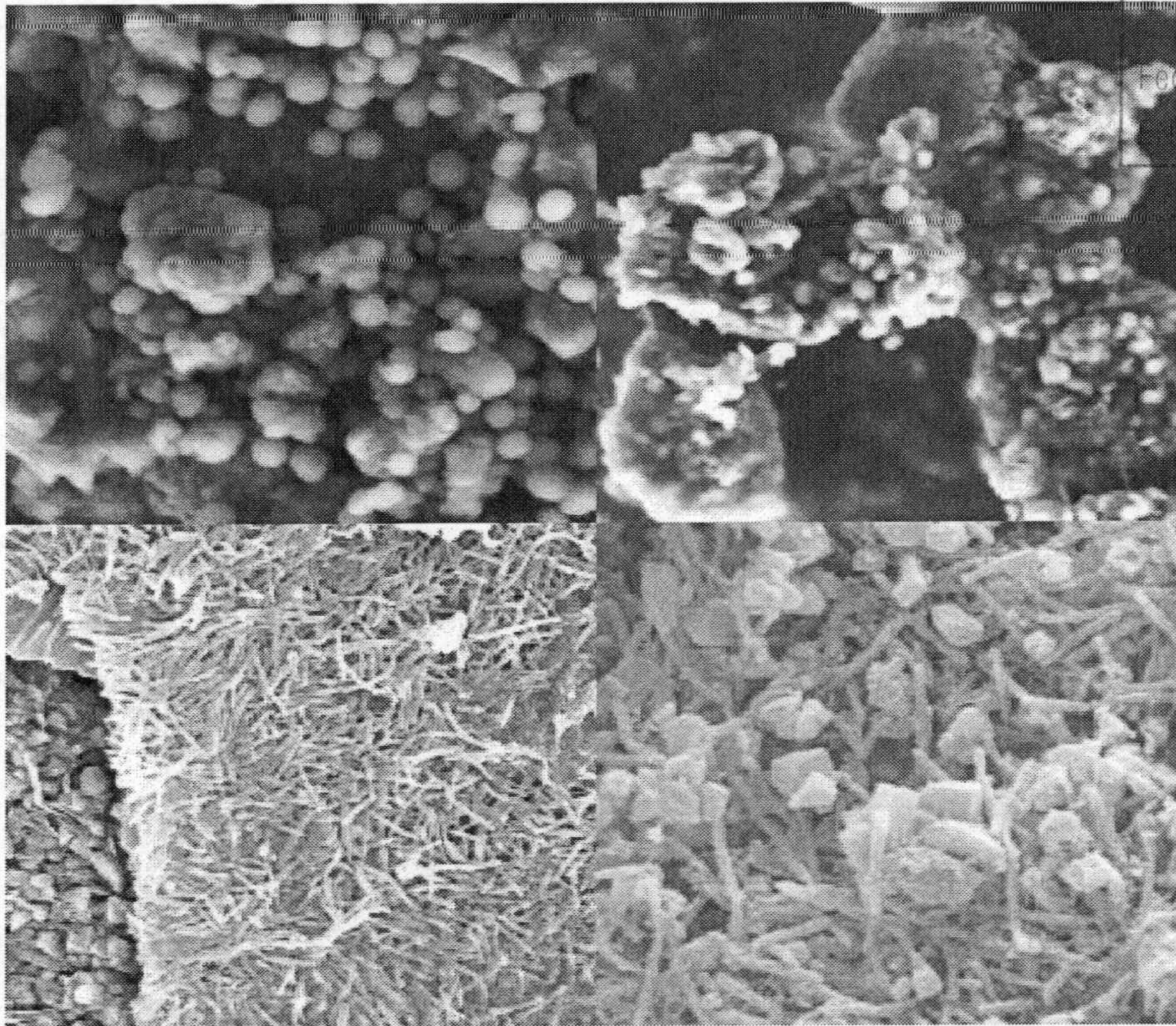




**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ..... 1/6/04 .....  
TRADA NUM. 1904 .....



**INTERRELACIONES ENTRE *Myxococcus xanthus* Y  
METALES PESADOS: ASPECTOS BÁSICOS Y  
POSIBLES APLICACIONES**

**TESIS DOCTORAL**

**Dña. FADWA JROUNDI**

**Granada, 2004**

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA**  
N.º Documento b 16498276  
N.º Copia i 17818710

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**20 MAYO 2004**  
**COMISION DE DOCTORADO**

Biblioteca Universitaria de Granada  
  
01255428



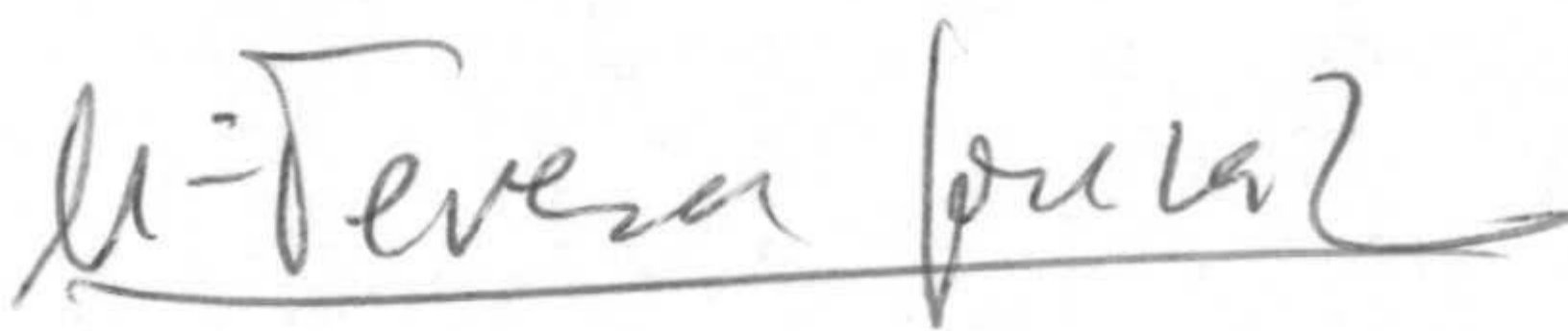
---

Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Granada

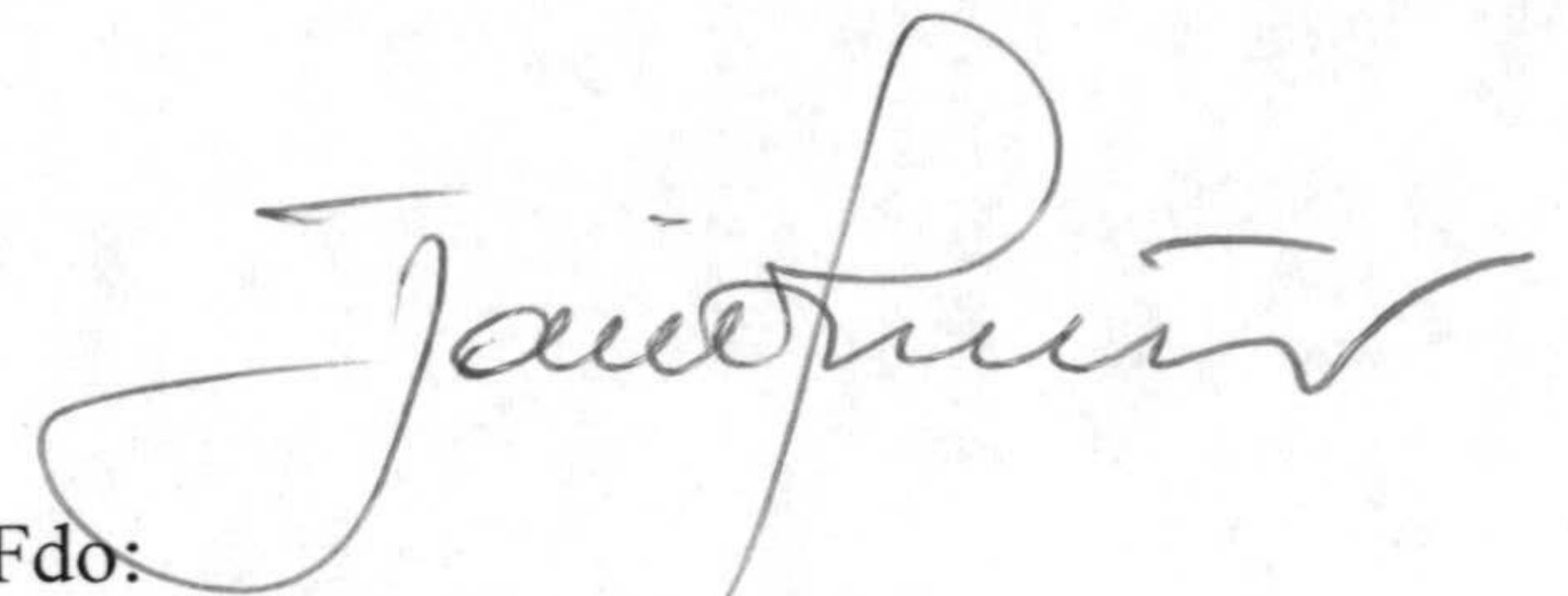
**INTERRELACIONES ENTRE *Myxococcus xanthus* Y METALES PESADOS:  
ASPECTOS BÁSICOS Y POSIBLES APLICACIONES**

Memoria presentada por la licenciada en Biología Dña Fadwa Jroundi para aspirar  
al grado de doctor

VºBº los directores

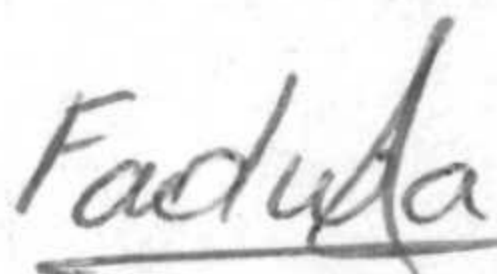


Fdo:  
Dra. Mª Teresa González Muñoz  
Catedrática de Microbiología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Granada



Fdo:  
Dr. José Mª Arias Peñalver  
Catedrático de Microbiología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Granada

La Doctoranda



Fdo:  
Dña. Fadwa Jroundi

---



---

**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante los años 1999-2004, dentro del grupo de Investigación Mixobacterias.**

**Para realizar este trabajo de investigación la doctoranda disfrutó de una Beca a cargo de proyecto financiado por la Fundación Empresa-Universidad de Granada durante los años 2002-2003 y de una Beca a cargo del proyecto BIOCON (2004).**

---



*Dedico todo mi trabajo y esfuerzo a mis Padres, a  
mis hermanos y de forma muy especial a Mourad.  
A ellos, por todo el cariño y apoyo que siempre  
supieron darme.*



---

## AGRADECIMIENTOS

*Al finalizar esta Tesis Doctoral me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que de un modo u otro, con su colaboración y esfuerzo, han contribuido en su realización.*

*Deseo agradecerle a los directores de este trabajo, los profesores M<sup>a</sup> Teresa González Muñoz y José M<sup>a</sup> Arias Peñalver por su inmensa ayuda, disponibilidad y orientación, les agradezco haber estado siempre presentes en los momentos claves.*

*A Dr. Concepción Jiménez la gran ayuda que me prestó en todo momento y sus valiosos consejos en todos los aspectos.*

*Al Prof. Dr. Manuel Rodríguez Gallego, por sus valiosos comentarios científicos, su disponibilidad, y su colaboración en la elaboración e interpretación de los datos cristalográficos y mineralógicos.*

*Al Dr. Mohamed Larbi Merroun por su valiosa ayuda que me prestó en todo momento y sobre todo por su enorme colaboración en la realización de este trabajo.*

*Al Prof. Dr. Jesús González López por las facilidades y acogida que en todo momento mostró para la realización de este trabajo.*

*Al personal del Instituto del Agua por su valiosa ayuda sobre todo a Doña Clementina y Ramiro.*

*Al personal de microscopía electrónica y laboratorio de preparación de muestras de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Especialmente a Alicia, Conchi y Juan de Dios.*

*A los profesores del Departamento, por su amistad, interés y colaboración en los momentos necesarios.*

*A mis amigas y compañeras de laboratorio Zakia y Chiara por su amistad, ayuda y apoyo.*

---



---

*A todos los compañeros/as del Departamento, por los buenos momentos compartidos y en especial a mis amigos Samir, Samira, Fouad, Matilde, Marina, Arantxa, Platero, Jessica, Pedro, Esther, Manolo, por su constante apoyo, amistad y ánimos durante estos años, y a todo el personal del Departamento sobre todo Mari carmen y Conchi.*

*Quiero expresar mi más profunda gratitud a Dra. María Teresa González Muñoz por su apoyo constante en todo momento, su valiosa ayuda y por estar a mi lado en los momentos difíciles. Nunca se me olvidará.*

*A mis amigas y compañeras de piso Raquel, Paqui, Esther y Elena por su apoyo, ayuda y por los buenos momentos que pasamos juntos. Nunca me olvidaré de vosotras.*

*A Mourad por su amor, comprensión, y sacrificio que me esta ofreciendo en todo momento. Quiero agradecerte lo que has hecho por mi pero con palabras me resulta muy difícil hacerlo. Muchas gracias.*

*Por último (aunque no por ello menos importante), quiero agradecer a toda mi familia, especialmente a mi madre, mi padre, mi abuela y mis hermanos Nahla, Driss, Khawla, Kenza y a la pequeña Khadija por su apoyo, sacrificio, estímulo y paciencia constantes que han demostrado con creces durante todo este tiempo. Sin vuestra ayuda nunca hubiera podido ver mi sueño realizado.*

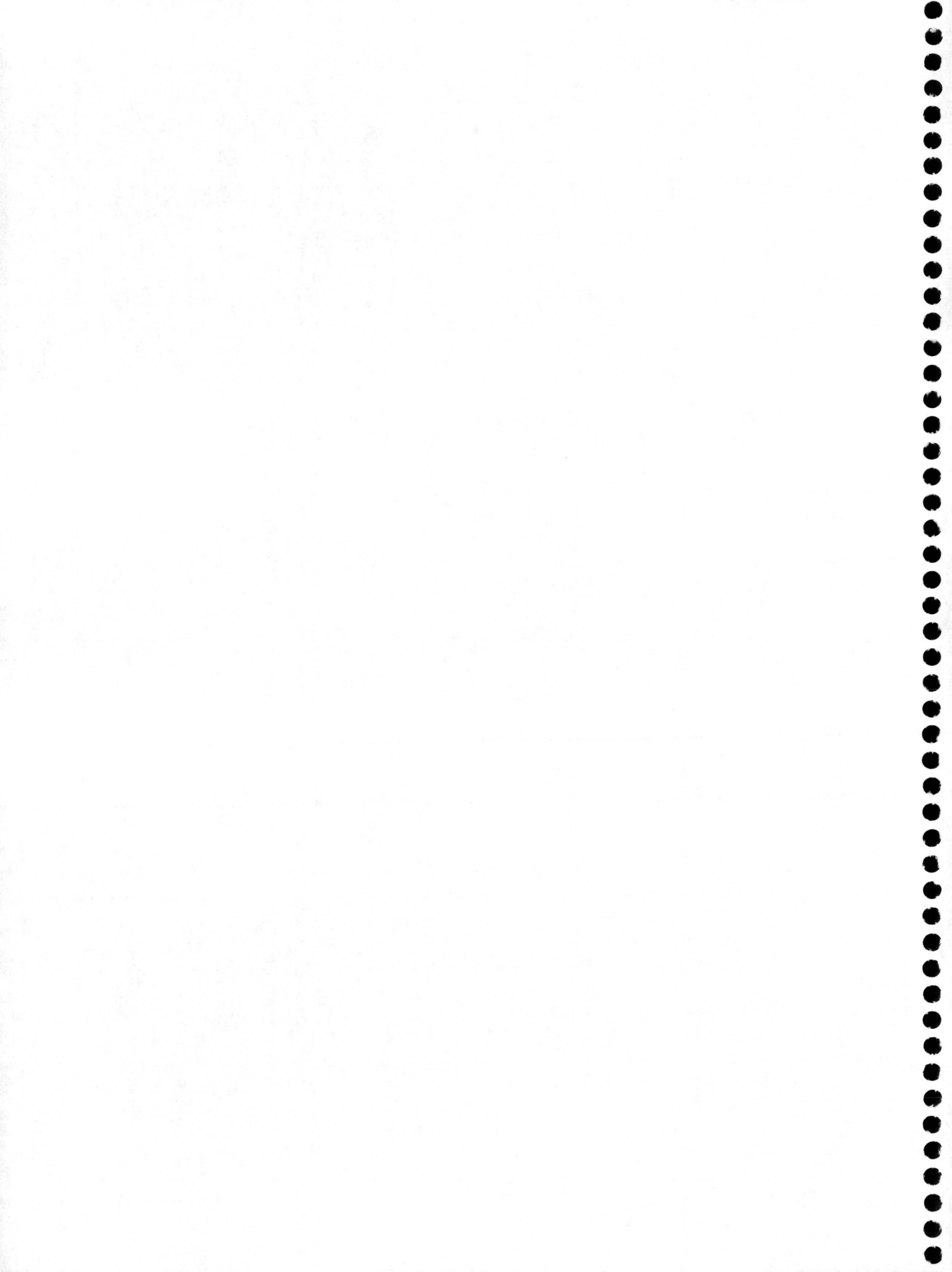
*A todos y a cada uno, Gracias.*

---



*ÍNDICE*







|   |    |
|---|----|
| <i>I. INTRODUCCIÓN</i> .....  | 1  |
| CAPITULO I: MIXOBACTERIAS.....  | 3  |
| 1.- ESTRUCTURA CELULAR.....   | 5  |
| 2.- MOVILIDAD.....  | 9  |
| 3.- NUTRICIÓN Y METABOLISMO.....  | 13 |
| 4.- CICLOS DE VIDA.....   | 15 |
| 5.- LAS MIXOBACTERIAS EN LA NATURALEZA.....   | 23 |
| CAPITULO II: METALES PESADOS Y MICROORGANISMOS.....   | 24 |
| 1.- LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS.....   | 26 |
| 2.- EFECTOS TÓXICOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS.....  | 27 |
| CAPITULO III: BIOREMEDIO DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS.....                                   | 29 |
| 1.- ELIMINACIÓN DE METALES POR PRECIPITACIÓN ASOCIADA A BIOMINERALIZACIÓN.....                          | 31 |
| 1.1.- Precipitación de carbonatos.....  | 32 |
| 1.2.- Precipitación de fosfatos.....  | 33 |
| 2.- ELIMINACIÓN DE METALES POR BIOADSORCIÓN.....  | 34 |
| 2.1.- Bioadsorción de metales por microorganismos.....  | 35 |
| 2.2.- Bioadsorción por polímeros microbianos.....   | 39 |
| 2.3.- Determinación de los grupos funcionales implicados en la interacción con los metales pesados..... | 41 |
| 2.3.1.- Espectroscopía de infrarrojos (IRS).....  | 42 |
| 2.3.2.- Espectroscopía de absorción expandida de rayos X para determinación de estructura fina.....     | 43 |
| 3.- BIOPELÍCULA.....  | 44 |
| 3.1.- Formación y estructura de una biopelícula.....  | 46 |
| 3.2.- Importancia del polisacárido extracelular EPS en la biopelícula.....                              | 49 |
| <i>II.- OBJETIVOS</i> .....   | 51 |
| <i>III.- MATERIAL Y MÉTODOS</i> .....   | 56 |
| 1.- MICROORGANISMOS.....  | 58 |



|   |    |
|---|----|
| 2.- MEDIOS DE CULTIVO.....  | 58 |
| 2.1.- MEDIOS DE CONSERVACIÓN, MANTENIMIENTO Y<br>CRECIMIENTO BACTERIANO.....                      | 58 |
| 2.2.- MEDIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE MINERALES.....   | 60 |
| 2.2.1.- Medios para la producción de carbonatos.....  | 61 |
| 2.2.1.- Medios para la producción de fosfatos.....  | 61 |
| 3.- TÉCNICAS GENERALES Y ESPECIALES.....  | 62 |
| 3.1.- MODALIDADES DE CULTIVO.....   | 62 |
| 3.1.1.- Cultivos en medios líquidos.....  | 62 |
| 3.1.2.- Cultivos en medios sólidos.....   | 62 |
| 3.2.- MEDIDAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....  | 63 |
| 3.3.- MEDIDAS DE pH.....  | 63 |
| 3.4.- CURVAS DE CRECIMIENTO.....  | 63 |
| 4.- TOXICIDAD DE METALES.....   | 64 |
| 4.1.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE METALES.....   | 64 |
| 4.1.1.- Tabla de reactivos usados.....  | 64 |
| 4.1.2.- Preparación.....  | 64 |
| 4.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA<br>INHIBITORIA (CMI).....                          | 65 |
| 4.3.- CURVAS DE CRECIMIENTO CON METALES.....  | 65 |
| 4.4.- INFLUENCIA DE LOS METALES EN EL CICLO DE VIDA.....  | 66 |
| 4.4.1.- Comprobación del crecimiento de la bacteria en presencia de la<br>CMI de los metales..... | 66 |
| 4.4.2.- Estudio del movimiento.....   | 66 |
| 4.4.3.- Obtención de cuerpos fructificantes.....  | 66 |
| 5.- CAPTACIÓN DE METALES.....   | 67 |
| 5.1.- BIOADSORCIÓN POR MICROORGANISMOS.....   | 67 |
| 5.1.1- Bioadsorción de plata por células proliferantes de <i>M.</i><br><i>xanthus</i> .....       | 67 |
| 5.1.1.1.- Proceso seguido.....  | 67 |
| 5.1.1.2.- Preparación de las muestras para la observación de la<br>plata acumulada.....           | 67 |



|  |    |
|--|----|
| 5.1.2.- Bioadsorción de metales por biomasa no proliferante.....   | 68 |
| 5.1.3.- Bioadsorción de uranio.....  | 69 |
| 5.1.3.1.- Preparación de biomasa para análisis mediante espectroscopía de infrarrojos (IRS).....                             | 69 |
| 5.1.3.2.- Preparación de biomasa para análisis mediante espectroscopía de EXAFS.....   | 69 |
| 5.2.- FORMACIÓN DE MINERALES EN PRESENCIA DE METALES PESADOS E INCORPORACIÓN DE ESTOS ÚLTIMOS EN LOS MINERALES FORMADOS..... | 70 |
| 5.2.1.- Producción de fosfatos en presencia de metales.....  | 70 |
| 5.2.2.- Producción de carbonatos en presencia de metales.....  | 70 |
| 6.- TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS CRISTALES.....   | 71 |
| 6.1.- A PARTIR DE MEDIOS LÍQUIDOS.....   | 71 |
| 6.2.- A PARTIR DE MEDIOS SÓLIDOS.....  | 71 |
| 7.- ENSAYOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE <i>M. xanthus</i> Y BIOADSORCIÓN DE METALES PESADOS POR LA MISMA...   | 72 |
| 7.1.- ESTABLECIMIENTO DE LA BIOPELÍCULA DE <i>M. xanthus</i> .....   | 72 |
| 7.2.- UTILIZACIÓN DE LA BIOPELÍCULA PARA BIOADSORCIÓN DE METALES.....  | 73 |
| 8.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA OBSERVACIÓN Y ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....                                  | 74 |
| 8.1.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....  | 74 |
| 8.2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....  | 74 |
| 9.- DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).....   | 75 |
| 10.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS FT-IR.....  | 75 |
| 11.- ESPECTROSCOPIA EXAFS.....   | 76 |
| 12.- ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....  | 76 |
| IV.- RESULTADOS.....   | 77 |
| CAPITULO I: INFLUENCIA DE DIFERENTES METALES PESADOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i> .....      | 79 |



