layer sobre una rejilla de Cu revestida de carbono (200 mesh). La rejilla se secó sobre papel de filtro. La misma muestra también se estudió teñida, usando 1% de acetato de uranilo. Se tomaron micrografías TEM y HRTEM con un microscopio G2 FEI TITAN Philips CM-20.

Análisis FT-IR

Se realizaron análisis FT-IR en un espectrómetro de IR200 (ThermoNicolet).

Medidas magnéticas

Las mediciones magnéticas se realizaron en muestras liofilizadas utilizando un magnetómetro (Quantum Design MPMS-XL-5) equipado con un sensor SQUID.

Experimental Capítulo 4

Preparación de nanopartículas de maghemita.

La magnetita se sintetizó según el método de Massart² mediante coprecipitación de sales de Fe²⁺ y Fe³⁺ con una estequiometría de 0,5 y en agitación constante. Posteriormente, sin parar de agitar, se añadieron 200 ml de NH₃ y se dejó en agitación vigorosa durante 20 min aproximadamente. Pasados los 20 min la disolución se decantó con un imán de 1.2 T, quedando un sobrenadante transparente. A continuación, se añadieron 200 ml de HNO₃, 2M y decantamos con imán nuevamente. Posteriormente, se añadieron 300 ml de Fe(NO₃)₃ · 9H₂O, 0,33M calentando a 100 °C durante 30 min y en agitación constante para conseguir una oxidación total de las nanopartículas. Decantamos con imán. Posteriormente se añadieron 200 ml de HNO₃, 2M y dejamos en agitación por 15 min. Decantamos con imán y lavamos tres veces con acetona decantando siempre con el imán (100-200 ml cada lavado). Resuspendimos en dH₂O (200-250 ml). Calentamos en baño maria a 40-60 °C por 1-2h.

Incorporación de nanopartículas de maghemita en *Lactobacillus fermentum* CECT5716 y *Bifidobacteria breve* CECT7263

La estrategia para incorporar nanopartículas de maghemita en *Lactobacillus fermentum* CECT5716 o *Bifidobacteria breve* CECT7263 implica un procedimiento en dos etapas en el que, después de la detención de la proliferación de las bacterias probióticas, las nanopartículas de maghemita se depositan sobre los EPS de las bacterias. El estado latente de las bacterias favorece la adsorción de las partículas en su superficie externa en lugar de su internalización. Las bacterias probióticas procedentes de leche humana *Lactobacillus fermentum* CECT5716 y *Bidobacteria breve* CECT7263 fueron cultivadas en MRS y MRS/Cisteina respectivamente a 37°C con agitación orbital durante 24 h y posteriormente se lavaron con agua destilada mediante centrifugación. Las bacterias lavadas se resuspendieron de nuevo a su volumen original y la densidad óptica se midió a 600 nm para obtener una concentración de 1×10^9 CFU/mL. Las bacterias se recogieron a 3000 x g durante 5 min y posteriormente se le añadió una solución ácida (pH 2) de nanopartículas de maghemita (66.6 µL maghemita/ml cultivo, de una concentración stock 0.95M), preparadas como se ha explicado anteriormente. La solución se diluyó con agua destilada hasta el volumen de partida. Las bacterias marcadas con nanopartículas de maghemita (acuñadas como "Bacterias Magnéticas Artificiales") se recogieron a 100 g, 20 min. Varios ciclos sucesivos de centrifugación / lavado no eliminan las nanopartículas de la superficie bacteriana. La concentración de hierro para cada muestra se midió después de liofilizarse por Inductive Coupled Plasma (ICP), dando un contenido de hierro de 100-295 mgFe/g bacteria.

Determinación de la Viabilidad (CFU) de Bacterias Magnéticas Artificiales

Para estimar la concentración de Bacterias Magnéticas Artificiales, se sembraron diluciones apropiadas de éstas por cuadruplicado en placas de agar MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Los cultivos se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 48 h. La viabilidad bacteriana total se determinó por recuento directo de las colonias. Dando unos valores de viabilidad de siempre por encima de $1 \cdot 10^8$.

Microscopía confocal de Bacterias Magnéticas Artificiales

Las Bacterias Magnéticas Artificiales se tiñeron con SYTO9 para el estudio de fluorescencia. Una gota de la solución se depositó sobre un portaobjetos de polilisina y se observó en un microscopio confocal Leica DMI6000.

Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución de Bacterias Magnéticas Artificiales

Para la preparación de una rejilla para Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), se colocó una gota de Bacterias Magnéticas Artificiales sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono (200 mesh). La rejilla se secó con papel de filtro. Las micrografías electrónicas fueron tomadas con un microscopio electrónico analítico HR Philips CM-20 que funciona a 200 keV.

Para los estudios por Microscopía Electrónica de Transmisión de Campo Oscuro (HAADF-STEM), el mapeo de Energy-Dispersive X-Ray (EDX map), la Microscopía de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM) y la Difracción de Electrones, la muestra de Bacterias Magnéticas Artificiales fue incluida en resina epóxida. La fijación se obtiene mediante la adición de glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sodico 0,1 M a 4°C durante 4 h. La muestra se lavarón 3 veces en tampón cacodilato de sodio 0,1 M durante 15 min. Se añadió 0,1% de tetroxido osmio en tampón cacodilato de sodio 0,1 M y se dejó reposar durante 1 h. El tetroxido de osmio se lavó tres veces con tampón de cacodilato de sodio 0,1 M durante 15 min cada vez. Posteriormente se llevó a cabo la deshidratación a través de unos lavados en serie de etanol y óxido de propileno. Finalmente, la muestra está incrustado en resina epoxi y se dejó durante la noche a 4°C. Después de realizar ultramicrocortes, se observaron las muestras con un microscopio G2 FEI TITAN.

Mediciones Magnéticas de Bacterias Magnéticas Artificiales

Las mediciones magnéticas de Bacterias Magnéticas Artificiales se realizaron en muestras liofilizadas de la muestra con un mayor contenido en hierro (295,5 mg de hierro por g de bacterias) utilizando un magnetómetro (Quantum Design MPMS-XL-5) equipado con un sensor SQUID. La temperatura de análisis osciló entre 2 y 300 K, de acuerdo con un procedimiento clásico de zero-field-cooled/field-cooled

(ZFC/FC) en presencia de un campo magnético débil (5 mT), obteniéndose los ciclos de histéresis a 300 K en un campo magnético oscilante de 5 T a -5 T.

Experimental Capítulo 5

Cultivo de Bacterias Magnéticas Artificiales

Se prepararon Bacterias Magnéticas Artificiales como se ha explicado anteriormente en el capítulo 4. Posteriormente, después de recogerlas a 100 g, 20 min., el sobrenadante se descartó y se añadió 10 ml de medio MRS fresco. Las células se dejaron crecer de nuevo, cambiando el medio de cultivo cada 24 horas. Se tomaron muestras a diferentes tiempos: 15 h, 18 h, 39 h, 49 h y 62 h, para ser analizadas. Cada muestra fue liofilizada antes de su análisis.

Medidas magnéticas Vs crecimiento bacteriano de Bacterias Magnéticas Artificiales

Las medidas magnéticas para el estudio de la evolución del magnetismo con el crecimiento bacteriano se realizaron sobre las muestras liofilizadas. Las medidas de ZFC/FC y de histéresis se analizaron como se explicó anteriormente en el capítulo 4 utilizando un magnetómetro (Quantum Design MPMS-XL-5) equipado con un sensor SQUID.

Para analizar las propiedades magnéticas de las Bacterias Magnéticas Artificiales nanoestructuradas en cadenas, después de recoger las células del cultivo a los diferentes tiempos mediante centrifugación, el sobrenadante se descartó y se añadió resina LR-White. Posteriormente, se incluyeron las muestras en cápsulas y la resina polimerizó en presencia de un campo magnético externo de 1.2 T, después de tres días bajo luz ultravioleta. Más tarde, las cápsulas se cortaron en láminas de aproximadamente en 0,5 micras para su análisis. Las medidas magnéticas se llevaron a cabo en un susceptómetro Quantum Design (MPMS-XL) (Universidad de Barcelona). Se realizaron medidas entre 5 y 300 K a 5 frecuencias AC: 0.1, 1, 10, 100 y 1000 Hz y con una amplitud de campo de 0,41 mT.

Imágenes de Resonancia Magnética (MRI)

Para la toma de imágenes de resonancia magnética del intestino, la concentración de hierro de la solución final Bacterias Magnéticas Artificiales se optimizó a 9.6mM. La concentración óptima fue el resultado de varios ensayos pre-clínicos. Se analizaron siete ratones y las imágenes fueron adquiridas utilizando un Tomógrafo Biospec (Bruker, Karlsruhe, Alemania) equipado con un imán horizontal de 4.7 T, de 33 cm (Oxford Ltd., Oxford, Reino Unido). Los tiempos de análisis fueron: Antes de la administración de la muestra (pre), 30 minutos, 1, 2, 3, 6 y 24 h después de la administración de la muestra. Los ratones fueron alimentados sólo con un gel de nutrientes de base acuosa durante 72 h antes de la adquisición de imágenes. Esto permitió una limpieza completa del intestino. Se tomaron Imágenes T2-weighted del abdomen desde la espalda hacia el vientre.

Experimental Capítulo 6

Preparación de NanoPROB

Tanto para la preparación de las nanopartículas de maghemita como para la incorporación de las partículas en las bacterias, se procedió como se ha explicado anteriormente en el capítulo 4.

El proceso de incorporación de nanopartículas maghemita de *Lactobacillus Fermentum* CECT5716 da como resultado un suplemento de hierro (NanoPROB). Este suplemento ha sido escalado industrialmente con el objetivo de ser comercializar en un futuro cercano. Actualmente se están produciendo 20kg de polvo seco de este producto con un contenido en hierro de 295.5mg Fe/Kg bacterias liofilizadas y una viabilidad de $6.7 \cdot 10^8$ cfu/g bacteria.

Mantenimiento de las ratas

Ratas Wistar (180-200g) obtenidas del servicio animalario de la Universidad de Granada (Granada, España) se agruparon en seis grupos (n=8). Cuatro de ellos recibieron diferentes tratamientos. El grupo control no-tratado y el grupo sano también fueron incluidos como referencias. Todos los animales fueron alojados en cajas de policarbonato compacto (Makrolon), manteniéndoles una atmósfera

acondicionada de aire y con ciclos de día/noche de 12h. Tenían acceso libre a comida y agua.

Extracción de los órganos de las ratas

Las ratas fueron anestesiadas y matadas cumpliendo los protocolos de “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” como recomienda el instituto de salud nacional. Los órganos gastrointestinales (estómago, intestino delgado, intestino grueso y ciego) se extrajeron, liofilizaron y morturaron en polvo.

Análisis ICP del contenido en Fe de los distintos órganos de las ratas

El contenido en Fe en cada tejido se midió mediante ICP.

Medidas de susceptibilidad magnética ac en tejidos (ratas)

Las muestras en polvo se colocaron en cápsulas de gelatina para su caracterización magnética. Las mediciones magnéticas se realizaron en un susceptómetro Quantum Design MPMS-XL SQUID con opción AC en el Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza. Las mediciones se llevaron a cabo entre 10 y 300 K, a una frecuencia de AC de 11 Hz y con una amplitud de campo de 0,41 mT.

INSTRUMENTAL

1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

La base de la microscopía electrónica es la utilización de un haz de electrones acelerados, como fuente de luz, y su focalización sobre la superficie de la muestra mediante unas lentes condensadoras. La interacción de los electrones incidentes con la muestra produce una serie de radiaciones secundarias, que nos proporcionan información sobre su naturaleza y composición. En función del tipo de radiación secundaria utilizada, se distinguen diferentes tipos de microscopios electrónicos. Así, el Microscopio Electrónico de Transmisión utiliza los electrones transmitidos, facilitando información acerca de la estructura interna, mientras que el Microscopio Electrónico de Barrido, puede usar los electrones secundarios o los

electrones retrodispersados. El primer caso proporciona información sobre la topografía de la superficie de la muestra, mientras que el segundo, revela diferencias en la composición química por diferencias de contraste, ya que los electrones retrodispersados dependen del número atómico medio de los elementos que componen la muestra.

1.1 Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM).

Las imágenes se obtuvieron utilizando un Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución PHILIPS CM-20HR a 200 KeV. Para conseguir la máxima resolución se empleó el contraste de fase, utilizando el rayo transmitido y varios difractados. Dichas medidas se han realizado en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

1.2. Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HR-SEM).

Estas medidas se llevaron a cabo en un Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución por Emisión de Campo, FESEM ZEISS SUPRA, equipado con un sistema de microanálisis Aztec 2.1 XMax. Las imágenes de alta resolución se obtuvieron utilizando los electrones secundarios, y operando a bajo voltaje, 3 keV, y alto vacío. Dado que las muestras no son conductoras, es necesario recubrirlas de una fina capa de carbono, evitando así la acumulación de cargas sobre la superficie. Tanto las medidas de microscopía como la preparación de muestras fueron llevadas a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

1.3. Microscopía Electrónica de Transmisión-Barrido (STEM) con Detección Anular de Electrones de Alto Ángulo en modo Campo Oscuro (HAADF).

La configuración STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) permite la formación de imágenes de barrido utilizando, para ello, los electrones transmitidos. Una de las principales ventajas de esta configuración es la posibilidad de obtener imágenes de contraste Z, donde Z

hace referencia al número atómico. La imagen de contraste Z está formada mediante la colección de electrones dispersados a alto ángulo en un detector anular de campo oscuro de alto ángulo (HAADF). Las imágenes de alta resolución adquiridas con este detector proporcionan información, de una forma directa y simple, sobre la estructura, ya que los átomos con mayor número atómico dispersarán a ángulos superiores que los átomos ligeros. Dado que la intensidad de la señal dispersada es proporcional a Z^2 , el contraste de la imagen variará en esta proporción, así, aquellas áreas de la muestra donde la concentración de elementos pesados es mayor, aparecerán en la imagen con un brillo de intensidad muy superior a aquellas otras áreas ricas en elementos ligeros.

1.4. Espectroscopia de Rayos-X de Dispersión de Energía (EDX).

El funcionamiento de este tipo de sistemas se basa en la captación de los rayos X emitidos por la muestra al ser bombardeada por un haz de electrones. Cuando el haz de electrones interacciona con un átomo de la muestra, puede existir una transferencia de energía que provoque que un electrón del átomo promocione desde un orbital interno a la banda de conducción. Otro electrón de un orbital más externo pasaría a reemplazarlo, y la diferencia de energía existente entre los dos estados se emite en forma de rayos X, siendo esta energía altamente específica para cada elemento y para cada transición. Este detector de energía dispersiva de rayos X debe estar acoplado a un microscopio electrónico, que le permita seleccionar la zona a analizar.

2. MAGNETISMO

Las medidas de susceptibilidad magnética se han realizado en un magnetómetro tipo SQUID (Quantum Design MPMS-XL-5). Este magnetómetro se utiliza para hacer medidas de susceptibilidad magnética (χ_M) en función de la temperatura y la magnetización (M) en función del campo aplicado (histéresis magnética) de muestras sobre un amplio rango de temperaturas (de 1.9 K a 400 K) y campos magnéticos (de 5 T a -5 T). Además, la gran sensibilidad del magnetómetro SQUID

permite determinar la susceptibilidad magnética con apenas unos miligramos de muestra.

Las muestras previamente necesitan ser liofilizadas para poder llevar a cabo estas medidas de magnetismo. El tratamiento consiste en congelar las muestras en Nitrógeno líquido para a continuación poder liofilizarlas en un liofilizador tipo CRYODOS-50. Las muestras se liofilizan durante 24 horas a una temperatura del condensador de -50°C y bajo un vacío de 7×10^{-2} mbar. Una vez liofilizadas, las muestras se molturan y se pesan, ya que las medidas obtenidas en el SQUID las referimos a una unidad de masa (emu/g).

En esta tesis se han llevado a cabo principalmente dos tipos de medidas magnéticas:

2.1. Curvas de magnetización a campo cero (ZFC) y a campo no nulo (FC)

Los datos obtenidos de las medidas de magnetización a campo cero (zero field-cooling) y campo no nulo (field-cooling) evalúan la dependencia de la susceptibilidad magnética de los materiales con la temperatura (figura 1). Esta medida se utiliza normalmente para determinar la llamada temperatura de bloqueo (T_B). Las medidas de magnetización ZFC-FC son llevadas a cabo de la siguiente manera:

Para la curva ZFC la muestra primero se enfría en ausencia de campo magnético externo desde temperatura ambiente hasta una temperatura baja normalmente 2 K. Entonces se aplica un campo magnético pequeño y la magnetización en función de la temperatura se mide durante el proceso de calentamiento hasta temperatura ambiente.

La curva FC se obtiene midiendo la magnetización cuando la muestra se enfría en el mismo campo magnético antes aplicado para la ZFC.

En las medidas FC los dipolos están alineados a temperatura ambiente y son enfriados en este estado. Posteriormente, cuando se hace subir la temperatura, ésta proporciona la energía térmica necesaria para que los momentos magnéticos vuelvan a orientarse al azar dando como resultado una disminución de la magnetización.

En las medidas ZFC los dipolos magnéticos de la muestra están ordenados al azar a temperatura ambiente y permanecen así después del enfriamiento. A baja temperatura los dipolos bloqueados al azar no tienen energía térmica suficiente para rotar pero cuando se incrementa la temperatura los dipolos magnéticos se van orientando en dirección al campo aplicado resultando en un incremento del momento magnético y por tanto en una magnetización no nula. El valor de la magnetización aumenta con el aumento de la temperatura hasta alcanzar una temperatura a partir de la cual la energía térmica es suficiente para provocar la rotación continua de los dipolos magnéticos y por lo tanto su desmagnetización. Podemos decir que hay dos zonas bien diferenciadas en la curva de magnetización ZFC. La temperatura que corresponde al punto más alto de la curva ZFC es la temperatura de bloqueo T_B y depende del volumen de la partícula, su anisotropía y su orientación con respecto al campo aplicado. Por debajo de ésta no hay energía térmica suficiente para que los dipolos magnéticos se orienten al azar y el material se comporta como ferromagnético o ferrimagnético. Por encima de ella sí hay suficiente energía térmica, los dipolos se orientan al azar comportándose el material como paramagnético o superparamagnético. Si esta temperatura coincide con la temperatura de separación de las curvas ZFC y FC significa que las partículas son muy homogéneas, pero si no coincide, nos indica que existe una distribución de barreras de energía que puede estar relacionado con tamaños distintos de partículas, cristalinidad, etc. Si cuando nos desplazamos hacia temperaturas más bajas la curva FC no permanece horizontal, sino que sube nos indica que no existe mucha interacción entre las partículas.

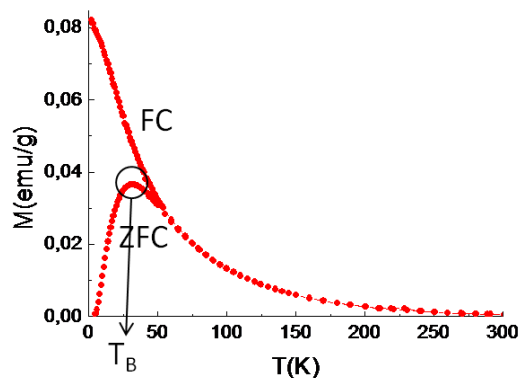


Figura 1. Ejemplo de una curva ZFC-FC.

En nuestro caso las medidas se realizaron en el rango de temperaturas comprendido entre 2-300 K y aplicando un campo constante de 50 G ó 0.005 T.

Curva de Histéresis

Las curvas de magnetización indican la variación de la magnetización (también llamada imanación o imantación) cuando se aplica un campo magnético (figura 2). Se basan en métodos inductivos, concretamente en la medida de la tensión inducida en un sistema de bobinas detectoras cuando varía el flujo magnético que la atraviesa según la ley de Faraday.

Los parámetros magnéticos que podemos determinar a partir de estos ciclos son:

- La magnetización a saturación (M_s), que es la magnetización de un material cuando todos sus momentos magnéticos bipolares están alineados a lo largo del campo magnético aplicado.
- La magnetización remanente (M_R), que es la parte de la inducción magnética que queda en el núcleo cuando el campo que realizó dicha inducción es nulo, es decir, la magnetización de la muestra a campo magnético cero después de que haya llegado a la M_s .
- La coercitividad magnética (H_C), que es la fuerza del campo magnético necesaria para eliminar la magnetización remanente del material.

La magnetización de saturación es una propiedad intrínseca que depende del tipo de material, mientras que la magnetización remanente, la coercitividad y la susceptibilidad magnética son propiedades extrínsecas, que dependen del campo y de la preparación de la muestra y varían enormemente con el tamaño y la forma de las partículas, la rugosidad superficial, porosidad, cristalinidad, presencia de impurezas, exceso de agua, etc.

Las curvas de magnetización están originadas a partir de barreras de energías locales que surgen como consecuencia de la anisotropía intrínseca de las partículas. Esta anisotropía determinará el mecanismo a través del cual tiene lugar la saturación y posterior inversión de la magnetización, y consecuentemente, los valores de los parámetros característicos de esta curva. Cada curva caracteriza

perfectamente a cada tipo de material magnético y nos permite deducir su comportamiento.

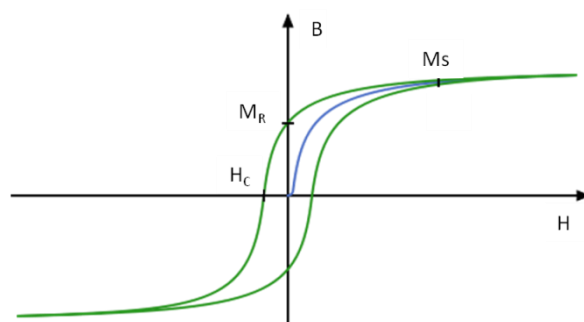


Figura 2. Curva de histéresis típica, dónde se indican H_c , H_s y M_R

En nuestro caso los ciclos de histéresis se obtienen a una temperatura constante de 2 K en presencia de un campo magnético variante desde +5 T a -5 T.

2.2. Medidas de susceptibilidad magnética AC

La susceptibilidad magnética se define como la respuesta de un material a un campo magnético. ($M=\chi H$). En las medidas de susceptibilidad magnética AC, se aplica un campo alterno a la muestra y se mide el momento resultante. Puesto que el momento inducido es dependiente del tiempo, las medidas de AC pueden cuantificar dos parámetros: la magnitud de la susceptibilidad y el cambio de fase. De aquí que la susceptibilidad se pueda describir como combinación de dos componentes una real (en fase) (χ') y otra componente fuera de fase o imaginaria (χ'').

Las muestras en polvo se colocaron en cápsulas de gelatina para su caracterización magnética. Las mediciones magnéticas para las muestras NanoProb se realizaron en un susceptómetro Quantum Design MPMS-5S SQUID con opción AC (Universidad de Zaragoza). Las mediciones se llevaron a cabo entre 2 y 300 K, a una frecuencia de AC de 11 Hz y con una amplitud de campo de 0,41 mT.

Las medidas magnéticas para el estudio de la evolución del magnetismo con el crecimiento bacteriano se llevaron a cabo en un susceptómetro Quantum Design (MPMS-XL). Las medidas se realizaron entre 5 y 300 K a 5

frecuencias AC: 0.1, 1, 10, 100 y 1000 Hz y con una amplitud de campo de 0,41 mT.

3. RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN (MRI)

La imagen de resonancia magnética (MRI) es una técnica de imagen usada principalmente en estudios médicos para obtener imágenes de alta calidad de los órganos internos del cuerpo humano. La técnica de MRI se basa en los principios básicos de la resonancia magnética nuclear (NMR), una técnica espectroscópica usada para obtener información química y física de las moléculas a nivel microscópico.

En la breve historia de dicha técnica hay que mencionar a Felix Bloch y Edward Purcell, quienes obtuvieron el Premio Nobel en 1952, por el descubrimiento del fenómeno de la resonancia magnética en 1946. Desde el año 1950 hasta el año 1970, la NMR se usó en el análisis molecular de propiedades tanto físicas como químicas.

En 1971 Raymond Damadian demostró que los tiempos de relajación en tejidos sanos y tumores eran diferentes, lo que motivó a los científicos a considerar la resonancia magnética para detección de tejidos tumorales. En 1973 Hounsfield introdujo la técnica de tomografía basada en rayos X (CT). En 1975 Richard Ernst propuso el tratamiento de la imagen obtenida por resonancia magnética mediante el uso de la transformada de Fourier. Esta técnica es la base de los principios usados en la MRI actual. En 1991, Richard Ernst obtuvo el Premio Nobel en química por dicho descubrimiento. Posteriormente se ha ido mejorando la técnica para disminuir los tiempos de adquisición en la imagen hasta conseguir la obtención de imágenes a tiempo real.

La resonancia magnética (MRI) se encuentra, por tanto, entre las mejores metodologías no invasivas disponibles en la actualidad en la medicina clínica para evaluar la anatomía y la función de los tejidos. Sus principales ventajas son que permite la adquisición rápida de imágenes in vivo y, en condiciones específicas, es posible obtener la resolución de imágenes a nivel de la célula. Esta técnica se basa en el balance entre el momento magnético extremadamente pequeño en un protón (^1H), y el altísimo número de protones presentes en los tejidos biológicos, lo que conduce a un efecto medible en la presencia de grandes campos magnéticos.

Los núcleos de hidrógeno (protones ^1H), llamados spines nucleares, tienen propiedades magnéticas. Se comportan como pequeños imanes giratorios, representados por vectores. La suma de todos los pequeños campos magnéticos de cada spin se llama magnetización neta o magnetización macroscópica. Normalmente, la dirección de estos vectores se distribuye al azar. Así, la suma de todos los spines da una magnetización neta nula. Dentro de un gran campo magnético externo (llamado B_0), los espines nucleares se alinean con el campo externo. Algunos de los espines se alinean con el campo (en paralelo) y otros se alinean en contra del campo (anti-paralelo). El vector magnético de los protones girando se pueden desglosar en dos componentes ortogonales: longitudinal o componente Z, y un componente transversal, situada en el plano XY. Dentro del campo magnético B_0 , hay más spines alineados con el campo (en paralelo - estado de baja energía) que spines alineados contra el campo (anti-paralelo - estado de alta energía). Debido a este ligero exceso de spines en paralelo, la magnetización neta (magnetización macroscópica) tiene un componente longitudinal (a lo largo del eje Z) alineados con B_0 .

La precesión corresponde a la rotación del componente transversal sobre el eje longitudinal (la precesión es el cambio de la dirección del eje alrededor del objeto que gira. El ejemplo típico es el movimiento que realiza una peonza, o trompo ...). Se define la ecuación de Larmor como el movimiento de precesión de los protones cuando son expuestos a un campo magnético externo B_0 :

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

dónde γ es el radio giromagnético, que para los protones ^1H $\gamma = 2,67 \times 10^8 \text{ rad} / \text{s}^{-1} \text{ T}^{-1}$, por lo que en un campo $B_0 = 1 \text{ T}$ la frecuencia de precesión de Larmor corresponde a un campo de radio frecuencia con $\omega_0/2\pi = 42,57 \text{ MHz}$.

La MRI se basa en la capacidad de los núcleos de hidrógeno del agua de alinearse con un movimiento de precesión alrededor de un campo magnético estático aplicado B_0 . La frecuencia de precesión (frecuencia de Larmor) de los protones es proporcional a la intensidad de la fuerza del campo. La precesión de los núcleos de hidrógeno puede ser perturbado por pulsos de radiofrecuencia.

Un pulso de radiofrecuencia que coincide con la frecuencia de precesión afecta el equilibrio de spin: se produce un intercambio de energía y modifica la trayectoria

del spin y los hace entrar en coherencia de fase a los protones (spines), por lo que decrece la magnetización longitudinal y aparece una magnetización transversal. El ángulo de inclinación depende de la intensidad, forma de onda y la duración de pulso de radiofrecuencia. El vector de la magnetización transversal está en continuo movimiento con una frecuencia de precesión y emite una corriente eléctrica que es la señal de MRI.

La relajación es el proceso físico dinámico en el que el sistema de spines vuelve al equilibrio (a su estado alineado original) lo que puede ser explotado para dar una imagen. Cuando se apaga el pulso de radiofrecuencia los protones dejan de estar en coherencia de fase y vuelven al estado de menor energía, es decir, decrece la magnetización transversal y se recupera la magnetización longitudinal. Por tanto la relajación puede desglosarse en:

Recuperación de la magnetización longitudinal, en consonancia con B_0 , siguiendo una curva exponencial caracterizada por constantes de tiempo T_1 .

Descomposición de la magnetización transversal, debido a los spines fuera de fase, de acuerdo a una curva exponencial caracterizada por constantes de tiempo T_2 .

La relajación de ambas magnetizaciones T_1 y T_2 dependen del entorno químico y magnético en el que se encuentre el protón.

La magnetización longitudinal se debe a una diferencia en el número de spines en estado paralelo y en estado anti-paralelo. La relajación longitudinal T_1 refleja una pérdida de energía, en forma de calor, desde el sistema de spines a la red que los rodea (relajación spin-red), como los spines pasan de un estado de alta energía a un estado de baja energía, la energía de radiofrecuencia se libera de nuevo en la red que la rodea. La relajación en el plano xy es relativamente rápida, y está impulsada por la pérdida de coherencia de fase de los protones en precesión debido a sus interacciones magnéticas entre sí y con otros momentos fluctuantes en el tejido.

La recuperación de la magnetización longitudinal sigue una curva exponencial. La tasa de recuperación se caracteriza por el tiempo tejido-específico constante T_1 . Después de tiempo T_1 , la magnetización longitudinal ha regresado al 63% de su valor final. Con una fuerza de 1,5 T del campo, los valores de T_1 son alrededor de 200 a 3000 ms. Los valores de T_1 son mayores, a mayor fuerza de campo.

La magnetización transversal se debe a los spines que están en coherencia de fase. La relajación transversal T2 resulta de spines fuera de fase. Como los spines se mueven juntos, sus campos magnéticos interactúan (interacción spin-spin), modificando ligeramente su tasa de precesión. Estas interacciones son temporales y aleatorias. Por lo tanto, la relajación spin-spin causa una pérdida acumulada en la fase que resulta en el descenso de la magnetización transversal.

La decadencia de la magnetización transversal está descrita por una curva exponencial, caracterizado por la constante de tiempo T2. Después de tiempo T2, la magnetización transversal ha perdido el 63% de su valor original. T2 es tejido-específico y siempre es inferior a T1. La relajación transversal es más rápida que la relajación longitudinal. Los valores de T2 no están relacionados con la intensidad de campo.

El contraste viene de las diferencias locales que existen en la cinética de relajación a lo largo de los planos longitudinal (tiempo de relajación spin-red T1) y transversal (tiempo de relajación spin-spin T2) del campo magnético principal aplicado a la muestra. En base a esto, el contraste endógeno depende de la naturaleza química y física de los tejidos y, a menudo surge de la variación local en la densidad de protones (la concentración de agua). Cada tipo de protón da una intensidad diferente (un contraste diferente). El tratamiento mediante un software apropiado de los diferentes contraste de los diferentes tipos de protones permite la construcción de un imagen de la zona biológica que sirva para un análisis morfológico y anatómico.

Aunque el contraste inherente de los tejidos puede ser manipulado en MRI de manera mucho más flexible que en otras técnicas de imagen, en muchos casos llevar a cabo un diagnóstico en base a las imágenes requiere el uso de agentes de contrastes. En general, la manipulación del contraste en resonancia magnética aplicando agentes de contraste es usada cuando no se puede cambiar el contraste inherente del tejido y el uso de estas sustancias exógenas o agentes de contraste que alteran la intensidad de la señal para acortar los tiempos de relajación de los núcleos de hidrógeno de los tejidos es esencial para mejorar la sensibilidad y la especificidad de MRI. Los agentes de contraste se pueden dividir en agentes positivos, porque acortan T1, lo que hace que a nivel local mejoren la señal (puntos

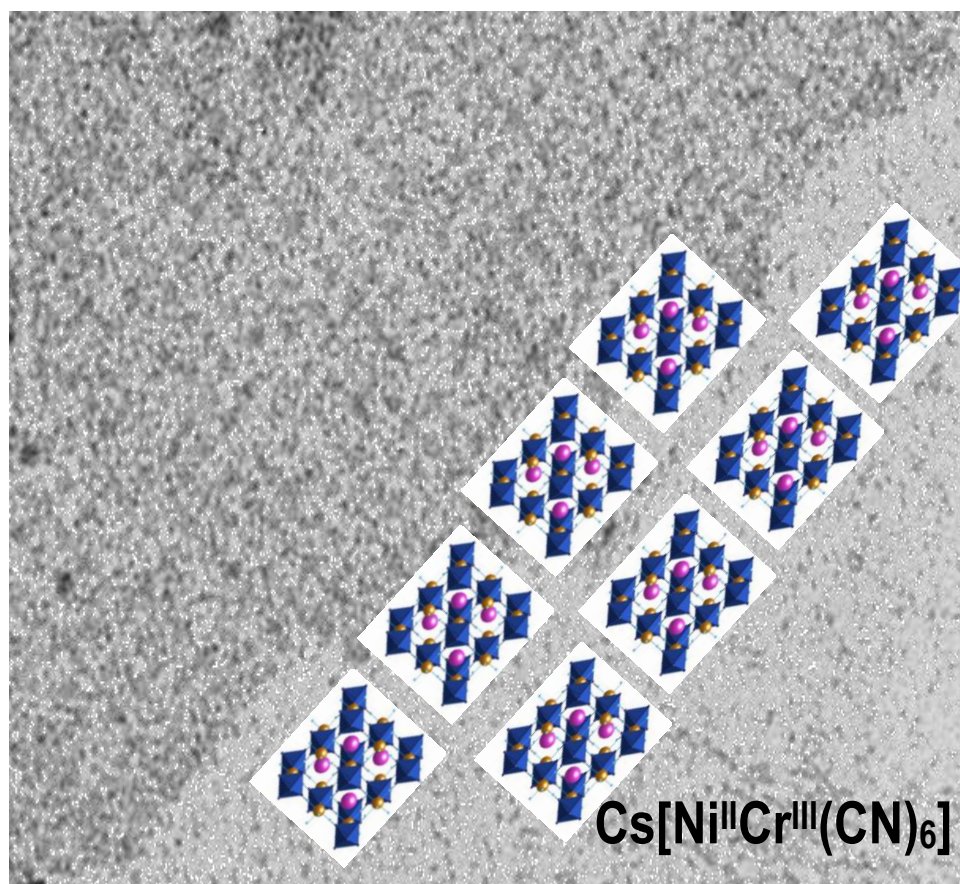
brillantes) y como agentes negativos si acortan T2, ya que éstos reducen la señal total o parcialmente (puntos negros).

Durante los últimos 20 años, se ha desarrollado de manera significativa la química de los agentes de contraste para su uso en vivo. Han recibido particular atención los metaloquelatos paramagnéticos, principalmente derivados de gadolinio, que por lo general se comportan como agentes de contraste T1, ya que causan aumento del contraste positivo y proporcionan imágenes más brillantes en el sitio en el que se acumulan. Los protones de las moléculas de H₂O "próximas" al compuesto paramagnético sienten un efecto de relajación de la magnetización longitudinal mayor que para los restantes protones del medio. El intercambio continuo de las moléculas de H₂O a la esfera de coordinación del Gd (esfera interna) y de sus proximidades (esfera externa) traslada el efecto paramagnético del agente de contraste y genera una señal diferenciada en la zona de influencia (zona donde se acumula el agente de contraste).

Por otra parte, los sistemas de partículas a base de óxido de hierro superparamagnético (SPIO o USPIO) han emergido como agentes de contraste T2, ya que su principal (aunque no único) efecto es producto de la perturbación magnética que crea en su entorno cuando se aplica un campo magnético externo. Esta heterogeneidad magnética se traduce en un acortamiento de T2 y por ende en un mayor contraste con respecto a la zona de no influencia. Mayor Magnetización, menor T2 y más contraste.

References

1. Brinzei D, Catala L, Louvain N, Rogez G, Stephan O, Gloter A, et al. *J Mater Chem.* 2006;16(26):2593.
2. Massart R. *Trans Magn [Internet].* 1981 Mar; 17(2):1247-8.



**Chapter 3. Nanopatterning of Magnetic
CrNi Prussian Blue Nanoparticles Using a
Bacterial S-layer as Biotemplate**

The capability to deposit, in a controlled manner, magnetic nanoparticles on an adequate surface is a prerequisite to exploring the potential applications of magnetic devices relevant to the emerging field of molecular electronics. Presently, developments in colloidal synthesis permit a fine control of morphological characteristics of magnetic nanoparticles such as size and shape but much effort is required to their ordered deposition, which would open the possibility to tailor new devices.

In this field, most common magnetic nanoparticles checked consist of ferromagnetic zero-valent metal nanoparticles.¹⁻² However, other kind of magnetic nanoparticles, as those of molecule-based magnets, have also been deposited onto different substrates.³⁻⁷ The family of Mn_{12} clusters and Prussian blue derivatives are two genuine examples. In particular, the interest in magnetic Prussian blue nanoparticles lies on the extraordinary variety of their additional physical properties (electrochromism, photomagnetism, piezomagnetism, etc),⁸⁻¹⁴ which opens prospect for making original functional nanomaterials. Likewise, an additional advantage of molecular magnets consists of their solubility in common solvents, which facilitates the positioning of nanoparticles onto selective portions of the substrate. Along these lines, several chemical and physical approaches for controlled deposition of this kind of nanoparticles have been investigated, including microcontact printing,⁷ photolithography,¹² self-assembly by water-droplet templates,¹⁶ and local oxidation nanolithography.^{17,18} Nevertheless, development of methodologies based on the ordered deposition of nanoparticles on solid substrates directly from solution is highly desirable.

In this sense, an alternative and elegant approach to the more conventional surface methodologies to integrate magnetic nanoparticles into patterned devices is based on the use of microorganisms as bioplatfroms for arranging (in some cases producing and arranging) nanoparticles.¹⁹⁻²¹ Here, we present an approach based on the bacterial cell surface layers (S-layers) that leads, using a simple and fast process, to pattern nanoparticles of a Prussian blue derivative over large areas of the S-layer substrate. The pattern is fabricated by molding a water suspension of $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ nanoparticles on a structured S-layer matrix.

S-layers represent the outermost cell envelope component in a broad range of bacteria and archaea. They are monomolecular arrays composed of a single protein or glycoprotein. They are highly porous protein mesh works with unit cell sizes in the range of 3 to 30 nm, and pore sizes of 2 to 8 nm. S-layer proteins exhibit the capability to form free-floating self-assembly products in solution with different patterns (e.g. flat sheets, tubes, vesicles), which makes it very attractive to be used as a template for the fabrication of different

nanopatterning.²² The highly ordered crystalline S-layers of some bacteria have been used as templates for direct precipitation of metals from solution or by binding preformed metallic nanoparticles.²²⁻²⁸ However, no extension of this procedure has been applied to molecule-based nanoparticles.

In the present study, nanoparticles of the ferromagnetic Prussian blue derivative $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ were deposited on S-layer protein of *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 (formerly *Bacillus sphaericus* JG-A12) and were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM), IR absorption spectroscopy and SQUID techniques. It has been previously reported that S-layer of *L. sphaericus* JG-A12 binds selectively and reversibly metals from heavy metal-contaminated uranium wastewaters.²⁹ Likewise, zero-valent metal nanoparticles (Pd, Au, etc) with size ranging 1-5 nm have been deposited on this S-layer.³⁰ The use of the predefined nanoporous pattern of S-layer precludes uncontrolled aggregation of the nanoparticles and keeps their structural and magnetic integrity. This preliminary result is encouraging and opens the possibility to pattern a big amount of coordination nanoparticles, especially molecular magnets.

Chemical agents are frequently used during the synthetic process to control the growth of the particles to preclude their aggregation and ensure their dispersion in different solvents.

Mallah et al have recently shown that such stabilization can be achieved in some cases, as in the $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ network, without the use of coating agents, thus leading to negative monodisperse particles with average size of 6 nm.^{31,32}

The inner surface charge of S-layers can be negative or positive, depending on the equity or excess of exposed carboxylic acid or amino groups. Working at acid pH, the protonation of amino groups is favorable and allow the interaction with negatively charged nanoparticles. Although there is no definitive proof of the nature of the bond between S-layers and nanoparticles, in principle, this interaction may be purely electrostatic, by hydrogen bonding or both. In this sense, the negatively charged $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ nanoparticles could be deposited by electrostatic interaction with positive NH_3^+ terminal groups at the S-layer and/or by hydrogen bonds since the surface of the $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ particles have N atoms belonging to the peripheral $Cr(CN)_6^{3-}$ fragment. Therefore, the choice of $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ nanoparticles to be pattern onto a S-layer seemed appropriate.

The production of the S-layer CrNi nanoparticles was carried out in a single step procedure, by incubation of S-layer of *L. sphaericus* JG-A12 with a water suspension of nanoparticles of the ferromagnetic complex $Cs_xNi[Cr(CN)_6]$ with an average size of 6 nm for 24 hours at room temperature. Dynamic light scattering (DLS) measurements

confirmed that no aggregations of particles took place in these conditions, showing the existence of a single population size centered on ~ 6 nm. The mixture was centrifugated and resuspended several times until the supernatant solution contained negligible concentration of Ni and Cr (see Experimental). The resulting powder was then dried and isolated.

Infrared spectroscopy on powder showed two asymmetric vibrations, one intense at 2172 cm^{-1} and a low intensity shoulder at 2130 cm^{-1} (Figure 1) assigned to bridging and non bridging cyanides located in the core and at the particles surface, respectively.^{31,34}

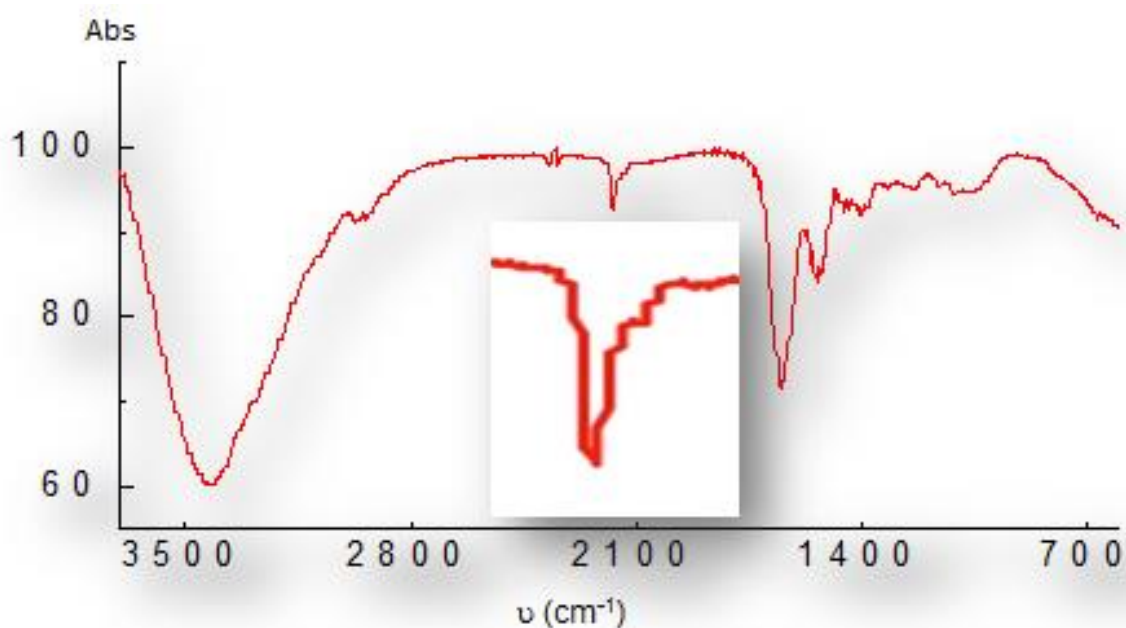


Figure 1. IR powder spectrum of S-layer CrNi, showing the typical bridging cyanide bands (inset).

Transmission Electron Microscopy (TEM) images of the deposited CrNi nanoparticles onto the S-layer are shown in Figure 2. Metallic cores were generally well-defined, showing irregular spherical-like topologies with heterogeneous size (average size of 6.0 nm, $\sigma = 1.4$ after measuring 50 nanoparticles). Energy-dispersive X-ray spectra (EDX) done on 50×50 nm windows resulted homogeneous over the entire S-layer and confirmed the presence of Cr, Ni and Cs (Figure 2b).

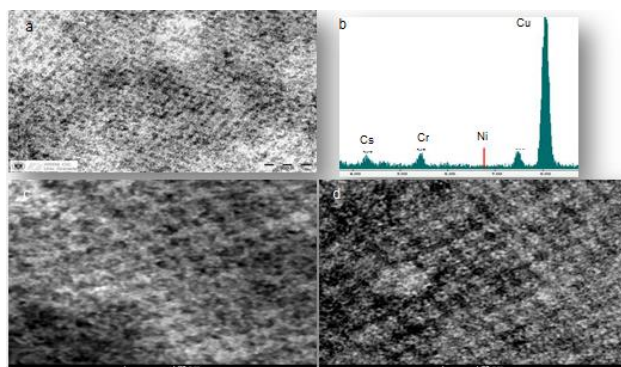


Figure 2. a) TEM micrograph of the CrNi-S-layer revealing a square ($p4$) symmetry pattern of CrNi nanoparticles on the S-layer. It is noticeable that the square lattice structure of the S-layer is visible without the use of contrast, with the electron-dense CrNi nanoparticles themselves providing contrast. b) EDX spectrum. Cu peak is due to the sample grid. c) High Resolution TEM micrograph. d) HRTEM micrograph of a stained sample.

TEM image confirms that deposition of CrNi nanoparticles takes place onto the S-layer pores forming a dense carpet of nanoparticles following a square lattice ($p4$) pattern, with a center-to-center spacing of the morphological units of 12 nm, which are typical for the S-layer of *L. sphaericus* (Figure 3). The patterning of CrNi Prussian blue nanoparticles is therefore controlled by the predefined pattern of the S-layer, which serves as a template for their deposition.

All attempts to obtain good AFM images of the S-layer after nanoparticle deposition were unsuccessful. The profile of the S-layer was very irregular, probably due to a heterogeneous filling of its porous network.

Magnetic properties of the deposited nanoparticles were studied using a SQUID magnetometer. The magnetic behavior reveals the expected superparamagnetic behavior, with a blocking temperature (T_B) of around 9 K. Field-cooled (FC) and zero-field-cooled (ZFC) magnetization measurements on the as-prepared CrNi-S-layer sample were carried out within an applied field of 50 G, and a signal of very good quality was obtained. As can be seen in Figure 4 the two curves diverge below $T = 14$ K and the maximum of the ZFC is observed at 9 K. This blocking temperature is lower, as expected, than those found for bulk material (Curie temperature of 70K)^{33,34} and for nanoparticles with a higher average size of 9 nm ($T_B = 12$ K)⁹ and it is similar to that observed for the same nanoparticles (average size 6 nm) grafted on a silicon wafer.⁶ Otherwise T_B of NiCr-S-layer is higher than that of diluted

nanoparticles of the same size ($T_B = 4K$),^{3,35} which might indicate the existence of dipolar interaction among magnetic NiCr nanoparticles once deposited in the S-layer.

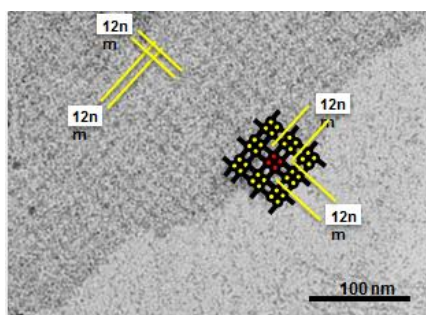


Figure 3. Nanopatterning of CrNi nanoparticles onto the S-layer protein *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. Inserted square $p4$ cell units into a TEM micrograph allows visualizing how the pattern of CrNi deposition matches with that of the cubic $p4$ S-layer of *L. sphaericus*.

As a consequence of the superparamagnetic behavior of deposited CrNi nanoparticles, a hysteresis loop of magnetization appears below T_B . At temperatures above 9K no hysteresis is observed. In contrast, a clear hysteresis loop of magnetization is observed at 2K with a coercive field of 82.5 G (inset Figure 4).

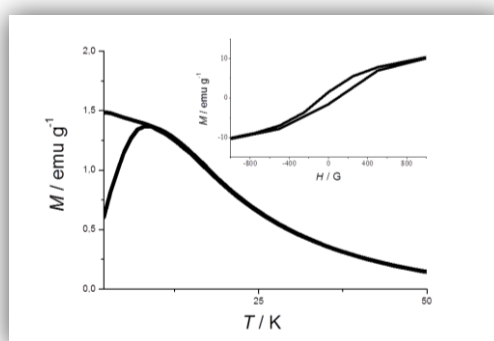


Figure 4. Thermal dependence of the ZFC and FC susceptibility with an applied field of 50G of powder CrNi-S-layer. Inset: Hysteresis loop of magnetization at 2K.

Another evidence of the superparamagnetic behavior of the deposited CrNi nanoparticles is given by the ac susceptibility measurements. Fig. 5 displays the

temperature dependence of the in-phase (χ') and out-of-phase (χ'') ac susceptibility. The data of both components exhibit a maximum in the temperature and a shift of this maximum towards higher temperatures at increasing frequencies. For an assembly of isolated single domain particles the relaxation time of magnetization (τ_0) is expected to follow the Arrhenius law $\tau_0 = \tau_0 \exp(E_a/kT)$. We have found a linear dependence of $\ln(\tau)$ vs. $1/T_m$ (T_m = temperature of the maximum of the χ'' peak). From the fitting to the Arrhenius equation, a value of $\tau_0 = 3 \cdot 10^{-15}$ s was calculated. This value is sensibly lower than that expected for isolated single magnetic domain nanoparticles (10^{-9} - 10^{-13} s). This value is lower than that expected for isolated magnetic single-domain nanoparticles (10^{-9} - 10^{-13} s). In addition to the determination of τ_0 , the Mydosh parameter Φ can be calculated, where $\Phi = (T_{\max} - T_{\min}) / T_{\max} (\log v_{\max} - \log v_{\min})$ with T_{\max} and T_{\min} being the temperatures of the maxima of the $\chi'' = f(T)$ curves for the two extreme applied frequencies, v_{\max} and v_{\min} respectively. For non-interacting magnetic single-domain nanoparticles a Φ value higher than 0.1 is expected. For our system a Φ value of 0.07 is obtained, suggesting strongly interacting single-domain nanoparticles or disordered systems (spin glass behavior).³⁶

The possible reason why τ_0 is so low is still unclear. In principle, lower values for τ_0 are found for strongly interacting single domain particles or disordered systems. In this sense, although the existence of interparticle dipolar interactions, despite the dilution of these nanoparticles in the S-layer, can not be ruled out, an average distance of 12 nm between nanoparticles (Figure 3) seems too large to justify the low value of τ_0 . It is more reasonable to consider the existence of some aggregation of nanoparticles at the porous of the S-layer since more than one nanoparticle of 6 nm could be randomly deposited on a single porous of 8 nm. TEM images do not discard this possibility. The existence of some aggregation would explain the low τ_0 value as well as the increase in TB with respect to close magnetic system

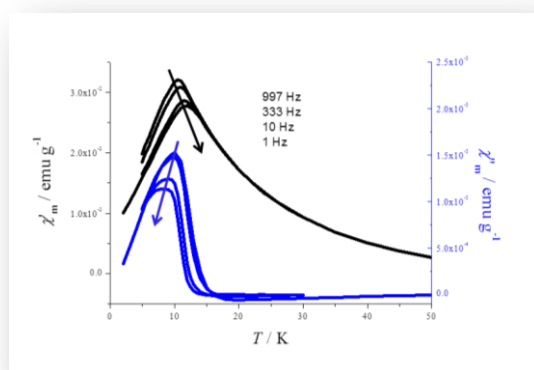


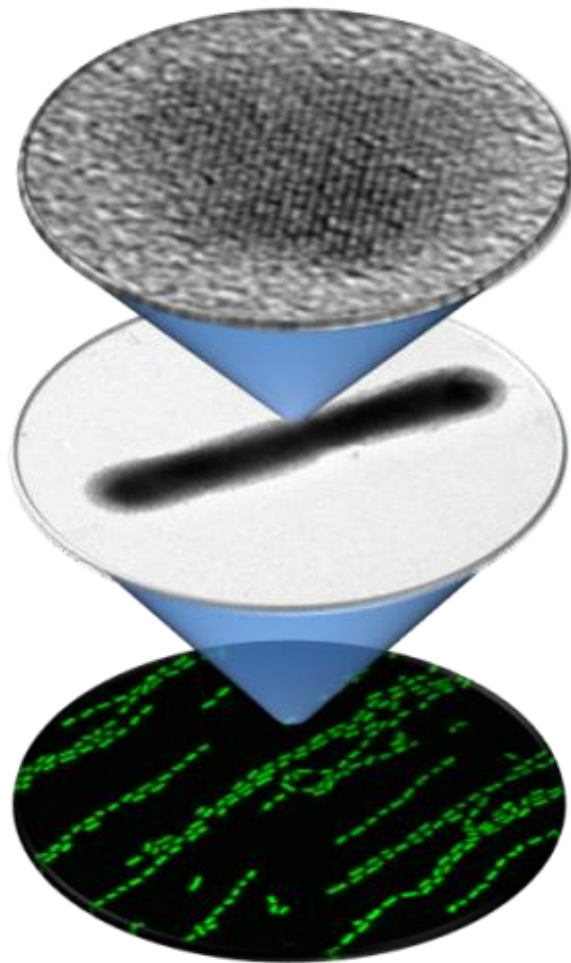
Figure 5. Thermal dependence of the in-phase χ' (black) and out-of-phase χ'' (blue) ac susceptibility of deposited CrNi nanoparticles onto the S-layer at 1, 10, 333 and 997 Hz from left to right.

In summary, we have developed a simple process that is able to fabricate patterns of nanoparticles of a molecule-based magnetic material on a bioplatfrom, as it is the S-layer. These results are encouraging to extend this approach by focusing on molecule-based magnets patterned into domains with controlled shapes and positions on a biosurface, since these domains could be used as magnetic bits as well as in the field of molecular spintronics.

References

1. Dugay, J.; Tan, R. P.; Loubat, A.; Lacroix, L.-M.; Carrey, J.; Fazzini, P. F.; Blon, T.; Mayoral, A.; Chaudret, B.; Respaud, M. *Langmuir* **2014**, *30*, 9028-9035.
2. Pena, L.; Varon, M.; Konstantinovic, Z.; Balcells, L.; Martinez, B.; Puentes, V. *J. Mat. Chem.* **2011**, *21*, 16973-16977.
3. Fleury, B.; Volatron, F.; Catala, L.; Brinzei, D.; Rivière, E.; Huc, V.; David, C.; Miserque, F.; Rogez, G.; Baraton, L.; Palacin, S.; Mallah, T. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 1898-1900.
4. Ghirri, A.; Candini, A.; Evangelisti, M.; Gazzadi, G. C.; Volatron, F.; Fleury, B.; Catala, L.; David, C.; Mallah, T.; Affronte, M. *Small* **2008**, *4*, 2240-2246.
5. Clemente-León, M.; Coronado, E.; López-Muñoz, A.; Repetto, D.; Catala, L.; Mallah, T. *Langmuir* **2012**, *28*, 4525-4533.
6. Coronado, E.; Forment-Aliaga, A.; Pinilla-Cienfuegos, E.; Tatay, S.; Catala, L.; Plaza, J. A. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 3625-3633.
7. Cavallini, M.; Gomez-Segura, J.; Ruiz-Molina, D.; Massi, M.; Albonetti, C.; Rovira, C.; Veciana, J.; Biscarini, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 888-892.
8. Mallah, T.; Thiebaut, S.; Verdaguer, M.; Veillet, P. *Science* **1993**, *262*, 1554.
9. Entley, W. R.; Girolami, G. S. *Science* **1995**, *268*, 397. (10) Ferlay, S.; Mallah, T.; Ouahes, R.; Veillet, P.; Verdaguer, M. *Nature* **1995**, *378*, 701.
10. Sato, O.; Iyoda, T.; Fujishima, A.; Hashimoto, K. *Science* **1996**, *272*, 704.
11. Sato, Y.; Ohkoshi, S.; Arai, K.; Tozawa, M.; Hashimoto, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14590.
12. Ohkoshi, S.; Tokoro, H.; Hozumi, T.; Zhang, Y.; Hashimoto, K.; Mathoniere, C.; Bord, I.; Rombaut, G.; Verelst, M.; Moulin, C. C. D.; Villain, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 270.
13. Coronado, E.; Gimenez-Lopez, M. C.; Levchenko, G.; Romero, F. M.; Garcia-Baonza, V.; Milner, A.; Paz-Pasternak, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4580.
14. Kim, K.; Seo, M.; Means, J.; Meenakshi, V.; Teizer, W.; Zhao, H.; Dunbar, K. R. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 3872.
15. Gómez-Segura, J.; Kazakova, O.; Davies, J.; Josephs-Franks, P.; Veciana, J.; Ruiz-Molina, D. *Chem. Commun.* **2005**, 5615.
16. Martínez, R. V.; García, F.; García, R.; Coronado, E.; Forment-Aliaga, A.; Romero, F. M.; Tatay, S. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 291.
17. Martínez, R. V.; Martínez, J.; Chiesa, M.; Garcia, R.; Coronado, E.; Pinilla-Cienfuegos, E.; Tatay, S. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 588-591.
18. Bansal, V.; Bharde, A.; Ramanathan, R.; Bhargava, S. K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *179-182*, 150-168.
19. Martín, M.; Carmona, F.; Cuesta, R.; Rondón, D.; Gálvez, N.; Dominguez-Vera, J. M. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 3489-3493.
20. Carmona, F.; Martin, M.; Galvez, N.; Dominguez-Vera, J. M. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 8565-8569.
21. Badelt-Lichtblau, H.; Kainz, B.; Völlenklee, C.; Egelseer, E.-M.; Sleytr, U. B.; Pum, D.; Ilk, N. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 895-903.
22. Bergkvist, M.; Mark, S. S.; Yang, X.; Angert, E. R.; Batt, C. A. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 8241-8248.
23. Györvary, E.; Schroedter, A.; Talapin, D. V.; Weller, H.; Pum, D.; Sleytr, U. B. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2004**, *4*, 115-120.
24. Hall, S. R.; Shenton, W.; Engelhardt, H.; Mann, S. *Chem. Phys. Phys. Chem.* **2001**, *3*, 184-186.
25. Mark, S. S.; Bergkvist, M.; Yang, X.; Teixeira, L. M.; Bhatnagar, P.; Angert, E. R.; Batt, C. A. *Langmuir* **2006**, *22*, 3763-74.
26. Mark, S. S.; Bergkvist, M.; Yang, X.; Angert, E. R.; Batt, C. A. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1884-1897.
27. Dieluwweit, S.; Pum, D.; Sleytr, U. B.; Kautek, W. *Mat. Sci. and Eng. C* **2005**, *25*, 727-732.
28. Merroun, M. L.; Raff, J.; Rossberg, A.; Hennig, C.; Reich, T.; Selenska-Pobell, S. *Appl. and Environ. Micr.* **2005**, *71*, 5542-5553.
29. Merroun, M.; Rossberg, A.; Hennig, C.; Scheinost, A. C.; Selenska-Pobell, S. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 188-192.
30. Brinzei, D.; Catala, L.; Louvain, N.; Rogez, G.; Stephan, O.; Gloter, A.; Mallah, T. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2593-2599.
31. Catala, L.; Brinzei, D.; Prado, Y.; Gloter, A.; Stephan, O.; Rogez, G.; Mallah, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 183-187.