|  |     |
|--|-----|
| 1).- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS DISTINTOS IONES METÁLICOS (CMI).....  | 79  |
| 2).- ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE <i>M. xanthus</i> EN PRESENCIA DE DISTINTOS METALES PESADOS.....                               | 80  |
| 3).- INFLUENCIA DE DISTINTOS METALES SOBRE EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i> .....   | 81  |
| A).- Efecto de los metales sobre la cepa 422 de <i>M. xanthus</i> .....  | 84  |
| B).- Efecto de los metales sobre las distintas cepas de <i>M. xanthus</i> .....  | 89  |
| CAPITULO II: BIOADSORCIÓN Y FIJACIÓN DE METALES PESADOS POR <i>M. xanthus</i> .....  | 94  |
| 1.- FIJACIÓN DE METALES POR CEPA PROLIFERANTE DE <i>M. xanthus</i> . EL CASO DE LA PLATA.....                                  | 94  |
| 2.- FIJACIÓN DE URANIO POR CEPA NO PROLIFERANTE DE <i>M. xanthus</i> . ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE LOS COMPLEJOS FORMADOS..... | 97  |
| 2.1.- Determinación de los grupos funcionales por Espectroscopía de Infrarrojos.....   | 98  |
| 2.2.- Determinación de la naturaleza de los grupos funcionales por espectroscopía EXAFS.....                                   | 102 |
| 3.- FIJACIÓN DE METALES POR MINERALES PRECIPITADOS POR <i>M. xanthus</i> .....   | 104 |
| 3.1.- Precipitación de fosfatos.....   | 105 |
| 3.2.- Precipitación de carbonatos.....   | 109 |
| CAPITULO III: BIOPELÍCULA.....   | 116 |
| 1.- FORMACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LA BIOPELÍCULA DE <i>M. xanthus</i> 422.....  | 116 |
| 2.- INFLUENCIA DE LOS METALES PESADOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE <i>M. xanthus</i> .....  | 122 |
| 3.- ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LAS SOLUCIONES DE METALES PESADOS.....  | 133 |
| V.- DISCUSIÓN.....   | 134 |
| TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS SOBRE <i>M. xanthus</i> .....   | 136 |



|  |     |
|--|-----|
| ABSORCIÓN DE PLATA POR CÉLULAS PROLIFERANTES DE <i>M. xanthus</i> .....  | 147 |
| NATURALEZA DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DE <i>M. xanthus</i> IMPLICADOS EN LA BIOABSORCIÓN DEL URANIO.....          | 151 |
| PRECIPITACIÓN DE MINERALES (FOSFATOS Y CARBONATOS) POR <i>M. xanthus</i> EN PRESENCIA DE METALES PESADOS.....    | 155 |
| FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE <i>M. xanthus</i> SOBRE SOPORTES POROSOS Y BIOADSORCIÓN DE METALES POR LA MISMA..... | 163 |
| <i>VI.- CONCLUSIONES</i> .....   | 169 |
| <i>VII.- BIBLIOGRAFÍA</i> .....  | 173 |



*I.- INTRODUCCIÓN*







## CAPITULO I.- MIXOBACTERIAS

Las mixobacterias son bacilos Gram-negativos típicos que abundan en el suelo y en nichos ecológicos en los que exista materia orgánica en descomposición. Su distribución es prácticamente universal, habiéndose aislado a partir de muestras de suelos de todo el mundo y bajo condiciones climáticas tan amplias que abarcan desde el trópico al ártico.

La primera descripción de mixobacterias data de 1892, año en que Thaxter, cuando se dedicaba a la recolección de hongos en Nueva Inglaterra, observó la presencia de crecimientos de color anaranjado sobre restos vegetales en descomposición. Estos organismos presentaban un aspecto mucoso típico, lo que llevó a Thaxter a incluirlos en un género denominado *Myxobacter* (Thaxter, 1892). Fue este mismo autor quien consiguió, en 1908, cultivar por primera vez estos microorganismos, descubriendo su fase vegetativa unicelular, quedando claro que se trataba de organismos de naturaleza bacteriana.

A pesar de haber transcurrido más de un siglo desde la fecha de su descripción, los conocimientos existentes sobre las mixobacterias han sido adquiridos prácticamente en el transcurso de los últimos 30 años. El motivo de este retraso radica, de una parte, en que hasta entonces los estudios sobre mixobacterias fueron realizados desde un punto de vista casi exclusivamente morfológico y, de otra, porque las técnicas microbiológicas clásicas eran de difícil aplicación al estudio de estas bacterias en medios líquidos.

Las características más notables de las mixobacterias, que las diferencian del resto de las bacterias Gram-negativas, son: a) presentan un movimiento por deslizamiento, b) son microorganismos de hábitos sociales, presentado un alto potencial morfogenético y c) la capacidad de producción de una gran variedad de enzimas y metabolitos secundarios. Estas propiedades no son independientes unas de otras y pueden tener su justificación en el comportamiento social y en la ecología de estos microorganismos (Reichenbach, 1984).



La taxonomía de las mixobacterias está basada casi exclusivamente en caracteres morfológicos, tales como la forma de las células vegetativas y de las mixósporas, la forma y estructura de los enjambres y, especialmente, la morfología de los cuerpos fructificantes. Además, se han utilizado algunos parámetros accesorios como pigmentación, tipos de ácidos grasos y producción de actividades enzimáticas. Desgraciadamente, ninguno de estos caracteres son estables. Así, muchas razas de mixobacterias pueden dar lugar a cuerpos degenerados o incluso dejar de producir totalmente cuerpos fructificantes. En este último caso, todos los intentos para inducir a estas razas a una fructificación normal han sido infructuosos (Reichenbach, 1993). El manual de Bergey de la bacteriología sistemática propone un único orden (Myxococcales), que incluye 4 familias con 8 géneros y 32 especies (Staley *et al.*, 1989).

**Tabla 1.- Clasificación sistemática de las mixobacterias**

| Grupo         | Orden               | Familia                 | Genero              | Especie   |
|---------------|---------------------|-------------------------|---------------------|---|
| Mixobacterias | <i>Myxococcales</i> | <i>Myxococcaceae</i>    | <i>Myxococcus</i>   | <i>fulvus</i><br><i>virescence</i><br><i>xanthus</i><br><i>stipitatus</i><br><i>coralloides</i><br><i>macrosporus</i>   |
|               |                     | <i>Archangiaceae</i>    | <i>Archangium</i>   | <i>gephyra</i>  |
|               |                     | <i>Cystobacteraceae</i> | <i>Cystobacter</i>  | <i>fucus</i><br><i>minus</i><br><i>disciformis</i><br><i>ferrugineus</i>  |
|               |                     |                         | <i>Melittangium</i> | <i>boletus</i><br><i>lichenicola</i><br><i>alboraceum</i>   |
|               |                     |                         | <i>Stigmatella</i>  | <i>aurantiaca</i><br><i>erecta</i>  |
|               |                     | <i>Polyangiaceae</i>    | <i>Polyangium</i>   | <i>vitellinum</i><br><i>luteum</i><br><i>cellulosum</i><br><i>sorediatum</i><br><i>rugiseptum</i><br><i>miror</i><br><i>aureum</i><br><i>spumosum</i><br><i>fumosum</i><br><i>parasiticum</i> |
|               |                     |                         |                     | <i>Chondromyces</i>   |
|               |                     |                         | <i>Nannocystis</i>  | <i>exedens</i>  |



La posición filogenética de las mixobacterias fue establecida en las pasadas décadas, en base a estudios de secuencia del ARNr 16S (Oyaizu y Woese, 1985; Shimkets y Woese, 1992). Como puede observarse en la Figura 1, las mixobacterias son un grupo coherente y están asignadas a la rama  $\delta$  del grupo *Proteobacteria* (conocido como bacterias purpúreas), junto a *Bdellovibrio* y las bacterias reductoras de azufre y sulfatos como parientes remotos mas próximos, no existiendo relación alguna con otras bacterias deslizantes (Shimkets, 1993).

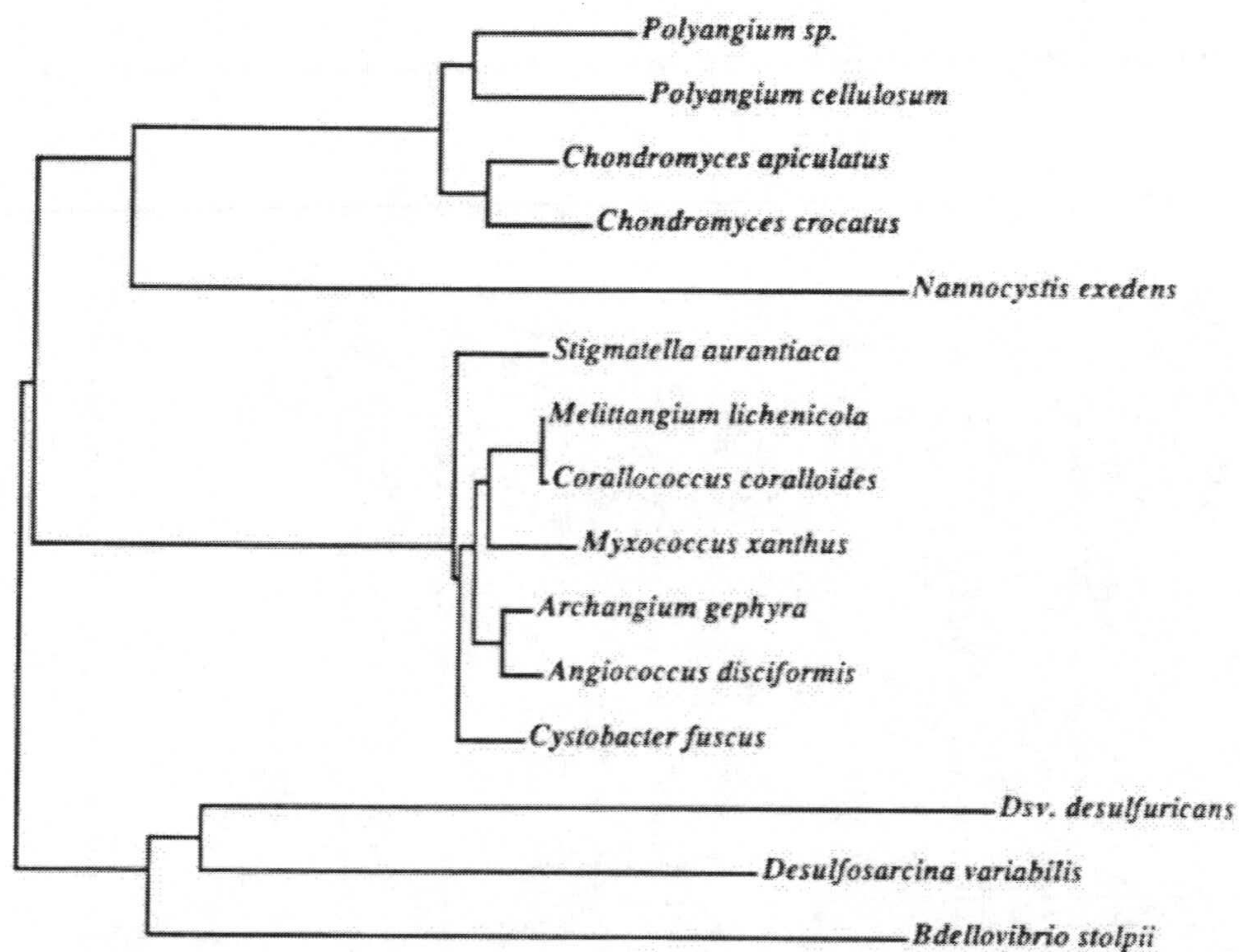


Figura 1.- Árbol filogenético de las mixobacterias, establecido en base a estudios de ARNr 16S.

## 1.- ESTRUCTURA CELULAR

Las células de mixobacterias son bacilos que presentan una morfología de aspecto cilíndrico, con extremos redondeados o, más frecuentemente, afilados que se multiplican por fisión binaria transversal. Las células se encuentran embebidas en un



mucílago más o menos tenaz constituyendo una colonia plana característica que recibe el nombre de “enjambre”. En *Myxococcus xanthus*, el hidrolizado del polisacárido extracelular ésta formado mayoritariamente a base de glucosa, galactosa, manosa y ramnosa (Sutherland y Thomson, 1975; Sutherland, 1979; Behmlander y Dworkin 1994). A este mucílago se le han atribuido varias funciones, ninguna de las cuales ha sido demostrada claramente: facilitar la adhesión de unas células a otras; facilitar la adhesión a sustratos sólidos así como su digestión; suministrar protección frente a toxinas y bacteriófagos; intervenir en el movimiento por deslizamiento. El mucílago constituye la matriz en la que se encuentran inmersas las mixósporas en el cuerpo fructificante (Dworkin, 1972; Kim *et al.* 1999).

Como el resto de las bacterias Gram-negativas, las mixobacterias presentan una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos, proteínas y fosfolípidos (MacRae y McCurdy, 1975; Dawid, 2000). Las mayores diferencias entre el lipopolisacárido de mixobacterias y el de las otras bacterias son la ausencia de heptosa, la presencia de ácidos grasos ramificados de número impar de átomos de carbono y, en algunas especies, la presencia de 3-O-metil-D-xilosa (Rosenfelder *et al.*, 1974; Sutherland 1979). Los monosacáridos varían de unas cepas a otras e incluyen ribosa, manosa, galactosa, ramnosa, y galactosamina (Sutherland y Smith, 1973; Behmlander y Dworkin, 1994). La membrana externa es menos densa que la citoplasmática debido a su alto contenido en fosfolípidos, constituyendo la fosfatidiletanolamina el componente mayoritario con un 64% del total de fosfolípidos (Orndorff y Dworkin, 1980).

El periplasma de *M. xanthus* contiene varias proteínas con actividad enzimática; entre otras; desoxirribonucleasas y fosfatasas. De otra parte, se han descrito algunas proteínas implicadas en su movilidad. El choque osmótico libera dieciocho proteínas mayoritarias y provoca una inmovilidad transitoria. Sin embargo, no se ha examinado si estas proteínas son verdaderamente periplasmáticas o, por el contrario, se hallan en tránsito a la membrana externa (Burchard, 1974).



El peptidoglucano es cualitativamente similar al de *Escherichia coli*, pero se encuentra en cantidad relativamente baja, representando aproximadamente el 0,6% del peso seco de la célula (White *et al.*, 1968). A diferencia del peptidoglucano de otras bacterias Gram-negativas, no se encuentra formando una capa continua sino que presenta como “paquetes” conectados por un material sensible a la tripsina y al lauril sulfato sódico, formado por polímeros de glicocola y serina (White *et al.*, 1968). El bajo contenido en peptidoglucano y su especial disposición, puede estar en relación con la flexibilidad de estas células y con la capacidad de conversión en formas esféricas o mixósporas en *M. xanthus* (Kaiser *et al.*, 1979). El peptidoglucano de *M. xanthus* se compone de ácido glutámico, ácido diaminopimérico, alanina, glucosamina y ácido murámico en relación molar de 1:1:1,7:0,75:0,75. A estos compuestos hay que añadir cantidades sustanciales de glicocola, serina y glucosa (White *et al.*, 1968).

Por lo que respecta a la membrana plasmática, esta se ajusta al modelo general, si bien hay que hacer notar que los ácidos grasos de sus fosfolípidos, frecuentemente insaturados, presentan ramificaciones e hidroxilaciones en  $\alpha$  o  $\beta$  (Schöder y Reichenbach, 1970; Ware y Dworkin, 1973; Fautz *et al.*, 1979). El fosfolípido mayoritario es la fosfatidiletanolamina (60% del total). El perfil de proteínas es muy diferente al de la membrana externa (Orndorff y Dworkin, 1980).

Se ha detectado la presencia de pigmentos de tipo carotenoide en la membrana citoplasmática de muchas mixobacterias. Estos compuestos son responsables, en parte, de la coloración de las colonias y de los cuerpos fructificantes, y parecen tener una función fotoprotectora (Kleinig *et al.*, 1970; Reichenbach y Kleinig, 1971; Kleinig, 1972; Arias y Montya, 1982).

Las mixobacterias presentan apéndices extracelulares de tipo fimbrias –pili- de localización polar, a las que se atribuye un papel importante en la adhesión de las células en la comunidad, así como en el movimiento coordinado de estas bacterias (MacRae y McCurdy, 1975; Dobson *et al.*, 1979; Kaiser, 1979; Li *et al.*, 2003). Recientemente se han obtenido evidencias claras del papel de las fimbrias en el comportamiento social, ya que una desfimbriación mecánica no afecta al



movimiento individual de las células (Rosenbluh y Eisenbach, 1992; Sun *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003). A pesar de ello, su papel no está del todo claro. Estos autores sugieren que las fimbrias actúan como sensores táctiles que indican la proximidad de otras células y que sería la señal para que las células sinteticen o exporten unos filamentos extracelulares (Arnold y Shimkets, 1988a y b; Behmlander y Dworkin 1994a y b), referidos como fibrillas, que hacen que las células permanezcan unidas durante su movimiento social (Behmlander y Dworkin, 1991).

Finalmente, las mixobacterias presentan uno de los genomios cromosómicos más grandes de los existentes en las bacterias (Shimkets, 1990). En *M. xanthus* se ha demostrado que el genomio posee un tamaño de 9.554 Kpb (Chen *et al.*, 1990; Dawid, 2000); en *Stigmatella aurantiaca* oscila entre 9.200 y 9.870 Kpb, dependiendo de la raza, y en *S. erecta* está comprendido entre 9.710 y 10.100 Kpb (Neuman *et al.*, 1992). En *M. xanthus* se ha encontrado que sólo una pequeña porción del genomio está destinado al proceso de desarrollo; aproximadamente un 8% del mismo incrementa su transcripción durante el desarrollo y un 0,3-0,6% resulta ser esencial para estos eventos (Kroos *et al.*, 1986). Una situación similar ocurre durante la esporulación en *Bacillus subtilis* (Piggot, 1973).

Este tamaño no está relacionado con la formación de esporas, ya que *B. subtilis*, una bacteria que forma endosporas, tiene un genomio similar al de *E. coli*, y presenta un genomio de unas 5700 Kp (Kolsto *et al.*, 1990), muy por debajo del de las mixobacterias. Asimismo, *Anabaena*, bacteria formadora de células especializadas en la fijación de nitrógeno (heteroquistes) y de resistencia (acinetos), presenta un genomio muy por debajo del de las mixobacterias.

Este exceso de ADN podría permitir a estos organismos la flexibilidad para poder desarrollar unas funciones génicas que les permita acrecentar la complejidad morfológica y de desarrollo. Además, gran parte de la información contenida en su cromosoma podría ser usada para otras funciones (Shimkets, 1993).



Otra característica llamativa del genomio de las mixobacterias es su alto contenido en G+C que oscila entre el 67 y el 71 moles por ciento. Esta elevada proporción de bases G+C se cree ha sido desarrollada por las mixobacterias o a lo largo de la evolución para protegerse de la luz ultravioleta solar, a la que, por vivir normalmente en la superficie de los suelos, están muy expuestas (Yee y Inouye, 1984).

## 2.- MOVILIDAD

Las mixobacterias se mueven por deslizamiento sobre superficies sólidas o en la interfase aire-agua. Este movimiento deslizante es lento ( $1\mu\text{m}/\text{min}$ ) comparado con las bacterias flageladas ( $60\mu\text{m}/\text{min}$ ), aunque a veces alcanzan velocidades de hasta  $60\mu\text{m}/\text{min}$  (Spormann y Kaiser, 1995). La movilidad por deslizamiento se requiere para dos fascinantes procesos de comportamiento social observados en estos microorganismos: la formación de cuerpos fructificantes y el proceso conocido como ondulación u oleaje (McBride *et al.*, 1993). Se trata de unas ondas oscilantes y rítmicas de las células que discurren a través de las capas celulares dispuestas sobre una superficie sólida.

En *M. xanthus*, cada onda está compuesta de una cresta de varias capas de células con unas pocas células entre crestas. Shimkets y Kaiser (1982b) definieron las ondas como acumulaciones de células, con forma rígida, orientadas y moviéndose de manera sincrónica y pulsante, y han demostrado claramente que el peptidoglucano exógeno, o una combinación de sus subunidades, induce la ondulación.

En *M. xanthus*, el deslizamiento es inducido por células bacterianas, peptidoglucano, y algunos componentes del peptidoglucano: N-acetilglucosamina, ácido N-acetil murámico, meso-diaminopimélico y D-alanina (Shimkets y Kaiser, 1982).

El mecanismo por el cual las bacterias deslizantes se mueven sobre superficies sólidas ha sido discutido durante muchos años y no aclarado. De hecho

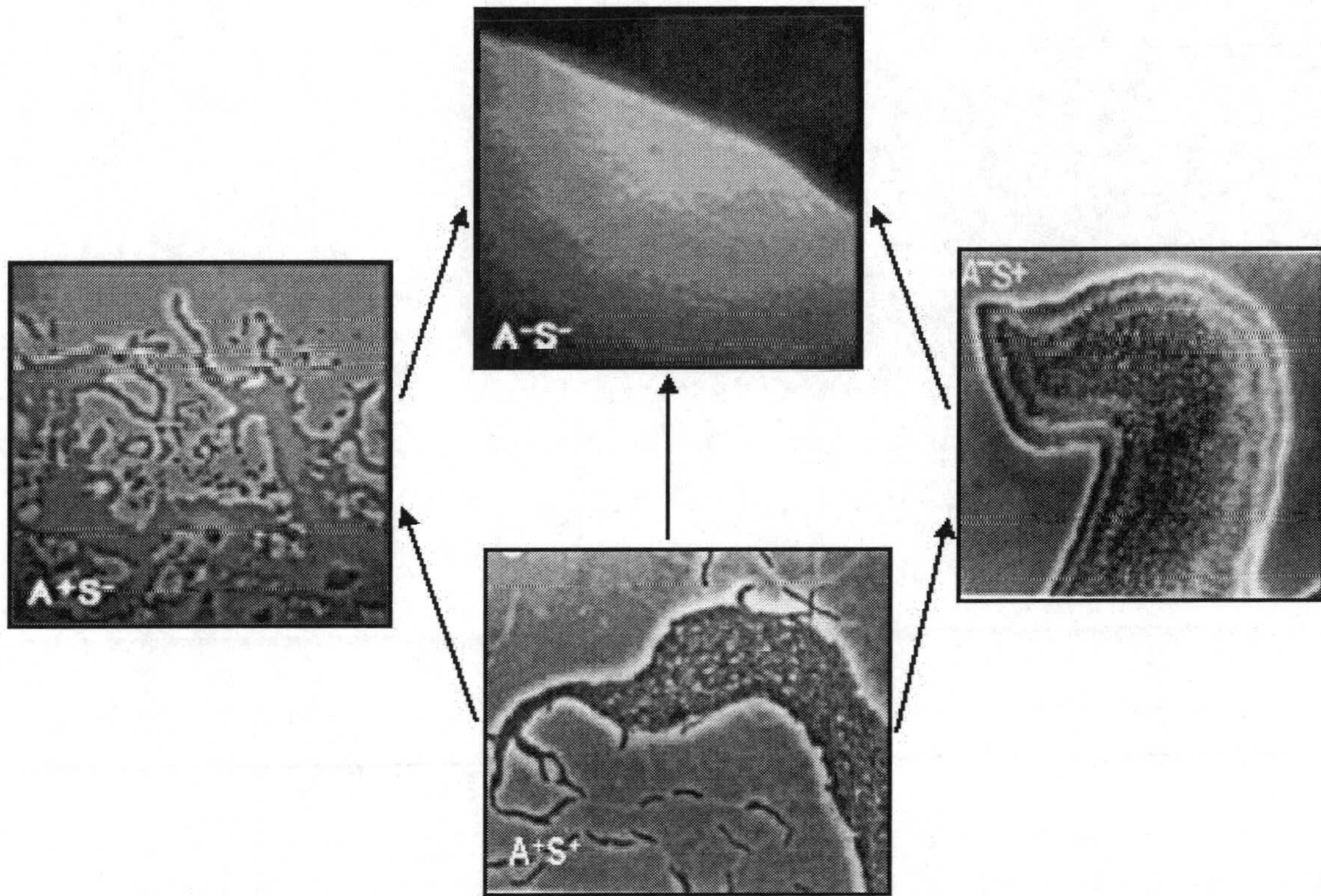


se ha descrito genéticamente que *M. xanthus* dispone de dos sistemas distintos de movilidad lo que le facilita el movimiento sobre una gran variedad de superficies en varios ambientes fisiológicos y ecológicos (Shi y Zusman 1993; Ward and Zusman 1999). Existen muchas hipótesis:

- a.- Expulsión direccional de una sustancia mucosa (Jahn, 1924; Henrichsen, 1972; Ridgeway y Laewin, 1973)
- b.- Elementos tubulares contráctiles existentes en el citoplasma (Schmidt-Lorenz y Kühlwein, 1968; Bisalputra *et al.*, 1975; Mac Rae y McCurdy, 1975; 1976; Burchard *et al.*, 1977)
- c.- Ondas de contracción a lo largo de la superficie celular (Doetsch y Hageage, 1968; Halfen y Gastenholz, 1971; Henrichsen, 1972; Halfen, 1973; Humphrey *et al.*, 1979)
- d.- Fimbriación polar (MacRae y McCurdy, 1976)
- e.- Excreción de un material surfactante (Dworkin *et al.*, 1983; Keller *et al.*, 1983).

El estudio de diferentes mutantes del deslizamiento ha evidenciado la existencia de dos sistemas de movilidad: el sistema A (de aventurero), que controla el deslizamiento de las células individuales, y el sistema S (de social), que controla el movimiento de grupos coordinados de células conocidos como enjambres (Figura 2). Las células  $A^+S^+$  se deslizan individualmente y/o en grupos. Las células  $A^-S^+$  se mueven en densos enjambres pero nunca individualmente; estos mutantes no pueden realizar el fenómeno de ondulación, aunque la mayoría de ellos sí forman cuerpos fructificantes (Rodríguez y Spormann, 1999). Y, finalmente, las células  $A^+S^-$  se mueven tan sólo de manera individual; aproximadamente 2/3 de estos mutantes no fructifican ni ondulan (Shimkets y Kaiser, 1982a; Yang *et al.*, 1998).





**Figura 2.-** Diferentes fenotipos respecto al movimiento en *M. xanthus*. Cepa salvaje A<sup>+</sup>S<sup>+</sup> y mutantes en movimiento social (S) y aventurero (A).

Dos características que parecen estar reguladas por el sistema S, y que podrían jugar un cierto papel en él, son la cohesión celular y la presencia de pili o fimbrias. Todas las células S<sup>+</sup> poseen pili y aglutinan en medio líquido, pero no las S<sup>-</sup>. Parece, por tanto, que la capacidad de las células para adherirse puede tener un profundo efecto sobre el comportamiento celular (Kaiser, 1979). De hecho, los pili tipo IV, que parecen estar involucrados en el movimiento social de *M. xanthus*, son los que median el movimiento de bacterias sobre superficies sin intervención de flagelos, produciendo el movimiento “twitching” en organismos como *Pseudomonas aeruginosa* o *Neisseria gonorrhoeae* (Wall y Kaiser, 1999). Además, el gen *pilQ* (*SglA*) ha mostrado codificar un homólogo a la secretina necesaria para la biogénesis de este tipo de pili (Wall *et al*, 1999).



Además de los loci de los sistemas de A y S, se ha identificado otro que bloquea completamente la movilidad cuando muta (Stephens y Kaiser, 1987). Este locus se ha denominado *mgl* y contiene dos marcos abiertos de lectura, *mglA* y *mglB*. La mayoría de las mutaciones que bloquean la movilidad se localizan en el gen *mglA*. Este gen codifica para una proteína de 22 kD que muestra una gran similitud a proteínas de unión a GTP. El gen *mglB*, por su parte, codifica para una proteína similar a la calmodulina, sin embargo su papel no está del todo claro (Hartzell y Kaiser, 1991 a y b; Ward y Zusman, 1999; Spormann, 1999). Mas recientemente se ha encontrado que la proteína MglA parece intervenir en ciertos mecanismos de transducción de señales que controlan la movilidad en *M. xanthus* (Thomasson *et al.*, 2002).

Otros genes involucrados en el movimiento de *M. xanthus* son los llamados *frz* (de frizzy) que controlan el cambio de sentido del movimiento de las células (Blackhart y Zusman, 1985a y b). Los mutantes *frz* son móviles, pero han perdido el control del movimiento y cuando las células se agregan durante el ciclo de desarrollo no originan cuerpos fructificantes sino filamentos zigzagueantes. Hay 6 genes *frz*, denominados *frzA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F* y *G*, cinco de los cuales muestran gran homología con los genes de quimiotaxis en bacterias entéricas. El estudio de la frecuencia en el cambio de dirección ha sido estudiado también en otros mutantes (Spormann y Kaiser, 1999; Spormann, 1999).

Otra clase de mutantes son los llamados mutantes *dsp* (de crecimiento disperso) incapaces de formar cuerpos fructificantes y de moverse en grupo, ya que han perdido la capacidad de formar fibrillas extracelulares y por lo tanto la capacidad de aglutinarse (Arnold y Shimkets, 1988; Chang y Dworkin, 1994, 1996; Lancero *et al.*, 2002).



### 3.- NUTRICIÓN Y METABOLISMO

Las mixobacterias se caracterizan por la producción de una amplia gama de enzimas que les permite llevar a cabo varias actividades líticas necesarias para su nutrición. Estas actividades son las siguientes:

- Actividad bacteriolítica debida a la producción de una amplia variedad de enzimas capaces de romper las paredes celulares (Rosenberg y Varon, 1984), entre las que cabe citar: muramidasa (Harcke *et al.*, 1971; 1972), glucosaminidasas (Hart y Zahler, 1966; Sudo y Dworkin, 1972; Haska, 1974), amidasa (Tsai *et al.*, 1965; Katz y Strominger, 1967; Sudo y Dworkin, 1972), y peptidasas (Tipper *et al.*, 1967). Estas enzimas degradan materia orgánica insoluble como son proteínas desnaturalizadas, fragmentos de células y microorganismos vivos o muertos tales como actinomicetos, cianobacterias, levaduras y otros hongos (Katznelson *et al.*, 1964)
- Actividad proteolítica responsable del crecimiento de las mixobacterias a expensas de muy diversos tipos de proteínas como son las proteasas I y II producidas por *Myxobacter* AL 1 y II (Jackson y Wolfe, 1968) y los sistemas proteolíticos extracelulares de *Sorangium* (Whitaker, 1965), *Chondrococcus coralloides* (Harke *et al.*, 1971) y *M. xanthus* (Rodríguez y Montoya, 1980). Como en el caso de la actividad bacteriolítica, la actividad proteolítica se ve afectada por la composición del medio de cultivo (Haska y Stahl, 1971; Pérez-López *et al.*, 1978).
  - Presencia de fosfatasas ácidas y alcalinas extracelulares y periplásmicas en *M. xanthus* (Nicaud *et al.*, 1989)
  - Actividad desoxirribonucleásica y ribonucleásica permitiendo el crecimiento de estas bacterias en medios suplementados con ADN y ARN como únicas fuentes de carbono y nitrógeno (Norén, 1955).
  - Actividad lipásica presente en dos sistemas enzimáticos de *M. xanthus*, uno de ellos extracelular y otro unido a estructuras celulares (Ruiz-Rodríguez, 1980).
  - Capacidad hidrolítica frente a muy diversos tipos de polisacáridos que abarca desde celulasas a amilasas, y enzimas que degradan polisacáridos complejos presentes en la pared celular de las bacterias, levaduras y hongos filamentosos



(Solntseva, 1940; 1941; Beebe, 1943; Norén, 1955; Mc Curdy, 1969; Irschik y Reichenbach, 1985; Reichenbach, 1986).

Aparte de las enzimas citadas, también se ha atribuido un papel en la lisis de otros microorganismos a los antibióticos y bacteriocinas producidas por las mixobacterias, en el sentido de que su acción podría ser un paso previo a la lisis por las enzimas extracelulares (McCurdy y MacRae, 1974; Hirsch, 1977; Brown *et al.*, 1976; Reichenbach, 1986).

Por lo que respecta a su metabolismo, viene siendo admitido que las mixobacterias no utilizan los azúcares. En relación con las enzimas de la vía glucolítica, que en estas bacterias parece funcionar en sentido inverso, se ha detectado en *M. xanthus* la presencia de una hexoquinasa dependiente de pirofosfato y no de ATP (Shimkets, 1984). Se han detectado en *M. xanthus* todas las enzimas necesarias para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos así como las del ciclo del glioxilato, observándose que este último incrementa su actividad durante la esporulación (Shimkets, 1984).

Datos recientes han demostrado la existencia del enzima fosfofructoquinasa, que permitiría a las mixobacterias poder utilizar los azucares. Así, los niveles de esta enzima aumentan durante el ciclo de desarrollo. Probablemente, su activación ocurre por fosforilación durante la formación de cuerpos fructificantes (Nariya e Inouye, 2002).

Finalmente, y a pesar de que en *M. xanthus* los aminoácidos sirven como fuente de carbono, nitrógeno y energía, se conoce muy poco sobre el metabolismo intermediario de estos compuestos. La familia del aspártico y aspartato-quinasa parecen jugar un papel en el control del desarrollo. La metionina requiere para su síntesis una fuente exógena de vitamina B<sub>12</sub> (Bretscher y Kaiser, 1978). Los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) deben ser aportados como nutrientes (Umbarguer, 1978); mientras que los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) pueden ser sintetizados por la propia bacteria



(Bretscher y Kaiser, 1978). El estudio de las numerosas actividades transaminasas y deshidrogenasas ligadas al metabolismo de los aminoácidos no ha pasado, en la mayoría de los casos, de su detección en extractos celulares (Shimkets, 1984).

#### **4.- CICLOS DE VIDA**

La característica general más sobresaliente de las mixobacterias es su alto potencial morfogenético, el cual tiene lugar a dos niveles: una morfogénesis cooperativa, que conduce a la formación de cuerpos fructificantes, por la acción de cientos de miles de células, y una morfogénesis celular, mediante la cual las células vegetativas sufren una serie de cambios que conducen a la aparición de células de reposo, denominadas mixósporas, que se localizan en el interior de los cuerpos fructificantes.

Debido a este potencial morfogenético, las mixobacterias pueden presentar dos ciclos de vida muy diferentes entre sí, un ciclo de desarrollo o fructificación y un ciclo vegetativo (Figura 3). El primero conduce a la aparición de los cuerpos fructificantes (Figura 4) y mixósporas. El inicio de este ciclo de desarrollo está íntimamente relacionado con los factores nutricionales del medio, disparándose en respuesta a una deficiencia nutricional (Manoil y Kaiser, 1980a). El segundo, es muy simple; tras sucesivas divisiones binarias, en medios sólidos, se produce una expansión del enjambre, mientras que en medios líquidos y supuesto crecimiento disperso, conduce a un aumento de la densidad celular del cultivo. Este crecimiento vegetativo se mantiene siempre que el medio contiene abundancia de nutrientes.



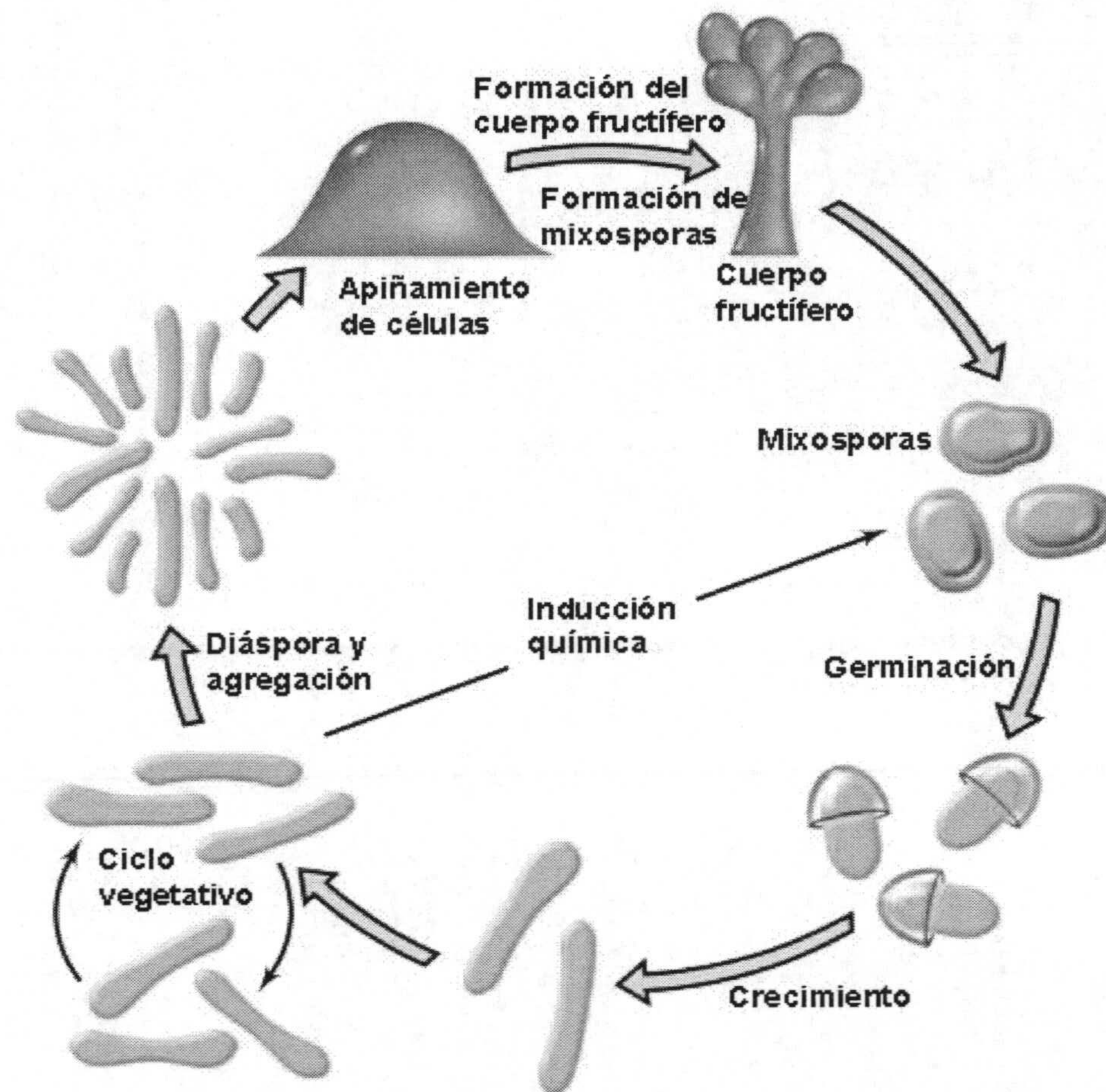
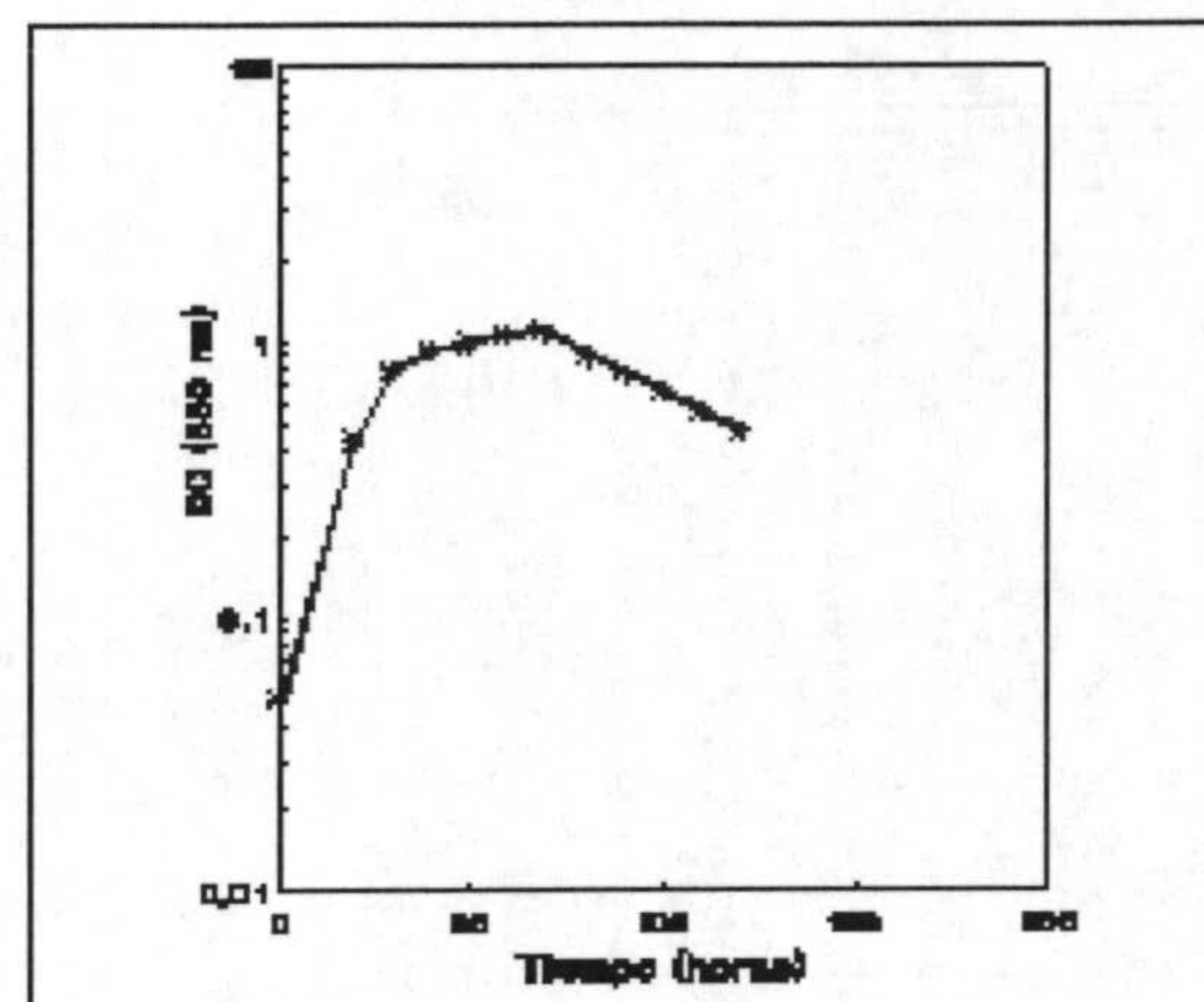


Figura 3.- Ciclos de vida de *M. xanthus*. (Tomado de Madigan *et al.*, 2004).

Cuando las mixobacterias crecen de manera dispersa en medios líquidos, muestran una intensa autólisis. Así, en estos cultivos, tras la fase de crecimiento exponencial, entran en una breve fase estacionaria que se continúa con una lisis espontánea donde prácticamente mueren todas las células del cultivo (Figura 4). Este fenómeno ha sido descrito en *M. xanthus* (Mason y Powelson, 1958), *M. virescens* (Haskä y Stahl, 1971) y *M. coralloides* (Fernández-Vivas *et al.*, 1983). Es en ésta última mixobacteria en donde se ha llevado a cabo la mayoría de los estudios sobre autólisis vegetativa.



Figura 4.- Curva de crecimiento de *M. xanthus* en medio de cultivo típico (CT)



La composición del medio de cultivo influye poderosamente sobre la autólisis; en general, todos los factores que permiten llegar más rápidamente a altas densidades celulares hacen que los cultivos entren más pronto en fase de autólisis (Arias y Montoya, 1982). Por el contrario, aquellos que tienen una influencia negativa sobre el crecimiento retrasan el comienzo de la autólisis (Benhamú *et al.*, 1979).

Estos hechos fueron explicados en base a un posible fenómeno de cooperativismo celular; para que tuviera lugar el proceso de autólisis era necesario que los cultivos superaran un nivel crítico de densidad celular y el proceso era más rápido cuanto mayor era la concentración de células alcanzada. Para explicar el mecanismo por el que se llevaría a cabo dicho fenómeno de cooperativismo celular, se encontraron evidencias de que la autólisis es disparada por un factor activador que es liberado al medio durante la fase de crecimiento exponencial y que, cuando llega a una concentración crítica, activa las enzimas autolíticas (Arias *et al.*, 1983). Por otra parte, el fosfato inorgánico tiene una importante influencia sobre la autólisis; así, concentraciones de fosfato de 40 mM inhiben totalmente el proceso (Fernández-Vivas *et al.*, 1983).

El ciclo de desarrollo viene condicionado por la existencia de unas señales intracelulares que detectarían el déficit nutricional y causarían la producción de



una(s) señal(es) intracelular(es) que sincronizarían la respuesta de la población como un todo.

La carencia parcial de los aminoácidos necesarios para el crecimiento vegetativo (alanina, valina, leucina e isoleucina) induce rápidamente el ciclo de desarrollo (Bretscher y Kaiser, 1978; Manoil y Kaiser, 1980b). De igual forma la carencia de otros aminoácidos no esenciales, de una fuente de carbono y energía (piruvato) y de fosfato inorgánico, también disparan dicho proceso (Manoil y Kaiser, 1980b).