32. Manuel, E.; Evangelisti, M.; Affronte, M.; Okubo, M.; Train, C.; Verdaguer, M. *Phys. Rev. B* **2006**, *73*, 172406
33. Evangelisti, M.; Manuel, E.; Affronte, M.; Okubo, M.; Train, C.; Verdaguer, M. *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *316*, e569.
34. Prado, Y.; Lisnard, L.; Heurtaux, D.; Rogez, G.; Gloter, A.; Stéphan, O.; Dia, N.; Rivière, E.; Catala, L.; Mallah, T. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1051–1053.
35. Brinzei, L. Catala, N. Louvain, G. Rogez, O. Stéphan, A. Gloter, T. Mallah, *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, 2593-2599.



**Capítulo 2. Artificial Magnetic Bacteria: Living
Magnets at Room Temperature**

Magnetic nanoassemblies possess in most cases more efficient properties than magnetically-independent nanoparticles, due to their increased magnetic properties and stronger magnetic responses. As an example, the use of magnetic nanoassemblies instead of single nanoparticles can shorten the handling time of hyperthermia treatment because magnetic interactions can enhance their heating power.^{1,2}

Consequently, gaining control on the assembly of magnetic nanoparticles is a milestone that scientists should aim at. Interestingly, nature has provided an outstanding model to follow: biogenic magnetite of magnetic bacteria³⁻⁶. These organisms efficiently assemble single magnetic nanocrystals which are utilized to passively align the bacteria with the geomagnetic field for orientation and navigation. Biogenic magnetite exhibits fascinating magnetic properties that could be suitable for biotechnological⁷⁻¹⁰ however they are recalcitrant to large-scale production and they are unprecedented in their use for human oral administration.

An alternative for the assembly of magnetic nanomaterials might be to replicate natural magnetic bacteria. Towards this end, efforts have been made to create structurally-mimetic magnetic bacteria by synthesizing magnetosomes in cells, either directed by the *magA* gene or by transfecting cells to express the *magA* protein^{11,12}. We report a different approach. Whilst our focus was inspired by magnetotactic bacteria, we attempted to mimic their functionality rather than their structure. We used the non-magnetic probiotic bacteria *Lactobacillus fermentum* or *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacteria breve* as bioplatfroms to densely arrange maghemite nanoparticles on their external surfaces, thus obtaining what we call artificial magnetic bacteria. These probiotic bacteria, in contrast to native magnetic bacteria, are well known to have a positive effect on the maintenance of human health since they constitute an important part of natural microbiota.

In the artificial magnetic bacteria, dipole-dipole interactions occur between nanoparticles due to their close proximity, so that maghemite nanoparticles spontaneously assemble with the application of an external magnetic field and induce the probiotic bacteria to behave as magnets at room temperature. The use of an external magnetic field is in fact one of the most common routes to achieve ordered magnetic structures¹³⁻¹⁷. However, the ordered nanostructures thus

obtained are often limited to short-range chains which are usually prone to uncontrolled aggregation, with subsequent negative effects, for instance for biomedical applications. Our system of artificial magnetic bacteria overcomes these limitations: the presence of the bacteria as a platform facilitates the fixation of chains and the whole magnetic system remains in solution.

Results and Discussion

Our strategy to graft maghemite nanoparticles on Gram positive probiotics involves a two-step procedure in which, after halting the proliferation of probiotic bacteria, nude maghemite nanoparticles are deposited onto the bacteria biofilm. The adsorption of magnetic nanoparticles takes place within the biofilm, which is an extra-bacterial conglomeration of products, composed mainly of polysaccharides, that surrounds the bacterial wall. In fact, when the bacterial biofilm was removed following a standard protocol, no assembly of particles surrounding the probiotic bacteria was observed, but a random aggregation at the extra-bacterial space was found (Figure S1). Moreover, as the biofilms are polyanionic due to the presence of either uronic acids or ketal-linked pyruvates, the nude particles are required to be positively charged^{18,19}. Thus, while positive maghemite nanoparticles attach onto the external bacteria surface, the negative ones show no affinity for deposition (Figure S2). We have succeeded in the preparation of a batch of artificial magnetic bacteria with iron contents ranging from 0.1 to 25 mg of iron per gram of bacteria by controlling the ratio of the amount of attached maghemite nanoparticles in regards to the quantity of bacteria. Figure 1 shows typical transmission electron microscopy (TEM) images of samples containing these two extremes of iron content.

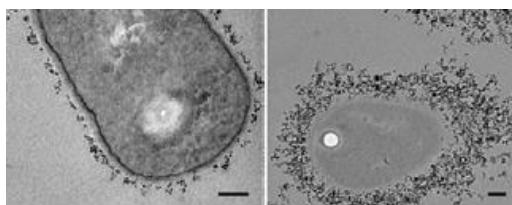


Figure 1. Typical TEM micrographs of thin epoxy resin sections of *Lactobacillus fermentum* loaded with different iron amounts. Iron contents per g of bacteria were 0.1 (left) and 25 mg (right). Scale bars are 200 nm.

The bacteria, labeled with maghemite nanoparticles, are easily redispersed in water forming a red-dark solution. The sample with the highest iron loading (25 mg of iron/g bacteria) was deeply examined, both by TEM and magnetic measurements. Large accumulations of nanoparticles were seen on the external bacterial surface in a “plum pudding” formation, where the magnetic nanoparticles are positively-charged “plums” onto a “pudding” constituted by the bacterial biofilm (Figure 2). Figure 2 b shows a typical high-resolution (HR)-TEM image of an agglomerate of nanoparticles surrounding the bacteria wall. They were well-defined, showing spherical-like topologies with heterogeneous size (average size of 10.0 nm, $\sigma = 1.2$ after measuring 100 nanoparticles). The corresponding electron diffraction pattern (Figure 2d) and measured d-spacing (Figure 2 e) were indexed according to the maghemite structure²⁰ X-ray powder diffraction (XRD) measurements of the magnetic colloid (Figure S3) also showed typical patterns for maghemite. Based on the calculations with the Debye–Scherrer’s formula the mean maghemite nanoparticle size was 10.7 nm, accordingly with the sizes measured by TEM.

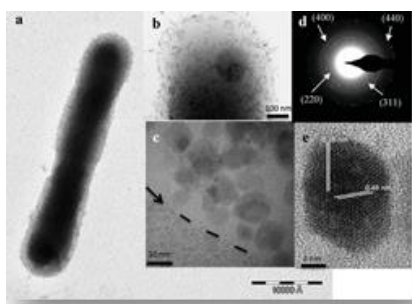


Figure 2. a) A non-contrasted TEM image of the sample containing 25 mg of iron/g of bacteria. It is noticeable that the bacterium is perfectly visible without the use of contrast, with the electron-dense maghemite nanoparticles themselves providing contrast. b) A zone at higher magnification shows the “plum pudding” structure. c) A typical HRTEM micrograph of maghemite nanoparticles surrounding the bacterial wall (marked with an arrow in the figure). d) An electronic diffraction pattern of a representative particle. e) HRTEM image of a single maghemite particle with labeled d-spacing values.

The wide shell of particles surrounding the bacteria wall was visualized using high annular dark field-scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM; Figure 3a). To confirm the presence of the iron nanoparticles around the bacteria, energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) experiments were performed, which

showed the juxtaposition of iron (in red) and the bacterial matrix. The spatial distribution of iron (Figure 3b), which was barely detectable inside the bacteria or in the inter-bacterial region, indicates clearly that the iron nanoparticles were incorporated into the external bacterial region, embedded in the biofilm.

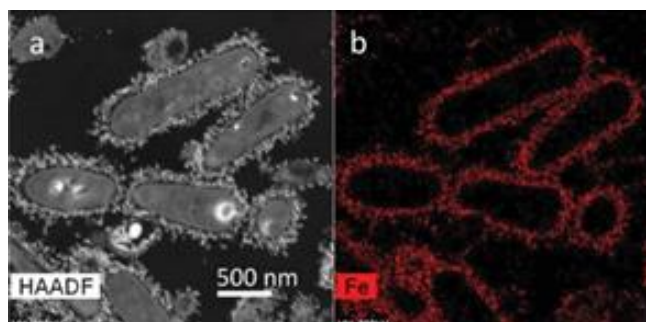


Figure 3. a) HAADF-STEM micrograph of a thin epoxy resin section showing the presence of particles at the external surface of artificial magnetic bacteria. b) EDX compositional maps of iron collected over the whole HAADF-STEM image in (a)

While individual maghemite nanoparticles of this size range (10 nm) are superparamagnetic at room temperature and do not show persistent magnetization^{21,22}, the artificial magnetic bacteria of highest iron content (25 mg of iron/g of bacteria) become magnets at room temperature. This was seen without any assistance of a microscope (Figure 4). This magnetic behavior is due to the assembly process of nano particles caused by magnetic dipole-dipole interaction between them onto single bacteria. In fact, the blocking temperature (TB) of these maghemite nanoparticles shifts from 160 K to practically room temperature for the assembly of particles occurring at the artificial magnetic bacteria with the highest iron content (Figure 4e,f). It should be noted that the broadening of the TB peak of the artificial magnetic bacteria is due to the existence of magnetic assemblies of different length and shapes, which make difficult the exact determination of TB, which can be estimated close to room temperature (Figure 4 e). Therefore, whereas the transition from the superparamagnetic to the ferromagnetic phase occurs at 160 K²² in the maghemite nanoparticles (10 nm), this transition moves to room temperature once they are assembled onto the probiotic bacteria. It means more than 100 K higher. In fact, magnetization data at 300 K showed hysteresis with coercivity of 50 Oe (Figure 4 f), although the

assemblies do not show a single-domain behavior ($M_r/M_s < 0.5$) as typically found in magnetotactic bacteria.

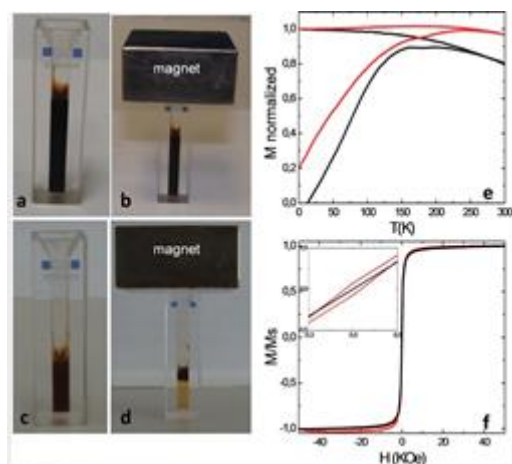


Figure 4. a) Dispersion of maghemite nanoparticles (average size of 10 nm) in aqueous media. b) The application of a magnet to the dispersion produces no effect. c) Dispersion of the highest iron-containing artificial magnetic bacteria in aqueous media. d) Separation of the artificial magnetic bacteria by application of a magnet. e) Field-cooled (FC) and zero-field-cooled (ZFC) curves of lyophilized powders of maghemite nanoparticles (black) and artificial magnetic bacteria (red). f) Hysteresis curves at 300 K of lyophilized powders of maghemite nanoparticles (black) and artificial magnetic bacteria (Red). Inset: zooming of the region at low magnetic fields.

Therefore, the artificial magnetic bacteria behave as magnets at room temperature, mimicking the key feature of natural magnetotactic bacteria, despite their structures bear no similarity. While natural magnetic bacteria usually contain internal chains of a few magnetic nanocrystals, our artificial magnetic bacteria are enriched with thousands of magnetic nanoparticles deposited at their external surface.

The artificial magnetic bacteria showed the ability to swim (Figure S4) and be guided towards a target when exposed to a directional magnetic field. The artificial magnetic bacteria were labeled with fluorescent green SYTO9 (Figure 5) to visualize the response to an external magnetic field. This fluorophore is commonly used for the labeling of live bacteria, which, incidentally, demonstrated that the bacteria remain alive after grafting the magnetic nanoparticles. As it is shown in Figure 5, on placing a permanent magnet (0.3 T) to a drop of aqueous solution of the artificial magnetic bacteria deposited in polylysine glass, magnetic nanoassembly occurred. The artificial magnetic bacteria became directionally arranged following the magnetic field lines. Note that the application of the same

external magnet to the maghemite nanoparticles in the absence of bacteria produces no effect (Figure 3 b). This fact points out the crucial role of the bacteria as platforms to assembly the magnetic nanoparticles and therefore inducing the artificial bacteria to behave as magnets at room temperature. The similarities and differences between the biogenic and our biometric magnetic bacteria should be highlighted here. Firstly, nature chose magnetite crystals of the appropriate size, usually larger than 50 nm^{3,4}. This is a wise “decision” of nature, since smaller crystals would not contribute efficiently to the bacteria magnetic moment. However, here we demonstrate that we can produce, from superparamagnetic small maghemite nanoparticles (10 nm in size), magnetic bacteria that present a collective ferromagnetic phase at room temperature, although a single domain behavior was not reached.

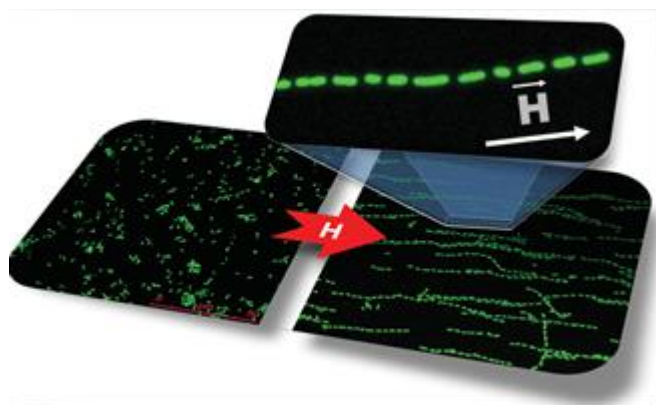


Figure 5. Arrangement on polylysine glass of the artificial magnetic bacteria labeled with the green SYTO9 after applying an external magnetic field. Inset: A single chain fragment is magnified to highlight the magnetic order of these artificial magnetic bacteria. Every fluorescent spot corresponds to an artificial magnetic bacterium.

On the other hand, in our biomimetic magnetic bacteria, a 3D cylindrical shell architecture is built from maghemite nanoparticles that implies a highly complex process of assembly. Interestingly, this assembly (Figure 4) resembles the filamentous structure of twisted strands found in some magnetotactic bacteria,²³ with the difference that while in our artificial magnetic bacteria every brick is by itself a magnetic bacterium, in biogenic magnetic bacteria, the bricks are magnetosomes. From a crude magnetic point of view, artificial magnetic bacteria differ from most native ones. Thus, whereas some native magnetic bacteria are

able to align themselves with the Earth magnetic field (50 μT), the minimal magnetic field required for arranging the artificial bacteria was 30 mT. However, it should be noted that, the functional magnetosome chains usually aggregate when extracted from native bacteria. This aggregation worsens their magnetic properties and therefore their biomedical applications. In fact, a decrease in the coercivity and reduced remanence is observed in extracted magnetosomes if compared with the whole magnetotactic bacteria²⁴. Nevertheless, and in order to advance in the pursuit of mimicking their functionality as closely as possible, we wanted to take advantage of their features. The artificial magnetic bacteria resulted to exhibit some magnetic behaviors that reminded those of the native ones: the possibility to be magnetically ordered (Figure 5) and the ability to swim in an aqueous solution when an external magnetic field was applied (Figure S4). But, at the same time, our synthetic system presented some advantages with respect to the native one. Firstly, it provided flexibility for monitoring the iron loading per bacterium.

Interestingly, in all the assayed iron content range, most bacteria remain alive and in fact, the viability does not fall below $1 \cdot 10^8$ CFU (colony forming units), which is in the range of the accepted values for labeling bacteria as a probiotic (see Experimental Section). Secondly, the probiotics are not unprecedented in human administration since their well-known healthy effect, in particular in the promotion of the immune system activity, the defense against infections and because their anti-inflammatory properties^{25,26}.

Furthermore, certain probiotics have emerged as biological vectors with tumor specificity and therapy activity²⁷ as due to their anaerobic nature of probiotic, they are known to specifically localize at the hypoxic regions of solid tumors^{28,29}.

Conclusion

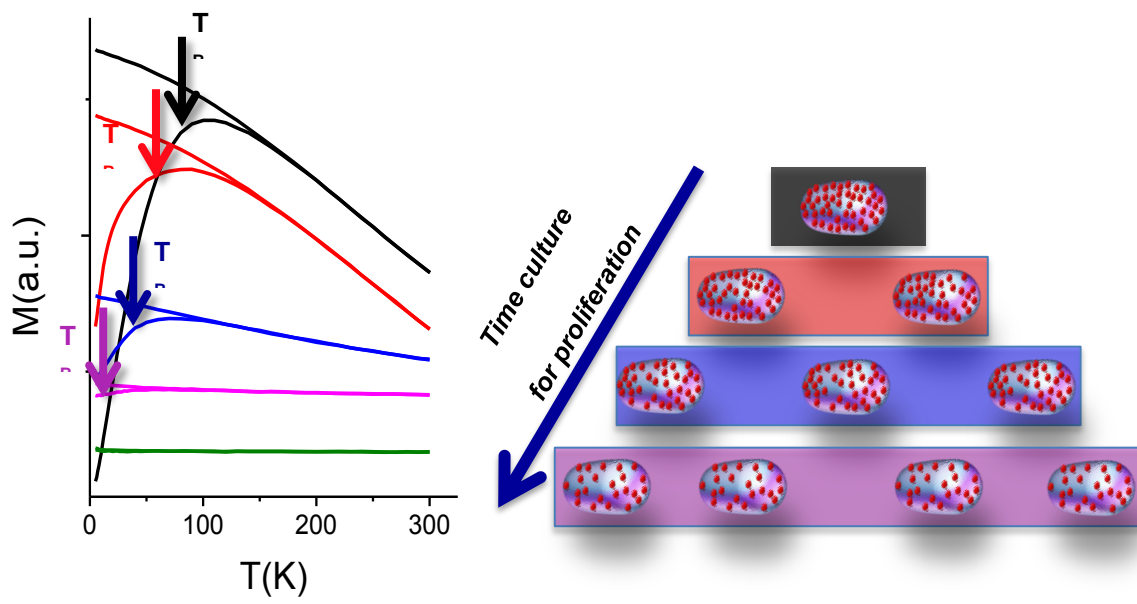
We have developed a simple and powerful methodology to create magnetic bacteria from superparamagnetic nanoparticles and probiotics. The artificial magnetic bacteria resulted to exhibit some magnetic behaviors that reminded the key features of native ones: they are alive and become magnetically ordered at room temperature, although the magnetic field required is sensible higher than

the geomagnetic one. However, this synthetic system presented some advantages with respect to the native one: flexibility for monitoring the iron loading per bacterium and good viability.

In the basis on their magnetic properties, these artificial magnetic bacteria, as it occurs for native ones, have a broad window of biomedical applications, i.e., MRI, hyperthermia, biosensors, etc.⁷⁻¹⁰. However, it must be emphasized that while native magnetic bacteria are unprecedented in their administration to humans, our artificial magnetic bacteria are made of probiotic bacteria, widely incorporated in food since they confer health benefits for humankind. In addition, our procedure involves mild chemical conditions and may be easily adapted to large-scale production. All these aspects provide additional value to this research³⁰.

References

1. M. Vallet-Regi , E. Ruiz-Hernández, 2011 , 23 , 5177 .
2. B. Mehdaoui , R. P. Tan , A. Meffre , J. Carrey , S. Lachaize , B. Chaudret , M. Respaud , *Phys. Rev. B: Cond. Matt. and Mater. Phys.* 201, 87, 174419/1.
3. Schüler, *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 654.
4. A. Bazylinski, R. B. Frankel, *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 , 2 , 217 .
5. a) Z. Tang , N. A. Kotov , *Adv. Mater.* 2005, 17, 951; b) E. Bäuerlein , *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 614.
6. D. Schüler, *Microbiology Monographs* Vol. 3 , Springer , Heidelberg 2006 .
7. D. Schüler, R. B. Frankel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 52, 464 .
8. E. Alphandéry, S. Faure, O. Seksek , F. Guyot , I. Chebbi , *ACS Nano* 2011 , 5 , 6279 .
9. C. Lang, D. Schüler, D. Faivre, *Macromol. Biosci.* 2007, 7, 144 .
10. T. Matsunaga, T. Suzuki, M. Tanaka, A. Arakaki, *Trends Biotechnol.* 2007, 25, 182.
11. X. P. Hu, A. W.-S. Chan, O. Zurkiya, Patent WO 2006119102 A1 20061109, 2006 .
12. K. Nishida, P. A. Silver, *PLoS Biol.* 2012, 10, e1001269 .
13. Z. H. Nie, A. Petukhova, E. Kumacheva , *Nat. Nanotechnol.* 2010 ,5 ,15 .
14. Y. Min, M. Akbulut , K. Kristiansen , Y. Golan , J. Israelachvili , *Nat. Materials* 2008 , 7 , 527.
15. Y. Lu, L. Dong, L.-C. Zhang, Y.-D. Su, S.-H. Yu, *Nano Today* 2012, 7,297.
16. M. D. Krebs, R. M. Erb, B. B. Yellen, B. Samanta, A. Bajaj, V. M. Rotello, E. Alsberg, *Nano Lett.* 2009, 9, 1812 .
17. N. Leventis, I. A. Elder, J. L. Gary, D. R. Rolison, *Nano Lett.* 2002, 2, 63.
18. S. C. Hayden, G. Zhao, K. Saha, R. L. Phillips, X. Li, O. Miranda, V. M. Rotello, M. A. El-Sayed, I. Schmidt-Krey, U. H. F. Bunz , *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 6920 .
19. V. Berry, R. F. Saraf, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 117, 6826 .
20. T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. B. Na, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 12798.
21. Valero, S. Tambalo, P. Marzola, M. Ortega-Muñoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Santoyo, J. D. Lopez, J. J. Delgado, J. J. Calvino, R. Cuesta, J. M. Domínguez-Vera, J. M., Santoyo-González, N. Gálvez, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 4889.
22. J. Park , E. Lee, N. M. Hwang, M. Kang, S. C. Kim, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, J.-H. Park, T. Hyeon, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 2872.
23. D. Schüler, *Biomaterialization* (Ed: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim 2000, p.109.
24. E. Alphandéry, A. T. Ngo, C. Lefèvre , I. Lisiecki , L. F. Wu , M. P. Pileni , *J. Phys. Chem.* 2008 , 112 , 1 2304 .
25. M. E. Sanders, F. Guarner, R. Guerrant, P. R. Holt, E. M. M. Quigley, R. B. Sartor, P. M. Sherman, E. A. Mayer, *Gut* 2013, 62, 787.
26. Lara-Villoslada, M. Olivares, S. Sierra, J. M. Rodríguez , J. Boza, J. Xaus, *British J. Nutrition* 2007, 98, S96 .
27. M. Cronin, D. Morrissey, S. Rajendran, S. M. El Mashad, D. van Sinderen, G. C. O'Sullivan, M. Tangney, *Mol. Therapy* 2010, 18, 1397.
28. X. Li, G. F. Fu, Y. R. Fan, W. H. Liu, X. J. Liu, J. J. Wang, X. Gen-Xing, *Cancer Gene Ther.* 2003, 10, 105.
29. T. Nakamura, T. Sasaki, M. Fujimori, K. Yazawa, Y. Kano, J. Amano, S. Taniguchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66, 2362.
30. J. M. Domínguez-Vera, N. Gálvez, M. Martín, F. Carmona, D. Rondón, M. Olivares, (Biosearch SA) Patent Cooperation Treaty (PCT), P8748EP00, 2013.



Living magnets are one of the most exciting biomaterials offered by nature. Magnetotactic bacteria are magnetite (Fe_3O_4)- or greigite (Fe_3S_4)- producing bacteria, found in both freshwater and marine environments. They inhabit the oxic–anoxic transition zone under the microaerophilic conditions required for growth^{1,3}. Magnetite crystals are actively precipitated through biological mechanisms in intracellular organelles called magnetosomes^{1,4,5}. They display narrow size distributions and are in the magnetically stable single-domain range. Magnetosomes are assembled in chains inside the cell, and provide the microorganism with a permanent magnetic dipole. Magnetosome chains have remarkable magnetic properties^{2,6}.

These living systems represent an ideal framework to address a conceptual question: how magnetism evolves with life. Recently, a time-resolved magnetic study was carried out on the biomineralization process of the magnetotactic bacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense*, pointing out the dynamic transformation from the initial antiferromagnetic ferrihydrite to a ferrimagnetic magnetite phase⁷. However, no data are available concerning the evolution of magnetic properties with bacteria growth, i. e., proliferation, degradation, etc.

We have recently reported that magnetic properties of natural magnetobacteria can be roughly reproduced following a biomimicry approach. Probiotic bacteria *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacteria breve* were used as bioplatfroms to densely arrange superparamagnetic nanoparticles on their external surfaces, thus obtaining the so-called artificial magnetic bacteria⁸. This system, unlike magnetotactic bacteria, offers extraordinary possibilities for manipulation because it can be produced on a large scale; the easy proliferation and magnetic properties can be tuned by modulating different parameters, such as the number of nanoparticles per bacteria, culture media, etc.

An important issue when labelling bacteria with maghemite nanoparticles is the dilution of the label as the bacteria replicates. In this report we evaluate how proliferation and growth can affect the magnetic properties of these artificial magnetic bacteria. We will show how dilution effects have to be considered regarding nanostructuration applications, in addition to MR Imaging.

We have prepared a batch of artificial magnetic bacteria by controlling growing cells. Once maghemite nanoparticles were attached to the bacteria surface, following the procedure previously reported, fresh medium was added, boosting cell proliferation. Samples were taken at different time points: 15 h (henceforth sample **1**), 18 h (**2**), 39 h (**3**), 49 h (**4**), and 62 h (**5**) (see experimental section). Figure 1 shows typical TEM images of these samples after being preserved in epoxy resin. We observed a nanoparticle dilution with proliferation (Figure 1 right) that may have originated, as mentioned previously, during bacteria growth, spreading the nanoparticles

among the daughter bacteria. Simultaneously, there may be new nude bacteria accounting for this dilution effect. In all cases nanoparticle-labelled bacteria exhibit no negative effects on cell viability.

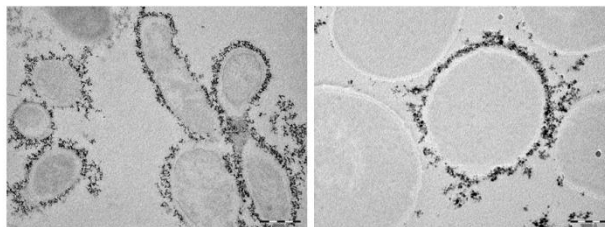


Figure 1. TEM images of thin epoxy resin sections of samples **1** (left) and **3** (right).

The magnetic properties of this batch of artificial magnetic bacteria agree with those expected for an assembly of randomly oriented superparamagnetic nanoparticles with considerable dipolar interactions⁹. Exchange interactions between particles in close proximity may also account for the magnetic properties of artificial magnetic bacteria¹⁰.

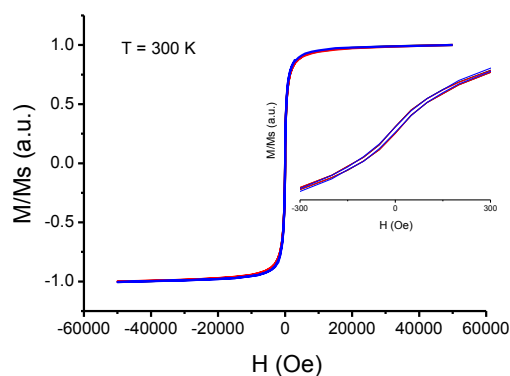


Figure 2. Hysteresis loops of samples **1** and **3** at 300 K.

Hysteresis loops were recorded at 5 K and 300 K, and the obtained magnetic values are summarized in table 1. Hystereses at 300 K (Figure 2) reach saturation at 1 T for samples 1, 2 and 3, with a low coercive field from 9 to 8 Oe, as previously reported, on increasing maghemite nanoparticle dilution due to bacterial growth (table 1).

Table 1. Variation of the reduced remanence (5K), coercive fields (5K) and blocking temperatures of samples 1 to 5.						
Samples	M_R/M_S	H_C 5 K	T_B	$(M_r/M_s)_{II}$	(M_r/M_s)	H_{cII}
1	0.22	175	90	0.39	0.42	320
2	0.2	176	76			
3	0.06	174	70			
4	0.01		105			
5	0.006		52			

Table 1. Variation of the reduced remanence (5K), coercive fields (5K) and blocking temperatures of samples 1 to 5.

Hysteresis loops at 5 K open below T_B with slightly lower coercivities, if compared to the usual maghemite nanoparticles of 10 nm¹¹. The coercive field, and the ratio M_r/M_s increases on increasing the amount of magnetic nanoparticles, as shown in Table 1. In any case the artificial magnetic bacteria do not show a single-domain behaviour ($M_r/M_s < 0.5$), as is typically found in magnetotactic bacteria. The zero field cooled and field cooled magnetization curves, measured when applying a field of 50 Oe, are shown in Figure 3. The observed irreversibility is often attributed to the characteristic blocking-unblocking process of the particle magnetic moment when thermal energy is varied.

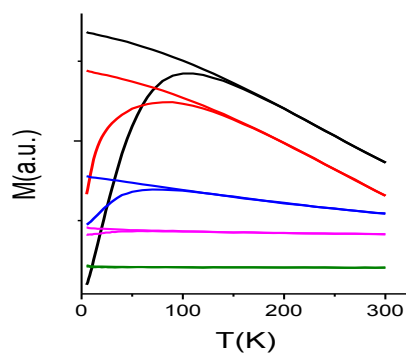


Figure 3. ZFC/FC curves fo

This characteristic temperature is called the blocking temperature T_B , below which the particle moment appears blocked, within the timescale of the experiment. All ZFC magnetization curves exhibit a maximum which is moving to lower temperatures as the bacteria proliferation time increases, showing a dilution effect.

To investigate in more detail the nature of the irreversibility observed in the ZFC-FC curve, we measured the temperature dependence of the ac susceptibility at different frequencies. Figure 4 shows imaginary χ'' parts of the ac susceptibility of samples 1 and 2. All samples showed a single maximum near the T_B , which position and amplitude are sensitive to the applied ac magnetic field frequency. The position shifts to higher temperatures with increasing frequency.

The shift is a clear evidence of superparamagnetic behaviour for these artificial magnetic bacteria. We estimated a value of χ'' maxima at *ca.* 83 K for sample 1 and 77 K for sample 2 at a frequency of 1000 Hz, in agreement with blocking temperatures found in ZFC-FC measurements.

For superparamagnetic particles, thermal energy flips the magnetization between two states by overcoming an anisotropy energy barrier. The relaxation time, τ , is given by

$$(1) \quad \tau = \tau_0 e^{\left(\frac{E_a}{K_B T} \right)}$$

Where τ_0 is a time constant that is usually of the order of 10^{-9} - 10^{-11} s for a superparamagnetic system, E_a is the effective anisotropy energy, K_B is Boltzmann's constant, and T is the blocking temperature of the particle. Taking the log of Eq. (1) gives the equation:

$$(2) \quad \ln \tau = \ln \tau_0 + \left(\frac{E_a}{K_B} \right) \left(\frac{1}{T} \right)$$

Fitting the blocking temperatures with frequencies using equation 2, we obtained τ_0 values, being 10^{-13} s for sample 1, 4.9×10^{-10} s for sample 2 and 2.3×10^{-9} s, indicating an superparamagnetic behaviour for sample 1 and 2 and a deviation from this behaviour for sample 1¹⁵.

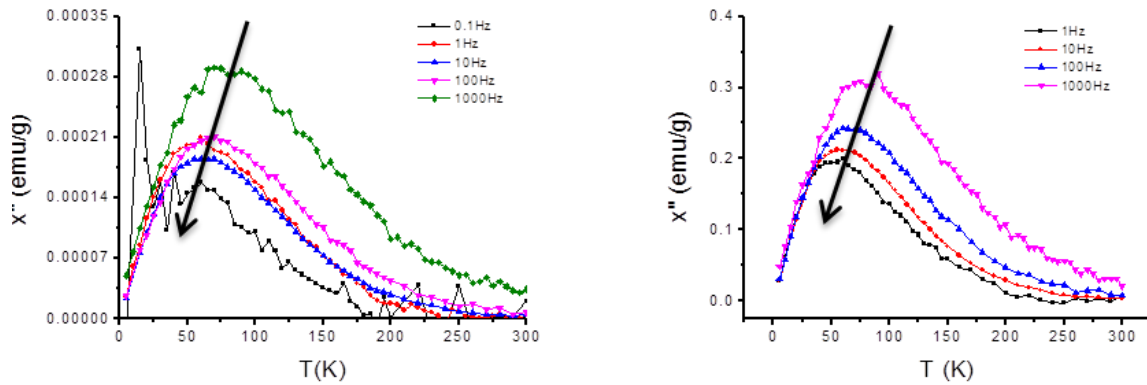


Figure 4. Temperature dependence of the out of phase (imaginary) component $\chi''(T)$ of the magnetic susceptibility for 1 and 2 samples, at different excitation frequencies, taken in zero external magnetic field. The arrows indicate increasing frequencies.

Since T_B depends on the measurement frequency, it can be checked that the particles are truly noninteracting by verifying the dependence of T_B on measurement time, as given by the Néel-Brown theory. Departures from this theory indicate interparticle interactions, for example dipole-dipole or interparticle exchange interactions¹⁶. For noninteracting particles, χ' vs. T curves for various particle concentrations are identical when properly normalized. Deviation from this behaviour indicates that interparticle interactions are important. Figure 5 shows that χ' normalized curve

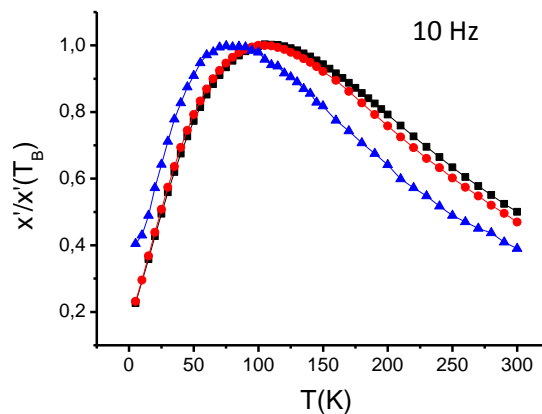


Figure 5. Compar

ves have been

normalized to their respective maximum values

Briefly, for proliferation times between 0 and 39 h (sample 1, 2 and 3) artificial magnetic bacteria showed magnetic properties sufficient for use in nanostructuring and biomedical applications^{17,18}.

Thus, using probiotic bacteria as "carriers" of magnetic nanoparticles allows the achievement of 2 milestones in nanotechnology: first, nanostructured hybrid materials for recording and sensing applications¹⁷, and second, oral administration of artificial magnetic bacteria for MR Imaging of the bowel^{19,20}, which is one of the greatest current challenges in medicine. Probiotics are known to have a positive effect on the maintenance of human health, since they constitute an important part of natural microbiota^{22,23}.

For recording and sensing applications nanostructured magnetic materials are needed²¹. Magnetic nanoassemblies possess in most cases more efficient properties than magnetically-independent nanoparticles, due to their increased magnetic properties and stronger magnetic responses.

On placing a permanent magnet (1.2 T) to sample 1 they align following the magnetic field lines and form a chain-like nanostructure. This magnetic behaviour is due to the assembly process of nanoparticles caused by magnetic dipole–dipole interaction among them on single bacteria and among magnetic bacteria⁸. The use of an external magnetic field is in fact one of the most common routes to achieve ordered magnetic structures²⁴⁻²⁸. For structural characterization, and in order to study the magnetic properties of these 1D nanostructures, we fixed the chain-like assemblies into an epoxy resin with an applied field of 1.2 T during the polymerization process.

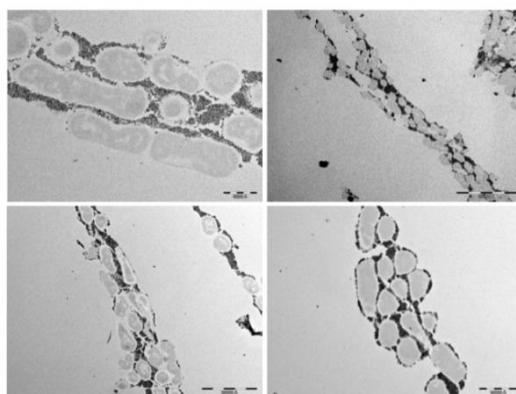


Figure 6. TEM micrographs of a thin epoxy resin section of sample 1, showing the 1D nanostructure formation after a magnetic field is applied. Maghemite particles are surrounding the external surface, making the bacteria align in a chain-like structure.

TEM images (Figure 6) showed the formation of 1D nanostructures by magnetic activation of maghemite nanoparticles around bacteria, once an external magnet is applied. Maghemite

nanoparticles, due to their dipole-dipole interactions, make the bacteria align, forming a chain-like structure.

Also the external shell of the bacteria (formed mainly by exo-polysaccharides) helps play an important role in fixing and keeping the bacteria in contact²⁹⁻³².

Hysteresis loops of the 1D bacteria-maghemite assemblies were measured when applying a magnetic field parallel or perpendicular to the direction of the alignment.

Magnetization curves for AMB sample 1 showed clearly the change in the shape of the hysteresis loop with the orientation of the applied field (Figure 7). For the two different field configurations, the coercive fields are designated by $H_{c\parallel}$ and $H_{c\perp}$ respectively.

When the field is parallel to the direction of the alignment, the hysteresis loop is squarer than that corresponding to the randomly oriented artificial magnetic bacteria. Also an increase in the reduced remanence (M_r/M_s) and coercivity values are found (table 1), especially when the field applied is parallel to the alignment³³⁻³⁸. The hysteresis curves are similar to those observed for whole magnetotactic bacteria³⁷.

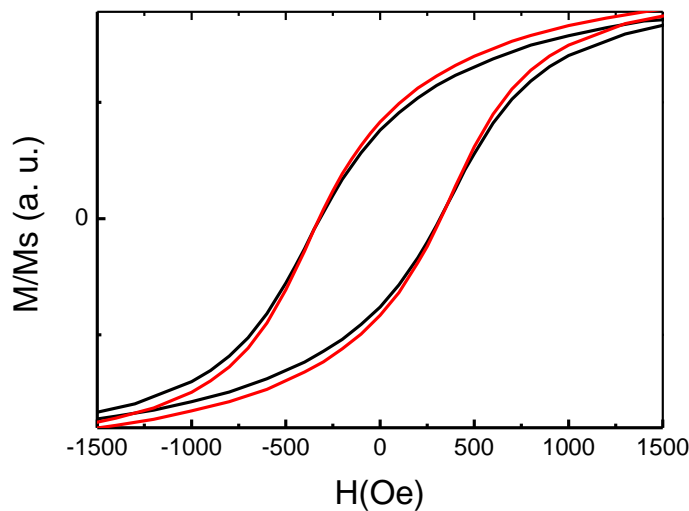


Figure 7. Magnetization curves at 5 K recorded for sample 1 fixed in a thin section of epoxy resin. Hysteresis loops are either parallel (red line) or perpendicular (black line) to the direction of the 1D alignment.

Such changes in the magnetization curves of 1D nanostructures compared to randomly oriented nanoparticles are due either to exchange coupling between adjacent particles or to the long-range dipole-dipole coupling, with a collective “flip” of the magnetic dipole³⁹. The reduced remanence of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles randomly oriented is 0.30. This value is lower than that calculated for

single-domain particles (0.50). This clearly indicates that Y-Fe₂O₃ nanocrystals are characterized by uniaxial anisotropy³⁹. The increase in the Mr/Ms ratio and coercive field is a measure of the strength of the magnetic anisotropy.

Furthermore, we tested the efficiency of these magnetic probiotic bacteria as oral probes for MR Imaging of bowel.

MRI

For taking MRI images of the bowel, it was necessary to optimize the volume and concentration of the final AMB solution. 7 mice were analyzed through MRI. Images were acquired before sample injection (pre), 30 mins, 1, 2, 3, 6 and 24 h after injection. Mice were fed only with a nutrient water based gel for 72 h before imaging. This allowed a complete cleaning of the bowel. The optimal concentration (see Experimental Section) resulted from several pre-clinical tests. T2-weighted images of the abdomen from back to belly are shown in Figure 8 (left to right). Images acquired before substance injection (pre), clearly showed that 72 h of feeding with water based nutrient gel provided a good test-bed for iron based contrast agents. Bowel loops are filled with gel and resulted hyperintense at MRI. Little dark spots, as indicated by the blue arrow, are probably air bubbles. The big dark circular spot on the final panels is the breathe sensor used to monitor mouse health during anesthesia (purple arrow). After 6 hours we could observe that the contrast media had spread throughout the majority of the bowel. Several regions are involved in the signal loss process, as shown by the blue arrows.

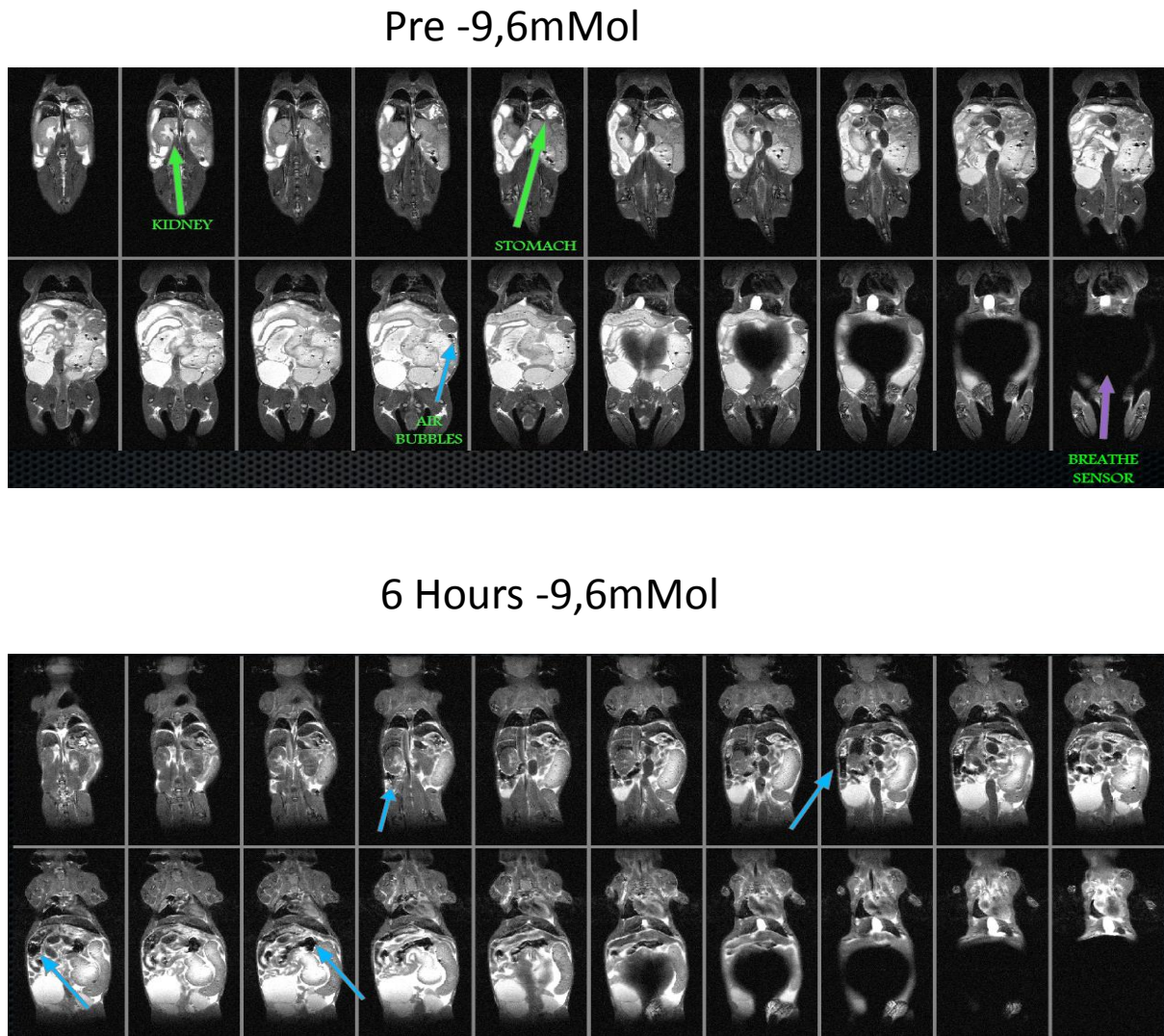


Figure 8. MRI micrographs of sample 1. Top: pre-contrast T2*-weighted images. Bottom: The post-contrast T2*-weighted images, acquired 6h after injection

References

1. a) D. Schüler, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 654-672.; b) D. Schüler, R. B. Frankel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, 464-473.
2. D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 217-230.
3. E. Bäuerlein, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 614-641.
4. M. Amora, V. Busignya, M. Durand-Dubiefc, M. Tharauda, G. Ona-Nguemab, A. Gélaberta, E. Alphanbéryb, N. Menguyb, M. F. Benedettia, I. Chebbic,, F. Guyotb, *PNAS* **2015**, 112, 1699-1703.
5. A. Komeili, *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, 36, 232-255.
6. D. Faivre, D. Schüler, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4875-4898.
7. M. L. Fdez-Gubieda, A. Muela, J. Alonso, A. García-Prieto, L. Olivi, R. Fernández-Pacheco, J. Manuel Barandiarán, *ACS Nano* **2013**, 7, 3297-3305.
8. AFM
9. A. G. Roca, D. Niznansky, J. Poltiero-Vejpravova, B. Bittova, M. A. González-Fernández, C. J. Serna, M. P. Morales, *J. Appl. Phys.* **2009**, 105, 114309(1-7).
10. S. Mørup, M. F. Hansen, C. Frandsen, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2010**, 1, 182-190.
11. D.L. Leslie-Pelecky, R.D. Rieke, *Chem.Mater.* **1996**, 8, 1770- 1783.
12. J. L. Dormann, *Rev. Phys. Appl.* **1981**, 16, 275.
13. L. Neel, *Ann. Geophys.* **1949**, 5, 99.
14. L. Neel, *C. R. Acad. Sci. Paris* **1961**, 252, 6075.
15. D. Bonacchi, A. Caneschi, D. Dorignac, A. Falqui, D. Gatteschi, Donella Rovai, C. Sangregorio, R. Sessoli, *Chem. Mater.* **2004**, 16, 2016-2020.
16. F. Luis, E. del Barco, J. M. Hernandez, E. Remiro, J. Bartolomé, J. ´Tejada, *Phys. Rev. B*, **1999**, 59, 11837-11846.
17. Y. W. Jun, J. W. Seo, J. Cheon, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41,179-189.
18. A. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1222-1244.
19. L. V. Ileva, M. Bernardo, M. R. Young, L. A. Riffle, J. L. Tatum, J. D. Kalen, P. L. Choyke, *Nat. Protoc.* **2014**, 9, 2682-2692.
20. K. Kluchova, R. Zboril, J. Tucek, M. Pecova, L. Zajoncova, I. Safarik, M. Mashlan, I. Markova, D. Jancik, M. Sebel, H. Bartonkova, V. Bellesi, P. Novak, D. Petridis, *Biomaterials* **2009**, 30, 2855-2863.
21. Z. Tang, N. A. Kotov, *Adv. Mater.* **2005**, 17, 951-962.
22. M. E. Sanders, F. Guarner, R. Guerrant, P. R. Holt, E. M. M. Quigley, R. B. Sartor, P. M. Sherman, E. A. Mayer, *Gut* **2013**, 62, 787.
23. F. Lara-Villoslada, M. Olivares, S. Sierra, J. M. Rodríguez, J. Boza, J. Xaus, *British J. Nutrition* **2007**, 98, S96.
24. Z. H. Nie, A. Petukhova, E. Kumacheva, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5,
25. 15-25.
26. Y. Min, M. Akbulut, K. Kristiansen, Y. Golan, J. Israelachvili, *Nat. Materials* **2008**, 7, 527-538.
27. [Y. Lu, L. Dong, L.-C. Zhang, Y.-D. Su, S.-H. Yu, *Nano Today* **2012**, 7,
28. 297-315.
29. M. D. Krebs, R. M. Erb, B. B. Yellen, B. Samanta, A. Bajaj, V. M. Rotello, E. Alsberg, *Nano Lett.* **2009**, 9, 1812-1817.
30. a) N. Leventis, I. A. Elder, J. L. Gary, D. R. Rolison, *Nano Lett.* **2002**, 2, 63-67; b) J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Science* **1999**, 284, 1318-1322.
31. R. M. Donlan, *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, 8, 881-890.
32. I. B. Beech, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2004**, 53, 177-183.
33. L. M. Ruiz, et al. *Hydrometallurgy* **2008**, 94, 133-137.
34. C. M. Waters, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, 21, 319-346.
35. B. Cao, Y. Zhu, L. Wang, C. Mao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11750-11754.
36. Y. Lalatonne, L. Motte, V. Russier, A. T.;Ngo, P. Bonville, M. P. Pileni, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 1848-1854.
37. D. Fragouli, R. Buonsanti, G. Bertoni, C. Sangregorio, C. Innocenti, A. Falqui, D. Gatteschi, P. D. Cozzoli, A. Athanassiou, R. Cingolani, *ACS Nano* **2010**, 4, 1873-1878.
38. M. P. Pileni, *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 12304-12309.
39. E. Alphanbéry, Y. Ding, A. T. Ngo, Z. L. Wang, L. F. Wu, M. P. Pileni, *ACS Nano* **2009**, 3, 1539-1547.
40. C. Petit, V. Russier, and M. P. Pileni, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 10333-10336.
41. M. P. Pileni, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 3358-3371.
- 42.



**Capítulo 4. Probiotic Bacteria Comprising Metals, Metal
Nanoparticles and Uses Thereof**

FIELD OF THE INVENTION

The present invention falls within the field of probiotic bacteria and, more specifically, it related to probiotic bacteria loaded with metallic ions and/or metal nanoparticles, to the use of these probiotic bacteria for the prophylaxis or treatment of mineral deficiency diseases, to the use of these bacteria as contrast agent for imaging of the digestive tract and to the use of these bacteria for the treatment of cancer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Minerals are one of the five fundamental groups of nutrients needed to life. Micronutrient malnutrition affects >50% of the worldwide population. In particular, iron, zinc and calcium are considered an emerging public health problem in most of developing countries. In developed countries there are also serious problems of deficiency of minerals due to improper eating habits that has prevailed the comfort and pleasure to health. Iron deficiency is the most common nutritional problem in the world. As well as affecting a large number of children and women in developing countries, it is the only nutrient deficiency which is also significantly prevalent in industrialized countries. The consequences of iron deficiency anemia are very serious. Anemia resulting from iron deficiency in young children has become very common since the level of bioavailable iron in a typical infant's diet is low while their rapid growth requires a much higher level of iron. The consequences of iron deficiency anemia (IDA) are very serious as it is associated with impaired cognitive and psychomotor development, reduced growth and decreased resistance to infection.

To increase the daily intake of these minerals, numerous food supplements containing different inorganic and organic forms of these metals are commercially available. At any rate, it is quite well known that inorganic salts have a very low bioavailability. Organic salts, commonly based on gluconate, citrate, or other molecules, are characterized by a higher systemic effect. Therapeutic doses of iron supplements, which are prescribed for iron deficiency anemia, may cause gastrointestinal side effects such as nausea, vomiting, constipation, diarrhea, dark colored stools, and/or abdominal distress. Therefore, there is a need of providing

new formulations for metal supplementation, in particular for iron supplementation, with minimum gastrointestinal side effects.

SUMMARY OF THE INVENTION

In a first aspect, the invention relates to a bacterium selected from a lactic acid bacterium and a bacterium of the genus *Bifidobacterium* comprising at least one metal nanoparticle bound to its surface.

In second aspect, the invention relates to a method for obtaining a bacterium selected from a lactic acid bacterium and a bacterium of the genus *Bifidobacterium* comprising at least one metal bound to its surface, comprising contacting said bacterium with at least said metal, wherein said contacting is carried out in the presence of at least one salt of a divalent cation and at a temperature wherein the growth of said bacterium is substantially reduced.

In a third aspect, the invention relates to a bacterium obtainable by the method according to the second aspect.

In a fourth aspect, the invention relates to a biologically pure culture of a bacterium according to the first aspect or a bacterium according to the third aspect.

In a fifth aspect, the invention related to a foodstuff comprising a bacterium according to any the first aspect or a bacterium according to the third aspect or a biologically pure culture according to the fourth aspect.

In a sixth aspect, the invention relates to a pharmaceutical composition comprising a bacterium according to any the first aspect or a bacterium according to the third aspect or a biologically pure culture according to the fourth aspect and a pharmaceutically acceptable carrier.

In a seventh aspect, the invention relates to a bacterium selected from the bacterium of the first aspect and the bacterium of the third aspect, or a biologically pure culture according to the fourth aspect, for its use in the treatment and/or prevention of a disease or condition associated with a metal deficiency, wherein the bacterium comprises the metal that is deficient in said disease or condition and wherein the bacterium or culture is administered orally.

In an eighth aspect, the invention relates to a bacterium selected from the bacterium of the first aspect and the bacterium of the third aspect, or a biologically

pure culture according to the fourth aspect, for its use in the treatment of cancer, wherein the metal is comprised in a magnetic nanoparticle.

In a ninth aspect, the invention relates to a non-therapeutic method for the delivery of a metal in the intestine of a subject, comprising the oral administration of a bacterium according to the first aspect or the bacterium of the third aspect or the biologically pure culture of the fourth aspect.

In a tenth aspect, the invention relates to the use of a bacterium according to any the first aspect or a bacterium according to the third aspect or a biologically pure culture according to the fourth aspect as contrast agent for magnetic resonance imaging, wherein the metal is comprised in a magnetic nanoparticle.

In an eleventh aspect, the invention relates to a method for the magnetic resonance imaging of the digestive tract of a subject which comprises:

- i. orally administering to said subject a bacterium according to the first aspect, or a bacterium according to the third aspect, or a biologically pure culture according to the fourth aspect, or a contrast agent comprising a bacterium according to the first aspect, or a bacterium according to the third aspect, or a biologically pure culture according to the fourth aspect, wherein the metal is comprised in a nanoparticle and,
- ii. detecting the metal nanoparticles in the digestive tract of the subject.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Transmission Electron Microscopy images of fine-tuning layers of artificial magnetic bacterial embedded in an amorphous epoxy resin, a) positive and b) negative maghemite nanoparticles and c) bacteria without EPS biofilm. Note as the grafted of nanoparticles take place when bacteria contain EPS biofilm and the nanoparticles are positive, d) Fe mapping of a maghemite-containing bacteria showing as the iron selectively accumulates at the external bacteria surface.

Figure 2. A typical non contrasted TEM image of bifidobacteria after incubation with positive maghemite nanoparticles forming like a plum pudding.

Figure 3. (a) Dispersion of artificial magnetic bacteria in the aqueous media followed by (b) separation of the magnetic bacteria by a magnetic field.

Figure 4. Deposition of Artificial magnetic bacteria labeled with the green SYTO9 dye on polylysine in the presence of an external magnet.

Figure 5. Time dependency of iron removal from iron oxide nanoparticle-containing bacteria in stomach and intestine mimic media. Note that the level of iron removed in intestine medium is significantly higher than that of stomach.

Figure 6. Time dependency of calcium removal bacteria in stomach and intestine mimic media.

Figure 7. Time dependency of zinc removal bacteria in stomach and intestine mimic media.

Figure 8. (A) SEM image showing the bacteria after incubation with Ca^{2+} . (B) EDX spectrum showed the K_{α} peak at 3.8 eV characteristic of Ca.

Figure 9. (A) SEM image shows the bacteria after incubation with maghemite and Ca^{2+} . (B) EDX spectrum showed the K_{α} peaks at 6.2 eV and 3.8 eV characteristic of Fe and Ca, respectively.

Figure 10. A whole MRI body image of a mouse, after 6h of administration of maghemite nanoparticles-containing bacteria. The morphology of some upper intestine parts is evident owing to the positive (dark) contrast due to the accumulation of magnetic nanoparticles.

Figure 11. A whole MRI body image of a mouse, after 12h of administration of maghemite nanoparticles-containing bacteria. The morphology of some lower intestine parts is evident owing to the positive (dark) contrast due to the accumulation of magnetic nanoparticles.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The inventors of the present invention have observed that a lactic acid bacterium or a bacterium of the genus *Bifidobacterium* is capable to bind a metal nanoparticle to its surface in a pH dependent manner. The association between the bacterium and the metal nanoparticle is stable under those pH conditions at which the nanoparticle has a positive surface charge (Figure 1). Moreover, the inventors have observed that the pH conditions at which the metal nanoparticle is stably associated with the bacterium overlap with the acidic pH conditions in the stomach, whereas the pH conditions in the intestine allow the dissociation between the metal nanoparticle and the bacterium with the subsequent delivery of the metal nanoparticle (Example 2). Based on this property, the inventors have developed a method for administering metal supplements to subjects in need

thereof by the oral administration of a bacterium containing metals and/or metal nanoparticles according to the invention. These bacteria, as well as a culture of these bacteria, can also be formulated as a pharmaceutical composition or form part of a foodstuff or nutritional product. Moreover, based on the ability of the lactic acid bacteria and bifidobacteria to reach tumor hypoxic areas, the nanoparticle-associated bacteria could also be used to target a compound of interest to a tumor. Further, the bacteria carrying magnetic nanoparticles associated to their surfaces are capable of destroying tumor cells when subjected to a selectively increase of the temperature (hyperthermia) in the vicinity of the tumor when applying an alternating magnetic field in the range of radio frequency. Finally, the present inventors have also seen that the metal-nanoparticle loaded bacteria are suitable for imaging the gastrointestinal system by magnetic resonance (MRI) (example 4). Thus these bacteria are also suitable for use as oral MRI contrast agents.

Bacterium and culture

In a first aspect, the invention relates to a bacterium, herein after "bacterium of the invention", selected from a lactic acid bacterium and a bacterium of the genus *Bifidobacterium* comprising at least one metal nanoparticle bound to its surface.

The bacterium of the invention is selected from a lactic acid bacterium and a bacterium of the genus *Bifidobacterium*.

The term "lactic acid bacterium" or "LAB", as used herein, refers to any bacterium capable of producing, as the major metabolic end product of carbohydrate fermentation, lactic acid or at least one of its derivatives (including, but not limited to, acetic acid or propionic acid): the term is therefore intended to include propionic acid bacteria (PAB), which produce propionic acid as a carbohydrate fermentation product. Illustrative non- limitative examples of lactic acid bacteria are bacteria of the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* and *Streptococcus* as well as the genera of the order *Lactobacillales* *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* and *Weisella*. Typically, the lactic acid bacterium is selected from the species *Leuconostoc* spp., *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*,

Lactobacillus bifidus, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus jensenii*.