La alimentación cooperativa y el desarrollo de las mixobacterias requieren la coordinación de muchas células. Esta coordinación es posible gracias al intercambio de varias señales intercelulares. Se han aislado cinco tipos diferentes de mutantes defectivos de señales (Hagen *et al.*, 1978; Downard *et al.*, 1993). Estos mutantes son incapaces de esporular cuando crecen solos pero pueden ser rescatados añadiendo células salvajes o células de otro grupo de complementación. Los mutantes han sido denominados *asg*, *bsg*, *csg*, *dsg* y *esg*, y las señales celulares de las que dependen son los factores A, B, C, D y E, respectivamente (a, b, c, d y e signal gene  $\equiv$  *asg*, *bsg*, *csg*, *dsg* y *esg*). Los factores A y B actúan al principio del desarrollo mientras que los factores D y C actúan a las 4 y 6 horas del agotamiento de nutrientes, respectivamente. La señal A es la que más temprano actúa de las cinco señales, ya que es producida cuando las células detectan un agotamiento de nutrientes y posteriormente actúa como un sensor de la densidad celular. Por último, la señal E se hace notar entre las 6 y 12 horas del inicio del desarrollo (Shimkets, 1999; Kaiser, 1999), (Tabla 2).



Tabla 2.- Momento de actuación de las señales implicadas en el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*.

| Señales | Momento de actuación  |
|---------|---|
| A       | Inicio del desarrollo. Detecta el agotamiento de nutrientes |
| B       | Inicio del desarrollo                                       |
| C       | A las 6 horas del comienzo del desarrollo                   |
| D       | A las 4 horas del comienzo del desarrollo                   |
| E       | Entre las 6 y 12 horas del comienzo del desarrollo          |

La naturaleza de las señales implicadas en la detección de los niveles de aminoácidos e iniciación del desarrollo permanece sin ser aclarada, habiéndose relacionado con la respuesta estricta y sus mediadores (Manoil y Kaiser, 1980a y b), con la familia de aminoácidos del aspártico y la aspartatoquinasa (Rosenberg *et al.*, 1973) y con compuestos derivados de la adenina y de nucleótidos cíclicos (Campos y Zusman, 1975; Manoil y Kaiser, 1980c; Passador y McCurdy, 1985).

Para la agregación, además de la iniciación, son requeridos otros factores: la presencia de una superficie sólida, una densidad celular alta y, en algunas especies, la luz.

La luz no estimula el desarrollo de *M. xanthus*. En este caso las experiencias sugieren que la adenina es la señal mayoritaria, aunque no la única, para la agregación. Esta señal es específica para la agregación y no actúa sobre la esporulación (Shimkets y Dworkin, 1981).

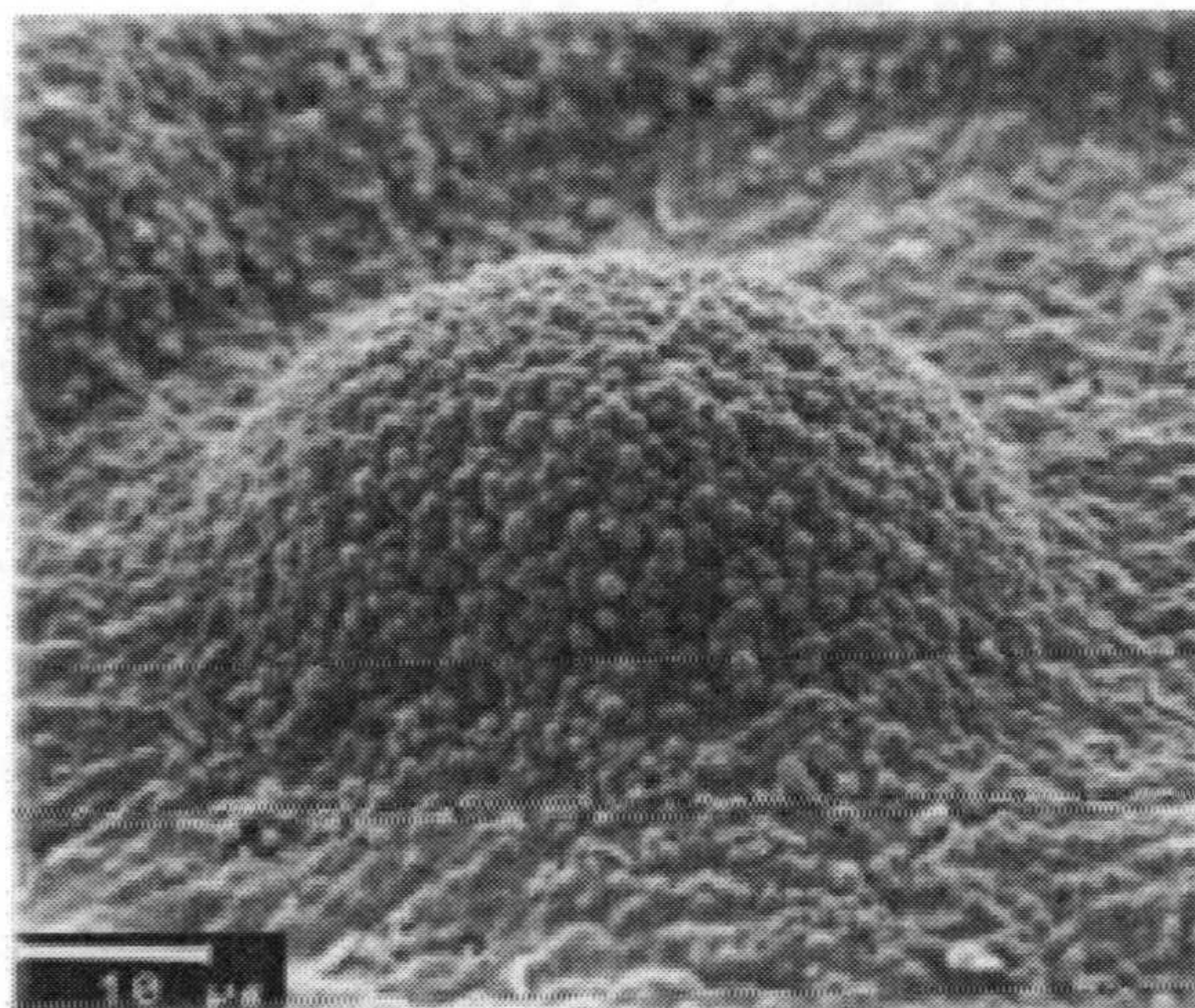
Por otra parte se ha descrito una hemoaglutinina que puede jugar un papel importante en el proceso de agregación. Probablemente intervenga también en la esporulación, ya que algunos mutantes defectivos en este proceso no producen



hemoaglutinina (La Rossa *et al.*, 1983). Esto podría representar un punto de unión entre agregación y esporulación.

Una vez cumplidos estos requisitos, las células empiezan a deslizarse hacia puntos concretos, normalmente formando oleadas. En esos puntos de atracción se originan unos agregados que van creciendo de tamaño hasta constituir el cuerpo fructificante maduro (Figura 5). El tamaño de las células es de 5-10  $\mu\text{m}$ , mientras que el cuerpo fructificante en ocasiones puede ser de varios cientos de micras, por tanto la formación de este cuerpo fructificante supone una notable empresa para estos microorganismos.

**Figura 5.-** Cuerpo fructificante de *M. xanthus* observado con microscopio electrónico de barrido



Las células sufren una serie de cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos que conducen a la formación de mixósporas. A diferencia de las endosporas clásicas, que son formados de *novo*, las mixósporas son el resultado de la transformación de la célula vegetativa completa en la correspondiente célula de resistencia. Además, aunque son algo más resistentes que las células vegetativas a las condiciones ambientales adversas, lo son mucho menos que las endosporas.

La germinación de las mixósporas (provenientes de los cuerpos fructificantes o inducidas artificialmente) ocurre cuando son colocadas en un medio rico, por lo



que se cree que algunos nutrientes del medio deben actuar como señal para el desencadenamiento del proceso. En medio pobre la germinación requiere una vez más la cooperación celular, ya que sólo tiene lugar si la densidad celular es alta. Una vez desencadenada la germinación, las mixósporas pierden rápidamente su refringencia, la cubierta se rompe y emerge la nueva célula vegetativa bacilar, dejando atrás la cubierta vacía (Voelz y Dworkin, 1962).

En cuanto al significado biológico del ciclo de desarrollo, la hipótesis más aceptada es que la función de dicho proceso sería la de originar una nueva comunidad de células vegetativas. En este sentido, los cuerpos fructificantes serían colonias en reposo.

Cabe preguntarse por qué se requiere o es necesario que el ciclo se inicie con una comunidad. La explicación puede hallarse en el modo de vida de estos microorganismos en la naturaleza. Las mixobacterias viven en ambientes de macromoléculas en degradación, muchas de ellas provenientes de bacterias y levaduras. Para que una mixobacteria aislada pueda captar nutrientes tendrá que producir enzimas de varios tipos y excretarlos al exterior. Allí difundirán y, a una distancia determinada de la bacteria productora, encontrarán un sustrato adecuado que será digerido. Los nutrientes liberados difundirán desde el punto en el que se han producido de manera radial, por lo que no todos llegarán a la mixobacteria en cuestión, sino sólo una pequeña parte, que sería insuficiente para mantener el crecimiento de la misma.

Por el contrario, si en puntos cercanos existen otras mixobacterias, o sea, si se parte de una comunidad, la producción de enzimas será mucho más elevada, con lo que la degradación de moléculas será más rápida y el aprovechamiento más efectivo. De esta forma cada célula tendrá acceso a los nutrientes liberados por la actividad de toda la comunidad.



Mientras en el medio existen los nutrientes necesarios para garantizar el desarrollo vegetativo, este se mantendrá en óptimas condiciones. Si se produce un agotamiento de los nutrientes se disparará de nuevo el ciclo de desarrollo.

Por otra parte, el ciclo de desarrollo conlleva el sacrificio de la mayor parte de las células de la comunidad inicial. En diferentes especies de *Myxococcus* (*M. xanthus*, *M. fulvus* y *M. virescens*) se ha demostrado un curioso fenómeno de lisis celular durante el ciclo normal de desarrollo, justo una vez ocurrida la agregación y antes de la esporulación (Wireman y Dworkin, 1975).

Durante el proceso de esporulación tiene lugar la lisis del 80% aproximadamente de las células agregadas, de manera que sólo el 20% llegan a formar mixósporas (Wireman y Dworkin, 1977). Es por ello que se ha formulado la hipótesis de que, dado que el desarrollo supone un estado de iniciación, la muerte y lisis de la mayor parte de la población tiene por objeto suministrar a los supervivientes suficientes nutrientes para esporular. Esto podría ser considerado, desde un punto de vista sociobiológico, como un caso de altruismo por parte de la población que se sacrifica, aunque también cabe considerarlo como un caso de “canibalismo” por parte de la población superviviente.

Otros autores (Shimkets y Kaiser, 1982a) consideraron que esa autólisis masiva podría estar ligada al programa de desarrollo, ya que obtuvieron unos mutantes (*Spo C* en *M. xanthus*), que no muestran autólisis y son incapaces de esporular. Estos mismos autores comprobaron que los componentes del peptidoglucano (Shimkets y Kaiser, 1982b; Janssen y Dworkin, 1985) son capaces de inducir la esporulación de los mutantes *Spo C*, y ello se traduce paralelamente en unos niveles normales de autólisis. En base a estos datos es por lo que sugirieron otra teoría, según la cual algunos productos liberados en la lisis podrían actuar como “señales químicas” que inducirían la esporulación. Esta teoría viene apoyada por el hecho de que durante la lisis celular se liberan al medio una concentración de aminoácidos de entre 2 y 5mM. En el laboratorio se pudo comprobar que la adición



de concentraciones similares de aminoácidos ejerce una influencia sobre la iniciación del desarrollo (Shimkets, 1987).

Como en el caso anterior, esta última hipótesis también considera la autólisis como un fenómeno de cooperación entre las células de la población. Sin embargo hay que tener en cuenta que las células esporulantes que están sujetas a morfogénesis son osmóticamente delicadas y, por tanto, están expuestas a la lisis, que podría representar sólo un fracaso en el intento de esporular, con poco o ningún papel en el desarrollo (Zusman, 1984). Este proceso de desarrollo supone un gran esfuerzo energético que, parece ser, es suplido por la lisis de los miembros de la comunidad.

## 5.- LAS MIXOBACTERIAS EN LA NATURALEZA

Las mixobacterias son muy comunes en la naturaleza, el hábitat natural para la mayoría de las especies es el suelo, en rangos de pH entre 5 y 8. No obstante, han sido aisladas algunas mixobacterias a partir de muestras de suelo con un pH de 9,4, pero sólo crecen y forman los cuerpos fructificantes cuando el pH del medio está ajustado a neutralidad. Otras se han aislado a partir de suelos con pHs ácidos (Rückert, 1978, 1979; Dawid, 1979), pero sólo crecen después de añadir 0.8% de  $\text{NaHCO}_3$  al suelo (Rückert, 1978). Otro hábitat típico de las mixobacterias es la materia orgánica en descomposición, en particular, los restos vegetales, líquenes y excrementos de herbívoros (Kühlwein, 1950). También, se encontraron en el tracto intestinal de peces de aguas dulces (Till, 1982).

Las mixobacterias también se encuentran en aguas dulces (Geitler, 1925; Jeffers, 1964; Brauss *et al.*, 1967; Gräf, 1975; Hook, 1977; Trzilová *et al.*, 1980). Una especie, *Poliangium parasiticum*, ha sido descrita como parásito obligatorio de las algas de aguas dulces del género *Cladospora* y formando cuerpos fructificantes dentro de las células vacías, obviamente estimuladas por el agotamiento de los nutrientes (Geitler, 1925). En aguas marinas se ha descrito, también, la presencia de mixobacterias, si bien se especula en torno a si es este un hábitat natural para ellas o



si su presencia allí es consecuencia de su aporte desde otro lugar (Roper y Marshall, 1977; Yamamoto *et al.*, 1982; Izuka *et al.*, 1988).

Las mixobacterias se han encontrado en todas las zonas climáticas. En climas áridos y semiáridos; la resistencia de las mixósporas a la desecación les da una fuerte ventaja en la selección (Singh y Singh, 1971; Brockman, 1976; Rückert, 1978; Dawid, 1978; 2000). Rückert y Heym (1977) encontraron mixobacterias en el desierto con una pequeña cantidad de vegetación. Parece que la temperatura no juega un papel importante en la distribución de las mixobacterias (Dawid, 2000). La mayoría de las especies son típicamente mesófilas. El crecimiento *in vitro* puede conseguirse entre 6 y 35° C. La única mixobacteria cuyo crecimiento ha sido cuidadosamente estudiado en función de la temperatura es *M. xanthus* (Janssen *et al.*, 1977), su máximo crecimiento ocurre a 28° C; a 40° C las células se dañan y no hay ningún crecimiento.

## CAPITULO II.- METALES PESADOS Y MICROORGANISMOS

Los iones metálicos están implicados en todos los aspectos de la vida microbiana. Los cationes  $K^+$  y  $Mg^{2+}$  son especies intracelulares mayoritarias, mientras que el  $Na^+$  y el  $Ca^{2+}$ , así como algunos elementos de transición y el Zinc, aun siendo todos metales esenciales, están presentes solamente a niveles de traza o ultratraza (Hughes y Poole, 1989).

Estos cationes desempeñan varias funciones, aunque en muchos casos su papel no esté del todo claro. Sin embargo, en términos generales, se sabe que están implicados en la estabilización de una serie de estructuras biológicas, desde las paredes celulares a la conformación de las proteínas. Frecuentemente, son catalizadores efectivos de una serie de procesos bioquímicos y, en algunos casos, son capaces de desencadenar, moderar o inhibir reacciones (Hughes y Poole, 1989). Los metales alcalinos Ca y Mg desempeñan funciones tanto estructurales como catalíticas, mientras que los metales V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo y W, y el metaloide Se participan sólo en funciones catalíticas. Para que los microorganismos



los puedan utilizar con esta finalidad se necesitan concentraciones ambientales bajas (Ehrlich, 1997).

Algunos procariontes pueden emplear las especies metálicas que existen en más de un estado de oxidación, como es el caso de Cr, Mn, Fe, Co, Cu, As, y Se, como donadores o aceptores de electrones en su metabolismo energético. Así, las eubacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, y las archaeas *Acidianus brierleyi* y *Sulfolobus acidocaldarius* son capaces de obtener toda la energía necesaria para el crecimiento mediante la oxidación del Fe(II) al Fe(III) (Ehrlich, 1996). Para desempeñar estas funciones, los metales o metaloides deben de estar localmente en concentraciones suficientemente altas para satisfacer las demandas de los organismos.

Las interacciones microbianas con pequeñas cantidades de metales o metaloides no ejercen gran impacto en la distribución de estos últimos en el medio ambiente. Mientras que las interacciones con grandes cantidades, requeridas, por ejemplo, en el metabolismo energético, tienen un impacto notable (Ehrlich, 1997).

El estudio de los organismos quimiolitotrofos ha permitido el desarrollo de métodos no contaminantes para la extracción de metales de minas de baja calidad o de difícil extracción. Estos métodos podrían suponer en el futuro la mejor solución al problema de mantener suministros adecuados de algunos metales clave. También se han usado microorganismos y componentes estructurales de los mismos tanto en la recuperación de metales tóxicos de efluentes, así como de residuos de los procesos industriales (Tsezos, 1985). Estos métodos parecen ser más ventajosos que los métodos convencionales (Tomioka *et al.*, 1994; Swift y Forciniti, 1997), incluidos las resinas de intercambio iónico.

Durante las dos últimas décadas ha aumentado de forma constante el interés de los químicos inorgánicos por estudiar el papel de los metales en los sistemas biológicos. Sus estudios han ido desde la investigación de sistemas que implican compuestos de coordinación, hasta estudios sobre la estructura, las propiedades



electrónicas y la reactividad de las metaloenzimas aisladas, o los cofactores que contienen metales y grupos de compuestos metálicos biológicamente determinados. Es probable que las futuras investigaciones se centren en el comportamiento de los iones metálicos en células enteras en condiciones fisiológicamente específicas. Los microorganismos ofrecen la oportunidad de estudiar la función de los metales en sistemas biológicos intactos, que presentan necesidades nutricionales y características de crecimiento bien conocidas, que son fáciles de manipular genéticamente, y que responden a las condiciones externas (Hughes y Poole, 1989).

### **1.- LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS**

La capacidad de que un compuesto químico persista y llegue a ser contaminante, según Higgins y Burns (1975), depende de sus propiedades fisicoquímicas, su resistencia a la eliminación por mecanismos físicos, químicos y/o biológicos, y de su toxicidad para los microorganismos, plantas y animales.

Tanto en los ecosistemas terrestres como en los acuáticos existen dos tipos de aportes de metales: uno natural y otro antropogénico. El peligro toxicológico depende de la distribución de estas sustancias en el ambiente. Respecto al primer aporte (natural), en condiciones normales, gracias a los procesos biológicos, los metales se mantienen bajo niveles constantes, merced a un equilibrio natural. Este equilibrio puede romperse cuando entran compuestos tóxicos en el ambiente mediante procesos industriales, pues desequilibran la acción natural. De hecho, muchas industrias, incluidas las industrias metalúrgicas, descargan componentes tóxicos indeseables en sus efluentes finales, como son los iones metálicos (Costa y Leite, 1990). Por ello, y debido a la actividad humana, los metales pesados se han ido redistribuyendo lentamente en el ambiente, ya que, durante las últimas décadas, los depósitos de metales que estaban confinados en el interior de la corteza terrestre han sido explotados y liberados al medio ambiente. La continua entrada de metales a los diferentes medios, como consecuencia de todo esto, ha provocado un aumento en los niveles de estos elementos y, por tanto, se hace necesario evaluar las consecuencias de este incremento. Al no haber sistemas biológicos capaces de



transportarlos, su vertido se traduce en un aumento en los niveles ambientales de contaminantes, lo que conlleva serios problemas para la salud humana.

Los microorganismos, cuando se encuentran en ambientes contaminados, ofrecen diversas respuestas que engloban mecanismos de precipitación, transporte enzimático y/o formación de metalotioninas (Mergeay, 1997). Aquellos microorganismos tolerantes a metales pesados, que están en altas concentraciones en el medio (superiores 0,01M), presentan la capacidad de precipitarlos, eliminando su toxicidad al retirarlos del medio acuoso. Los microorganismos acidófilos y los quimiolitotrofos, como *Acidithiobacillus sp.* y *Archaea*, presentan mecanismos de defensa frente a altas concentraciones de metales pesados. Una concentración entre 1 $\mu$ M y 10mM de diversos metales inducen en los microorganismos como *E. coli*, *Alcaligenes sp.*, y *Desulfovibrio sp.*, la puesta en marcha de mecanismos regulados enzimáticamente para exportar al exterior celular los metales pesados que han sido capaces de entrar al interior celular. Los microorganismos eucariotas, más sensibles a la presencia de metales pesados, inducen la formación de metalotioninas cuando se encuentran en ambientes con concentraciones de metal tóxico de 1nM a 100nM (Mergeay, 1997).

## 2.- EFECTOS TÓXICOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS

En la literatura se pueden encontrar referencias a diversos efectos tóxicos de los metales pesados sobre los microorganismos. Los microorganismos son sensibles tanto a las deficiencias como a excesivas concentraciones de elementos metálicos, aunque son capaces de adaptarse a ellas. Entre otros aspectos de la toxicidad de los metales pesados para la microbiota, se encuentran la reducción del crecimiento así como de la actividad enzimática (Kabata Pendias y Pendias, 1992); alteración de la fase exponencial y perturbaciones en la morfología y la fisiología de las células (Hughes y Poole, 1989). Los Actinomicetos y fundamentalmente los hongos son más resistentes que las bacterias a elevadas concentraciones de metales pesados (Doelman, 1995).



Los cationes metálicos juegan un papel importante como elementos traza en reacciones bioquímicas sofisticadas; sin embargo, a altas concentraciones, éstos forman complejos inespecíficos en la célula, lo cual lleva al bloqueo de un grupo funcional esencial de alguna biomolécula (Avery *et al.*, 1996), incluyendo enzimas o polinucleótidos. Así, por ejemplo, todos los metales pesados tóxicos, tales como el plomo, cadmio o plata se caracterizan por formar sulfuros insolubles y, por lo tanto, manifiestan una fuerte afinidad por los grupos -SH de la cisteína y pueden bloquear este residuo que es esencial en muchos procesos biológicos. De igual modo, los elementos traza altamente necesarios como el  $Zn^{2+}$  o  $Ni^{2+}$  y, especialmente el  $Cu^{2+}$ , son tóxicos a altas concentraciones. Otros cationes metálicos pueden interaccionar con los iones fisiológicos, tal como  $Cd^{2+}$  con  $Zn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Co^{2+}$  con  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  con  $Mg^{2+}$ , inhibiendo así la función fisiológica de cada uno de estos cationes (Nies, 1999).

El efecto tóxico del cromo sobre los microorganismos ha sido demostrado por muchos investigadores. En *Saccharomyces cerevisiae* la toxicidad del cromo fue más fuerte en células crecidas con fuentes de carbono no fermentables que con aquellas crecidas en sustratos fermentables; otros efectos incluyen la inhibición de la captación del oxígeno y la inducción de “pequeñas” mutaciones. Estos resultados sugieren que el cromo afecta especialmente la mitocondria de esta levadura. Un efecto adicional del cromo en *S. cerevisiae* incluye conversión génica (Cervantes *et al.*, 2001).

El cobre, aun siendo un metal esencial para el crecimiento, a altas concentraciones tiene efectos tóxicos sobre los microorganismos. La membrana plasmática se considera como el lugar inicial y principal de la acción del cobre (Ohsumi *et al.*, 1988; Cervantes y Gutiérrez, 1994; Stohs y Bagachi, 1995). Así, la exposición de los hongos y las levaduras a elevadas concentraciones de cobre conduce a la alteración de la integridad de la membrana que se manifiesta por la pérdida de solutos celulares móviles como es el caso del potasio y se traduce, generalmente, en muerte celular (Avery *et al.*, 1996). En la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum*, por ejemplo, su efecto tóxico incluye una fuerte



reducción del crecimiento y afecta también a otros parámetros estrechamente relacionados con la fotosíntesis (Cid *et al.*, 1995). El mismo efecto ha sido observado sobre otros microorganismos tal como *D. desulfuricans* (Sani *et al.*, 2001).

Por otra parte los microorganismos pueden reducir la toxicidad de los metales por la incorporación de estos en sus células, bien localizándolos en determinadas zonas o en formas que les aíslan del metabolismo, o bien por precipitación sobre su superficie mediante unión no específica (Gadd y Griffiths, 1978). No obstante, también pueden contribuir a reacciones de metilación de elementos traza como As, Hg, Pb y Tl (Beiger y Jernelov, 1984), incrementando su toxicidad.

### **CAPITULO III.- BIORREMEDIO DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS**

Para intentar frenar el continuo deterioro de la naturaleza, sobre todo del agua, se están desarrollando diversas técnicas y nuevas tecnologías utilizando microorganismos para la eliminación de agentes contaminantes, especialmente los metales pesados. Las técnicas convencionales de tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados tales como precipitación por hidróxidos, reducción, intercambio iónico, electrólisis, resultan poco eficientes o muy caras si se considera que las concentraciones iniciales de metales varían entre 10-100ppm, requiriéndose una concentración final de 1ppm después del tratamiento de las aguas (Shumate *et al.*, 1978; Tobin *et al.*, 1984; Bender *et al.*, 1995). De ahí que la utilización alternativa de microorganismos o biomasa microbiana esté recibiendo cada día mayor atención (Marañón y Sastre, 1990).

El Biorremedio de metales y radionucleidos puede parecer un nombre inapropiado puesto que ningún proceso puede degradar y por lo tanto eliminar los elementos inorgánicos. Por consiguiente, en décadas pasadas se ha prestado relativamente poca atención para entender las interacciones metal-microorganismo y radionucleido-microorganismo y a cómo éstas pueden ser usadas para minimizar los problemas ambientales.



La reciente conciencia de la contaminación por metales y radionucleidos de subsuperficie de suelos, de los cuales la bioinmovilización puede ser el único remedio factible para proteger la salud pública de la posible contaminación del agua subterránea (acuíferos), ha motivado las investigaciones sobre las interacciones de los microorganismos con los metales y radionucleidos. Estas investigaciones, en la frontera entre microbiología, geoquímica, geología y biología molecular, se benefician de los desarrollos de la caracterización de las comunidades microbianas en su hábitat natural (Bond *et al.*, 2000) y de la caracterización de los complejos metálicos asociados a las células (Beveridge *et al.*, 1997). De todo ello surge la interpretación de cómo los microorganismos afectan al reparto *in situ* de los metales entre las fases gaseosa, líquida y sólida, y se proporcionan las bases científicas para el biorremedio de la contaminación por metales y radionucleidos (Barkay y Schaefer, 2001).

La distribución y la diversidad de los microorganismos que ocupan los lugares contaminados, y de los genes que codifican fenotipos facilitando las interacciones metal-microorganismo, son elementos críticos en el biorremedio de los metales y radionucleidos. Los microorganismos son omnipresentes en el ambiente, con mas frecuencia en las aguas (Barkay, 2000) y los suelos contaminados (Konopka *et al.*, 1999). La familiaridad con la fisiología de las poblaciones activas y la comprensión de cómo las reacciones beneficiosas están controladas *in situ*, son necesarios para el éxito de las estrategias de remediación.

Actualmente existen excelentes artículos y libros que tratan las interacciones metal-microorganismo (Nies, 1999), el efecto de los microorganismos sobre la movilización metálica (Gadd, 2000), la biomineralización (Lovley, 2000) y la homeostasis microbiana de los metales (Ehrlich, 1999). Barkay y Schaefer (2001) trataron asuntos pertinentes para las aplicaciones de las transformaciones microbianas, la bioadsorción y la mineralización de los metales y radionucleidos para el biorremedio. Una mirada atenta a estos tres procesos indica que hacer una



distinción entre ellos es artificial, porque cada interacción metal-microorganismo puede implicar la combinación de los tres.

## 1.- ELIMINACIÓN DE METALES POR PRECIPITACIÓN ASOCIADA A BIOMINERALIZACIÓN

La biomineralización bacteriana, que cae dentro del ámbito de la denominada “mineralización inducida biológicamente” (Lowenstam, 1981), implica los procesos mediante los cuales estos microorganismos provocan la formación de diversos minerales (Rodríguez Navarro *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 1995; 1996; González-Muñoz *et al.*, 1993; García Sánchez *et al.*, 2002). Esta producción está inducida mediante una doble vía. De una parte, por el aporte de iones procedentes de su metabolismo, que contribuyen a incrementar los niveles de sobresaturación y a modificar los valores del pH en el ambiente circundante, circunstancias ambas que favorecen las condiciones físico-químicas para la precipitación de minerales (González-Muñoz *et al.*, 2000). Y, de otra parte, por el aporte de núcleos heterogéneos de cristalización, particularmente por las membranas celulares y/o algunos de sus componentes, que se sabe tienen esta habilidad (González-Muñoz *et al.*, 1996).

Entre los minerales reconocidos universalmente que pueden ser precipitados biogénicamente por bacterias están los carbonatos y fosfatos. Entre los primeros destacan la calcita y la vaterita (dos polimorfos del  $\text{CaCO}_3$ ) y, entre los segundos, la estruvita ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).

Una vía alternativa, de creciente interés, para la eliminación de metales pesados de ambientes contaminados está basada en la adsorción de los mismos sobre la superficie de minerales (García-Sánchez y Álvarez Ayuso, 2002; McBride 1979; 1980). La unión de los metales a estos minerales es considerada como un proceso de superficie, pudiendo ocurrir adsorción o precipitación. Ambos mecanismos implican reacciones características de algunos metales con las superficies del  $\text{CaCO}_3$ , mediante las que la adsorción tiene lugar a bajas concentraciones del metal en la



solución, mientras que la precipitación se produce cuando las concentraciones son elevadas (McBride, 1979; 1980). En el caso de los fosfatos, se presupone que la adsorción ocurre por intercambio iónico (Shul'ga y Samusevich, 2001)

### 1.1.- Precipitación de carbonatos

La absorción de los metales pesados sobre la superficie de la calcita presenta un proceso potencialmente significativo para el secuestro de los metales desde aguas, suelos, y efluentes residuales. La adsorción y la precipitación implican reacciones características de algunos metales con las superficies del carbonato cálcico  $\text{CaCO}_3$ . El primer proceso ocurre cuando los metales están presentes en las soluciones a bajas concentraciones mientras domina la precipitación si éstos se encuentran a altas concentraciones. Está ampliamente documentado que las superficies del  $\text{CaCO}_3$  quimioadsorben iones metálicos (como Cd, Co, Pb y Zn) a bajas concentraciones, empleando el mecanismo de retención del metal (Stipp *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; Sturchio *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1998).

Papadopoulos y Rowell (1988; 1989) demostraron que Cd y Zn forman, sobre la superficie de la calcita, una capa sólido-solución con ambos elementos reemplazando el Ca hasta que la solución alcanza la composición esperada para el equilibrio de  $\text{CdCO}_3$  o  $\text{ZnCO}_3$  con  $\text{H}_2\text{O}$  y la adición de estos metales a la solución causa la precipitación de carbonatos de Cd o Zn. La capa sólido-solución formada por la adsorción de los metales sobre la superficie de la calcita se consideró por Davis *et al.* (1987) y Fuller y Davis (1987), como la segunda etapa del proceso de adsorción. Este proceso implica como primer paso la rápida reacción de adsorción del metal seguido por la lenta formación de la superficie cristalina sólido-solución.

Aunque las evidencias espectroscópicas mas concluyentes apoyan a la formación del sólido-solución ( $\text{MCO}_3$ -calcita) sobre las superficies de la calcita, la adsorción del metal parece ser muy compleja en diferentes condiciones, y la química de superficie de la calcita está sometida a intensa investigación (Zhu, 2002).



La coprecipitación del zinc con el carbonato cálcico ha sido estudiada por Crocket y Winchester (1966) quienes demostraron que la cristalización es más homogénea e importante a 50° C, mientras que a bajas temperaturas es mucho más lenta para preservar la distribución logarítmica. Algunos carbonatos de elementos en traza son menos solubles que la calcita o el aragonito, y esos deberían ser coprecipitados con el carbonato cálcico en la naturaleza.

Los carbonatos pueden combinar con el manganeso y el hierro para formar depósitos en la naturaleza. El origen de al menos algunos de estos depósitos ha sido atribuido a la actividad microbiana. Un ejemplo de ello sería la aparición de rhodocrosita ( $MnCO_3$ ) y siderita ( $FeCO_3$ ) en la bahía Punnus-Ioki del lago Punnus Yarvi en la península Karelian de la antigua Rusia (Sokolova-Dubinina and Deryugina, 1967). Todos los sedimentos y las muestras tomadas de menas del lago contenían bacterias reductoras de manganeso que se concentraban en la capa superior del sedimento. *Bacillus circulans*, *B. polymyxa* y otro microorganismo no identificado, se consideraron como los posibles implicados en la formación de rhodocrosita bacteriogénica. La actividad reductora de manganeso que conduce a la formación de  $MnCO_3$  en la bahía del Punnus se relacionó con la degradación bacteriana de las plantas en descomposición, plantas procedentes de la orilla del lago. El óxido de manganeso parece actuar como aceptor final de electrones y el  $CO_2$ , producido por la mineralización de la materia orgánica, favorecería la precipitación del carbonato. Cerca del 5% de  $MnCO_3$  ha sido encontrado en el lado activo del sedimento (Ehrlich, 1990).

## 1.2.- Precipitación de fosfatos

La precipitación de fosfatos metálicos y de fosfatos de radionucleidos, como consecuencia de la producción de fosfatos por microorganismos es eficaz para un cierto rango de metales y de radionucleidos. En estos casos se propone, además, una mezcla de mecanismos acumulativos y quimioadsortivos que contribuyen a completar estos procesos (Gadd, 2000).



La biomineralización de los metales en fosfatos depende, en parte, de las condiciones del ambiente donde se encuentran los microorganismos. De hecho, la presencia en el medio de algunos iones puede influir sobre la mineralización de los metales. En este sentido, Basnakova y Macaskie (1999) estudiaron la mineralización del circonio por *Citobacter sp.* El resultado de esta mineralización fue una mezcla de  $Zr(HPO_4)_2$  y  $(ZrO_2)$ . Por otra parte se estudió la biomineralización del uranio en fosfato de uranilo ( $HUO_2PO_4$ ) que fue reprimida por la presencia del circonio y un exceso de fósforo. Sin embargo, la fijación celular de este compuesto ( $HUO_2PO_4$ ) facilitó la recuperación de  $Ni^{2+}$  por intercambio iónico, y también promovió la recuperación del circonio.

En la naturaleza, el fósforo inorgánico puede presentarse en forma soluble o insoluble. La concentración del fosfato está controlada por su solubilidad en presencia de un catión alcalino como  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  y de iones metálicos a valores de pH apropiados. Las formas insolubles del fósforo inorgánico (fosfato de calcio, fosfato de aluminio y fosfato de hierro) se convierten en solubles a través de la acción microbiana. El mecanismo por el cuál los microorganismos llevan a cabo este proceso es variable y puede ocurrir por:

- a) Producción de ácidos orgánicos o inorgánicos que atacan al fosfato insoluble
- b) Producción de quelantes tal como 2-cetogluconato, citrato, oxalato, y lactato, todos los cuáles pueden complejar la porción catiónica de los sales de fosfato insoluble y fuerzan así su disociación (Ehrlich, 1990).

## 2.- ELIMINACIÓN DE METALES POR BIOADSORCIÓN

La bioadsorción es un término general que puede ser utilizado para describir la adsorción y/o la complejación de metales pesados y/o radionucleidos mediante biomasa muerta o viva (Volesky y Holan, 1995), particularmente de origen microbiano (Volesky y May-Phillips, 1995; Gadd, 2000; Diles, 1999; Gutnick, 2000). En la bioadsorción se ocasiona el movimiento de un componente, en este caso



los metales pesados, desde una fase líquida (solución acuosa) para ser acumulada en otra fase sólida (superficie celular, fracción celular o polímeros extracelulares) por adsorción o intercambio iónico (McLean *et al.*, 1996). La bioadsorción se considera como un conjunto de procesos pasivos de acumulación, incluyendo intercambio iónico, coordinación, complejación, quelación, adsorción y microprecipitación. Es un proceso fisicoquímico rápido, reversible e independiente del metabolismo energético y es una consecuencia de la carga aniónica neta de la superficie celular (Brady *et al.*, 1994).

La bioadsorción podría ser un importante proceso natural para disminuir la concentración de metales en suelos y acuíferos contaminados (McLean *et al.*, 1996). Este proceso ha recibido en la última década mucha atención debido tanto a su novedad científica, como a su potencial aplicación industrial en la eliminación de elementos metálicos de soluciones diluidas (Volesky y May-Phillips, 1995; Atkinson *et al.*, 1998). Desde un punto de vista económico, Eccles (1995) ha demostrado que, para el tratamiento de aguas residuales, la bioadsorción es muy competitiva con otros procesos tales como el intercambio iónico o la precipitación química.

### **2.1.- Bioadsorción de metales por microorganismos.**

La bioadsorción de los metales pesados es una de las tecnologías más empleadas para la recuperación de los metales tóxicos a partir de los residuos industriales y aguas naturales. Es una alternativa potencial a los procesos convencionales para la recuperación de metales, tal como los procesos de intercambio iónico. Los microorganismos acumulan los metales metabólicos y no metabólicos mediante precipitación o fijación de estos metales en las paredes o en las membranas celulares (Beveridge y Doyle, 1989). La biomasa microbiana muerta, generalmente, es más eficiente que la biomasa viva en el proceso de captación de metales, ya que los protones generados mediante la respiración de las membranas de las células vivas compiten con los iones metálicos por los lugares de unión de metales (Urrutia *et al.*, 1992). Debido a esto, y también a la gran variedad y el bajo



coste de este tipo de material biológico, su utilización puede ser altamente rentable (Brierley *et al.*, 1986).

Algunos microorganismos son capaces de secuestrar y acumular metales pesados desde las soluciones. Los mecanismos de bioadsorción pueden ser independientes o dependientes de la actividad celular microbiana. El primer mecanismo, en general basado sobre la bioadsorción, intercambio iónico, complejación y/o microprecipitación, parece ser el mecanismo más común. De hecho, las paredes celulares, estando compuestas mayoritariamente de polisacáridos, proteínas y lípidos, ofrecen algunos grupos funcionales que fijan iones, tal como carboxilos, hidroxilos, sulfatos, fosfatos, y grupos amino. Los metales se unen rápidamente a estos sitios mediante una reacción que no requiere energía (Figura 6). Llevar a cabo la bioadsorción depende de algunos factores externos como el pH, competición de otros iones presentes en la solución, material orgánico como agentes complejantes, productos metabólicos celulares que pueden causar la precipitación de los metales, y de la temperatura (Beveridgey Doyle, 1989; Vegliò y Beolchini, 1997; Valls, 2002).

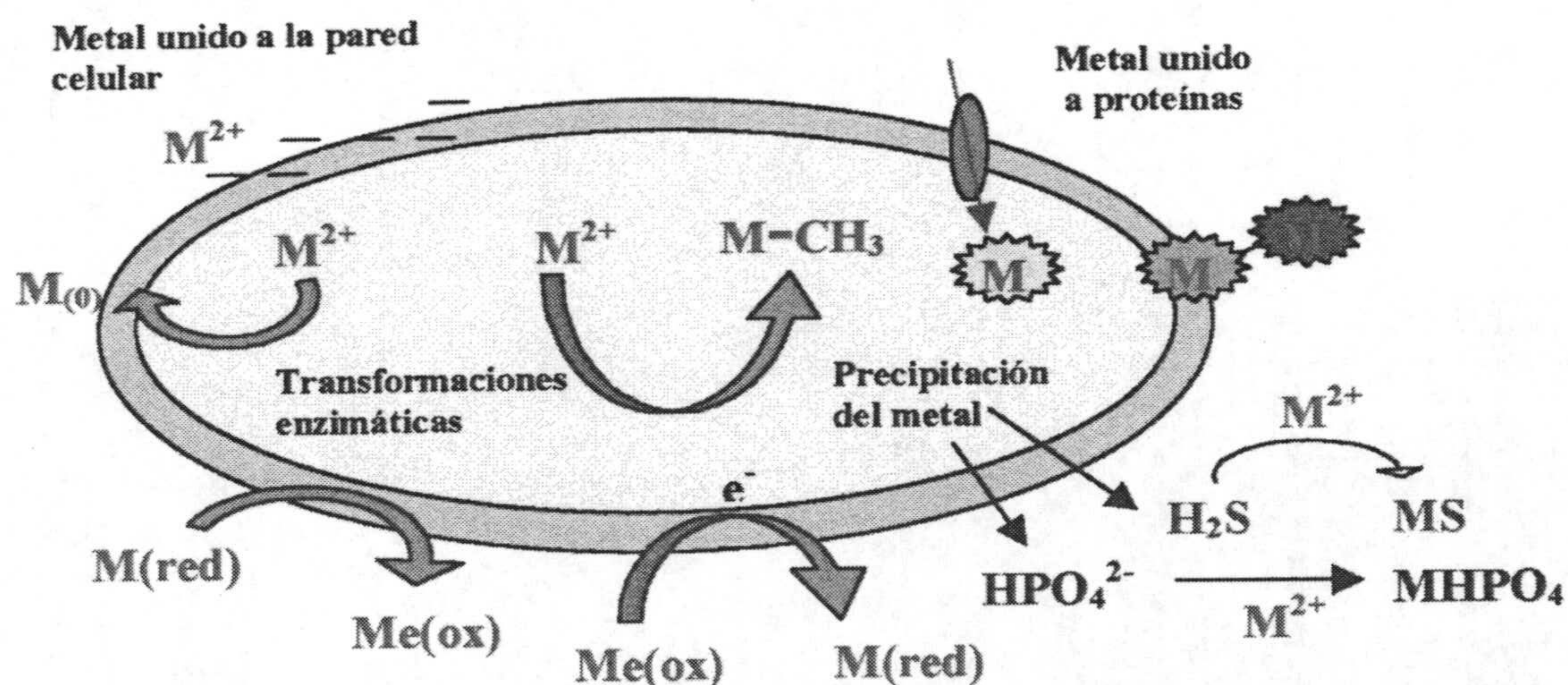


Figura 6.- Mecanismos de eliminación de metales pesados mediados por bacterias (Valls, 2002)



La capacidad que presentan algas, hongos, levaduras y bacterias de adsorber metales pesados ha sido ampliamente estudiada en los últimos años (Mullen *et al.*, 1989; Guibal *et al.*, 1992; Brady *et al.*, 1994; Bengtsson *et al.*, 1995; Ben Omar *et al.*, 1996; McLean *et al.*, 1996; Mogollon *et al.*, 1998).

Las algas marinas, las pardas en particular, presentan gran capacidad de fijación de metales, debido probablemente a su contenido en polisacáridos particularmente alginatos y carraginos (Percival y McDowell, 1967). Los grupos carboxilo son los principales lugares de unión de metales (Majidi *et al.*, 1990). *Ascophyllum nodosum*, que contiene una mezcla única de polisacáridos ofreciendo varios grupos activos capaces de fijar iones metálicos (Volesky, 1994), fija de manera eficiente cobalto (Kuyucak y Volesky, 1988), cadmio (Holan y Volesky, 1995) y plomo (Volesky, 1994). Otras algas son capaces de adsorber eficientemente distintos metales, como el níquel por *Ecklonia maxima* (Williams y Edyvean, 1997), zinc, cadmio, plomo y cobre por *Chlorella stigmatophora* (Kaplan *et al.*, 1987), zinc y cromo por *C. vulgaris* (Ting *et al.*, 1989; Aksu *et al.*, 1997) y cadmio por *Sargassum natans* (Holan *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que tanto la biomasa viva como muerta de los hongos puede ser utilizada en los procesos de bioadsorción (Volesky *et al.*, 1993). No obstante, el potencial de la biomasa no viva como bioadsorbente ha recibido gran interés ya que este material representa un subproducto de varios e importantes procesos industriales de fermentación, tales como *Aspergillus niger* (Gadd y White, 1993), *Rhizopus arrhizus* (Tsezos y Volesky, 1982), *Penicillium digitatum* (Galun *et al.*, 1987), *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 (Bengtsson *et al.*, 1995), *P. chrysogenum* y *A. oryzae* (Volesky, 1994), *Mucor miehei* (Fourest *et al.*, 1994).

La captación de uranio y torio por los hongos se lleva a cabo, solamente, mediante unión a la superficie celular. Grupos como fosfato, carboxilo, amino, hidroxilo, además de grupos presentes en la melanina y otros pigmentos son responsables de captación de iones metálicos por los hongos (Hughes y Poole, 1989).



Las levaduras, tipo de biomasa microbiana utilizada a gran escala por el hombre (Volesky y May-Phillips, 1995), presentan gran capacidad de secuestrar metales pesados. Los primeros estudios en este aspecto se enfocaron principalmente hacia los requerimientos nutricionales y toxicidad de los metales para las levaduras. Norris y Kelly (1979) estudiaron la captación del cobre por *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida utilis* y *S. cerevisiae*, el cadmio por *S. uvarium* y *S. lipolytica*, el zinc por *Sporobolomyces roseus*. Estudios más recientes se han enfocado hacia el uso de las cepas de *Candida albicans* (Kierans *et al.*, 1991), *S. cerevisiae* (Suh *et al.*, 1998) y las cepas industriales de *S. cerevisiae* en la bioadsorción de plata (Simmons y Singleton, 1996), estroncio (Avery y Tobin, 1992), uranilo (Ben Omar *et al.*, 1996), entre otros.