In a preferred embodiment, the lactic acid bacterium is a bacterium of the genus *Lactobacillus*. The term "Lactobacillus", as used herein, refers to a genus which is described in the NCBI database by the Taxonomy ID 1578. In a particular embodiment, the lactic acid bacterium is selected from the group consisting of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus bulgaricus*. In a more preferred embodiment, the lactic acid bacterium is *Lactobacillus fermentum*. The term "Lactobacillus fermentum" or "L. fermentum" refers to a species of the genus *Lactobacillus* which is described in the NCBI database by the Taxonomy ID 1613.

The term "bacterium of the genus *Bifidobacterium*" or "bifidobacterium", as used herein, refers to a genus of bacteria which is described in the NCBI database with the Taxonomy ID 1678. Illustrative non-limitative examples of suitable Bifidobacteria are the species *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis*, and *Bifidobacterium angulatum*.

In a particular embodiment, the bacterium of the genus *Bifidobacterium* is selected from the group consisting of *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium animalis*.

In a more preferred embodiment, the bacterium of the genus *Bifidobacterium* is *Bifidobacterium breve*. The term "Bifidobacterium breve" or "B. breve" refers to a species of the genus *Bifidobacterium* which is described in the NCBI database by the Taxonomy ID 1685.

In another particular embodiment, the lactic acid bacterium or the bifidobacterium of the invention is a bacterium which is capable of being transferred to the mammary gland after oral intake. For detecting the ability to being transferred to

the mammary gland, an assay such as described in WO2004003235 for detecting transfer of a microorganism to the milk after oral intake can be used. Examples of such bacteria are disclosed in the international application WO2008145756. In a more particular embodiment, the lactic acid bacterium or the bacterium of the genus *Bifidobacterium* capable of being transferred to the mammary gland after oral intake is selected from the group consisting of:

- *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession No. 7263
- *Lactobacillus fermentum* deposited in the CECT under Accession No. 5716
- *Lactobacillus coryniformis* deposited in the CECT under Accession No. 5711
- *Lactobacillus salivarius* deposited in the CECT under Accession No. 5713
- *Lactobacillus gasseri* deposited in the CECT under Accession No. 5714
- *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession No. 7264
- *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession No. 7260,
- *Lactobacillus plantarum* deposited in the CECT under Accession No. 7262,
- *Lactobacillus fermentum* deposited in the CECT under Accession No. 7265,
- *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7266,
- *Enterococcus hirae* deposited in the CECT under Accession N° 7410,
- *Lactobacillus plantarum* deposited in the CECT under Accession N° 7412,
- *Enterococcus faecalis* deposited in the CECT under Accession N° 7411 ,
- *Lactobacillus salivarius* deposited in the CECT under Accession N° 7409 and
- *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7413,

The bacterium of the invention comprises at least one metal nanoparticle bound to its surface. The term "metal nanoparticle" as used herein, refers to a nanoparticle that comprises a metal. The term "nanoparticle" as used herein, refers to a particle having a diameter ranging from about 1 to about 1000 nanometers. In a particular embodiment, the nanoparticles for use according to the invention typically have an average particle diameter ranging from 2 to 50 nm, preferably from 4 to 10 nm, more preferably 8 nm. The average particle diameter is the average maximum particle dimension, it being understood that the particles are not necessarily spherical. The particle size may conveniently be measured using conventional techniques such as microscopy techniques, for example transmission electron

microscopy. In one embodiment, the nanoparticles for use according to the invention have a spherical or substantially spherical shape. The shape may conveniently be assessed by conventional light or electron microscopy techniques. The term "metal", as used herein, refers to any element, compound or alloy that is a good conductor of both electricity and heat. In a particular embodiment, the metal is selected from the group consisting of iron, manganese, cobalt, nickel, calcium, zinc, magnesium, potassium, copper, chromium, selenium, silicon, iodine and combinations thereof. In a preferred embodiment, the metal is selected from the group consisting of iron, calcium, zinc, selenium and a combination thereof. In a more preferred embodiment, the metal is iron.

In a particular embodiment, when the metal is selenium it is not in the form of selenocysteine.

The metal could be in a zero-oxidation-state or in the form of an oxide. In a more particular embodiment, the metal is in the form of an oxide. The term "metal oxide", as used herein, refers to any oxide of a metal element. The term "oxide" refers to any chemical compound containing one or several oxygen atoms in a -2 oxidation state, together with other elements. In a particular embodiment, the metal oxide is an iron oxide. Illustrative non- limitative examples of iron oxides that can form part of the nanoparticle of the bacterium of the invention are maghemite, magnetite, hematite, goethite and ferrihydrite. In a particular embodiment, the iron oxide is selected from the group consisting of maghemite, magnetite, hematite, goethite and ferrihydrite.

In an even more preferred embodiment, the iron oxide is maghemite.

The term "maghemite", as used herein, refers to an iron oxide mineral defined by the formula $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$.

The term "magnetite", as used herein, refers to an iron oxide mineral defined by the formula Fe_3O_4 .

The term "hematite", as used herein, refers to an iron oxide mineral defined by the formula $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$

The term "goethite", as used herein, refers to an iron oxide mineral defined by the formula $\alpha\text{-FeO(OH)}$.

The term "ferrihydrite", as used herein, refers to an iron oxide mineral defined by the formula $(\text{Fe}^{3+})_2 \text{O}_3 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$ or by the formula $[\text{Fe}^{3+}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2]$.

In a particular embodiment of the bacterium of the invention, the nanoparticle is a magnetic nanoparticle. The term "magnetic nanoparticle", as used herein, refers to any nanoparticle with ferromagnetic and/or superparamagnetic behaviour. Non-limiting suitable examples can include, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Fe_2O_4 , Fe_xPt_y , Co_xPt_y , MnFe_xO_y , CoFe_xO_y , NiFe_xO_y , CuFe_xO_y , ZaFe_xO_y , CdFe_xO_y , wherein x and y vary between 1 and 6, depending on the method of synthesis known in the art. In a preferred embodiment, the magnetic nanoparticle comprises iron oxide. In a more preferred embodiment, the magnetic nanoparticle comprises maghemite.

The nanoparticles that can be attached to the bacteria according to the first aspect of the invention can be obtained by methods known by the person skilled in the art like, for example, the method described by Massart (Massart, R. IEEE Trans. Magn. 1981, 1247-1248) as illustrated in example 1.

In a preferred embodiment, the nanoparticles are directly bound to the bacteria, i.e. they do not contain any chemical group facing outwards or any coating which may form interactions with the components of the bacterial wall. In a preferred embodiment, the nanoparticles are not functionalized with amine groups. In another preferred embodiment, the metal nanoparticles are not coated with a polymeric component. In a still more preferred embodiment, the nanoparticles are not coated with a poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-b-poly(L-histidine)-b-poly(ethylene glycol) (PLGA-PLH-PEG).

In a particular embodiment, the bacterium comprises a metal nanoparticle and at least one additional metal, for example, 2, 3, 4 or more additional metals. In this particular embodiment, said additional metal is different from the metal which forms the metal nanoparticle. In a more particular embodiment, the additional metal is selected from the group consisting of iron, manganese, cobalt, nickel, calcium, zinc, magnesium, potassium, copper, chromium, selenium, silicon, iodine and combinations thereof. In a preferred embodiment, the bacterium comprises a metal nanoparticle comprising iron, preferably iron oxide, more preferably maghemite, and one or more additional metals selected from the group consisting of manganese, cobalt, nickel, calcium, zinc, magnesium, potassium, copper, chromium, selenium, silicon, iodine and combinations thereof. In a more particular embodiment, the bacterium comprises a metal nanoparticle comprising iron, preferably iron oxide, more preferably maghemite, and one or more additional

metals selected from the group consisting of calcium, zinc, selenium and a combination thereof. In a more particular embodiment, the bacterium comprises a metal nanoparticle comprising iron, preferably an iron oxide, more preferably maghemite, and further comprises a metal selected from zinc and calcium, more preferably it comprises zinc and calcium.

In a second aspect, the invention relates to a biologically pure culture of the bacterium of the first aspect of the invention.

The term "biologically pure culture", as used herein, refers to a culture in which the bacteria of the invention is found in a ratio of 95% or over, for example 96% or over, 97%) or over, 98%> or over, 99% or over or 100%, compared to other organisms present in the culture. The term "culture", as used herein, refers to a population of the bacteria of the invention. A culture may comprise other elements than the bacteria of the invention, such as the culture medium or any other substance that could be added to the culture medium beneficial for the culture growth or maintenance. The term "culture medium" or "medium" is recognized in the art, and refers generally to any substance or preparation used for the cultivation of living cells. The term "medium", as used in reference to a cell culture, includes the components of the environment surrounding the cells. Media may be solid, liquid, gaseous or a mixture of phases and materials. Media include liquid growth media as well as liquid media that do not sustain cell growth. Media also include gelatinous media such as agar, agarose, gelatin and collagen matrices. Exemplary gaseous media include the gaseous phase that cells growing on a petri dish or other solid or semisolid support are exposed to. The term "medium" also refers to material that is intended for use in a cell culture, even if it has not yet been contacted with cells. In other words, a nutrient rich liquid prepared for bacterial culture is a medium. Similarly, a powder mixture that when mixed with water or other liquid becomes suitable for cell culture may be termed a "powdered medium". "Defined medium" refers to media that are made of chemically defined (usually purified) components. "Defined media" do not contain poorly characterized biological extracts such as yeast extract and beef broth. "Rich medium" includes media that are designed to support growth of most or all viable forms of a particular species. Rich media often include complex biological extracts. Any conventional culture medium appropriate for lactic acid bacteria or

bifidobacteria culture known in the art can be used in the present invention, such as, for instance, MRS medium, HANK'S medium, APT medium, RCM medium, LM17 medium, GM17 medium and Elliker medium. In a particular embodiment, the culture medium than can form part of the biologically pure culture of the invention is MRS medium. A description of MRS medium and other media appropriate for the culture of lactic acid bacteria and bifidobacteria can be found in Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Vol. 34, edited by Janet E.L. Corry, G.D.W. Curtis, Rosamund M. Baird.

Method for obtaining the bacterium.

In a third aspect, the invention relates to a method for obtaining a bacterium selected from a lactic acid bacterium and a bacterium of the genus *Bifidobacterium* comprising at least one metal bound to its surface, comprising contacting said bacterium with at least said metal, wherein said contacting is carried out in the presence of at least one salt of a divalent cation and at a temperature wherein the growth of said bacterium is substantially reduced.

The terms "lactic acid bacterium", "bacterium of the genus *Bifidobacterium*", and "metal" have been previously described in connection with the first aspect of the invention.

According to the method of the third aspect, the contact between the acid lactic bacterium or the bacterium of the genus *Bifidobacterium* and the metal should be carried out in the presence of at least one salt of a divalent cation. The term "salt of a divalent cation", as used herein, refers to a compound in which a divalent cation is coupled to a counter-ion or is in solution. The term "divalent cation", as used herein, refers to an element in a positive oxidation state, resulting in a positive electrical charge with a valence of 2. Examples of divalent cations are Fe, Co, Ni, Ca, Zn, Mg, Cr, Se and Si. Preferably, the salt of a divalent cation is selected from a salt of calcium, a salt of magnesium and a combination thereof. More preferably, the salt of a divalent cation is selected from calcium chloride, magnesium chloride and a combination thereof. Even more preferable, the salt of a divalent cation is a combination of calcium chloride and magnesium chloride. Without wanting to be bound to any particular theory, it is believed that the addition of the salt is able to

affect the bacterium surface increasing its porosity and thereby increasing the metal binding.

According to the method of the third aspect, the contact between the acid lactic bacterium or the bifidobacterium and the metal should be carried out under temperature conditions wherein the growth of said bacterium is substantially reduced. The term "minimum growth temperature", as used herein, refers to the temperature below which sustained, balanced bacterial growth does not occur. The growth temperature suitable for carrying out the method according to the invention varies depending on the bacteria and should be determined for each species and strain of bacteria. The person skilled in the art knows methods and techniques for determining the temperature conditions wherein the growth of a bacterium is substantially reduced, such as the methods described by Shaw et al (Shaw et al, Journal of Bacteriology, 1971, Vol. 105 (2): 683-684). In a particular embodiment, the contact between the lactic acid bacterium or bifidobacterium and the metal is carried out at a temperature comprised between 0°C and 10°C, more preferably at 0°C.

In a preferred embodiment, the temperature at which the contacting with the metal is carried out is a temperature at which the growth of the bacterium is reduced at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, or more with respect to the growth of the bacteria at its optimum growth temperature.

In a particular embodiment, the lactic acid bacteria or the bifidobacteria are cooled to a temperature below the minimum growth temperature, for example 0°C, prior to the incubation with the metal, for example by storing the lactic acid bacterium or the bifidobacterium culture on ice for a time period of, for example, 10 minutes.

The lactic acid bacteria or the bifidobacteria that are going to be modified by the metal according to the method of the third aspect can be obtained by culture of the appropriate bacteria in standard culture conditions that are known by the person skilled in the art. In a particular embodiment, the lactic acid bacteria or the bifidobacteria derived from a 24 hour culture in MRS medium. In a preferred embodiment, the bacterium that is going to be treated with the method of the third aspect in order to obtain a bacterium that comprises a

metal bound to its surface has been grown in a culture medium that do not comprises said metal. Without wanting to be bound to any particular theory, it is believed that since the bacterium is contacted with the metal under conditions that do not allow substantial bacterial growth, the metal does not significantly enter into the bacterium but it is incorporated on the bacterium surface. In a particular embodiment of the method of the third aspect, the lactic acid bacterium or the bifidobacterium is contacted with a metal which is comprised in a nanoparticle. The term "nanoparticle" has been previously defined. In this particular embodiment, said contacting should be carried out at a pH in which the metal nanoparticle has a positive surface electrostatic charge. The term "surface electrostatic charge", as used herein, refers to the electrostatic charge of the particle that can be measured by the zeta potential of the nanoparticle. The term "zeta potential" refers to the electric potential in the interfacial double layer (DL) at the location of the slipping plane versus a point in the bulk fluid away from the interface. In other words, zeta potential is the potential difference between the dispersion medium and the stationary layer of fluid attached to the dispersed particle. The person skilled in the art knows how to calculate the zeta potential of a nanoparticle based on an experimentally-determined electrophoretic mobility or dynamic electrophoretic mobility (Delgado AV et al, 2005, Pure Appl. Chem. 77 (10): 1753-1850; Dukhin AS and Goetz PJ "Ultrasound for characterizing colloids", Elsevier, 2002). The pH at which the surface electrostatic charge of the metal nanoparticle is positive will depend on the nanoparticle composition, and can be determined by the person skilled in the art. For instance, when the metal nanoparticle comprises maghemite, the pH should be lower than: 5 In a preferred embodiment, when the metal nanoparticle comprises maghemite, the lactic acid bacterium or the bifidobacterium and the maghemite nanoparticle are incubated at a pH of 2.

These experimental conditions preserve the biofilm EPS (extracellular polymeric substance) of the bacteria. The presence of the EPS seems to be needed to graft the metal nanoparticles to the bacteria (Figure 1e). In fact, when EPS biofilm is removed following standard protocols (Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2. John J. Sambrook, David David, William Russell CSHL Press, 2001), the positive metal nanoparticles are not fixed to the external bacteria

surface (Figure 1e). In a particular embodiment, a drying step is carried out before the incubation of the lactic acid bacterium or the bifidobacterium culture with the metal. Said drying step can be performed by any suitable technique known by the skilled person, such as centrifugation of the cell culture and decantation of the medium. In a particular embodiment of the method of the third aspect, the lactic acid bacterium or the bifidobacterium is contacted with two or more metals. In a more particular embodiment, the bacterium is contacted with a first metal comprised in a nanoparticle, said contacting being carried out at a pH in which the nanoparticle has a positive electrostatic charge, and at least one additional metal different from the metal which is comprised in the nanoparticle. In an even more particular embodiment, the bacterium is contacted with an iron nanoparticle, for example a maghemite nanoparticle, and an additional metal selected from calcium, zinc, selenium and a combination thereof, preferably an additional metal selected from calcium, zinc and a combination thereof, more preferably a combination of calcium and zinc. The metals can be provided by a solution comprising a compound comprising said metal, for example, a salt of said metal, or by a solution comprising nanoparticles comprising said metal.

When a bacterium comprising more than one additional metal is desired, the lactic acid bacterium or the bifidobacterium could be contacted with these additional metals in the same step, i.e. incubating the bacteria with a solution comprising the different additional metals or, preferably, the contact between the lactic acid bacterium or the bifidobacterium and each of the different metals can be performed in different successive incubation steps. In a particular embodiment, the additional step(s) is (are) carried out prior to the incubation of the lactic acid bacterium or the Bifidobacterium with the metal nanoparticle. In a more particular embodiment, each additional step of contacting the bacterium with an additional metal is followed by a drying step. Said drying step can comprise, for example, centrifuging the mixture of the bacteria and the metal containing solution and removing the solution. In a particular embodiment, the method of the third aspect comprises the steps of:

- Contacting a lactic acid bacterium or a bifidobacterium with a first metal, for example, calcium.

- Contacting the lactic acid bacterium or a bifidobacterium with a second metal, for example zinc.
- Contacting the lactic acid bacterium or a bifidobacterium with a nanoparticle comprising a third metal, for example iron, preferably maghemite.

In further aspects, the invention is also related with a bacterium obtainable by the method of the third aspect, with a bacterium obtained by the method or the third aspect and with the biologically pure culture thereof. The term "biologically pure culture" has been previously defined.

Foodstuff and pharmaceutical compositions

The bacterium of the first aspect and the bacterium obtainable by the method of the third aspect can be orally administered to a subject both in the form of a foodstuff or in the form of a pharmaceutical composition.

Thus, in another aspect, the invention relates to a foodstuff comprising a bacterium according to the first aspect or a bacterium obtainable by the method of the third aspect or a biologically pure culture thereof.

The term "foodstuff", as used herein, refers to a substance or composition which is suitable for human and/or animal consumption. The foodstuff according to the present invention may relate to a foodstuff in a form which is ready for consumption. Alternatively or in addition, however, the term foodstuff as used herein may mean one or more food materials which are used in the preparation of a foodstuff. Non-limiting examples of suitable foodstuffs which can be used in the present invention are milk, yoghurt, cheese, curd, fermented milks, milk based fermented products, fermented cereal based products, fermented meat products, other milk based or cereal based powders, clinical nutrition formula, ice-creams, juices, bread, cakes or candies, animal feed formulations, semi- or synthetic diet formulations, infant formulae, clinical nutrition formulae, ice-creams, juices, flours, bread, cakes, candies or chewing-gums. The person skilled in the art knows how to prepare foodstuff from probiotic bacteria, like for example, the bacteria of the invention.

In another aspect, the invention relates to a pharmaceutical composition comprising a bacterium according to the first aspect or a bacterium obtainable

by the method of the third aspect or a biologically pure culture thereof and a pharmaceutically active excipient.

The term "pharmaceutical composition", as used herein, refers to a composition intended for use in therapy. The pharmaceutical composition is directed to the oral administration and can take the form of tablets, capsules, liquid bacterial suspensions, dried oral supplements, wet oral supplements, dry tube feeding or a wet tube feeding.

The term "pharmaceutically acceptable carrier", as used herein means a pharmaceutically acceptable material, composition or vehicle, such as a liquid or solid filler, diluent, excipient, solvent or encapsulating material, involved in carrying or transporting the subject agents from one organ, or portion of the body, to another organ, or portion of the body. Each carrier must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation. Some examples of materials which can serve as pharmaceutically acceptable carriers include: (1) sugars, such as lactose, glucose and sucrose; (2) starches, such as corn starch and potato starch; (3) cellulose, and its derivatives, such as sodium carboxymethyl cellulose, ethyl cellulose and cellulose acetate; (4) powdered tragacanth; (5) malt; (6) gelatin; (7) talc; (8) excipients, such as cocoa butter; (9) oils, such as peanut oil, cottonseed oil, safflower oil, sesame oil, olive oil, corn oil and soybean oil; (10) glycols, such as propylene glycol; (11) polyols, such as glycerin, sorbitol, mannitol, solutol and polyethylene glycol; (12) esters, such as ethyl oleate and ethyl laurate; (13) agar; (14) buffering agents, such as magnesium hydroxide and aluminum hydroxide; (15) alginic acid; (16) pyrogen-free water; (17) isotonic saline; (18) Ringer's solution; (19) ethyl alcohol; (20) phosphate buffer solutions; and (21) other non-toxic compatible substances employed in pharmaceutical formulations such as DMSO (dimethylsulphoxide) and its derivatives.

Remington's Pharmaceutical Sciences. Ed. by Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 discloses various carriers used in formulating pharmaceutical compositions and known techniques for the preparation thereof.

Suitable pharmaceutical forms for oral administration include any solid composition (tablets, pastilles, capsules, granules, etc.) or liquid composition (solutions, bacterial suspensions, emulsions, syrups, etc.) and can contain

conventional excipients known in the art, such as binding agents, for example syrup, acacia, gelatin, sorbitol, tragacanth, or polyvinylpyrrolidone; fillers, for example lactose, sugar, comstarch, calcium fosfate, sorbitol or glycine; lubricants for the preparation of tablets, for example magnesium stearate, disintegrants, for example starch, polyvinylpirrolidone, sodium starch glycolate or microcrystalline cellulose; or pharmaceutically acceptable wetting agents such as sodium laurylsulfate.

The required dosage amount of the bacteria of the invention in the foodstuff or pharmaceutical composition will vary according to the nature of the disorder or the proposed use of the composition, whether used prophylactically or therapeutically and the type of organism involved.

Any suitable dosage of the bacteria of the invention may be used in the present invention provided that the toxic effects do not exceed the therapeutic effects. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures with experimental animals, such as by calculating the ED, (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD (the dose lethal to 50% of the population) statistics. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, which can be expressed as the LD/ED ratio. Nevertheless, the activity of the bacteria of the invention in the individual is naturally dose dependent as well as dependent on the metal nanoparticle load of the bacteria. Compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from animal studies are used to formulate a range of dosage for human or animal use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that includes the ED, with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, the sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject requiring treatment. For instance, for preparing a foodstuff according to the present invention the bacterium of the invention is incorporated in a suitable support, in an amount of from 10^5 cfu/g to about 10^{12} cfu/g support material, preferably from about 10^6 cfu/g to about 10^{11} cfu/g support material, more preferably from about 10^6 cfu/g to about 10^{10} cfu/g support material.

In the case of a pharmaceutical composition, the dosage of the bacterium of the invention should be from about 10^5 cfu/g to about 10^{14} cfu/g support material, preferably from about 10^6 cfu/g to about 10^{13} cfu/g support material, more preferably from about 10^7 cfu/g to about 10^{12} cfu/g support material. For the purpose of the present invention the abbreviation cfu shall designate a "colony forming unit" that is defined as the number of bacterial cells as revealed by microbiological counts on agar plates.

Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the metal nanoparticle or to maintain the desired effect. Factors which may be taken into account include the severity of the disease state, the general health of the subject, the age, weight, and gender of the subject, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and response to therapy. Long-acting compositions may be administered every 3 to 4 days, every week, or biweekly depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the metal nanoparticle or to maintain the desired effect. Factors which may be taken into account include the severity of the disease state, the general health of the subject, the age, weight, and gender of the subject, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and response to therapy. Long-acting compositions may be administered every 3 to 4 days, every week, or biweekly depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

Method for the treatment and/or prevention of diseases caused by a metal deficiency.

The bacterium of the invention is suitable to be used as oral supplement for a subject in need of a metal. The administration of a metal by means of the bacterium of the invention is advantageous, among other reasons, because the metal nanoparticle is specifically released in the intestine, avoiding the release of the metal in the stomach, which usually leads to unwanted side effects (example 2, figure 5). Moreover, different metals, such as calcium or zinc, associated to a lactic acid bacterium or a bifidobacterium are also released in both stomach and intestine conditions (example 2, figures 6 and 7), which makes these bacteria

suitable platforms for multimetal oral supplementation. Therefore, in another aspect, the invention relates to a bacterium selected from the bacterium of the first aspect and the bacterium obtainable by the method of the third aspect, or a biologically pure culture thereof for its use in the treatment and/or prevention of a disease or condition associated with a metal deficiency, wherein the bacterium comprises the metal that is deficient in said disease or condition and wherein the bacterium or culture is administered orally.

In another aspect, the invention relates to the use of a bacterium selected from the bacterium of the first aspect and the bacterium obtainable by the method of the third aspect, or a biologically pure culture thereof, in the manufacture of a medicament for the treatment and/or prevention of a disease or condition associated with a metal deficiency, wherein the bacterium comprises the metal that is deficient in said disease or condition and wherein the bacterium or culture is administered orally.

In another aspect, the invention relates to a therapeutic method for the treatment and/or prevention of a disease or condition associated with a metal deficiency, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of a bacterium selected from the bacterium of the first aspect and the bacterium obtainable by the method of the third aspect, or a biologically pure culture thereof, wherein the bacterium comprises the metal that is deficient in said disease or condition and wherein the bacterium or culture is administered orally.

The term "metal" has been defined in connection with the bacterium of the invention. In a particular embodiment of the method for the treatment and/or prevention of diseases caused by a metal deficiency, the metal is calcium or zinc. In a particular embodiment, the metal is a "metal cation". The term "metal cation", as used herein, refers to a metal element in a positive oxidation state, resulting in a positive electrical charge. In a particular embodiment, the metal cation is a divalent metal cation, that is, a metal cation with a valence of 2. Examples of divalent metal cations are Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{2+} , Se^{2+} and Si^{2+} . In a particular embodiment, the divalent metal cation is Ca^{2+} or Zn^{2+} .

In another particular embodiment of the method of treatment and/or prevention, the bacterium comprises more than one metal, for example, 2, 3, 4, 5 or more

metals. In a more particular embodiment, the bacterium comprises calcium and zinc.

The lactic acid bacterium or bifidobacterium comprising at least one metal useful for the method for the treatment and/or prevention of diseases caused by a metal deficiency could be obtained contacting said lactic acid bacterium or bifidobacterium with said metal. An illustrative non limitative method for obtaining said bacteria comprising one or more metals is provided in the example 2 of the application.

In a particular embodiment, the metal is associated with the surface of the bacterium.

In another particular embodiment, the metal is comprised in a nanoparticle bound to the surface of the bacterium. The term "nanoparticle" as well as particular and preferred embodiments thereof has been previously described.

In a particular embodiment, the lactic acid bacterium or the bifidobacterium comprises a metal nanoparticle, and at least one additional metal different from the metal comprised in the nanoparticle. Preferably, the metal nanoparticle comprises an oxide, more preferably iron oxide, even more preferably maghemite. Preferably, the at least one additional metal is selected from the group consisting of iron, manganese, cobalt, nickel, calcium, zinc, magnesium, potassium, copper, chromium, selenium, silicon, iodine and combinations thereof. More preferable, the additional metal is calcium, zinc selenium or a combination thereof. Even more preferably, the additional metal is calcium and zinc.

In a particular embodiment, when the metal is selenium it is not in the form of selenocysteine.

In a more particular embodiment, the lactic acid bacterium or bifidobacterium comprises a maghemite nanoparticle, calcium and zinc.

The term "treatment", as used herein, refers to any process, action, application, therapy, or the like, wherein a subject (or patient), including a human being, is provided medical aid with the object of improving the subject's condition, directly or indirectly, or slowing the progression of a condition or disorder in the subject, or ameliorating at least one symptom of the disease or disorder under treatment.

The term "prevention", as used herein, means that the bacterium of the invention is useful when administered to a patient who has not been diagnosed as possibly

having the disorder or disease at the time of administration, but who would normally be expected to develop the disorder or disease or be at increased risk for the disorder or disease. According to the invention, the bacterium of the invention will slow the development of the disorder or disease symptoms, delay the onset of the disorder or disease, or prevent the individual from developing the disorder or disease at all.

The term "patient" or "subject", as used herein, refers to any animal, preferably a mammal and includes, but is not limited to, domestic and farm animals, primates and humans, for example, human beings, non-human primates, cows, horses, pigs, sheep, goats, dogs, cats, or rodents. In a preferred embodiment, the subject is a human being of any age or race. In a particular embodiment, the subject suffers from a disease associated with a metal deficiency. In another particular embodiment, the subject has not been diagnosed as suffering from a disease associated with a metal deficiency but is considered to be at increased risk of developing said disease.

The term "disease or condition associated with a metal deficiency" as used herein, refers to a condition presenting low serum levels of one or more metals. The serum levels of a metal that are considered low serum levels vary depending on parameters such as gender and age and are known by the person skilled in the art. The metal deficiency may stem from insufficient intake, digestion, absorption or utilization of said metal.

In a particular embodiment, the disease or condition associated with a metal deficiency is selected from the group consisting of a disease or condition associated with iron deficiency, a disease or condition associated with manganese deficiency, a disease or condition associated with cobalt deficiency, a disease or condition associated with nickel deficiency, a disease or condition associated with calcium deficiency, a disease or condition associated with zinc deficiency, a disease or condition associated with magnesium deficiency, a disease or condition associated with potassium deficiency, a disease or condition associated with copper deficiency, a disease or condition associated with chromium deficiency, a disease or condition associated with selenium deficiency, a disease or condition associated with silicon deficiency and a disease or condition associated with iodine deficiency.

Illustrative non- limitative examples of diseases or conditions associated with metal deficiencies are the following:

Diseases or conditions associated with iron deficiency: weakness, fatigue, skin pallor shortness of breath, anemia, low auto -immunity, depression, low blood pressure, speech disorders, poor memory and colds.

Diseases or conditions associated with manganese deficiency: attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD), asthma, carpal tunnel syndrome, seizures, loss of libido, miscarriage, growth retardation and nightmares.

Diseases or conditions associated with cobalt deficiency: pernicious anemia, severe fatigue, shortness of breath and low thyroid.

Diseases or conditions associated with nickel deficiency: hyperglycemia (high blood sugar), low blood pressure, depression, liver disease, anemia, low stomach acid, sinus congestion, fatigue and low adrenals.