De otra parte, las bacterias, microorganismos que tienen una más alta relación superficie/volumen, presentan por lo tanto grandes capacidades de adsorción de metales (Mullen *et al.*, 1989), por lo que se ha estudiado la bioadsorción de metales por diferentes especies de bacterias. Entre las Gram-positivas cabe destacar la bioadsorción de plata, cadmio, cobre y lantano por *B. cereus* y *B. subtilis* (Mullen *et al.*, 1989); la de uranilo por *Mycobacterium smegmatis* (Andres *et al.*, 1993); la de cadmio por *Arthrobacter viscosus* y *A. globiformis* (Scott y Palmer, 1990). Entre las Gram negativas, la bioadsorción de plata, cadmio, cobre y lantano por *E. coli* (Mullen *et al.*, 1989), la de cadmio por *Klebsiella aerogenes* (Scott y Palmer, 1990), la de uranilo por *P. aeruginosa* (Hu y Reeves, 1997), la de plata por *Citrobacter intermedius* (Goddard y Bull, 1989), y la de plomo, plata, uranilo y lantano por *M. xanthus* (Ben Omar *et al.*, 1996, 1997; González-Muñoz *et al.*, 1997; Merroun *et al.*, 1998; 2001).

Una de las importantes estrategias para incrementar la aplicación comercial de la bioadsorción por biomasa frente a las técnicas alternativas de eliminación de metales es la combinación de varias técnicas, incluyendo:

a) Búsqueda de nuevos organismos con capacidad de bioadsorción única (Pradham y Levine, 1995; Hu *et al.*, 1996; Vesper *et al.*, 1996).



b) Selección de fuentes baratas de biomasa microbiana como son los subproductos de algunos procesos industriales de fermentación. De hecho, en plantas de producción de biomoléculas valiosas (antibióticos, enzimas, ácidos orgánicos) o bebidas alcohólicas (cerveza) se generan importantes cantidades de esta biomasa microbiana que puede ser utilizada en la tecnología de bioadsorción. *S. cerevisiae* (Volesky y May-Phillips, 1995; Ben Omar *et al.*, 1996; Kapoor y Viararaghavan, 1998), *Streptomyces clavuligerus* (Matis *et al.*, 1996), *A. niger* (Gadd y White, 1993), *R. arrhizus* (Tsezos y Volesky, 1982) y *P. digitatum* (Galun *et al.*, 1987) son de gran importancia en este aspecto.

c) Tratamientos físicos y químicos de la biomasa microbiana (Churchill *et al.*, 1995; Kapoor y Viararaghavan, 1998b). Así, el pretratamiento químico de biomasa de *Streptomyces pimprina* con 1% Triton- X100, 80% etanol, carbonato sódico o agua hirviendo mejoran la eficacia de bioadsorción de este microorganismo, lo que se puede atribuir al incremento de exposición de los lugares de unión a los metales y a la limpieza de la superficie de la biomasa (Puranik *et al.*, 1995).

d) El uso del sistema de flotación para incrementar la posterior recogida de la biomasa y del metal adsorbido (Van Aswegen, 1981; Zouboulis *et al.*, 1995; Matis *et al.*, 1996; Zouboulis *et al.*, 1997).

e) El uso de sistemas de biofiltros o filtros sumergidos, donde se hace circular el agua a través de un medio poroso y donde con anterioridad se ha desarrollado una biopelícula, responsable del proceso de depuración de una gran variedad de efluentes ricos en metales pesados mediante la bioadsorción de éstos (Gómez, 1996; Hontoria, 1998; González-López, 1998).

## 2.2.- Bioadsorción por polímeros microbianos.

Uno de los mecanismos principales de captación de metales por microorganismos es la unión no específica de los metales a los biopolímeros de la pared celular, cápsulas y polímeros mucilaginosos extracelulares, jugando estos



últimos un papel destacado en la adsorción de iones metálicos de las soluciones (Sterritt y Lester, 1986), particularmente los polisacáridos (Beveridge y Doyle, 1989).

El peptidoglucano y los ácidos teicoicos de las paredes bacterianas, la quitina, el quitosano y las melaninas presentes en la pared de los hongos, el ácido algínico de la pared celular de las algas, las cápsulas bacterianas y los polímeros mucilaginosos de diferentes microorganismos, como es el caso de los polisacáridos extracelulares, presentan grandes capacidades de bioadsorción de metales.

Los exopolímeros de la cápsula de algunas bacterias están cargados negativamente debido a la presencia de uno o varios grupos del tipo de ácido urónico, piruvato, fosfato o sulfato (McLean *et al.*, 1996). Por lo tanto, se podría esperar que estos polímeros aniónicos atraigan a los cationes metálicos mediante interacciones electrostáticas (McLean *et al.*, 1990). Estas últimas representan las fuerzas químicas iniciales implicadas en la fijación de metales (Geesey y Jang, 1990).

Por otra parte se sabe que los iones metálicos influyen en la producción de las cápsulas y los polímeros extracelulares. Así, Bremer y Loutit (1986) describieron que la concentración de cromo en el medio de cultivo de una *Corynebacteria*, aislada a partir de sedimentos marinos contaminados por el cromo, afectaba notablemente la cantidad y la forma de los polímeros extracelulares producidos por esta bacteria.

Las variantes capsuladas de *K. aerogenes* acumulan mayor cantidad de metales (cobre, cadmio, manganeso, cobalto) que las variantes no capsuladas. El orden de acumulación de estos elementos por las variantes capsuladas es el siguiente:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$  (Rudd *et al.*, 1983). Mittleman y Geesey (1985), al trabajar sobre la captación del cobre por los exopolímeros de las bacterias de los sedimentos de agua dulce, observaron la existencia de un paralelismo entre valores de constantes de estabilidad del complejo Cu-cápsula de estas bacterias y la disminución del pH.



Tan y Loutit (1976), estudiaron la captación del molibdeno por polímeros extracelulares producidos por las bacterias de la rizosfera. Encontraron que este elemento se fija principalmente, mediante procesos pasivos, al ácido urónico de la capa mucosa que rodea a *Pseudomonas sp.* Los polisacáridos extracelulares de *P. aeruginosa* fijan molibdeno y cobre mediante el ácido glucurónico, que representa el 32% de peso total de la capa mucosa.

### **2.3.- Determinación de los grupos funcionales bacterianos implicados en la interacción con los metales pesados**

El mecanismo de bioadsorción de metales puede ser un proceso independiente de la actividad celular microbiana. Las bacterias contienen una gran variedad de complejos moleculares en su superficie que, a valores fisiológicos de pH, implican numerosos grupos químicos cargados (como grupos fosfato, carboxilo y amino) que dan normalmente a la superficie celular una densidad de carga neta aniónica (negativa). Debido a que la célula está en contacto directo con el ambiente, en las capas superficiales los grupos cargados son capaces de interaccionar con iones y moléculas cargadas presentes en el medio externo. Así, los cationes metálicos pueden ser atraídas electrostáticamente y unidos a la superficie celular (Langley y Beveridge, 1999). Respecto a su influencia sobre los procesos de bioadsorción (capacidades y selectividades), es necesario conocer los lugares de unión de los metales (Klimmek *et al.*, 2001), y caracterizar los complejos metal-microorganismo. Los principales trabajos científicos que tratan sobre las formas químicas y de especiación de los contaminantes tal como el uranio, están últimamente enfocados a la estructura a escala molecular. Tener conocimientos básicos a estos niveles es esencial para el tratamiento y la eliminación de los contaminantes ambientales (Merroun *et al.*, 2003).

La información a nivel molecular de los sistemas complejos ambientales, incluyendo las estructuras complejas tales como bacteria/uranio por ejemplo, puede ser obtenida por los análisis moleculares que utilizan radiación electromagnética



tales como espectroscopía de infrarrojos (IRS) (Yun *et al.*, 2001), espectroscopía XANES (“X-ray absorption near- edge structure”, análisis de la región cercana al borde de absorción de rayos X), espectroscopía EXAFS (“Extended X-ray absorption fine structure”, espectroscopía de absorción expandida de rayos X para determinación de estructura fina) (Merroun *et al.*, 2001; Henning *et al.*, 2001) y espectroscopía NMR (“Nuclear Magnetic Resonance”, resonancia magnética nuclear) (Andres *et al.*, 1994), entre otros.

### 2.3.1.- Espectroscopia de infrarrojos (IRS)

La espectroscopia de infrarrojos es la más útil para identificar los componentes químicos tanto orgánicos como inorgánicos. Puede ser utilizada para cuantificar algunos componentes desconocidos de una mezcla, y puede ser aplicada al análisis de sólidos, líquidos, y gases. El término espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) se refiere a un desarrollo bastante reciente de la manera por la cual los datos se recogen y se convierten de un patrón de interferencia a un espectro. Los instrumentos de FTIR utilizados actualmente son automáticos, lo que los hace más rápidos y más sensibles que los instrumentos dispersivos más antiguos.

La espectroscopía de infrarrojos se ha usado para la identificación de componentes químicos en las muestras biológicas, caracterización de las estructuras secundarias de las proteínas, identificación y clasificación de los microorganismos (Helm *et al.*, 1991; Naumann *et al.*, 1991). Esta técnica, se ha comprobado que es una herramienta práctica en la identificación de los grupos funcionales responsables de la fijación de los metales (Fourest y Volesky 1996; Pagnanelli *et al.*, 2000). Merroun *et al.* (2003b) demostraron usando este método, que los fosfatos están implicados en la acumulación del uranio por cepas de *A. ferrooxidans*.

Las técnicas espectroscópicas se fundamentan en la interacción de la materia con la radiación, y esta interacción involucra procesos como la absorción o difusión. Estos procesos sólo pueden darse a determinadas frecuencias de fotones y el



conjunto de frecuencias a las que se producen es propio de cada molécula lo que hace que su espectro de absorción/dispersión constituya como una "huella dactilar" única de la misma. Las absorciones que se producen en la región espectral del infrarrojo involucran energías muy pequeñas que al ser absorbidos por una molécula dada hacen que cambie su estado energético rotacional o vibracional y estos cambios son los responsables de las bandas de absorción de la misma en el infrarrojo.

### **2.3.2.- Espectroscopia de absorción expandida de rayos X para determinación de estructura fina (EXAFS)**

La absorción de rayos X es una técnica de investigación reciente fomentada por el uso de sincrotrones para la investigación fundamental. La técnica EXAFS da información directa sobre la estructura geométrica y electrónica local alrededor del átomo fotoexcitado. Es decir, se puede conocer la clase de átomos, su número de coordinación (N), distancia de enlace interatómica (R) y geometría alrededor del átomo fotoexcitado midiendo el desorden local relativo para el átomo central seleccionado (como los términos de Debye-Waller). Cada clase de átomo es fotoexcitado a una energía diferente por lo que puede ser usada como prueba analítica para verificar la existencia de un determinado elemento así como su estado de oxidación. La gran penetrabilidad de los rayos X permite estudiar la materia en sus diferentes estados de agregación. La espectroscopía EXAFS es una herramienta usual en la caracterización estructural de las formas de la materia más complejas y puede distinguir entre los diferentes grupos funcionales propuestos a ser importantes en la captación del metal (Kelly *et al.*, 2002).

Esta técnica ha sido usada para determinar los parámetros estructurales de los complejos de uranio formados por bacterias (Merroun *et al.*, 2003a; Kelly *et al.*, 2002; Hennig *et al.*, 2001), o por plantas (Günther *et al.*, 2003). Por otra parte, la absorción de rayos X tiene la ventaja de poder aplicarla tanto a materia amorfa como a cristalina y también a muestras cuyo contenido en uranio es muy bajo.

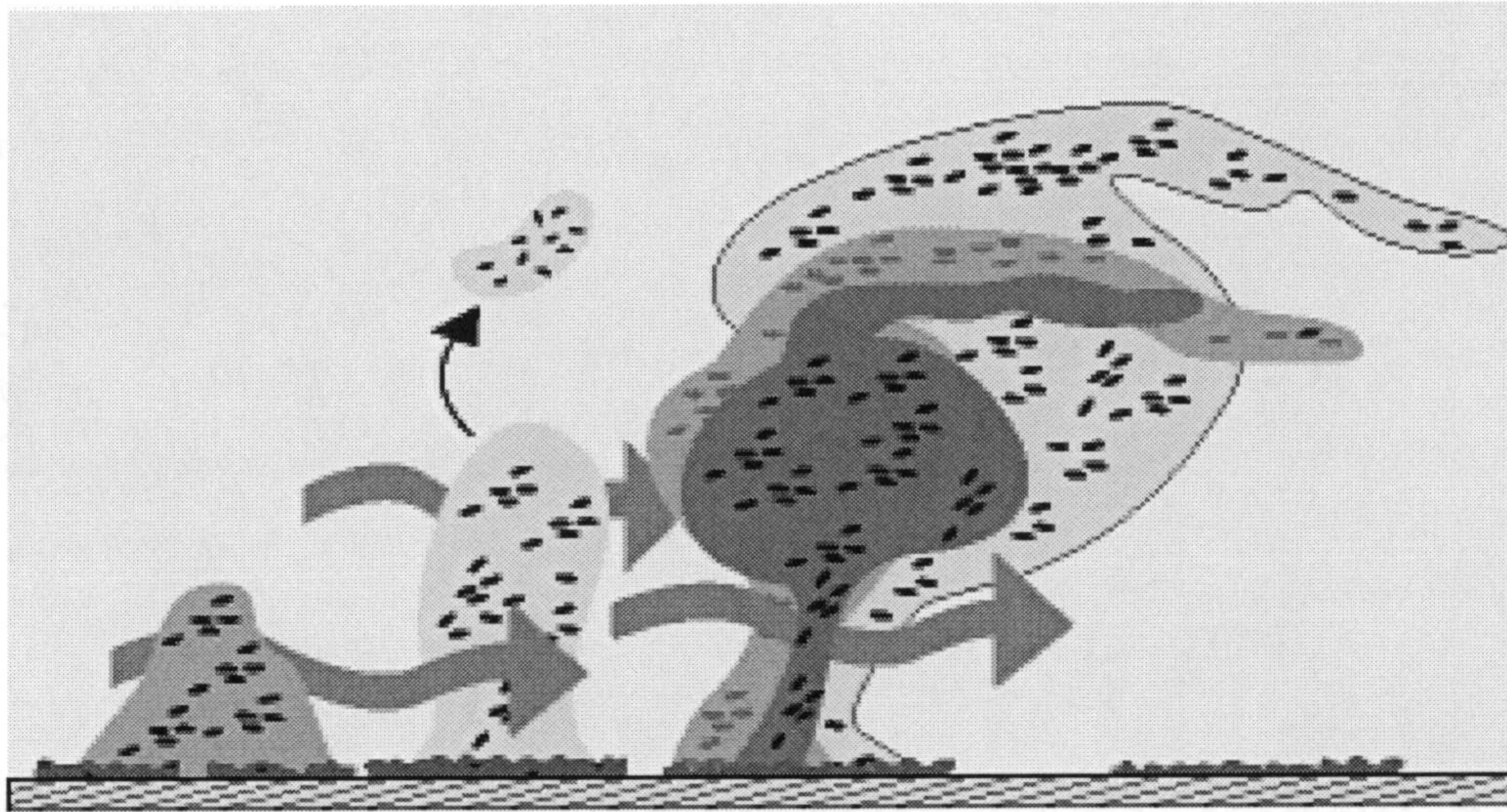


### 3.- BIOPELÍCULA

Las bacterias, en su ambiente natural, se suelen organizar en complejos entramados. Dentro de estos complejos las células están inmersas en películas de aspecto mucoso, fruto de la liberación de un material extracelular y tienen desarrollada una serie de mecanismos de comunicación entre los individuos. Estas películas o biofilms o biopelículas están presentes en todo tipo de ambientes. En la misma biopelícula pueden existir varias especies de bacterias formando microcolonias estructuradas en distintas capas y aprovechando las peculiaridades particulares de cada especie en beneficio del conjunto.

Estos sistemas no pudieron ser estudiados hasta la aparición de ciertas técnicas microscópicas como la microscopía confocal, que permitió el estudio de las capas profundas de las biopelículas. Esta tecnología microscópica permite hacer un barrido de la película en todo su grosor y ver planos de ésta a distintas profundidades, reconstruyendo después la estructura tridimensional de la biopelícula. Con estos estudios se pudo comprobar que las bacterias son únicamente una pequeña parte de la estructura, el resto es una materia de tipo mucilaginoso secretada por las propias bacterias, llamada matriz extracelular, que absorbe agua y captura pequeñas partículas (Figura 7). En su interior, el agua fluye llevando a las colonias bacterianas nutrientes disueltos y retirando los productos de desecho, que frecuentemente son utilizados por otros tipos bacterianos que forman parte de la estructura y que están convenientemente distribuidos según sus intereses. El flujo de nutrientes no es total en toda la dimensión de la biopelícula. En las zonas centrales, la llegada de nutrientes está de alguna manera regulada por la actividad de las bacterias situadas en la periferia, de manera que éstas están afectadas por la actividad metabólica de las situadas en la zona central de la biopelícula. Tanto es así, que para elementos importantes para el tipo de metabolismo, como el oxígeno, su concentración puede variar de forma significativa en centésimas de milímetro. Todo ello muestra que en la misma biopelícula existe una diversidad de ambientes bioquímicos (Costerton *et al.*, 1995).





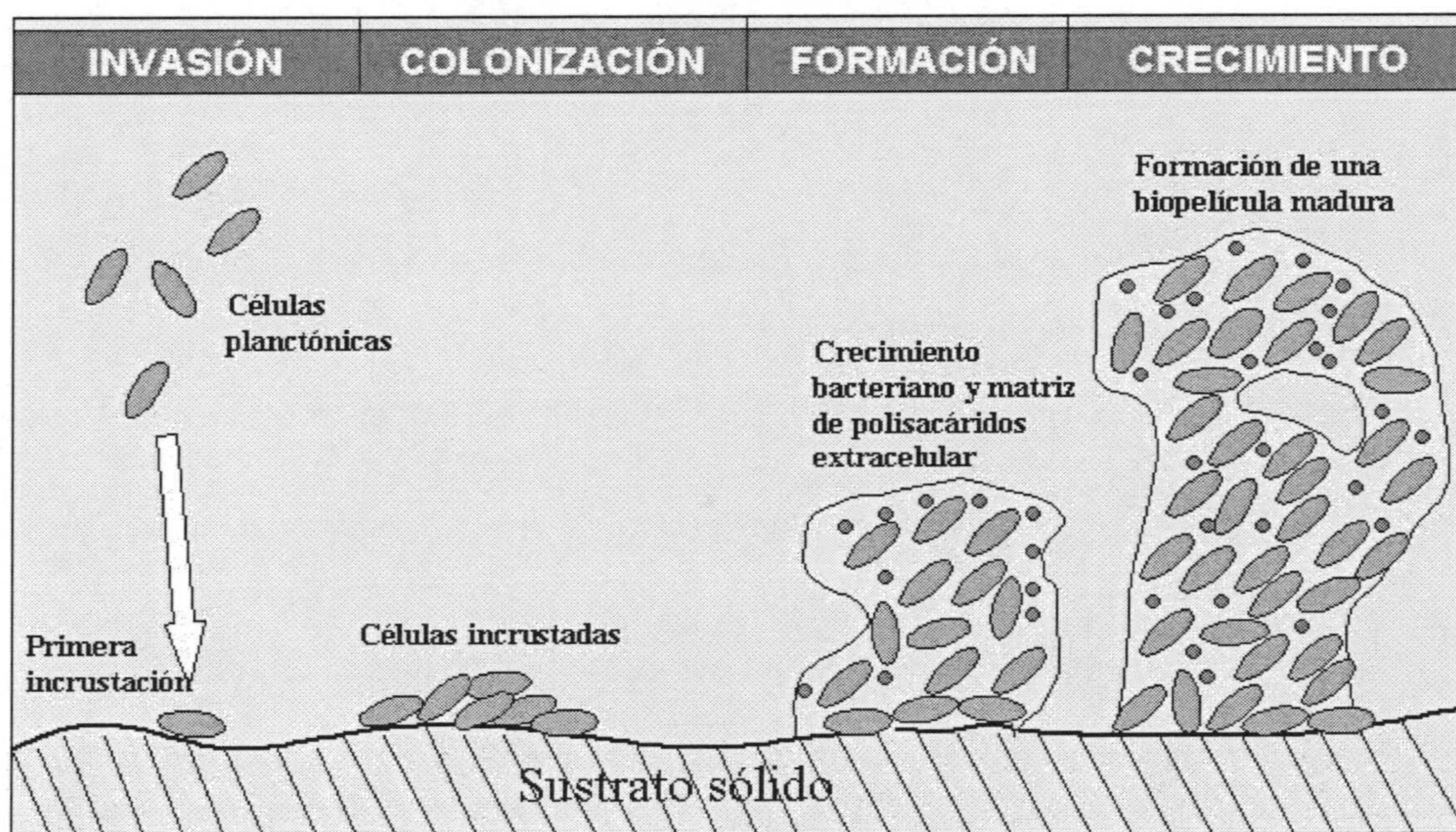
**Figura 7.- Modelo conceptual de la arquitectura de una biopelícula madura basado en observaciones directas usando un microscopio confocal (Costerton, 1995).**

Las biopelículas, comunidades complejas de microorganismos, como se ha dicho más arriba, que se desarrollan en diferentes ambientes, pueden ser sistemas beneficiosos de tratamiento de aguas residuales (Lazarova *et al.*, 1999) o aguas subterráneas contaminadas (González-López *et al.*, 1998) o perjudiciales, provocando problemas de corrosión (Fang *et al.*, 2002) y contaminación microbiana, dependiendo de la superficie donde se encuentren y de su composición bacteriana (Lawrence *et al.*, 1991; 1999). Cada día es más patente que los microorganismos tienen la habilidad de ocupar y modificar nichos ecológicos formando biopelículas, y hay una notable evidencia de la identificación de diversos géneros de organismos patógenos unidos a las superficies, tales como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, y *Mycobacterium*. Actualmente, se está utilizando una variedad de métodos sofisticados, microscópicos y moleculares, para explicar el desarrollo de la biopelícula. Estos métodos están generando una variedad de datos sobre los procesos de desarrollo y los mecanismos que regulan su formación (Stoodley y Stoodley, 2002).



### 3.1.- Formación y estructura de una biopelícula

Para muchos autores la formación de biopelícula es un proceso dinámico. Muchos modelos actuales, basados sobre *Pseudomonas* sp., describen la formación de biopelícula como un proceso continuo (lineal) que empieza cuando las células bacterianas libres se unen a una superficie (Figura 8). Esta unión está seguida por el crecimiento y madurez de la biopelícula que se transforma en una estructura compleja formada por una dispersión de células bacterianas separadas dentro de un fluido (Costerton y Stewart, 2001; Saur *et al.*, 2002). Las diferentes etapas de la interacción microbiana con la superficie requieren la producción de estructuras extracelulares que ayudan en la adhesión inicial, en el mantenimiento de la estructura de la biopelícula, y en la separación de los agregados (Saur *et al.*, 2002).



**Figura 8:** Diferentes etapas de la formación de la biopelícula.

Actualmente existen muchas pruebas que indican que la movilidad de las células y por lo tanto los flagelos, y otros apéndices filamentosos externos (pili, fimbrias, fibrillas, etc), juegan un papel bastante importante en la formación y el desarrollo de la biopelícula (Watnick *et al.*, 2001). O'Toole y Kolter (1998)



demonstraron que los flagelos y los pili IV que regulan el movimiento “twitching” en *P. aeruginosa* juegan un papel importante en la unión a la superficie. El mutante flagelar de esta bacteria fue incapaz de colonizar eficazmente una superficie tal como lo hacía la cepa madre (Sauer *et al.*, 2002). Lo mismo ocurre con *E. coli*, donde la presencia de los flagelos, pili I y fimbrias es necesaria para la formación de biopelícula (Jackson *et al.*, 2002). No obstante, la movilidad no parece ser un requisito para la formación de biopelícula, aunque siempre acompaña a la colonización de las superficies por microorganismos Gram negativos, puesto que en caso de diversas bacterias Gram positivas no móviles, tales como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, y *Mycobacterium*, se ha descrito que forman fácilmente biopelícula (Stoodley y Stoodley, 2002). En el caso de *Staphylococcus aureus*, Cucarella *et al.* (2001) demostraron que las proteínas asociadas a la biopelícula están implicadas en el inicio de la unión y en la adhesión intercelular.

La división binaria de las células presentes es otro mecanismo implicado en la formación de la biopelícula (Heydorn *et al.*, 2000; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). Cuando las células madres se dividen, las células hijas se extienden hacia el exterior del punto de adhesión, para formar grupos celulares. Este tipo de crecimiento ha sido estudiado microscópicamente midiendo la propagación radial sobre superficies de silicona de las microcolonias de *Mycobacterium fortuitum* en función del tiempo (Stoodley *et al.*, 2000).

La incorporación de células solitarias (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000) o también de células en tropel (Stoodley *et al.*, 2000) a la masa fluida ayuda en el desarrollo de la biopelícula. Varios estudios demostraron que se podría inducir, por el corte de grandes extensiones de biopelícula o por movimiento excesivo de microcolonias enteras sobre las superficies, la formación de biopelículas maduras capaces de colonizar nuevas superficies y de formar estructuras secundarias tal como “redes” u ondulación organizada (Stoodley *et al.*, 1999; Whitchurch *et al.*, 2002).

La contribución relativa de todos y de cada uno de estos mecanismos en la formación de biopelícula dependerá de los organismos y de las condiciones físicas y



químicas del ambiente en donde se encuentran (Geesey, 2001). En los ambientes oligotróficos, las biopelículas maduras pueden consistir en poco más de una cubierta escasa de células con poca complejidad estructural. Varios investigadores afirmaron que las biopelículas tardan tiempos variables para alcanzar la estructura madura. El desarrollo y madurez de una biopelícula depende, entre otros factores, del momento en que se inicie la unión de las células a la superficie y también del tiempo necesario para su crecimiento (Heydorn *et al.*, 2000; Stoodley *et al.*, 1999; Baty *et al.*, 2000).

Las bacterias en el interior de la biopelícula forman una comunidad funcional coordinada. De hecho, las biopelículas se asemejarían a los tejidos formados por células eucariotas en su cooperatividad, y en que están “protegidas” de las variaciones bruscas de las condiciones ambientales mediante el mantenimiento de una “homeostasis primitiva” dentro de la matriz de exopolímeros. Estos polímeros retienen la humedad y los nutrientes, y permiten la formación de microambientes dentro de la matriz, que distribuyen los organismos en función de las condiciones óptimas o permisivas imperantes. Es importante considerar el valor de esta estrategia en la tierra primitiva. En los primeros ecosistemas acuáticos las bacterias eran atraídas hacia los nutrientes que se concentran de forma natural sobre las superficies. El agrupamiento, en la ausencia de depredación, hacía que las bacterias estuvieran protegidas de la deshidratación, radiación ultravioleta, dispersión por el movimiento del agua, etc.

Los microorganismos en biopelícula son especialmente activos en la biomineralización. El establecimiento de gradientes químicos, y condiciones físicas en la capa celular y en las proximidades inmediatas de las células activas resulta beneficioso para la formación de minerales (Barkay y Schaefer, 2001). De hecho, una formación masiva de minerales ha sido descrita en las biopelículas de los acuíferos afectados por el drenaje ácido de minas. Las biopelículas no sólo soportan abundantes biomasas, que causan altas actividades microbianas, sino que también promueven procesos de mineralización al provocar altas concentraciones de soluciones localizadas de determinada composición, y condiciones de pH y potencial redox (Eh) adecuados alrededor de las células (Barkay y Schaefer 2001).



Las características del material soporte donde se desarrolla la biopelícula también influye en la adhesión de los microorganismos, de manera que la selección del material dependerá de muchos factores tales como: la resistencia a la degradación microbiana, características físico-químicas y de superficie, coste del material, etc. El rango de porosidad del material es también un factor importante en la fijación microbiana al mismo. Según Tampion y Tampion (1987), la acumulación de biomasa en el material soporte ocurre cuando el tamaño del poro es de una a cinco veces el tamaño bacteriano. En materiales soporte sintéticos el rango de porosidad puede, hasta ciertos límites, ser controlado. Geminer *et al.* (1994) consiguieron artificialmente para materiales cristalinos diámetros de poro en un rango de 20-2000Å.

### 3.2.- Importancia del polisacárido extracelular EPS en la biopelícula:

Las bacterias planctónicas se unen primero entre ellas mediante fuerzas físicas y atracción electrostática. Algunas de estas células se unirán permanentemente a la superficie con sus sustancias poliméricas extracelulares o polímeros. Los polímeros extracelulares constan de grupos de polisacáridos neutros o cargados que no son solamente un cemento de las células a la superficie, sino que también actúan como un sistema en el intercambio de iones para atrapar y concentrar nutrientes a partir del agua (Stephens, 2002). Mientras los nutrientes se acumulan, las células pioneras se reproducen. Luego, las células hijas producen su propio exopolímero, aumentando satisfactoriamente el volumen de la superficie para el intercambio de los iones. A continuación, se establecerá una próspera colonia de bacterias. En una biopelícula madura, el mayor volumen está ocupado por una matriz de polisacárido organizado y lleno de agua. Esta capa acuosa es la que forma la superficie gelatinosa y resbaladiza de la biopelícula (Costerton *et al.*, 1995).

La química del EPS, compuesto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas, es compleja (Flemming *et al.*, 2000; Sutherland, 2001). El alginato producido por la biopelícula de *P. aeruginosa*, es el componente del EPS más



estudiado y parece cumplir un papel importante en la determinación de la estructura de la biopelícula (Hentzer *et al.*, 2001). Otros polisacáridos tienen un papel estructural similar en otras especies, tales como el EPS rico en galactosa y glucosa de *Vibrio cholerae* O1 El Tor (Yildiz *et al.*, 2001) y el ácido colánico del EPS de *E. coli* K12 (Jackson *et al.*, 2002; Danese *et al.*, 2000).

Aunque los EPS son los componentes extracelulares más estudiados, existen datos que sugieren la existencia de una inmensa diversidad de los exopolisacáridos producidos por diferentes especies bajo diferentes condiciones de crecimiento, y por tanto, que aun queda mucho por conocer de ellos (Sutherland, 2001). Por una parte, esto se debe a la dificultad de la extracción y la separación del EPS de las células bacterianas y, por otra, a las complejidades resultantes a la hora de analizar y estudiar los polisacáridos, que pueden estar ligados en gran medida a una gran variedad de grupos químicos. Los tipos de grupos funcionales que presenten son críticos a la hora de fijar y concentrar iones (Lindberg, 1990; Sutherland, 1990; Schlegel *et al.*, 1998).

Existen muchos estudios que demuestran que el EPS captura y concentra grandes cantidades de iones metálicos, metaloides y moléculas. Algunos metales iónicos como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , etc, son capturados por el polímero extracelular (Kröpfl *et al.*, 2003). Esto ocurre principalmente a través de la formación de complejos de cationes con los grupos aniónicos sobre las moléculas del EPS (Geesey y Jang, 1989). La fuerza de afinidad de la fijación del complejo dependería mayoritariamente del tamaño / carga del ión, además de numerosos otros factores, como la composición del EPS, el estado físico del gel, pH, y la solubilidad y la concentración del metal. Factores como el pH podrían modificar fácilmente los ambientes de aguas marítimas, y eso influiría fuertemente en la unión y liberación de los metales del EPS. En general los pHs bajos (condiciones ácidas) causan la liberación de los iones y los pHs altos (condiciones básicas) tienden a favorecer su captura (Kröpfl *et al.*, 2003).



*II.- OBJETIVOS*







La contaminación del medio ambiente con metales pesados es un problema serio y creciente. A diferencia de los contaminantes orgánicos, que suelen ser destruidos, los metales tienden a persistir indefinidamente. Una vez liberados en el ambiente, circulan y finalmente se acumulan en la cadena alimenticia de los organismos superiores. Este aumento de los contaminantes metálicos en el medio ambiente ha llevado a los investigadores a buscar posibles remedios que puedan ayudar a corregir o minimizar esta contaminación.

De otra parte, el hecho de que los iones metálicos estén implicados en diversos aspectos de la vida microbiana y el que los microorganismos sean omnipresentes en todo tipo de ambientes, particularmente en aguas (Barkay, 2000) y suelos contaminados (Konopka *et al.*, 1999), ha aumentado el interés del estudio de la interacción metal-microorganismo. En este sentido, un campo de atención creciente es el de la aplicación de los microorganismos en procesos de biorremedio de ambientes contaminados por metales. Los microorganismos tienen la ventaja, frente a otros sistemas biológicos, de ofrecer la oportunidad de estudiar la función de los metales en sistemas biológicos intactos, además de presentar necesidades nutricionales y características de crecimiento bien conocidas, ser fáciles de manipular genéticamente, y responder a las condiciones externas de forma que puede ser estudiada con relativa facilidad (Hughes y Poole, 1989).

Dos aspectos destacados de las interacciones de los microorganismos con los diferentes elementos dentro del amplio e interdisciplinar campo de la Geomicrobiología, son los procesos de biomineralización y de bioadsorción de metales pesados llevados a cabo por bacterias. Estudios realizados previamente por nuestro Grupo de Investigación a lo largo de más de una década han puesto de manifiesto, de una parte la capacidad de bioadsorción de metales pesados por biomasa no proliferante de *M. xanthus* y, de otra, la extraordinaria capacidad biomineralizadora de este microorganismo. Habida cuenta del desarrollo y los diversos caminos a que ha conducido esta investigación, se abrían una serie de interrogantes sobre las nuevas posibilidades de aplicación de esta bacteria que era



preciso abordar a fin de dilucidar qué nuevas líneas sería interesante llevar a cabo en un futuro.

De acuerdo con todo ello, se planteó el desarrollo de la investigación que se presenta en esta Memoria, y que tenía los siguientes objetivos:

1.- Realizar un estudio de la toxicidad de diversos metales pesados sobre *M. xanthus*, tanto en cuanto a su incidencia sobre el ciclo de crecimiento vegetativo como sobre el ciclo de desarrollo y diferenciación característico de esta bacteria.

2.- Realizar un estudio de la capacidad de bioadsorción de plata, por ser un metal de alta toxicidad para la mayoría de los microorganismos y al mismo tiempo un metal valioso que interesa recuperar. En este sentido, y teniendo en cuenta estudios precedentes realizados con biomasa no proliferante de *M. xanthus*, estudiar: a) la capacidad de fijación de plata por células activas de *M. xanthus*, y b) la localización celular de la plata bioadsorbida.

3.- Igualmente, basándose en estudios anteriores en que se demostró la gran capacidad de *M. xanthus* no proliferante de adsorber y acumular uranio, determinar la naturaleza de los grupos funcionales bacterianos implicados en la fijación del uranio y dilucidar la composición estructural y electrónica del complejo/s formado/s por la interacción de este metal con el microorganismo.

4.- Teniendo en cuenta los procesos de biomineralización llevados a cabo por este mismo microorganismo y, de modo particular, la producción de fosfatos y carbonatos, investigar la posible incorporación de metales pesados en los minerales producidos, como vía alternativa para la eliminación de estos elementos contaminantes.

5.- Uno de los procesos para la eliminación de metales pesados de aguas contaminadas, empleado en la actualidad, es la utilización de sistemas de biofiltros, en los que se aprovecha la capacidad microbiana de formar biopelículas sobre



soportes inorgánicos porosos. Teniendo en cuenta, como se ha reiterado, la capacidad de fijación de metales pesados por biomasa no proliferante de esta bacteria, se propone investigar la habilidad de *M. xanthus* de establecer, sobre soportes porosos de bajo coste, una biopelícula, como primer paso hacia su posible utilización en sistemas de biofiltros.



*III.- MATERIAL Y MÉTODOS*







## 1.- MICROORGANISMOS

Para la realización de esta tesis se ha empleado de manera habitual la cepa salvaje 422 de *Myxococcus xanthus* (CECT, 422; ATCC 25232), y también se han utilizado las siguientes cepas mutantes de *M. xanthus*, procedentes de la Colección Americana de Cultivos Tipo:

- ❖ *DZF1*, cepa *sglA1*-FB derivada de la cepa DK101 (tiene alguna alteración en el movimiento social pero es A<sup>+</sup>S<sup>+</sup> y forma cuerpos fructificantes) (Inouye *et al.*, 1979).
- ❖ *frz* (mutantes de quimiotaxia, han perdido el control del movimiento, tienen movimiento aventurero y no forman cuerpos fructificantes) (Zusman, 1982).
- ❖ *mgl* (son inmóviles totales y no forman cuerpos fructificantes) (Hodgkin y Kaiser, 1977).
- ❖ *dsp* (crecen dispersos, no forman pili, no glutinan y carecen de la formación de cuerpos fructificantes) (Arnold y Shimkets, 1988a).
- ❖ *csgA* (dan lugar a la agregación pero no forman cuerpos fructificantes) (Kuspa *et al.*, 1986).

## 2.- MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1.- MEDIOS DE CONSERVACIÓN, MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO BACTERIANO

**Medio agar-levadura-** Este medio se ha utilizado para la conservación de las diversas cepas de *M. xanthus*. En este medio las mixobacterias dan lugar a abundantes cuerpos fructificantes que se conservan viables durante varios meses. Este medio se ajusta a la siguiente composición:



|                                |    |
|--------------------------------|----|
| Levadura prensada de panadería | 1% |
| Agar purificado (Merck)        | 2% |
| Agua destilada                 |    |
| PH 7,2                         |    |

Para su preparación, la levadura se suspende en una pequeña cantidad de agua destilada mediante la conveniente agitación, a fin de prevenir la formación de grumos, completando a continuación el volumen requerido. Posteriormente, se añade el agar y se ajusta el pH con solución NaOH al 10%. El medio, como todos los restantes que se describen, se esterilizó en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

**Medio TPM-** Es un medio pobre en nutrientes. Se utilizó para la conservación y la inducción de la formación de cuerpos fructificantes de las mixobacterias usadas en este trabajo. Su composición es la siguiente:

|                                     |      |
|-------------------------------------|------|
| Tris- HCl pH 7,6                    | 10mM |
| Tampón fosfato potásico pH 7,6      | 10mM |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 5mM  |
| Bacto- agar (Difco)                 | 1,5% |
| PH 7,6                              |      |

**Medio CT.-** Utilizado para el crecimiento en forma dispersa de *M. xanthus* y otras mixobacterias, tiene la siguiente composición:

|  |      |
|--|------|
| Bacto- Casitone ( Difco)   | 0,5% |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                                    | 0,1% |
| Tampón KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10mM |
| PH 6,5   |      |



**Medio CTA.-** Utilizado para el crecimiento vegetativo de las especies de *Myxococcus* sobre medios sólidos, responde a la siguiente composición:

|  |      |
|--|------|
| Bacto- Casitone ( Difco)   | 1%   |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                                    | 0,1% |
| Tampón KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10mM |
| Agar   | 1,8% |
| PH 7,2   |      |

**Medio CYE-** Este y su correspondiente medio sólido (adicionado de 1,8% de agar), son otros dos medios básicos para el mantenimiento y crecimiento, tanto en líquido como en sólido, de *M. xanthus*. Con la siguiente composición:

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| Bacto- Casitone (Difco)               | 1%   |
| Extrato de levadura (Difco)           | 0,5% |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0,1% |
| PH 7,6                                |      |

**CT-Glicerol-** Teniendo en cuenta la rápida autólisis que muestran los cultivos dispersos de *M. xanthus*, y las mixobacterias en general, para asegurar su conservación se ha procedido de la siguiente manera: células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, de entre 24 y 48 horas, eran recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio CT adicionado de glicerol 0,5M. En estas condiciones, y congeladas a - 80° C, pueden ser mantenidas durante largos períodos de tiempo.

## 2.2.- MEDIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE MINERALES

Con esta finalidad se han utilizado dos medios líquidos y sólidos especialmente destinados a la producción de minerales teniendo en cuenta estudios previamente realizados (Ben Chekroun, 2000).



Estos medios se han elegido y, algunos con determinados fines se han modificado, para investigar la posible formación de carbonatos y fosfatos. Se utilizaron en forma líquida y/o en forma gelificada por la adición de 1,8% de agar-agar purificado.

### 2.2.1.- Medios para la producción de carbonatos

*Medio M-9-* Tiene la siguiente composición:

|  |      |
|--|------|
| Bacto- Casitone (Difco)                                | 1%   |
| Tampón fosfato   | 10mM |
| Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O | 1%   |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . ½ H <sub>2</sub> O    | 0,2% |
| PH 8   |      |

*Medio M-3-* Tiene la siguiente composición:

|  |      |
|--|------|
| Bacto- Casitone (Difco)                                | 1%   |
| Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O | 1%   |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . ½ H <sub>2</sub> O    | 0,2% |
| PH 8   |      |

### 2.2.2.- Medio para la producción de fosfatos

*Medio CT-F-* Con la siguiente composición:

|  |          |
|--|----------|
| Bacto- Casitone  | 2 %      |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                                    | 12,18 mM |
| Tampón KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10 mM    |
| PH 7   |          |



### 3.- TÉCNICAS GENERALES Y ESPECIALES

#### 3.1.- MODALIDADES DE CULTIVO

Los cultivos de los distintos experimentos se realizaron en medios sólidos y/o líquidos, y estos últimos en agitación. La incubación de las diferentes cepas de *M. xanthus* se realizó a 28°C .

Las condiciones de cultivo, y según los distintos experimentos a que iban destinadas, se detallan a continuación.

##### 3.1.1.- Cultivos en medios líquidos

*Cultivos en tubos de ensayo.* Se utilizaron tubos de ensayo de 15 x 160 mm, con 5 ml de medio. La agitación se efectuó en agitador Certomat-R, Braun, a 180rpm.

*Cultivos en matraces Erlenmeyer.* Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio. La agitación se llevó a cabo en un agitador orbital Gallenkamp, a 200rpm. La inoculación se efectuó con 2 ml de cultivo en fase de crecimiento exponencial.

##### 3.1.2.- Cultivos en medios sólidos

Para el estudio en medios sólidos se utilizaron placas de Petri de 90 mm de diámetro adicionadas de 20 ml de los distintos medios de cultivo. Según los casos, la inoculación se hacía por uno de los procedimientos siguientes:

- Inoculación en estría
- Inoculación de gotas de 10 µl sobre la superficie del medio.



### 3.2.- MEDIDAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Se llevaron a cabo, a intervalos de tiempo variables según los distintos experimentos, por medidas de tipo turbidimétrico, mediante la determinación de los valores de absorbancia a 650nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 D. Las determinaciones se hicieron en cultivos líquidos en tubos de ensayo y en matraces Erlenmeyer con tubo lateral.

### 3.3.- MEDIDAS DE pH

Se efectuaron con un pHmetro Crison micro pH 2001.

### 3.4.- CURVAS DE CRECIMIENTO

Para realizar las curvas de crecimiento de la cepa salvaje de *M. xanthus* 422 así como las cepas mutantes, se emplearon como inóculo cultivos en fase estacionaria, crecidos durante 48 horas a 28° C. La inoculación se realizó con una cantidad tal que todas las cepas a estudiar partieran con la misma densidad óptica de forma que se comenzara el estudio al principio de la fase exponencial o al final de la fase lag. Se hizo un seguimiento del crecimiento microbiano, midiendo la densidad óptica a 650nm durante varios días con un espectrofotómetro Spectronic 20D.



#### 4.- TOXICIDAD DE METALES

##### 4.1.- PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE METALES

###### 4.1.1.- Tabla de reactivos utilizados

| Reactivo   | Casa Comercial | Peso molecular |
|--|----------------|----------------|
| Uranio( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) | Merck          | 502,13         |
| Plomo( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ )                              | Merck          | 331,20         |
| Cobalto( $\text{CoN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )    | Fluka          | 291,03         |
| Lantano( $\text{LaN}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )    | Fluka          | 433,02         |
| Cadmio( $\text{CdN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )     | Fluka          | 308,47         |
| Cromo( $\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )      | Fluka          | 400,15         |
| Manganeso( $\text{MnN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )  | Fluka          | 251,01         |
| Plata ( $\text{AgNO}_3$ )  | Panreac        | 169,87         |
| Cobre( $\text{CuN}_2\text{O}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )      | Panreac        | 241,60         |

Agua MilliQ

###### 4.1.2- Preparación

Se prepararon soluciones madres de los distintos metales mediante la disolución de sus correspondientes nitratos (uranio, plomo, cobalto, lantano, cadmio, cromo, manganeso, plata y cobre) en agua MilliQ. A partir de estas soluciones madre se hicieron las diluciones oportunas para obtener las concentraciones deseadas. El pH de las distintas soluciones de metales pesados se ajustó con soluciones de NaOH o  $\text{HNO}_3$ , 1N.



## **4.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)**

La determinación de la concentración mínima de los metales ensayados que inhibe el crecimiento de *M. xanthus* se ha realizado en medios sólidos. Con este fin se han inoculado placas de medios CTA adicionados de distintas concentraciones de cada uno de los metales. Las concentraciones de metales ensayadas son : 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 y 20 mM, concentraciones que se usan habitualmente en los estudios de resistencia a los metales por bacterias (Ehrlich 1978; Trevors *et al.*, 1985). El inóculo usado en todos los casos fue de 48 horas y se sembró en forma de gotas de 10  $\mu$ l, luego las placas se incubaron a 28° C durante varios días.

## **4.3.- CURVAS DE CRECIMIENTO CON METALES**

Para realizar las curvas de crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de los distintos metales, se emplearon cultivos de 48h crecidos a 28° C y se inocularon tubos de ensayo de 3ml del medio CT líquido y a diferentes concentraciones de cada metal, incluida la CMI del medio sólido. Se hizo un seguimiento de la densidad óptica a 650nm durante varios días con un espectrofotómetro Spectronic 20D.