Diseases or conditions associated with calcium deficiency: rickets, osteomalacia, osteoporosis, receding gums, pre-menstrual syndrome, panic attacks, muscle cramps, weak lungs, lower back pain, kidney stones, insomnia, weak bones, bone spurs and calcium deposits.

Diseases or conditions associated with zinc deficiency: loss of taste, loss of smell, retarded growth, delayed sexual development, slow wound healing, ADHD, hair loss, birth defects, body odor, brain disorders, diarrhea, heart defects, hernia, impotence, lung disorders and prostate disorders.

Diseases or conditions associated with magnesium deficiency: muscle weakness and cramps, nausea, cardiac arrhythmias, ADHD, arterial calcification, low calcium absorption, convulsions, depression, gastrointestinal disorders, growth disorders, menstrual migraines, osteoporosis, tremors, moodiness and fainting.

Diseases or conditions associated with potassium deficiency: nausea, anorexia, irritability, muscle weakness, fear, mental illness, low energy, aches and twinges, acidity, tendency toward violence, suspiciousness, loss of ambition, nervousness and negativity.

Diseases or conditions associated with copper deficiency: ADHD, anemia, arthritis, violent, cerebral palsy, high cholesterol, drooping eyelids, white hair, hernia, liver, cirrhosis, learning problems, low blood sugar, high risk of stroke and varicose veins.

Diseases or conditions associated with chromium deficiency: ADHD, unexpected weight loss, low sperm count, diabetes, manic depression, learning problems, growth problems, hyperactivity, coronary vessel disease, cataracts and abnormal sugar levels.

Diseases or conditions associated with selenium deficiency: age spots, skin aging, Alzheimer's disease, cancer, cystic fibrosis, fatigue, heart palpitations, HIV, hypothyroidism, liver damage, muscle weakness and scoliosis.

Diseases or conditions associated with silicon deficiency: brittle hair, brittle fingernails and toenails, poor skin quality, poor calcium utilization and arterial disease.

Diseases or conditions associated with iodine deficiency: goiter, menstrual disorders, mental confusion, heart and lung problems.

According to the first therapeutic use of the invention, a metal nanoparticle comprising the metal which is deficient in the disease or condition to be treated is administered to the subject in need thereof. For example, if a subject is going to be treated from a disease related with iron deficiency, or if the prevention of a disease associated with iron deficiency is desirable in a subject in risk of developing said disease, a bacterium comprising an iron nanoparticle is administered to this subject.

According to the first therapeutic uses and methods of the invention, the bacterium or the biologically pure culture is administered orally.

The term "oral administration", as used herein, refers to any form of delivery of the bacterium or culture of the invention to a subject, wherein the bacterium or culture of the invention is placed in the mouth of the subject, whether or not the bacterium or culture of the invention is immediately swallowed. Thus "oral administration" includes buccal and sublingual as well as esophageal administration.

The term "therapeutically effective amount", as used herein, refers to the sufficient amount of the bacterium or culture of the invention to provide the desired effect and will generally be determined by, among other causes, the characteristics of the bacterium or culture of the invention itself and the therapeutic effect to be achieved. It will also depend on the subject to be treated, the severity of the disease suffered by said subject, the chosen dosage form, etc. For this reason, the doses

mentioned in this invention must be considered only as guides for the person skilled in the art, who must adjust the doses depending on the aforementioned variables. In an embodiment, the effective amount produces the amelioration of one or more symptoms of the disease that is being treated, for example, the normalization of the levels of the metal that was deficient in the subject.

Methods for the treatment of cancer

The bacteria according to the invention or the biologically pure cultures according to the invention are also suitable for delivering magnetic nanoparticles to the gastrointestinal tract. The arranged magnetic nanoparticles onto the bacteria surface make that the bacteria exhibit permanent magnetic moments and stronger magnetic response. In an applied alternating magnetic field, magnetic moments of magnetic nanoparticles could be periodically reoriented, leading to the conversion of magnetic energy into thermal energy, and the temperature of surrounding regions was quickly elevated to the therapeutic temperature range (higher than 42 °C), which would result in the killing by hyperthermia of the neighbouring cells.

Thus, in another aspect, the invention relates to a bacterium according to the first aspect or to a bacterium obtainable by the method of the third aspect or to a biologically pure culture thereof for its use in the treatment of cancer, wherein the metal is comprised in a magnetic nanoparticle.

In another aspect, the invention relates to the use of a bacterium according to the first aspect or to a bacterium obtainable by the method of the third aspect or to a biologically pure culture thereof in the manufacture of a medicament for the treatment of cancer, wherein the metal is comprised in a magnetic nanoparticle.

In another aspect, the invention relates to a therapeutic method for the treatment of cancer, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of a bacterium according to the first aspect or to a bacterium obtainable by the method of the third aspect or to a biologically pure culture thereof, wherein the metal is comprised in a magnetic nanoparticle.

The terms "treatment", "subject" and "therapeutically effective amount" have been previously defined in connection with the therapeutic uses and methods for the treatment and/or prevention of diseases associated with metal deficiency.

The term "cancer", as used herein, refers to a disease characterized by uncontrolled cell division (or by an increase of survival or apoptosis resistance), by the ability of said cells to invade other neighbouring tissues (invasion) or by the spread to other areas of the body where the cells are not normally located (metastasis) through the lymphatic and blood vessels. Depending on whether or not they can spread by invasion and metastasis, tumours are classified as being either benign or malignant: benign tumours are tumours that cannot spread by invasion or metastasis, i.e., they only grow locally; whereas malignant tumours are tumours that are capable of spreading by invasion and metastasis. As used herein, the term cancer includes, but is not limited to, the following types of cancer: breast cancer; biliary tract cancer; bladder cancer; brain cancer including glioblastomas and medulloblastomas; cervical cancer; choriocarcinoma; colon cancer; endometrial cancer; esophageal cancer; gastrointestinal cancer; gastric cancer; hematological neoplasms including acute lymphocytic and myelogenous leukemia; T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma; hairy cell leukemia; chronic myelogenous leukemia, multiple myeloma; AIDS-associated leukemias and adult T-cell leukemia/lymphoma; intraepithelial neoplasms including Bowen's disease and Paget's disease; liver cancer; lung cancer; lymphomas including Hodgkin's disease and lymphocytic lymphomas; neuroblastomas; oral cancer including squamous cell carcinoma; ovarian cancer including those arising from epithelial cells, stromal cells, germ cells and mesenchymal cells; pancreatic cancer; prostate cancer; rectal cancer; sarcomas including leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, and osteosarcoma; skin cancer including melanoma, Merkel cell carcinoma, Kaposi's sarcoma, basal cell carcinoma, and squamous cell cancer; testicular cancer including germinal tumors such as seminoma, non-seminoma (teratomas, choriocarcinomas), stromal tumors, and germ cell tumors; thyroid cancer including thyroid adenocarcinoma and medullar carcinoma; and renal cancer including adenocarcinoma and Wilms tumor. Other cancers will be known to one of ordinary skill in the art.

In a particular embodiment, the cancer is a gastrointestinal cancer. The term "gastrointestinal cancer", as used herein, refers to any cancer affecting the gastrointestinal tract, including the esophagus, stomach, biliary system, pancreas, small intestine, large intestine or colon and rectum. In a particular embodiment,

the gastrointestinal cancer is a stomach cancer, a small intestine cancer or a large intestine or colon cancer.

According to the therapeutic methods and uses for the treatment of cancer, the bacterium of the invention can be administrated by any suitable route, for example, oral route, parenteral route or intravenous route. In a preferred embodiment, the bacterium or culture of the invention are administrated orally. The term "oral administration" has been previously defined.

In a particular embodiment of the therapeutic methods and uses for the treatment of cancer, the bacterium according to the first aspect is capable of being transferred to the mammary gland after oral intake. Methods for detecting the ability of a bacterium to being transferred to the mammary gland have been previously disclosed in connection with the bacterium of the first aspect, as well as examples and particular embodiments of said bacteria. In this particular embodiment, the bacterium of the invention is useful for the treatment of a breast cancer. Thus, in a particular embodiment of the therapeutic method and uses of the invention, the cancer is breast cancer and the bacterium is a bacterium capable of being transferred to the mammary gland after oral intake.

The term "breast cancer" refers to any malignant proliferative mammary cell disorder, usually occurring in the ducts (the tubes that carry milk to the nipple) and lobules (milk producing glands).

In a particular embodiment, the therapeutic method for the treatment of cancer comprises the step of targeting the bacterium according to the first aspect to the tumor.

The step of targeting the bacterium according to the invention to a tumor could be performed by different mechanisms. In one embodiment, the bacterium is directed to the tumor due to its preference for tumor anaerobic microenvironment. In another embodiment, the bacterium comprising a magnetic nanoparticle, previously defined, is guided and pulled towards the target tumor by one or more magnetic fields or magnetic field gradients (e.g., an external source of magnetic fields or magnetic field gradients). Such fields or gradients can be generated by, for example, one or more magnets and associated medical devices placed within or adjacent to a target tumor prior to, during or after bacterium delivery. In some embodiments, the magnets are placed inside the body using surgical or

percutaneous methods inside the target tumor, or outside the target tumor (e.g., around or adjacent to the target tumor). In some embodiments, the magnets are external magnets that are placed outside of a subject's body to create an external source of magnetic field around or adjacent to the target tumor. In some embodiments, the source of magnetic fields is a permanent magnet (e.g., neodymium (NdFeB) magnet). In one embodiment, the source of magnetic fields is an electro-magnet. In other embodiments, the size of magnets ranges from about 1 mm to about 10 m and the strength of magnetic fields ranges from about 0.1 Tesla to about 100 Tesla, including about 0.1 to about 0.5 Tesla, about 0.5 to about 1 Tesla, about 1 Tesla to about 1.1 Tesla, about 1.1 Tesla to about 1.2 Tesla, about 1.2 Tesla to about 1.3 Tesla, about 1.3 Tesla to about 1.4 Tesla, about 1.4 Tesla to about 1.5 Tesla, about 1.5 Tesla to about 2 Tesla, about 2 Tesla to about 4 Tesla, about 4 Tesla to about 10 Tesla, about 10 Tesla to about 30 Tesla, about 30 Tesla to about 50 Tesla, about 50 Tesla to about 70 Tesla, about 70 Tesla to about 90 Tesla, and overlapping ranges thereof. In several embodiments, the magnetic field is applied for a time period ranging from about 1 minute up to about 5 hours. In some embodiments, the magnetic field is applied for about 1 minute to 5 minutes, about 5 minutes to about 10 minutes, about 10 minutes to about 20, about 20 minutes to about 30 minutes, and overlapping ranges thereof. In several embodiments, the magnetic field is applied for about 5-15 minutes, including about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, or 14 minutes.

In some embodiments, the source of magnetic fields is from one or more magnets of an apparatus (e.g., a group of magnets as an integral apparatus to shape and focus the magnetic field). Such apparatus can include, for example, a surgical tool (e.g., catheters, guidewires, and secondary tools such as lasers and balloons, biopsy needles, endoscopy probes, and similar devices) with a magnetic tip attachment (see, e.g., U.S. Pat. No. 7,280,863 and U.S. Pat. Publ. Nos. 200711116006, 2006/0116634, 2008/0249395, 2006/0114088 and 2004/0019447). Thus, in some embodiments, bacteria are delivered and an external magnet is used to target the bacteria.

When the bacterium of the invention comprises a magnetic nanoparticle, said bacterium could be used to apply a heat therapy to a tumor, preferably a solid tumor, by means of an alternating magnetic field applied in the proximity of the

tumor. In this embodiment, once the magnetic nanoparticle-loaded bacterium has reached the tumor, an alternative magnetic field is applied in the proximity of the tumor, resulting on heat production by the magnetic nanoparticle-loaded bacterium. This heat treatment induces the partial or total destruction of the tumor cells and/or of the tumor(s). Since tumor cells are more susceptible to heat than healthy cells (See for example: Overgaard et al, Cancer, 1977, 39, 2637 -2646), the thermotherapy described in this disclosure could selectively destroy tumor cells. Thus, in a particular embodiment, the therapeutic method comprises the step of:

- i) targeting the bacterium according to the first aspect comprising a magnetic nanoparticle to a tumor and
- ii) applying an alternative magnetic field around or adjacent the tumor.

The term "alternative magnetic field" or "oscillating magnetic field", as used herein, refers to a magnetic field whose intensity changes over time. In one embodiment, the alternative magnetic field applied during the treatment is characterized by a frequency lying between about 50 k Hz and about 1000 k Hz, preferably between about 100 k Hz and about 500 k Hz, more preferably between about 1 00 kHz and about 200 k Hz.

In another embodiment, the magnetic field is characterized by a strength lying between about 0.1 mT and about 200 mT, preferably between about 1 mT and about 100 mT, more preferably between about 10 mT and about 60 mT, typically between about 10 mT and about 50 mT.

The maximum value of the magnetic field strength is determined by the value at which it becomes toxic for the organism (i. e. essentially when it generates Foucault's currents). It may be possible that magnetic fields of strengths higher than 200 mT can be used in the therapy if they are shown to be non-toxic.

In another embodiment, the method of the present invention is characterized by the length of time during which the magnetic field is applied. This length of time may be between about 1 second and about 6 hours, preferably between about 1 minute and about 1 hour, preferably between 0.5 and 30 minutes, most preferably between 1 minute and 30 minutes.

The heat treatment is preferably applied to anesthetized patients. Therefore, the time during which the treatment is carried out may be equal or less than the length

of time of the anesthesia. A heat treatment can thus potentially be carried out during more than 6 hours, for example if a patient is anesthetized during more than 6 hours.

In another embodiment, the method of the present invention is characterized by the quantity of magnetic nanoparticle-associated bacteria used during the therapy. This quantity of magnetic nanoparticle-associated bacteria is related to the magnetic nanoparticle load of the bacteria and to the magnetic material load of the nanoparticle. This quantity is estimated by measuring the amount of magnetic material present in the suspension of magnetic nanoparticle-associated bacteria, which is administered. The quantity of magnetic nanoparticle-associated bacteria, which needs to be injected, essentially depends on the volume of the treated tumor, the temperature required during the treatment and the method of injection. The largest tumor volume and the highest tumor temperature require the largest quantity of magnetic nanoparticle-associated bacteria administered.

In another embodiment, the concentration of the suspension of magnetic nanoparticle-associated bacteria typically lays between 1 mg/ml and 100 mg/ml, preferably between 10 mg/ml and 50 mg/ml, where this concentration represents the quantity of magnetic material, preferably iron oxide, more preferably maghemite, contained within the suspension.

In another embodiment, the administration of the magnetic nanoparticle-associated bacteria to the subject is repeated. The number of repetition depends on the quantity of magnetic nanoparticle-associated bacteria, which is administered at once. If only a small quantity of magnetic nanoparticle-associated bacteria is administered at once, the administration step might be repeated several times until the desired amount of magnetic nanoparticle-associated bacteria is administered to a patient.

In another embodiment the heat treatment started by application of the alternative magnetic field is repeated. The successive heat treatments applied after administration of a given amount of magnetic nanoparticle-associated bacteria are called a heat cycle.

The given amount of magnetic nanoparticle-associated bacteria used for each heat cycle may have been administered through a single administration or through several successive administrations as explained above. The different heat

treatments within a heat cycle are separated one from another by a resting time. The resting time may be equal to 1 second or longer than 1 second, preferably equal to 1 minute or longer than 1 minute, more preferably equal to 10 minutes or longer than 10 minutes, preferably equal to or longer than 30 minutes.

In an embodiment, the different heat treatments within a heat cycle are separated one from another by a longer resting time than that mentioned above. This resting time may lie between 1 day and 15 days.

In an embodiment, the heat cycle is repeated 1 to 648 000 times, in particular 1 to 10 1000 times, more particularly 1 to 100 times, typically 1 to 10 times. The highest repetition rate of 648 000 times is estimated by assuming that the treatment is carried out for a very short time, typically about one second, during 15 days with a very short resting time, typically about one second resting time separating each treatment. The number of repetition of the treatment depends on the length of time of the treatment. Preferentially the longer the treatment is the less repetition is needed provided the other parameters of the therapy (such as the strength and or frequency of the applied magnetic field) are fixed.

The transformation of magnetic energy to thermal ablation has been widely demonstrated to induce the drug delivery with spatial and temporal control depending on the 'On-off operations of the applied high-frequency magnetic field (J. Liu, Y. Zhang, C. Wang, R. Xu, Z. Chen, N. Gu, *J. Phys. Chem. C* 14 (2010) 7673-7679). As an example, magnetite nanoparticles with ibuprofen in polymer polyvinyl alcohol (PVA) and pluronic F68, and a thin layer of silica exhibits fast magnetically-triggered drug release behavior (S.H. Hu, Y.Y. Chen, T.C. Liu, T.H. Tung, D.M. Liu, S.Y. Chen, *Chem. Commun.* 47 (2011) 1776-1778). Therefore, in another embodiment, the bacterium of the invention comprising a magnetic nanoparticle further comprises a therapeutic agent useful in the treatment of cancer. In one embodiment the agent is encoded on a vector capable of expressing at least one exogenous gene encoding said agent. In this embodiment, the bacterium of the invention is transformed with the vector. In a further embodiment the agent is linked to the bacterium of the invention. The agent may be linked, bonded, fixed or chemically coupled or attached to the bacterium of the invention or to the bacterium membrane or attached/linked by any other means known to the skilled person. In a further embodiment, the agent is linked to the

metal nanoparticle or encapsulated in the metal nanoparticle. The method for linking the agent to the metal nanoparticle or for encapsulating the agent into the metal nanoparticle will depend on the nature of the agent, and is known by the person skilled in the art.

The term "therapeutic agent useful in the treatment of cancer", as used herein, refers to an agent suitable for being used in the treatment of cancer, such as a cytotoxic agent, an antiangiogenic agent or an antimetastatic agent.

Cytotoxic agents which can be used according to this embodiment of the therapeutic method of the invention for the treatment of cancer include but are not limited to anthracycline antibiotics such as doxorubicin and daunorubicin, taxanes such as Taxol™ and docetaxel, vinca alkaloids such as vincristine and vinblastine, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, irinotecan, idarubicin, mitomycin C, oxaliplatin, raltitrexed, tamoxifen, cisplatin, carboplatin, methotrexate, actinomycin D, mitoxantrone, bleomycin or mithramycin. Antiangiogenic agents which can be used in combination with the antibodies of the invention for the treatment of cancer include but are not limited to an antiangiogenic agent selected from the group of paclitaxel, 2-methoxyestradiol, prinomastat, batimastat, BAY 12-9566, carboxyam idotriazole, CC-1088, dextromethorphan acetic acid, dimethylxanthenone acetic acid, endostatin, IM-862, man' mast at. penicillamine, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, squalamine lactate, SU5416, thalidomide, combretastatin, tamoxifen, COI-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anti-VEGF antibodies. Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleukin 12, IM862, amiloride, angiostatin. KI-3 angiostatin. KI-5 angiostatin. Captopril. DL-alpha-di Pi uoromethy lornithine, DL-alpha-difluoromethylomithine HC1, endostatin, fumagillin, herbimycin A, 4-hydroxyphenyl et inamide, jugione, laminin, laminin hexapeptide, I am in in pentapeptide, lavendustin A, m ed rox y p rages t e r o n e, minocycline, placenta ribonuclease inhibitor, suramin, thrombospondin, antibodies directed against proangiogenic factors (for example, A vast in, Erbitux, Veet ibix. Herecpt in); low molecular weight tyrosine kinase inhibitors of proangiogenic growth factors (for example Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); mTOR inhibitors (for example Torisel); interferon alpha, beta and gamma II-12, matrix metalloproteinase inhibitors (for example, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU11248, vitaxin; PDGFR inhibitors (for example Gleevec); NM3 and 2-

ME2; cyclopeptides such as cilengitide. Antimetastatic agents which can be used in combination with the antibodies of the invention for the treatment of cancer include but are not limited to any agent capable of acting as an antimetastatic agent, such as alkylating agents; antimetabolites such as 5-fluorouracil, pemetrexed (MTA), raltitrexed (TDX); platinum cytotoxic agents such as cisplatin or oxaliplatin; topoisomerase inhibitors; antimicrotubule agents; anthracyclines; plant alkaloids; GTPase inhibitors; angiogenesis inhibitors; matrix metalloproteinase inhibitors; inhibitors of the cell cycle regulating kinase, such as cyclin-dependent kinases and cyclin inhibitors; Win signaling inhibitors; inhibitors of the E2F transcription factor; histone deacetylase inhibitors; AKT kinase or ATPase inhibitors.

Non-therapeutic method

The association between the metal nanoparticle and the lactic acid bacterium or bifidobacterium, which is stable under stomach pH conditions, is broken due to relatively high pH value in the intestine. This results in the release of the metal nanoparticle in the intestinal tract (example 2). Moreover, different metals, such as calcium or zinc, associated to a lactic acid bacterium or a bifidobacterium are also released in both stomach and intestine conditions (example 2, figures 6 and 7). Therefore, the bacterium of the invention, when orally administered, is useful for the delivery of a compound of interest in the intestine of a subject.

Thus, in another aspect, the invention also relates to a non-therapeutic method for the delivery of a metal in the intestine of a subject, comprising the oral administration of the bacterium of the first aspect or the bacterium obtainable by the method of the third aspect or a biologically pure culture thereof.

The term "non-therapeutic method", as uses herein, refers to a process, action, application or the like on a subject that (i) is not directed to the improvement of a condition or disease, directly or indirectly, or to slowing the progression of a condition or disease, or to ameliorating one or more symptoms of a condition or disease of said subject and (ii) is not directed to delay the onset of the disorder or disease, or prevent the individual from developing the disorder or disease at all.

Thus, the subject according to the non-therapeutic method of the invention does not suffer from a disease or condition related with a metal deficiency or any other

disease of condition that could be treated by administering the bacterium or the culture of the invention and is not at increased risk of developing said diseases

The terms "metal" and "oral administration" have been previously defined in connection with the therapeutic methods of the invention.

The term "intestine" or "bowel", as uses herein, refers to the segment of the digestive tract extending from the pyloric sphincter of the stomach to the anus. The term intestine includes both the small intestine, which in turns comprises the duodenum, jejunum and ileum, and the large intestine, comprising the cecum and colon.

Imaging agent and method for imaging

The bacterium of the invention is capable of contrasting the digestive tract on an imaging method, such as magnetic resonance (example 4). Therefore, in another aspect, the invention relates to a contrast agent comprising a bacterium according to the first aspect or a bacterium obtainable by the method of the third aspect or a biologically pure thereof, wherein the metal is comprised in a magnetic nanoparticle.

The terms "imaging agent" and "contrast agent" are used here interchangeably and refer to a biocompatible compound the use of which facilitates the differentiation of different parts of the image, by increasing the "contrast" between those different regions of the image. Preferably, the contrast agent is a contrast agent for magnetic resonance image (MRI). Contrast agent for magnetic resonance imaging includes gadolinium chelates, manganese chelates, chromium chelates and iron particles. MRI contrast agents can include complexes of metals selected from the group consisting of Cr(III), Mn(II), Fe(III), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Sm(III), Yb(III), Gd(III), V(II), Tb(III), Dy(III), Ho(III) and Er(III).

In a particular embodiment, the contrast agent comprises a bacterium comprising a metal nanoparticle comprising iron, more preferable iron oxide, even more preferably maghemite.

In another embodiment, the invention relates to the use of a bacterium according to the first aspect or a bacterium obtainable by the method of the third aspect or to a culture thereof as a contrast agent for magnetic resonance imaging.

In a particular embodiment the bacterium according to the first aspect or the bacterium obtainable by the method of the third aspect or the culture thereof can be administered orally or intravenously for their use as contrast agents for magnetic resonance imaging.

The term "magnetic resonance imaging" or "MRI", as used herein, refers to a medical imaging technique most commonly used in radiology to visualize the structure and function of the body. It provides detailed images of the body in any plane. MRI uses no ionizing radiation, but uses a powerful magnetic field to align the nuclear magnetization of (usually) hydrogen atoms in water in the body. Radio frequency fields are used to systematically alter the alignment of this magnetization, causing the hydrogen nuclei to produce a rotating magnetic field detectable by the scanner. This signal can be manipulated by additional magnetic fields to build up enough information to construct an image of the body. When a subject lies in a scanner, the hydrogen nuclei (i.e., protons) found in abundance in an animal body in water molecules, align with the strong main magnetic field. A second electromagnetic field that oscillates at radiofrequencies and is perpendicular to the main field, is then pulsed to push a proportion of the protons out of alignment with the main field. These protons then drift back into alignment with the main field, emitting a detectable radio frequency signal as they do so. Since protons in different tissues of the body (e.g., fat versus muscle) realign at different speeds, the different structures of the body can be revealed. Contrast agents may be injected intravenously to enhance the appearance of blood vessels, tumors or inflammation. MRI is used to image every part of the body, but is particularly useful in neurological conditions, disorders of the muscles and joints, for evaluating tumors and showing abnormalities in the heart and blood vessels.

The bacterium according to the first aspect or the bacterium obtainable by the method of the third aspect could be used as a contrast agent for the magnetic resonance imaging of virtually any part of the body. Without wanting to be bound by any particular theory, both lactic acid bacteria and bifidobacteria are reported to be attracted by hypoxic tumor environments and, consequently, these bacteria are especially useful for the imaging of solid tumors.

In a particular embodiment, the bacterium according to the first aspect or the bacterium obtainable by the method of the third aspect or the culture thereof is

used as a contrast agent for magnetic resonance imaging of the digestive tract. The term "digestive tract", as used herein, refers to a series of hollow organs joined in a long, twisting tube from the mouth to the anus. The digestive tract includes the mouth, esophagus, stomach, small intestine, large intestine or colon and rectum.

In another embodiment, the invention relates to a method for the magnetic resonance imaging of the digestive tract of a subject which comprises:

(i) orally administering to said subject a bacteria according to the first aspect, a bacterium obtainable by the method of the third aspect, a culture thereof or a contrast agent according to the invention, wherein the metal is comprised in a nanoparticle and

(ii) detecting the metal nanoparticles in the digestive tract of the subject. The terms "magnetic resonance imaging", "digestive tract", "subject", "oral administration" have been previously defined.

The step of detecting the metal nanoparticles in the digestive tract of the subject can be done by a person skilled in the art, preferably a specialized facultative or technician, by scanning with MRI equipment.

The part of the digestive tract that can be contrasted by the imaging method of the invention will depend on the time elapsed between the oral administration of the bacterium or culture of the invention and the detection of the metal nanoparticles by scanning the digestive tract of the subject. Therefore, in one embodiment of the magnetic resonance imaging method, the scanning is carried out between 1 and 5 hours after the oral administration, preferably 3 hours after the oral administration, thereby imaging the stomach or between 6 and 24 hours after the oral administration, preferably 24 hours after the oral administration, thereby imaging the intestine.

The invention is described by way of the following examples, which are merely illustrative and no limitative of the scope of the invention.

EXAMPLE 1

Artificial magnetic bacteria as nanomagnets at room temperature

Materials and methods

Preparation of bacteria with maghemite nanoparticles

A culture of bacteria was prepared and kept at 37°C and agitation for 24h. Then the bacterial culture was kept on ice to cool bacteria down, bacteria were collected by centrifuging at 100g and the optical density was measured at 600nm to take 1×10^9 cfu/ml. Bacteria were resuspended carefully in 1ml of ice-cold MgCl_2 - CaCl_2 solution (174.02 g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 203.02 g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and dissolve them in 1L of distilled water) to wash away all impurities and bacteria were collected at 3000g, 10min. After this, tubes were kept in inverted position for 1 min for water to drain away and then 66.66 μl of a solution of the maghemite nanoparticles (0.95M) at pH 2 were mixed with the bacteria. The mixture was filled with water up to 1ml and bacteria were collected by centrifuging at 100g, 20min, to remove the excess of ion. Maghemite nanoparticles were prepared according to Massart's method (Massart, R. IEEE Trans. Magn. 1981, 1247-1248) by coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) salts in stoichiometry of 0.5. By adjusting both pH (12 and 11 for 4 and 6 nm, respectively) and ionic strength (2 and 1M NaNO_3 for 4 and 6 nm, respectively), the size of the resulting magnetite nanoparticles can be controlled (Vayssieres, L.; Chaneac, C.; Tronc, E.; Jolivet, J. P. J. Colloid Interface Sci. 1998, 205, 205-212). All solutions were carefully deaerated with argon. After oxidation, a colloid of maghemite nanoparticles stable at pH 2 was obtained.

Results

Herein, we report a simple and efficient methodology to synthesize artificial magnetic bacteria by the deposition of magnetic nanoparticles on a biological platform as it is the surface of gram positive bifidobacteria. The negative charge of the external bacteria surface and the positive one of nanoparticles allow interaction. The possibility of this electrostatic interaction may require the presence of the EPS biofilms. More interestingly, it is also shown that the orientation and manipulation of the as-formed artificial magnetic bacteria by an external magnetic field it is also possible. Moreover, the magnetic orientation occurs at room temperature, a fact that envisages diverse and attractive applications in different recording magnetic devices. The methodology involves mild conditions and may be adapted to large-scale fabrication, which allow the

production of cheaper, more environmentally friendly components for devices of the future.

Deposition is driven by the electrostatic interactions existing between positive maghemite nanoparticles (8 nm-sized) and the whole external surface of bifidobacteria.

The physical interaction is controlled by changing the charge of the maghemite nanoparticles surface, so that the adsorption level of maghemite nanoparticles into the bifidobacteria displays distinct and highly controllable attachment level. Figure 1 shows the particle density distribution as a function of the magnetic nanoparticle surface charge. As it can be observed, positive maghemite nanoparticles selectively attach to the peptidoglycan shell (a) whereas negative ones exhibit no affinity for deposition (b).

The most favourable conditions were observed when *Bifidobacterium breve* in MRS medium were incubated with 8-nm sized maghemite nanoparticles at pH 2 to afford red homogeneous solutions that were centrifuged and washed with a NaCl solution for five times. The solutions were examined by Transmission Electron Microscopy (TEM). A typical image obtained from the material shows discrete electron-dense cores, which are regular in shape and size (Figure 2).

The mean diameter was statistically measured to be 8 ± 0.5 nm. Energy dispersive spectroscopy confirmed that the particles contained Fe, which was not detected outside the particles. Large accumulation of magnetic nanoparticles takes place on the external shell of bacteria forming like a plum pudding, where the magnetic nanoparticles are positively-charged "plums" surrounded by a negatively-charged "pudding", formed by the peptidoglycan network. The bacteria labeled with maghemite nanoparticles are easily dispersed in water forming a red-dark solution. Centrifugation followed by washing does not remove the nanoparticles from the bacteria surface, pointing out the strong interaction between nanoparticles and the peptidoglycan network. Magnetic bacteria are easily oriented in low magnetic fields and can be removed from solutions by small permanent magnets (Fig. 3). The orientation in low magnetic fields at room temperature was unexpected as it has been shown that only maghemite nanoparticles larger than 20 nm are attracted from solution by modest magnetic gradients. The fact that the magnetic bacteria behave as magnets at room

temperature points out the existence of a magnetic long order, due to dipolar-dipolar interaction as a consequence of the large accumulation and short distances among nanoparticles at the peptidoglycan shell. In this sense, it is interesting to note that the bottom yellow solution obtained after magnet application (Figure 3b) only contained maghemite nanoparticles did not move with the application of an external magnetic field, that is the 8nm maghemite nanoparticles are not attracted by the permanent magnet.

Moreover, the bottom yellow solution obtained after magnet separation (Figure 3b) is free of bacteria. This demonstrates that i) all bacteria were labeled with magnetic nanoparticles, ii) the bacteria act as bioplatfoms where magnetic long order between 8 nm-sized maghemite nanoparticles takes place.

Since these magnetic bacteria can move in the presence of a low magnetic gradient field at room temperature, we assayed the formation of magnetically oriented film by the application of an external magnetic field to a single drop of artificial magnetic bacteria deposited on different substrates. In order to visualize the magnetic bacteria, these were previously labeled with the fluorescent dye SYTO9 (green), which is commonly used for labeling live bacteria. As an example figure 4 shows the effect of a modest permanent magnet on the artificial magnetic bacteria when deposited on polylysine glass. Fluorescent artificial magnetic bacteria behave as magnets at room temperature and are aligned following the external magnetic field lines giving rise to a nanostructured organization of magnetic bacteria where position and orientation of nanoobjects are controlled by an external input (the magnetic field).

In conclusion, the present invention shows the possibility of preparing artificial magnetic bacteria and the possibility of controlling the magnetic orientation of these nanoobjects at room temperature. This step is crucial in the use of this system in recording magnetic devices.

EXAMPLE 2

Iron, calcium and zinc delivery study

Materials and methods

Bacteria with minerals (adapted from Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.132-150). A batch of four different types of samples was prepared: a) Only bacteria (control), b) bacteria with calcium, e) bacteria with calcium and zinc and finally d) bacteria with calcium, zinc and iron.

The general procedure is as follows:

1. Measure the O.D. 600 of the 24 hours *L. fermentum* culture to collect 2x10⁹ cells/ml.
2. Cool the cultures to 0°C by storing the tubes on ice for 10 minutes.
3. Recover the cells by centrifugation at 3000g, 20 minutes at 4°C.
4. Decant the medium from the cell pellets. Stand the tubes in an inverted position on a pad of paper towels for 1 minute to allow the last traces of media to drain away.
5. Resuspend each pellet by swirling or gentle vortexing in 1 ml of ice-cold MgCl₂-CaCl₂ solution (174.02 g of CaCl₂•2H₂O and 203.02 g of MgCl₂•6H₂O and dissolve them in 1L of distilled water).
6. Recover the bacteria by centrifugation at 3000g for 20 minutes at 4°C.
7. Decant the medium from the cell pellets. Stand the tubes in an inverted position on a pad of paper towels for 1 minute to allow the last traces of media to drain away.
8. Resuspend the pellet by swirling or gentle vortexing in 1 ml of ice-cold 0.5 M CaCl₂.
9. Add 5µl Zn(NO₃)₂•4H₂O (1M).
10. Recover the bacteria by centrifugation at 3000g for 20 minutes at 4°C.
11. Add 5µl of maghemite nanoparticles (0.95 M, pH 2-5) to the isolated pellet.

Note 1: when preparing control with only bacteria (control), after step 7, resuspend the pellet by swirling or gentle vortexing in 1 ml distilled water and then jump up to step 11.

Note 2: when preparing bacteria with only CaCh remove steps 9 and 10.

Note 3: when preparing bacteria with CaCh and Zinc remove step 11.

Note 4: when preparing bacteria with CaCl₂, zinc and iron, the sequence followed to add minerals is, calcium, zinc and iron.

12. Transfer the tubes to a rack placed in a preheated 42°C circulating water bath. Store the tubes in the rack for exactly 90 seconds. Do not shake the tubes.

13. Rapidly transfer the tubes to an ice bath. Allow the bacteria to chill for 1-2 minutes.

14. Recover the bacteria by centrifugation at 3000g for 20 minutes at 4°C.

15. Wash the bacteria twice in distilled water.

The resulting bacterium samples were incubated in both gastric and gastrointestinal juice at 37°C with continuous agitation (170 rpm). 1 ml of sample was taken every hour to complete 6 hours in the case of the gastric juice simulation and 4 hours in the case of the gastrointestinal juice simulation. The metal release was analyzed by atomic absorption and ICP (inductively coupled plasma mass spectrometry).

Simulated gastric juice composition: Simulated gastric juice was prepared by dissolving pepsin (0.01g), gastric mucin (0.015g) and NaCl (0.088g) in 10ml distilled water with pH of 1.3 adjusted using 1M HCl.

The final composition of the sample in the reaction cell was therefore, 1mg/ml of pepsin, 1,5mg/ml of gastric mucin and 8.8 mg/ml of NaCl (0.15mM).

Simulated gastrointestinal juice composition: Simulated gastrointestinal juice was prepared by dissolving bile extract (0.05g), lipase (0.016g) and CaCl₂ (0.007g) in 10ml of distilled water with pH of 7.0 adjusted using 1M HCl or NaOH.

The final composition of the sample in the reaction cell was therefore, 5 mg/ml of bile extract, 1.6 mg/ml of lipase, 5 mM CaCl₂.

Results

The samples (MI-MI 8) of *L. fermentum* specially prepared with maghemite were placed in appropriate vessels containing simulated stomach and intestine juices as appropriate and were incubated at 37°C with continued stirring. Samples were taken at the following times: 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours. Samples were centrifuged to decant bacteria and 900µl of the supernatants were taken

for analysis. Results show a small release of Fe under stomach conditions. The release is significantly higher under colon conditions and occurs mostly in the first hour (figure 5).

Following the same protocol, the metal release of calcium and zinc was analyzed in the presence and absence of magnetic nanoparticles (Figures 6 and 7).

EXAMPLE3

Metal incorporation on the bacterium surface

Materials and methods

Scanning electron microscopy (SEM) is one of the most powerful techniques for studying surface fine structures. SEM images were recorded by using a Zeiss SUPRA40VP Scanning Electron Microscope coupled with energy dispersive X-ray analyzer (EDX) X-Max 50mm. EDX is an analytical technique used for elemental analysis or chemical characterization. Samples were coated with carbon by are discharge method for SEM-EDX.

Results

Energy dispersive x-ray spectroscopy was used to determine the elemental composition of the surface of individual bacteria. The SEM image of figure 8a shows the bacteria after incubation with Ca^{2+} . EDX spectrum showed the Ka peak at 3.8 eV characteristic of Ca, representing a value of around 10% in weight (figure 8b).

The SEM image of figure 9a shows the bacteria after incubation with maghemite and Ca^{2+} . EDX spectrum showed the Ka peaks at 6.2 eV and 3.8 eV characteristic of Fe and Ca, respectively (figure 9b). The iron represents a value of around 20% in weight while the percentage of calcium is 10%.

EXAMPLE4

Bacteriacontaining maghemite nanoparticles as oral MRI contrastagent

Materials and methods

MRI measurements were performed with a 4.7T Biospec Tomograph System (Bruker, Karlsruhe, Germany) operating at 200 MHz and equipped with a 33 cm bore magnet (Oxford Ltd., UK).

In vivo experiments

In the in vivo experiments, normal Balb-c mice weighing about 20 g were used. Contrast agents were orally administered at different doses of Fe.

Results

MRI is one of the most powerful noninvasive modality for the diagnosis of many diseases in humans.

The efficiency in contrasting MRI images of the bacteria once maghemite nanoparticles had been labeled was tested. The main advantages of the system are the following:

1. Bacteria serve as oral carriers of superparamagnetic maghemite nanoparticles.
2. Bacteria do not delivery maghemite nanoparticles at the stomach and therefore, MRI Images can be collected (figure 10). Control of the saturation level of particles onto bacteria or the amount of bacteria is necessary for an optima MRI acquisition.
3. Bacteria liberate the maghemite nanoparticles as pH rises and therefore a delivery of these particles take place during their trip along the intestines (figure 11).

CLAIMS

A bacterium selected from a lactic acid bacterium and a bacterium of the genus *Bifidobacterium* comprising at least one metal nanoparticle bound to its surface.

The bacterium according to claim 1 wherein the metal nanoparticle comprises a metal selected from the group consisting of iron, manganese, cobalt, nickel, calcium, zinc, magnesium, potassium, copper, chromium, selenium, silicon, iodine and combinations thereof.

The bacterium according to any of claims 1 or 2 wherein the metal nanoparticle is a magnetic nanoparticle.

The bacterium according to any of claims 1 to 3 wherein the metal is in the form of an oxide.

The bacterium according to claim 4 wherein the metal oxide is iron oxide.

The bacterium according to claim 5 wherein the iron oxide is selected from the group consisting of maghemite, magnetite, hematite, goethite and ferrihydrite.

The bacterium according to any of claims 1 to 6 further comprising at least one additional metal different from the metal comprised in the nanoparticle.

8. The bacterium according to claim 7 wherein the at least one additional metal is selected from the group consisting of iron, manganese, cobalt, nickel, calcium, zinc, magnesium, potassium, copper, chromium, selenium, silicon, iodine and combinations thereof.

9. The bacterium according to claim 8 wherein the nanoparticle comprises an iron oxide and wherein the at least one additional metal is selected from the group consisting of calcium, zinc, selenium or a combination thereof.

10. The bacterium according to any of claims 1 to 9 wherein the nanoparticle has a size between 2 and 50 nm.

11. The bacterium according to any of claims 1 to 10 wherein the lactic acid bacterium is selected from the group consisting of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus bulgaricus* and the bacterium of the genus *Bifidobacterium* is selected from the group consisting of *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantum* and *Bifidobacterium animalis*.

12. A method for obtaining a bacterium selected from a lactic acid bacterium and a bacterium of the genus *Bifidobacterium* comprising at least one metal bound to its surface, comprising contacting said bacterium with at least said metal, wherein said contacting is carried out in the presence of at least one salt of a divalent cation and at a temperature wherein the growth of said bacterium is substantially reduced.

13. The method according to claim 12, wherein the metal is selected from the group consisting of iron, manganese, cobalt, nickel, calcium, zinc, magnesium, potassium, copper, chromium, selenium, silicon, iodine and combinations thereof.

14. The method according to any of claims 12 or 13, wherein the metal is comprised in a nanoparticle and the contacting between the bacterium and the nanoparticle is carried out at a pH in which said nanoparticle has a positive surface electrostatic charge.

15. The method according to claim 14, wherein the nanoparticle is a magnetic nanoparticle.

16. The method according to claim 15, wherein the metal is in the form of an oxide.

17. The method according to claim 16, wherein the metal oxide is iron oxide.

18. The method according to claim 17, wherein the iron oxide is selected from the group consisting of maghemite, magnetite, hematite, goethite and ferrihydrite.

19. The method according to any of claims 14 to 18, wherein the nanoparticle has a size between 2 and 50 nm.

20. The method according to any of claims 12 to 19 comprising contacting said bacterium with a first metal comprised in a nanoparticle at a pH in which said nanoparticle has a positive surface electrostatic charge, and with at least one additional metal, wherein the first metal and the at least one additional metal are different.

21. The method according to claim 20 wherein the first metal is maghemite and the additional metal is a combination of calcium and zinc.

22. The method according to any of claims 12 to 21, wherein the lactic acid bacterium is selected from the group consisting of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus bulgaricus* and the bacterium of the genus *Bifidobacterium* is selected

from the group consisting of *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantum* and *Bifidobacterium animalis*.

23. The method according to any of claims 12 to 22 wherein the salt of a divalent cation is selected from the group consisting of a calcium salt, a magnesium salt and a combination thereof.

24. The method according to claim 23, wherein the salt of a divalent cation is selected from the group consisting of calcium chloride, magnesium chloride and a combination thereof.

25. The method according to any of claims 12 to 26 wherein the contacting between the bacterium and the metal is carried out at a temperature comprised between 0°C and 10°C.

26. A bacterium obtainable by the method according to any of claims 12 to 25.

27. A biologically pure culture of a bacterium according to any of claims 1 to 11 or a bacterium according to claim 26.

28. A foodstuff comprising a bacterium according to any of claims 1 to 11 or a bacterium according to claim 26 or a biologically pure culture according to claim 27.

29. A pharmaceutical composition comprising a bacterium according to any of claims 1 to 11 or a bacterium according to claim 26 or a biologically pure culture according to claim 27 and a pharmaceutically acceptable carrier.

30. A bacterium selected from the bacterium of claims 1 to 11 and the bacterium of claim 26, or a biologically pure culture according to claim 27, for its use in the treatment and/or prevention of a disease or condition associated with a metal deficiency, wherein the bacterium comprises the metal that is deficient in said disease or condition and wherein the bacterium or culture is administered orally.

31. The bacterium, or the biologically pure culture thereof, for use according to claim 30, wherein the disease or condition associated with a metal deficiency is selected from the group consisting of a disease or condition associated with iron deficiency, a disease or condition associated with manganese deficiency, a disease or condition associated with cobalt deficiency, a disease or condition associated with nickel deficiency, a disease or condition associated with calcium deficiency, a disease or condition associated with zinc deficiency, a disease or condition associated with magnesium deficiency, a disease or condition associated with

potassium deficiency, a disease or condition associated with copper deficiency, a disease or condition associated with chromium deficiency, a disease or condition associated with selenium deficiency, a disease or condition associated with silicon deficiency and a disease or condition associated with iodine deficiency.

32. A bacterium selected from the bacterium of claims 1 to 11 and the bacterium of claim 26, or a biologically pure culture according to claim 27, for its use in the treatment of cancer, wherein the metal is comprised in a magnetic nanoparticle.

33. The bacterium or biologically pure culture for use according to claim 32 wherein the cancer is a gastrointestinal cancer.

34. A non-therapeutic method for the delivery of a metal in the intestine of a subject, comprising the oral administration of a bacterium according to any of claims 1 to 11 or the bacterium of claim 26 or the biologically pure culture of claim 27.

35. A contrast agent comprising a bacterium according to any of claim 1 to 11 or the bacterium according to claim 26 or a biologically pure culture according to claim 27, wherein the metal is comprised in a nanoparticle.

36. Use of a bacterium according to any of claims 1 to 11 or a bacterium according to claim 26 or a biologically pure culture according to claim 27 as contrast agent for magnetic resonance imaging, wherein the metal is comprised in a magnetic nanoparticle.

37. Use according to claim 36 wherein the bacterium or culture is administered orally or intravenously.

38. Use according to any of claims 36 or 37 for magnetic resonance imaging of the digestive tract.

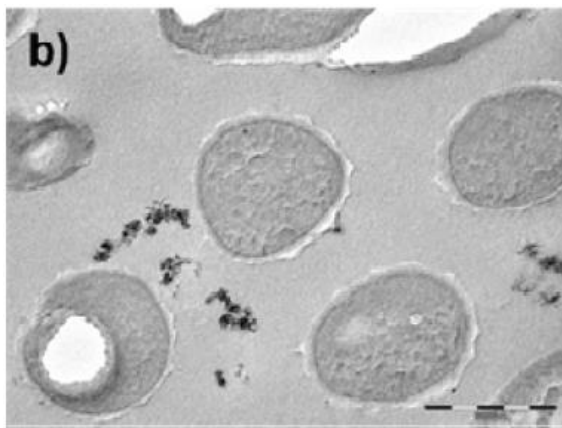
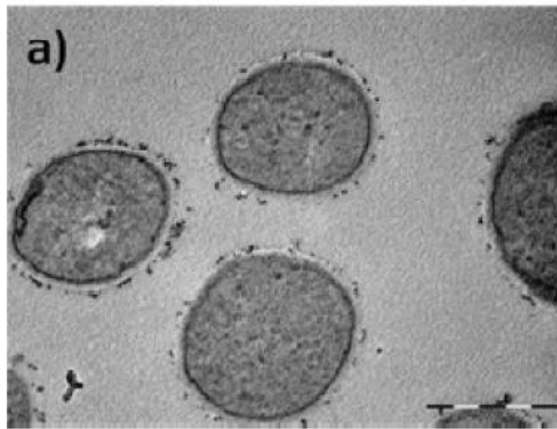
39. A method for the magnetic resonance imaging of the digestive tract of a subject which comprises:

- i. orally administering to said subject a bacteria according to any of claims 1 to 11, or a bacteria according to claim 26, or a biologically pure culture according to claim 27 or a contrast agent according to claim 35, wherein the metal is comprised in a nanoparticle and,
- ii. detecting the metal nanoparticles in the digestive tract of the subject.

40. A method according to claim 39 wherein the detection of the metal nanoparticles in the digestive tract of the subject is carried out between 1 and 5

hours after the oral administration thereby imaging the stomach or between 6 and 24 hours after the oral administration thereby imaging the intestine.

Figuras



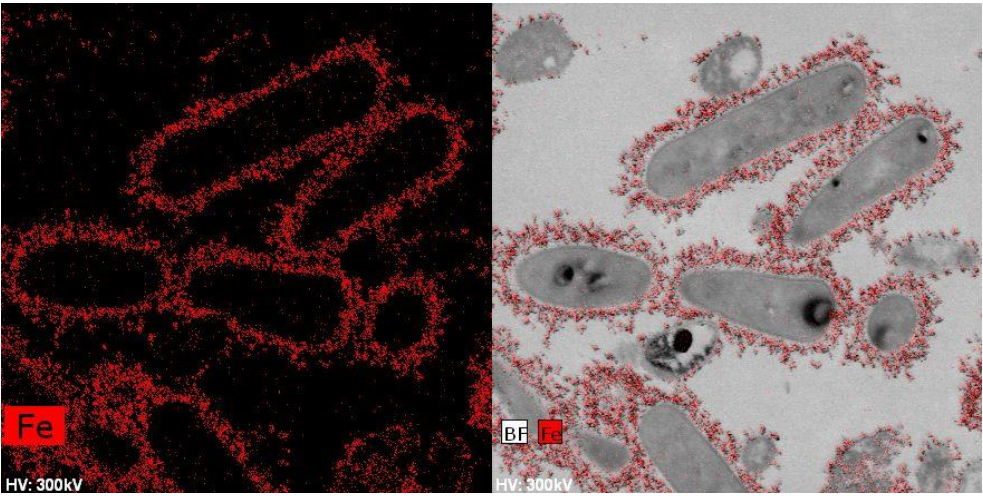
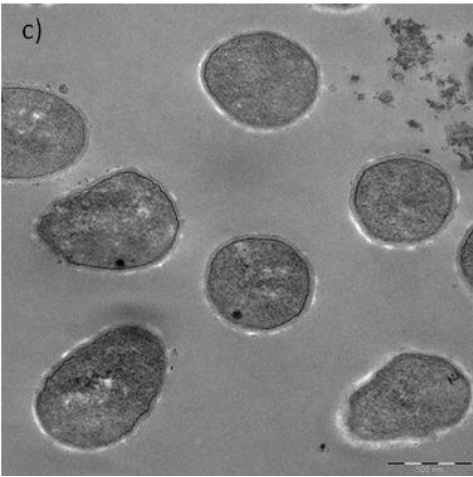


FIG. 1

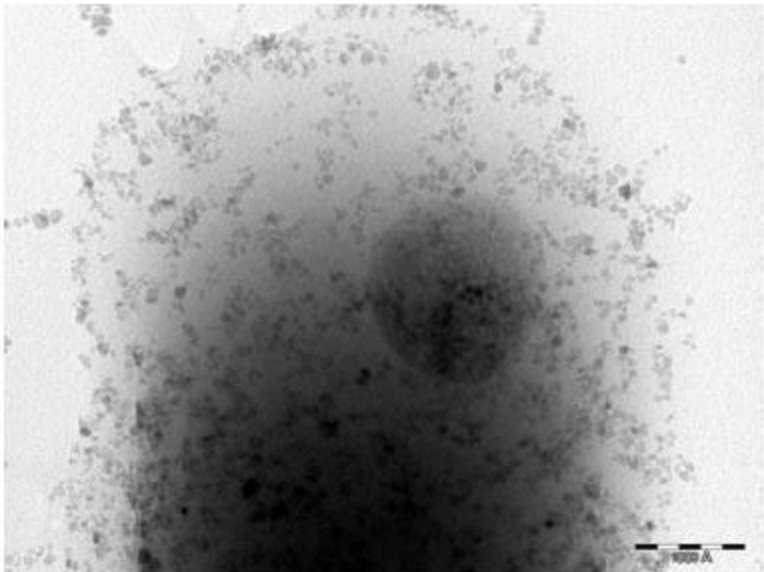


FIG. 2

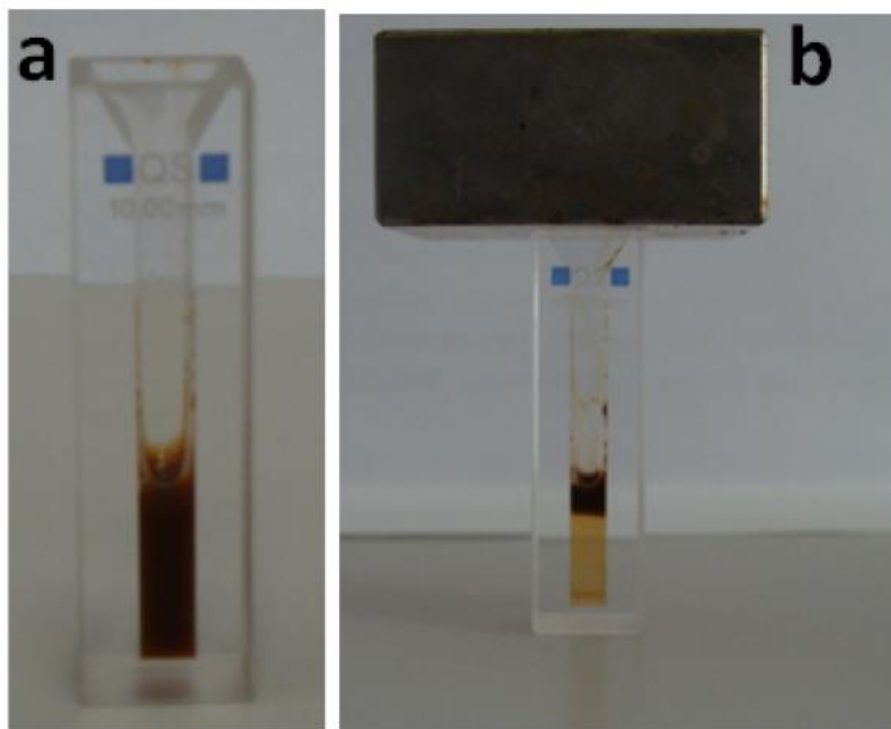


FIG. 3

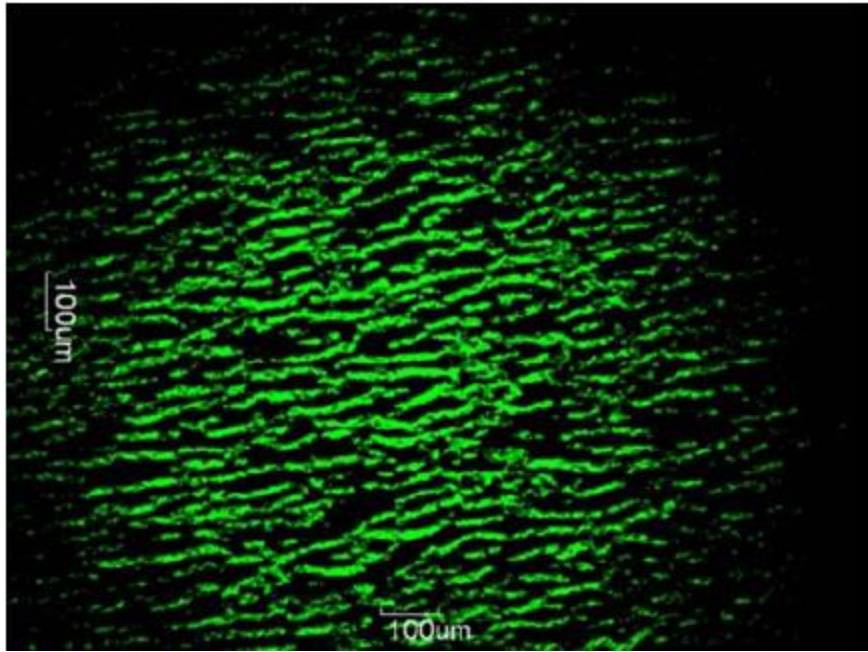


FIG. 4

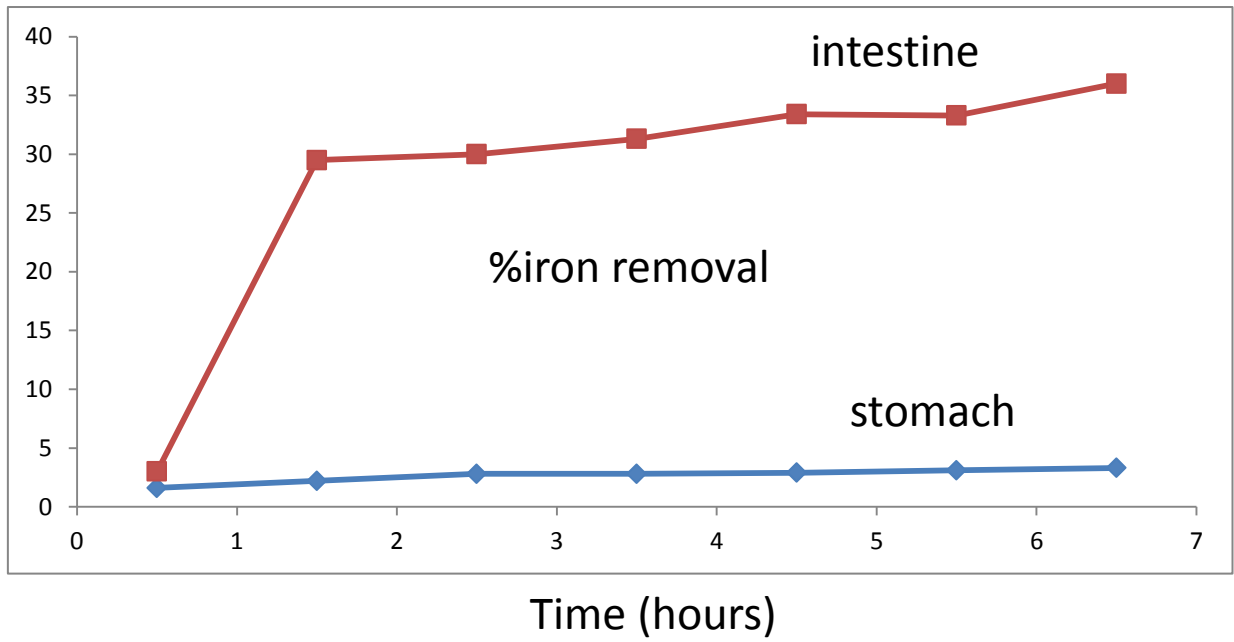


FIG. 5

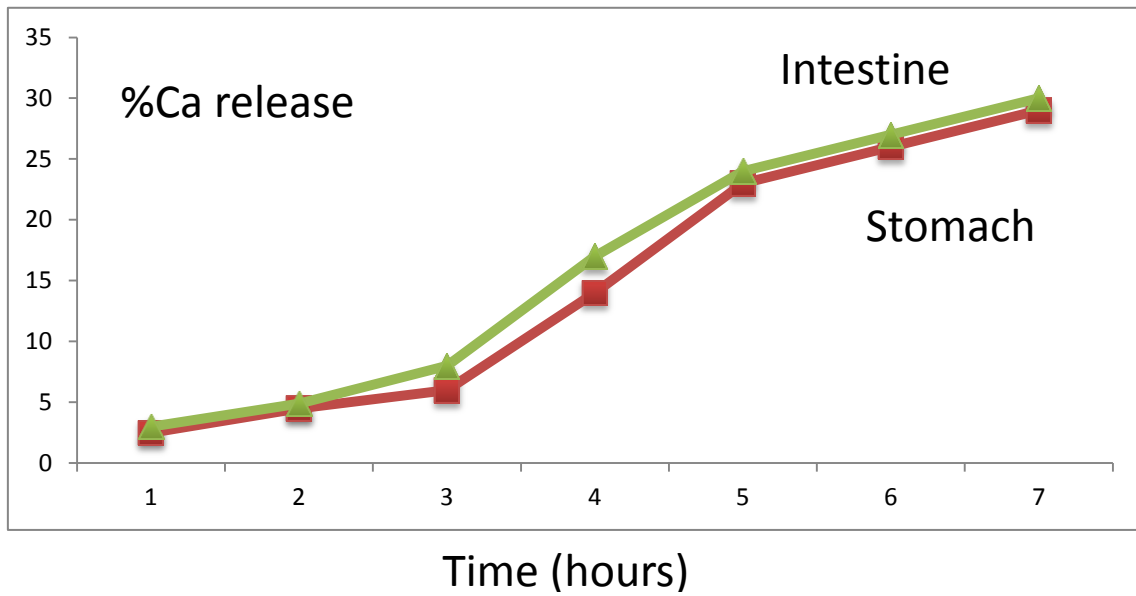


FIG. 6.

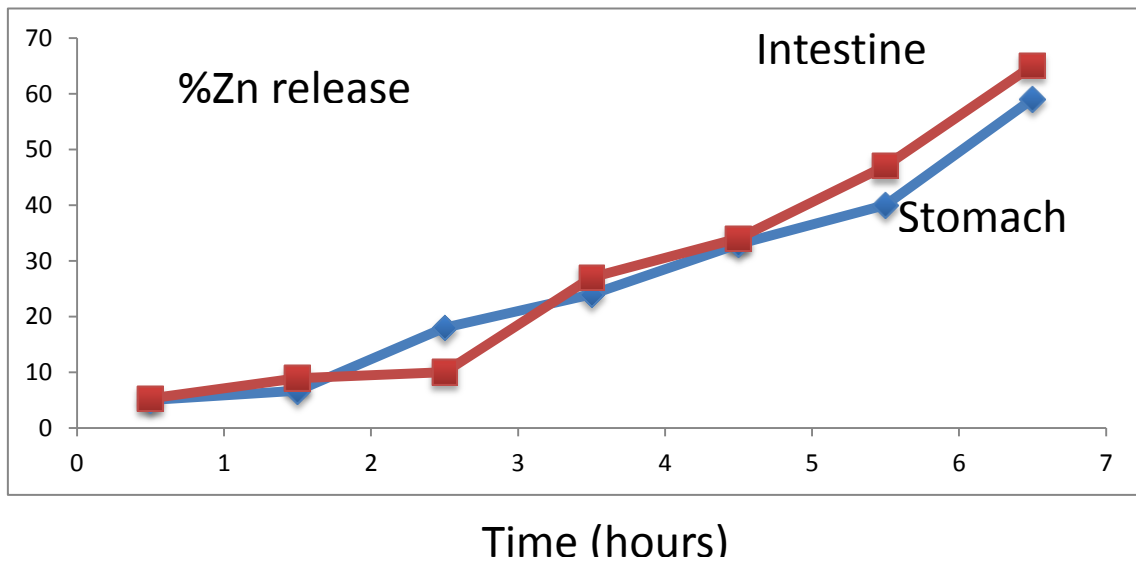


FIG. 7

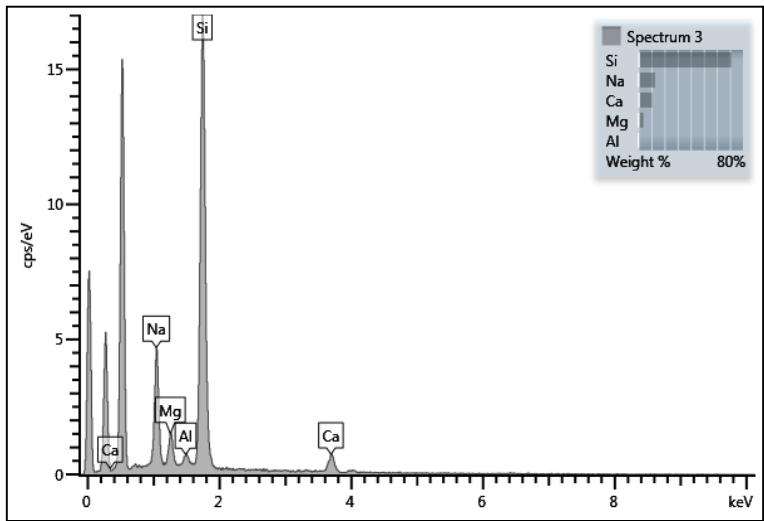
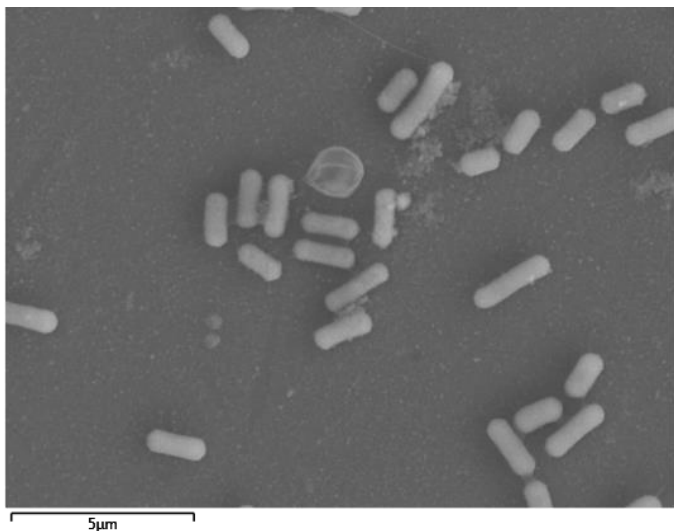


FIG. 8

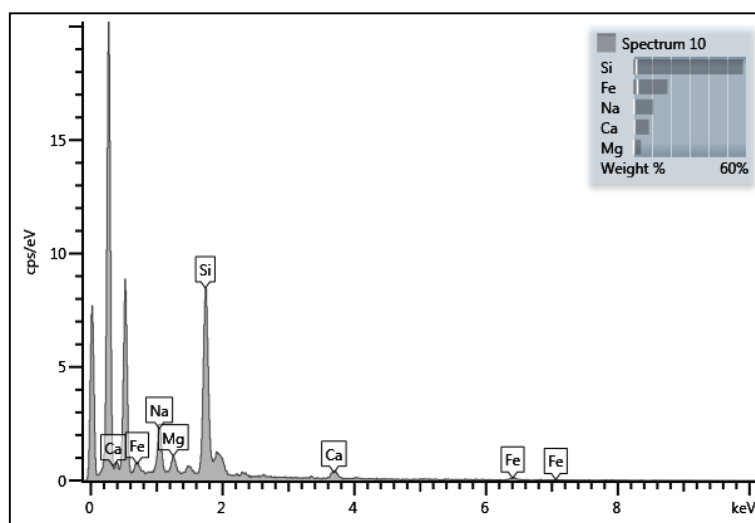
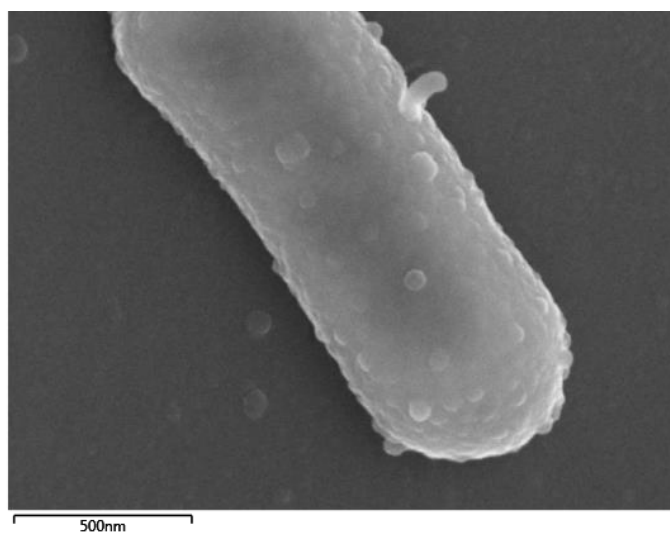


FIG. 9

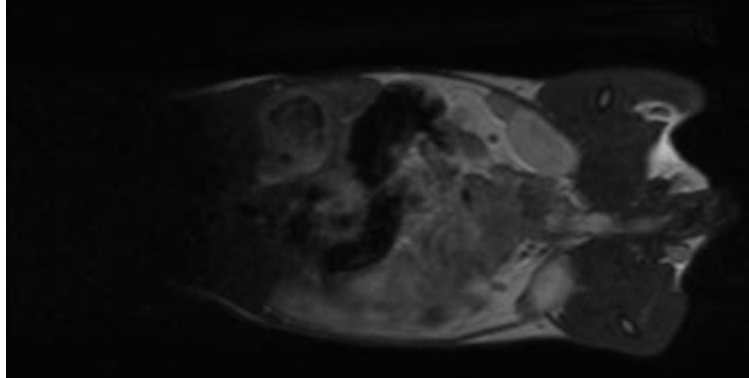


FIG. 10

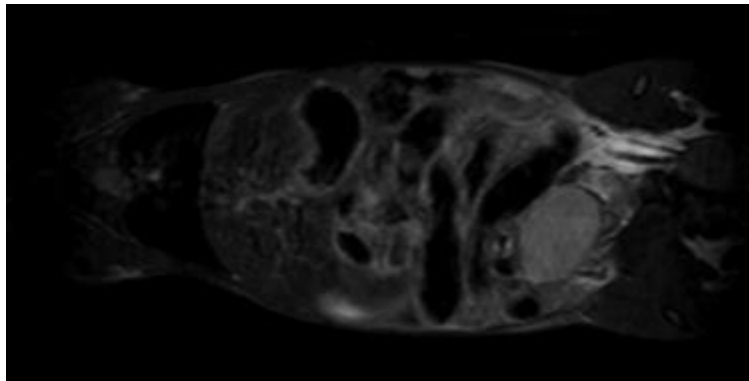


FIG. 11

4.1 NanoPROB. A new approach for iron supplement. First in vivo studies of biodistribution and degradation.

Minerals are one of the five main groups of nutrients necessary for life. Micronutrient malnutrition affects over 50% of the world population. In particular, iron deficiency is considered a public health problem in most developing countries. In developed countries, there are also serious problems of mineral deficiency due to inadequate eating habits, because comfort and pleasure have come to prevail regarding health. The daily intake of Fe is 1-2 mg, which corresponds approximately to the amount of iron that is lost daily due to flaking, and other forms of menstrual blood loss.

Dietary iron exists as Fe(II) and Fe(III). Fe(II) can pass and penetrate the enterocytes through DMT1 divalent metal ions¹. Furthermore, Fe(II) can pass, as porphyrin-Fe(II) introduced in the enterocyte, via not well-determined specific channels. .

Fe(III), the most important form of iron in the diet, should therefore be reduced to Fe(II) by the action of an iron-reductase in the Dcytb channels, before absorption. This is the reason why some reducing molecules, such as ascorbic acid or citric acid, increase iron absorption.

If iron is required for hemoglobin synthesis in bone marrow, then the enterocyte introduces it to the bloodstream through ferroportin channels¹. Ferroportin only recognizes Fe(II), and the only iron-binding protein in blood, transferrin, only captures and transports Fe(III). Therefore, a ferroxidase protein is required to oxidize Fe(II) to Fe(III). A level of enterocytes, this protein is hephaestin, a multi-copper protein that plays a crucial role in the transfer of iron from enterocyte to plasma. Once captured by transferrin, the iron is transported to all body cells.

Iron is essential for synthesis of hemoglobin (hemoglobin molecule contains four iron atoms). The direct consequence of iron deficiency (ID) is a reduction of hemoglobin synthesis and an increase in the number of mitosis caused microcytosis erythroblasts and hypochromia². The main consequence of the ID is anemia (IDA). IDA consequences are very serious and are associated with psychomotor development, reducing job growth, lower resistance to infections, behavioral changes such as pica (desire to eat nonfood items such as ice) restless

legs syndrome, membrane-esophageal dysphagia, functional impairment and decreased cognitive function, especially in elderly adults³.

Whatever the reason for ID, it should always be treated, to correct the anemia and replenishing the body's reserves through iron supplements, either oral or intravenous.

To increase daily oral intake of iron, supplements have been marketed containing several different forms of this metal, as inorganic salts, such as ferrous sulfate, or organic, such as iron citrate, iron fumarate, etc.

Iron inorganic salts have very low bioavailability. Organic salts, commonly based gluconate, citrate, fumarate or other molecules, have a higher systemic effect. Therapeutic doses of oral iron supplements (200 mg / day), which are prescribed for iron deficiency, can cause gastrointestinal side effects such as nausea, vomiting, constipation, diarrhea, dark stools and / or abdominal pain.

The administration of intravenous iron is not entirely effective, and also creates problems because the iron is not metabolized, leading to the formation of reactive oxygen species. In fact, Fe(II) catalyzes the conversion of endogenous hydrogen peroxide to hydroxyl radical (OH·) which is the most reactive cytotoxic known free radical, capable of generating lethal tissue damage.

There is therefore a need to provide new formulations for iron supplementation with minimal gastrointestinal side effects and high efficiency.

Because probiotic bacteria such as Bifidobacteria and Lactobacillus nest in human intestines and have beneficial effects in humans, they are good candidate to be used as iron carriers and deliverers, in order to adequately assimilate the daily requirement of iron in anemic patients without toxic sides.

Results and Discussion.

Data of Fe contents in the different tissues of the gastrointestinal tract (Figure 1) show that ingestion of NanoPROB increases the iron level in the small (76.13 mg/Kg) and large (94.74 mg/Kg) intestines of anemic rats, which are the tissues where iron absorption takes place. Note that the increase of iron in intestines is more effective with NanoPROB than with single nanoparticles (56.92 and 62.72 mg/Kg in SI and LI, respectively) or iron salt (70.79 and 87.19 mg/Kg in SI and LI, respectively).

In the stomach, however, the iron increase in anemic rats was lower when NanoPROB was administered than for other supplement forms, included those fed with a normal diet (healthy). It suggests that NanoPROB, go through the stomach and carry the iron nanoparticles to specific tissues, where they preferentially nest (intestines). Surprisingly, iron content in cecum is slightly lower (46.74 mg/Kg) in the NanoPROB diet than in the others, despite the fact that cecum is one of the main nests for the bacteria in rodents. This apparent contradiction can be explained by analyzing the data from the following experiment measuring ac magnetic susceptibility.

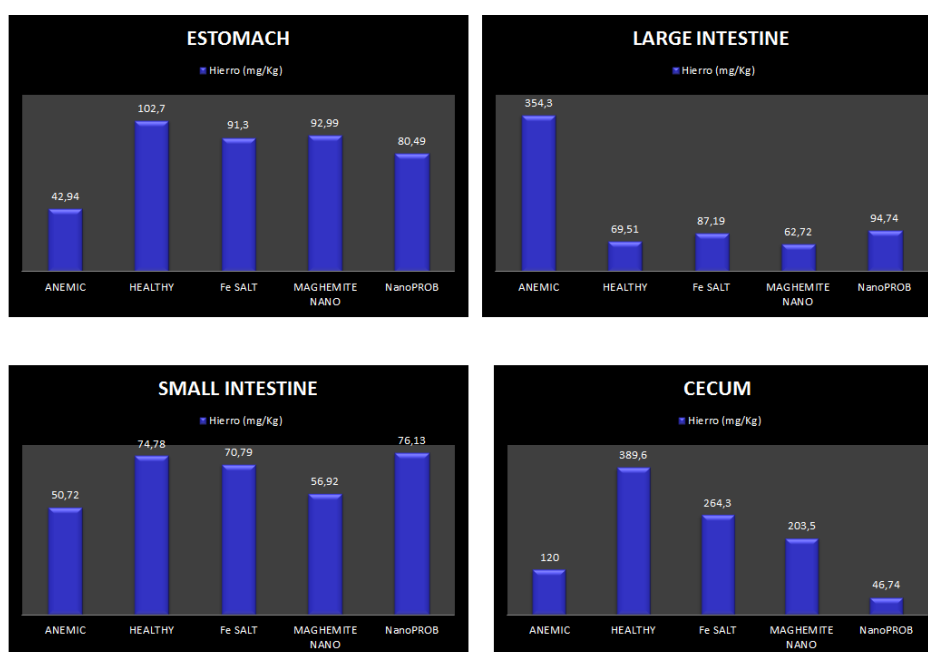


Figure 1. Iron content in different rats' tissue after NanoPROB administration

The temperature dependence of the AC magnetic susceptibility measurements is shown in Fig. 1 for maghemite nanoparticles (NPs) and NanoPROB (bacteria with NPs). The out-of-phase susceptibility maximum located around 140K, together with the in-phase susceptibility maximum located at higher temperatures (around 180 K) indicates a relaxation phenomenon. The temperature location of this maximum is related to the particle size and degree of aggregation[1], and acts as a fingerprint for the identification of the presence of these compounds in tissue samples. In addition, the AC magnetic susceptibility of the administered

compounds per mass of iron, serves as a calibration curve for the quantitative determination of the presence of the particles in tissue samples.

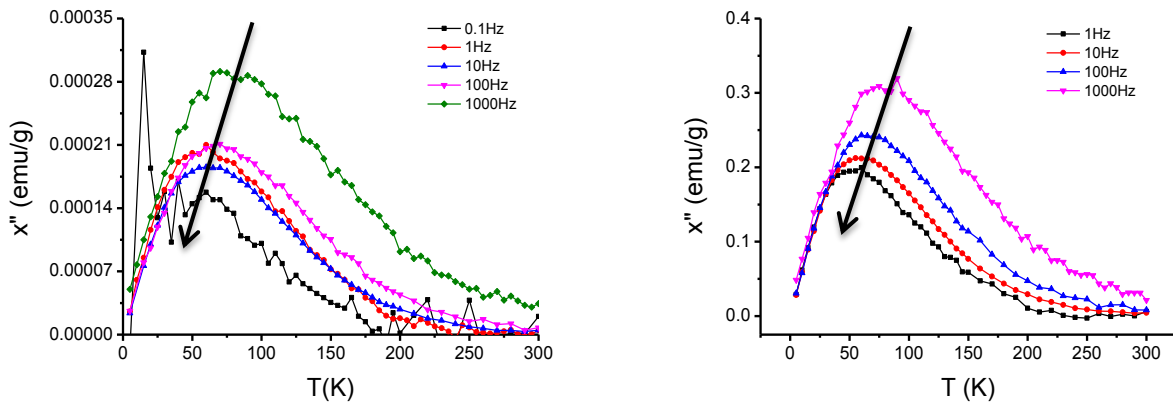


Fig. 2. Temperature dependence of the in-phase (left) and out-of-phase (right) magnetic susceptibility per mass of sample of the maghemite nanoparticles (NPs) and nanoPROB (bacteria-maghemite).

The AC magnetic susceptibility results from the tissue samples from the animals treated with the NPs and NanoPROB are shown in Figures 2 and 3. In all the analysed tissues, the presence of a maximum in both the in-phase and out-of phase components of susceptibility shows the presence of magnetic particles in the tissues. The height of these maxima is related to the number of particles. Therefore, it can be concluded that a greater number of particles is accumulated in the cecum in comparison with the rest of the tissues.

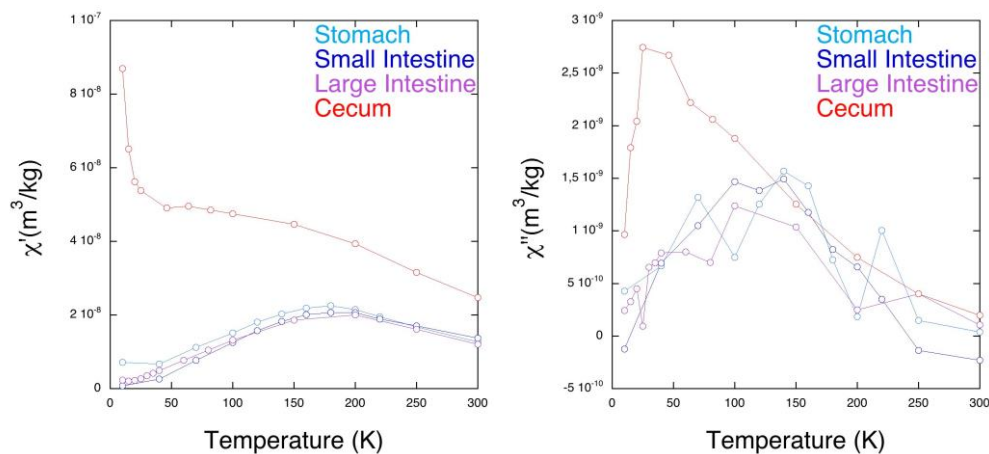


Figure 3. Temperature dependence of the in-phase (left) and out-of-phase (right) magnetic susceptibility per mass of sample for different tissues from the rats treated with NPs.

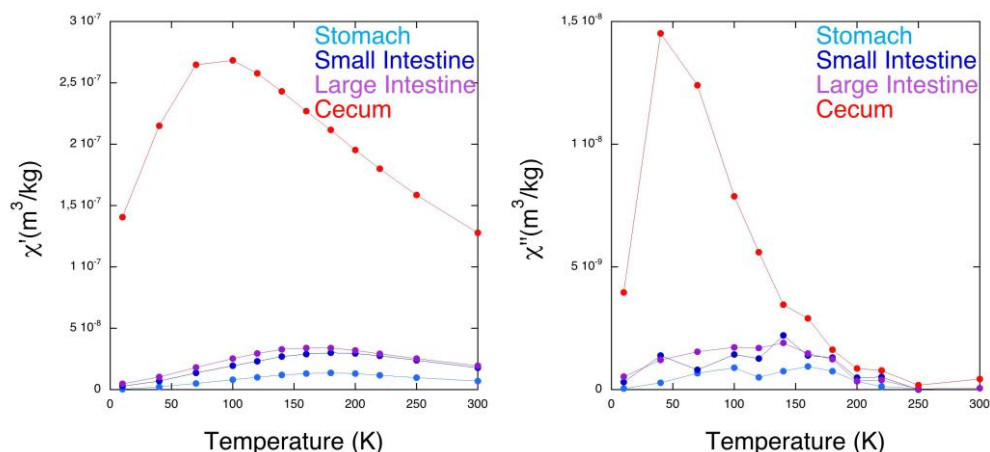


Figure 4. Temperature dependence of the in-phase (left) and out-of-phase (right) magnetic susceptibility per mass of sample of different tissues from the rats treated with NanoPROB.

The number of particles accumulated in each tissue has been calculated following the protocols described in previous works^{4,5}, using the NPs as the standard reference. It has to be taken into account that this reference remains valid while the location in temperature of the out-of-phase susceptibility maximum does not change. Thus, the quantification protocol will render exact values for all tissues except for the cecum.

Results for the quantitative determination of the presence of particles in the tissues are shown in Table 1. These results agree with the results from element analysis.

[Fe] (mg Fe/g dry tissue)	NPs	NanoPROB
	Stomach	0.027
Small Intestine	0.03	0.04
Large Intestine	0.025	0.038
Cecum	>0.055	> 0.3

Table 1. Iron concentration in the form of magnetic nanoparticles calculated from the magnetic measurements.

From these results, some conclusions can be drawn:

- (i) The concentration of magnetic nanoparticles is slightly higher in cecum than in other tissues. This is in agreement with specific bacteria accumulation in cecum due to their affinity for nesting at this site.
- (ii) Particles localized in the cecum have suffered degradation as the blocking temperature has shifted to a considerably lower temperature (80 K) with respect to that of NanoPROB (200 K) or that of isolated 10 nm - maghemite nanoparticles (170 k). This is as consequence of the decrease in particle size due to their degradation.
- (iii) The magnetic nanoparticles fixed to the stomach, small intestine and large intestine have suffered less degradation than those of the cecum, since their blocking temperature found in the in-of-phase components of the AC susceptibility is lower than the starting NanoPROB particles (Figure 2).
- (iv) The biodegradation pattern of maghemite nanoparticles of NanoPROB is different to that of isolated maghemite nanoparticles. As it can observed in Figure 3, in the in-of-phase components of the AC susceptibility, when maghemite nanoparticles (without the presence of probiotic bacteria) were administered to rats, the particles suffer higher degradation, leading to the presence of paramagnetic iron atoms at the cecum, which are responsible for the increase in the out-of-phase AC susceptibility at low temperatures.

These results collectively indicate that NanoPROB is a good carrier for magnetic nanoparticles through the gastrointestinal tract and can accumulate to facilitate slow iron delivery. Furthermore, this explains why the percentage of iron in the cecum is low even though the nanoparticle concentration is a maximum in this tissue. Therefore, the cecum is revealed as the tissue where NanoPROB allows greater concentration of nanoparticles, such that most of the existing iron is in the form of nanoparticles.

References

1. Anderson, G. J., Frazer, D. M. & McLaren, G. D. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **25**, 129–135 (2009).
2. Jolobe, O. M. P. *Clin. Lab. Haematol.* **22**, 79–80 (2000).
3. Zhu, A., Kaneshiro, M. & Kaunitz, J. D. *Dig. Dis. Sci.* **55**, 548–559 (2010).
4. Gutierrez L, Morales MP, Lazaro FJ. *PCCP.* 2014;16:4456-64.
5. López A, Gutiérrez L, Lázaro FJ. *Phys Med Biol.* 2007;52(16):5043-56.

Conclusiones

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ilustra el potencial de usar microorganismos para la creación de nanoestructuras con propiedades fascinantes y aplicaciones en el campo biomédico. Al igual que en otros ejemplos descritos en bibliografía que utilizan diferentes microorganismos, los procedimientos químicos utilizados en este trabajo para la producción de los materiales han sido siempre “eco-friendly”: temperaturas suaves, presión atmosférica y sin uso de disolventes o reactivos tóxicos. Una novedad importante es que hemos demostrado que se puede realizar nanoquímica con microorganismos convencionales, producidos a gran escala y además beneficiosos para la salud (probióticos), lo que incrementa las posibilidades de aplicaciones biomédicas reales.

De forma más explícita, los objetivos obtenidos en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Las S-layer pueden ser utilizadas como biotemplates para la deposición controlada de nanopartículas de imanes moleculares basadas en compuestos de coordinación. Hasta la actualidad, los escasos ejemplos reportados en bibliografía consistían en nanopartículas de metales nobles. En este sentido, el ejemplo descrito en esta Tesis Doctoral viene a demostrar que la aproximación de usar S-layer para la formación de nanoestructuras ordenadas es válida en el mundo de los materiales moleculares.
2. Se puede hacer uso de una bacteria probiótica, como *L. Fermentum*, para su uso como plataforma donde incorporar nanopartículas. Esta incorporación tiene lugar a nivel de los EPS de la bacteria por lo que el desarrollo del mismo es determinante para incrementar el número de partículas por bacteria. Además esta nueva metodología para crear nanoestructuras permite el control del número de nanopartículas/bacterias controlando el desarrollo de los EPS y la estequiometría partícula/bacteria.
3. La deposición de nanopartículas magnéticas de maghemita en el biofilm de *L. Fermentum* posibilita la interacción dipolar entre ellas y permite un incremento notable de sus propiedades magnéticas. De esta forma, hemos logrado crear, a partir de nanopartículas superparamagnéticas (maghemita 10 nm), un imán a temperatura ambiente.

4. La incorporación de nanopartículas de maghemita a los EPS de la bacteria no conlleva la muerte celular y más aún, controlando las condiciones del cultivo bacteriano, las bacterias alcanzan niveles de proliferación adecuados, no muy lejanos de las bacterias probióticas de partida. Esto se traduce en que los imanes obtenidos tras deposición de nanopartículas de maghemita sobre *L. Fermentum* son imanes vivos. Probablemente el primer imán vivo sintetizado en un laboratorio.
5. Que estos imanes vivos se alinean en presencia de un campo magnético externo, “simulando” a las bacterias magnetotácticas naturales.
6. Puesto que el sistema *L. Fermentum* con nanopartículas de maghemita es un imán vivo que puede proliferar, al llevarse a cabo la división celular, el número de nanopartículas magnéticas por bacteria disminuye, la interacción dipolar entre partículas disminuye (menos partículas, mayor distancia entre ellas) y por consiguiente, las propiedades magnéticas del sistema evolucionan espontáneamente con el crecimiento bacteriano. Fruto de esta evolución, la temperatura de bloqueo, que define la transición del régimen superparamagnético al ferromagnético, va decreciendo.
7. La enorme cantidad de nanopartículas de maghemita que pueden ser incorporada a la bacteria hace que el número de átomos de Fe/bacteria sea también elevadísimo, pudiéndose alcanzar concentraciones de Fe del orden de 295 mgFe/g bacteria, con valores de proliferación bacteriana de $6,7 \cdot 10^8$ CFU.
8. El hecho de poder concentrar tanta cantidad de hierro sin afectar de forma significativa la viabilidad bacteriana hace que el sistema desarrollado en esta Tesis Doctoral formado por *L. Fermentum* con nanopartículas de maghemita sea un candidato firme para usarlo como suplemento de Fe, en alimentación o como fármaco. Los mejores datos obtenidos en esta Tesis Doctoral alcanzan valores de concentración de Fe de 295 mg/g liófilo y de viabilidad celular de $6,7 \cdot 10^8$ CFU.
9. Estudios llevados a cabo *in vivo* (ratas) ponen de manifiesto que las bacterias hacen de “carriers” de las nanopartículas magnéticas y permiten la acumulación de éstas en el intestino delgado y ciego, que son justamente los tejidos donde las bacterias probióticas anidan y colonizan de forma

preferencial. Además, estudios de susceptibilidad magnética AC sobre los diferentes tejidos del aparato digestivo ponen de manifiesto que la degradación que sufren las partículas en el estómago es mínima y que logran alcanzar el intestino delgado y grueso como tal, con una disminución de tamaño y un descenso en su temperatura de bloqueo.

10. Ensayos preliminares in vivo (ratones) han confirmado que el sistema *L. Fermentum* – nanopartículas de maghemita pueden servir como agentes de contraste en Resonancia Magnética de Imagen (MRI) para la visualización de tejidos del aparato digestivo, lo que incrementa el interés de este sistema y deja entrever su potencial para el diagnóstico de patologías digestivas mediante MRI.