## **4.4.- INFLUENCIA DE LOS METALES EN EL CICLO DE VIDA**

### **4.4.1- Comprobación del crecimiento de la bacteria en presencia de la CMI de metales**

Para ello, las distintas cepas de *M. xanthus* se crecieron en medio sólidos CYE y TPM previamente adicionados con la CMI de cada metal ensayado, y se incubaron a 28° C durante varios días.



#### **4.4.2.- Estudio del movimiento**

El movimiento se estudió en placas, para su observación con lupa binocular. Para inocular estas placas se procedió del modo siguiente: los cultivos se crecieron en medio CYE hasta la fase exponencial. Cuando llegaron a una densidad óptica de 1,5 (650 nm) se concentraron 40 veces en tampón TM, de forma que se obtuviera la misma densidad en todos los cultivos. A partir de estas muestras, se colocaron 4 o 5 gotas de 10 µl en placas de CYE-agar adicionado con dos concentraciones distintas del metal, la CMI y una concentración menor, y se incubaron a 28° C durante varios días con observación continuada.

#### **4.4.3.- Obtención de cuerpos fructificantes**

Para el estudio del ciclo de desarrollo de los mutantes y su comparación con el fenotipo salvaje, las distintas cepas se crecieron en medio CYE hasta la fase exponencial. Cuando llegaron a una densidad óptica de 1,5 (650nm) se concentraron 40 veces en tampón TM (10 mM tris-HCl, pH 7,5; 8 mM MgSO<sub>4</sub>), de forma que se obtuviera la misma densidad en todos los cultivos. A partir de estas muestras, se colocaron gotas de 10 µl en placas de agar TPM previamente adicionado con dos distintas concentraciones de cada metal ensayado, la CMI y una concentración menor, y se incubaron a 28° C durante varios días hasta que se formaron cuerpos fructificantes maduros.



## 5.-CAPTACIÓN DE METALES

### 5.1.- BIOADSORCIÓN POR MICROORGANISMOS

#### 5.1.1.- Bioadsorción de plata por células proliferantes de *M. xanthus*

##### 5.1.1.1.- Proceso seguido

Los experimentos se realizaron siguiendo el esquema que se presente en la figura 6. Con un cultivo de *M. xanthus* obtenido en medio CT líquido se inocularon los medios nutricionales líquido CT y sólido CTA sin plata y con plata a concentraciones 0,1 y 0,5 mM. Para la preparación de estos últimos se utilizó una solución madre de nitrato de plata 10 mM esterilizada por filtración. El inóculo mencionado fue un cultivo de 48 horas, tiempo en el que las células alcanzan el final de la fase exponencial de crecimiento con una densidad de  $2 \times 10^9$  células / ml. Todos los tubos (5 ml del medio por tubo) fueron inoculados con 0,1 ml del inóculo y se incubaron en oscuridad y agitación a 160rpm. Las placas con el medio sólido (20ml del medio por placa) se inocularon por estrías con el mismo inóculo y se incubaron también en oscuridad. La temperatura de incubación fue, en todos los casos, 28° C (temperatura óptima de crecimiento de este microorganismo).

##### 5.1.1.2.- Preparación de las muestras para la observación de la plata acumulada

Después de 4 y 10 días de incubación, se recogieron muestras de los cultivos líquidos y sólidos, como se ve en la figura 9, para su preparación y posterior observación con microscopio electrónico de transmisión (TEM) (A: gotas de los cultivos sobre rejillas de cobre; B: inclusión en resina y posterior preparación de cortes ultrafinos montados sobre rejillas de cobre y sombreadas con carbón)



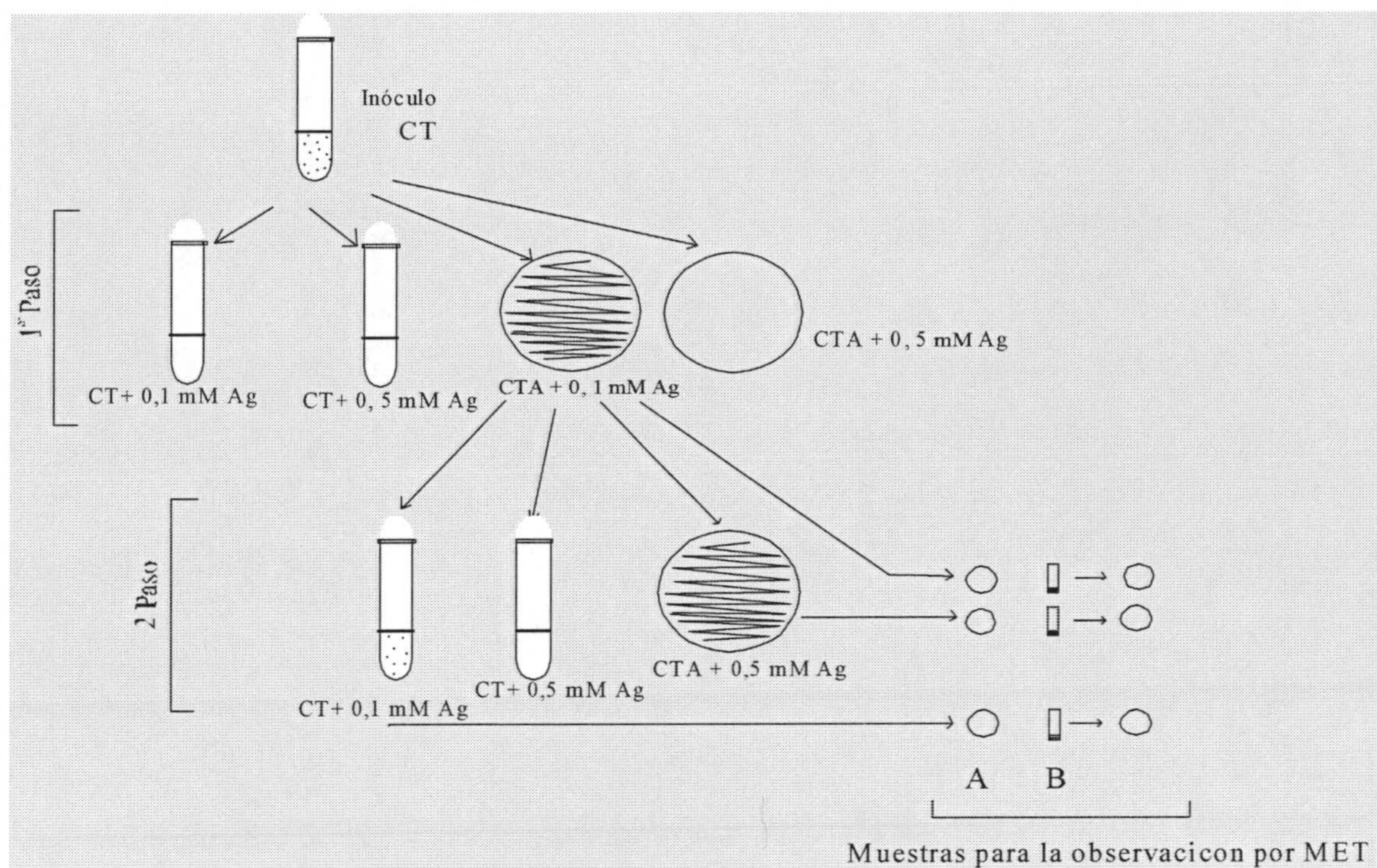


Figura 9.- Esquema del proceso seguido para permitir la acumulación de plata por células proliferantes de *M. xanthus* y su posterior observación con TEM.

### 5.1.2.- Bioadsorción de metales por biomasa no proliferante

**Preparación de la biomasa .-** Para la obtención de biomasa se utilizó un cultivo de 48 horas en medio CT, que se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 100 ml de medio. La inoculación se hizo con 1 ml de un cultivo de *M. xanthus* de 48 horas. Los matraces se incubaron a 28° C, a 200rpm, en un agitador orbital Gallenkamp. Las células se recogieron mediante centrifugación durante 30min a 5000rpm (Centrífuga Sorvall, rotor GSA). Del sedimento bacteriano se hicieron dos preparaciones:

- Biomasa húmeda (sin ningún tratamiento)
- Biomasa seca: la biomasa húmeda se secaba a 120° C durante 24 horas. Después se molía en un mortero. Finalmente se guardaba en desecador.



### 5.1.3.- Bioabsorción de uranio.

#### 5.1.3.1.- Preparación de biomasa para análisis mediante espectroscopía de infrarrojos (IRS)

Para los distintos experimentos de captación de uranio se trabajó de la siguiente manera: a tubos de 50 ml con 25 ml de la solución de uranio 1mM y a diferentes pHs (3 y 4,5) se adicionó la misma cantidad de biomasa húmeda. Los tubos se mantuvieron a 28° C y a 220rpm, en un agitador orbital Gallenkamp, durante 24 horas. Posteriormente la biomasa se recogió por centrifugación a 5000rpm durante 30min y se secó en un horno de secado a 120° C durante 24 horas.

#### 5.1.3.2.- Preparación de biomasa para análisis mediante espectroscopía de EXAFS

Para estudiar la naturaleza de los complejos de uranio formados por *M. xanthus* mediante EXAFS se trabaja de la siguiente manera:

1. Inocular 500 ml de medio CT con un precultivo de 50 ml de *M. xanthus*
2. Incubar el cultivo durante 48 h a 28° C a 220rpm
3. Después de 48 h, se recoge el pellet por centrifugación a 5000rpm durante 20min
4. Lavar el pellet con agua destilada 3 veces y centrifugar a 5000rpm durante 20min
5. El pellet recogido se divide en dos lotes
6. Cada una de estas fracciones de pellets se trató con uranio (25 ml) a concentración de 0,5 mM, una a pH 2 y otra a pH 4,5 durante 24h, y se incubaron a 28° C en agitación a 220rpm.
7. Después de 24 h de contacto de la biomasa con el uranio, se recogen los pellets por centrifugación a 5000rpm durante 20 min.
8. Los pellets se lavan tres veces con agua destilada y se centrifugan a 5000rpm durante 20min



Los pellets obtenidos se secan en el horno de secado durante 24 h a 120° C. Posteriormente se muelen en un mortero.

## **5.2.- FORMACIÓN DE MINERALES EN PRESENCIA DE METALES PESADOS E INCORPORACIÓN DE ESTOS ÚLTIMOS EN LOS MINERALES FORMADOS**

Para este ensayo se eligieron los siguientes metales, a las concentraciones finales que se indican:

- Cromo a 0,1 mM
- Cobalto a 0,5 mM
- Manganeso a 2,5 mM
- Cobre a 1 mM

### **5.2.1.- Producción de fosfatos en presencia de metales**

Matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100ml de medio líquido CT-F, previamente adicionados de la concentración adecuada de la solución del metal, fueron inoculados con 2ml de cultivo de 48 horas y se incubaron a 28° C con agitación a 180rpm durante 30 días, tiempo necesario para la producción del mineral (Ben Chekroun 2000).

### **5.2.2.- Producción de carbonatos en presencia de metales**

Para la producción de los carbonatos se procedió de la misma forma que en el caso de los fosfatos, pero utilizando matraces con 100ml del medio M-3 previamente adicionados del metal correspondiente, que fueron igualmente inoculados con 2ml de un cultivo de 48h, incubándose, en este caso, en agitación a 28° C durante 30 días.



## 6.- TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS CRISTALES

### 6.1.- A PARTIR DE MEDIOS LÍQUIDOS

Para recoger los cristales formados en los medios líquidos se procedió en dos pasos:

- Los cristales sueltos en el medio de cultivo se recogieron por centrifugación a 4000rpm y luego por decantación eliminando el medio de cultivo.
- Los cristales pegados a las paredes del matraz se lavaron con agua destilada y se despegaron por tratamiento de los mismos en baños de agua con ultrasonidos. Luego se recogieron por centrifugación y decantación de la misma manera.

Los cristales obtenidos se lavaron repetidas veces con agua destilada hasta que quedaron limpios de restos celulares y de medio de cultivo y, por último, se secaron en estufa de 37° C.

### 6.2.- A PARTIR DE MEDIOS SÓLIDOS

La recuperación de los cristales se llevó a cabo mediante distintos métodos, dependiendo de la situación de los cristales respecto al medio de cultivo.

- *Cristales formados en la superficie del medio de cultivo.* Para la recuperación de estos cristales se procedía raspando con asa de siembra y posteriormente eran depositados en placa de Petri limpia y lavados con agua destilada varias veces a fin de eliminar los restos del medio y de células. Finalmente, el agua se eliminaba por evaporación en una estufa de 37° C.

- *Cristales incrustados en el medio.* Los cristales se recuperaron fundiendo los medios de agar-agar en horno microondas. Para ello se cortaron los trozos de



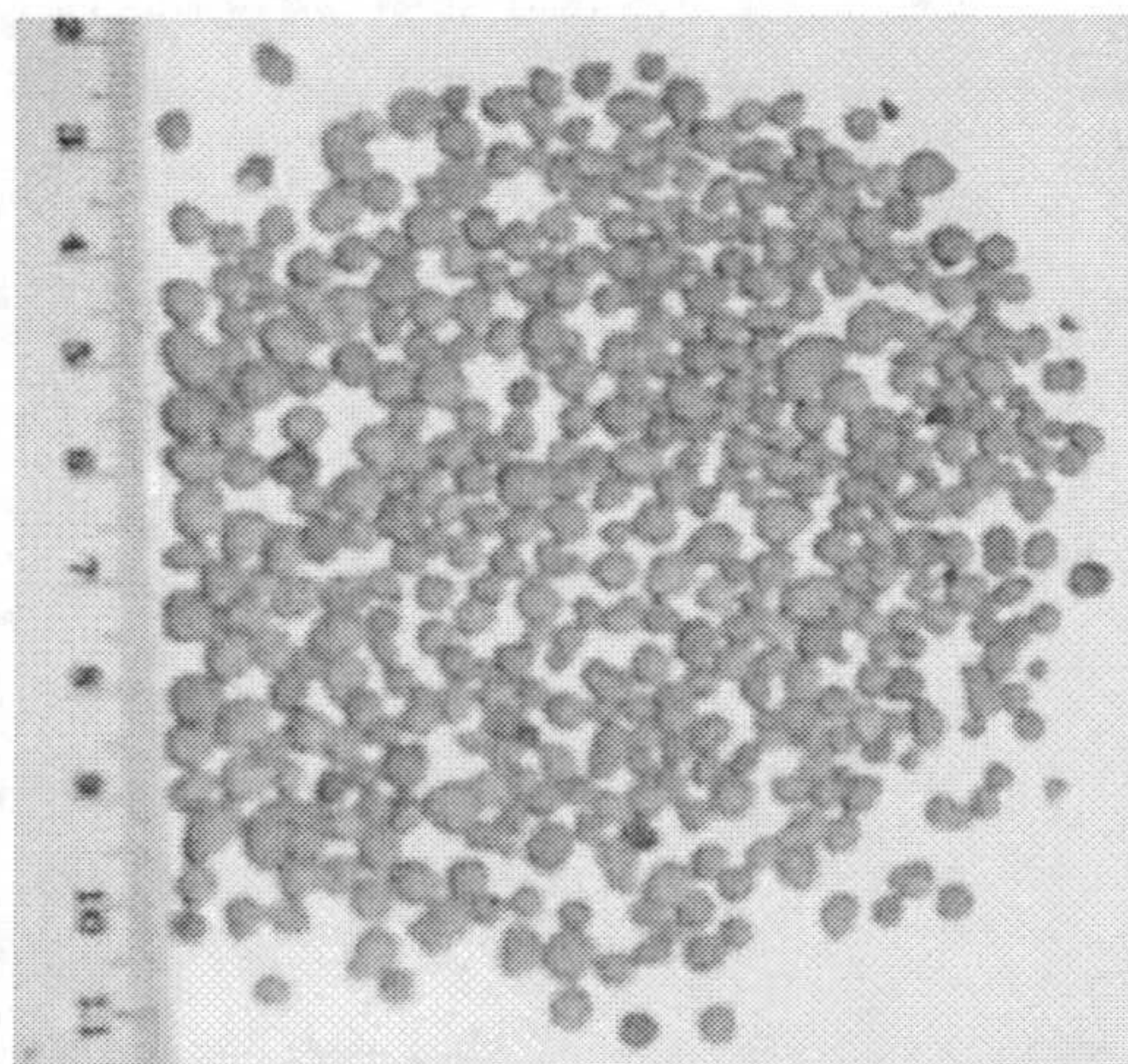
medio de cultivo que contenían cristales incrustados y se depositaron en un vaso de precipitados, se les adicionó agua destilada, y se fundieron en horno microondas a 600 W durante 50 segundos. Por último los cristales se lavaron varias veces con agua destilada a fin de quitarles los restos celulares y de agar, y se secaron en una estufa a 37° C.

## 7.- ENSAYOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE *M. xanthus* Y BIOADSORCIÓN DE METALES PESADOS POR LA MISMA

### 7.1.- Establecimiento de la biopelícula de *M. xanthus*

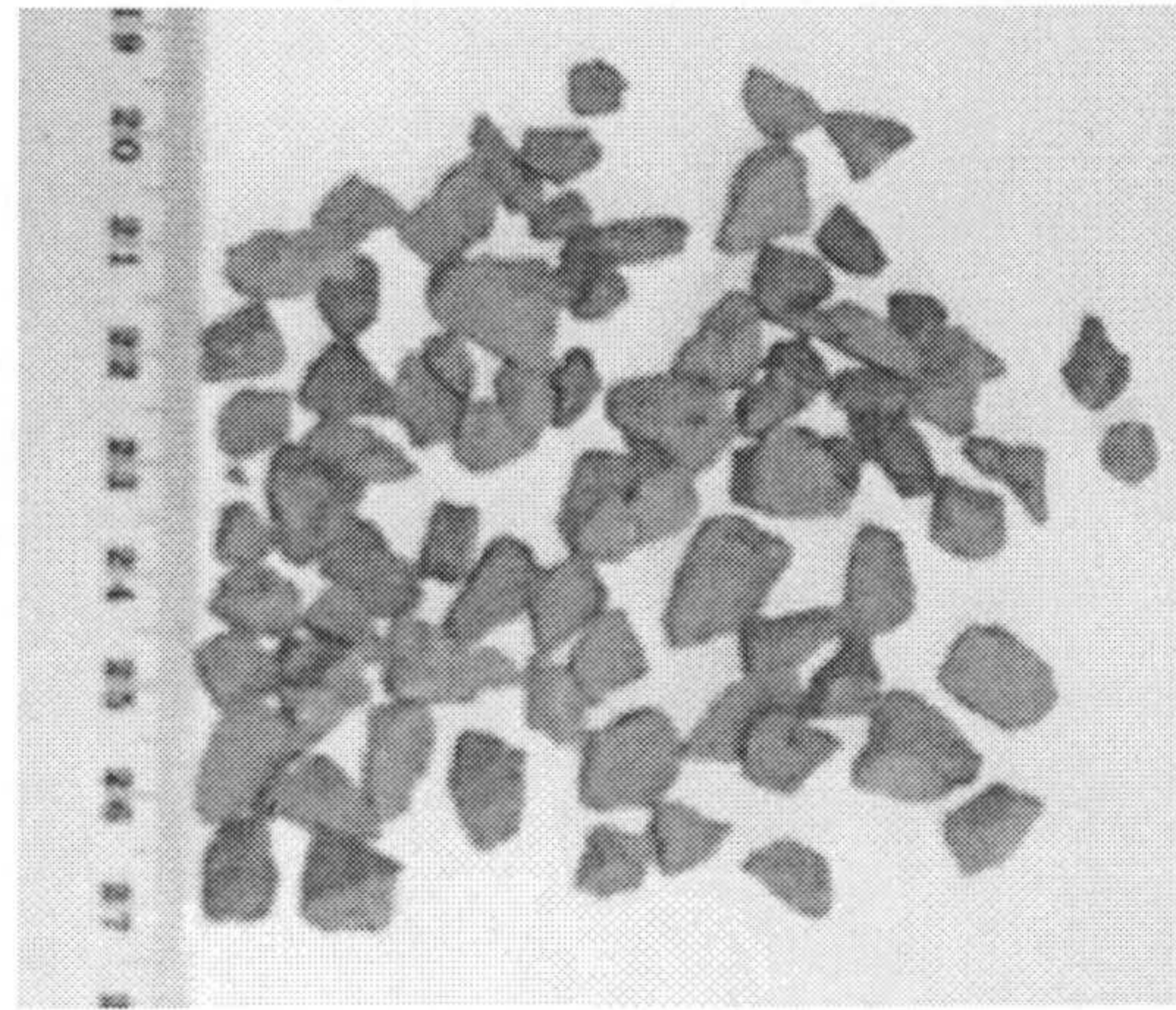
Para llevar a cabo estos ensayos se utilizaron dos tipos de material de soporte sobre el que crear la biopelícula: 1).- una arcilla inerte registrada bajo el nombre de Filtrolite en forma de bolitas y 2).- un soporte arcilloso poroso, concretamente residuos de ladrillo procedente del rechazo por roturas por deficiente manipulación, pero con cocción correcta. La granulometría del material arcilloso fue de 5-7mm, la misma utilizada en otros trabajos de investigación (Osorio *et al.*, 2001; Richard y Thebault, 1992; Pujol *et al.*, 1998). (Figuras 10 y 11)

**Figura 10 : Fotografía del soporte Filtrolite (1) utilizado para el establecimiento de la biopelícula de *M. xanthus*.**





**Figura 11: Fotografía del soporte arcilloso poroso (2) utilizado para el establecimiento de la biopelícula de *M. xanthus*.**



A matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml del medio M-9 líquido, se adicionó la misma cantidad de 40g del soporte previamente esterilizada en el autoclave a 120° C durante 20min, se inocularon con 3 ml de un cultivo de 48 horas de *M. xanthus* obtenido en CT y se incubaron a 28° C en agitación a 100rpm durante 10 días.

### **7.2.- Utilización de la biopelícula de *M. xanthus* para bioadsorción de metales**

Transcurrido el tiempo de incubación se decantó el líquido y al material soporte Filtrolite, que se queda en los matraces, se le añadió 100 ml de las soluciones del metal, preparadas en agua MilliQ, a la concentración correspondiente:

- Cobalto a 0,4 mM,
- Cromo a 0,4 mM,
- Manganeso a 0,4 mM
- Cobre a 1 mM

A continuación, los matraces se incubaron a 28° C y se dejaron en contacto con los metales en agitación suave (a 100rpm) durante dos horas, transcurridas las cuales se decantó la solución, se centrifugó a 4000rpm durante 3min y luego se



congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis bioquímico. Los soportes se llevaron para su observación en el microscopio electrónico de barrido (MEB).

## **8.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA OBSERVACIÓN Y ESTUDIO CON MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA**

### **8.1.- Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

*Preparación de muestras biológicas.* Para su estudio, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), las muestras se fijaron en una solución al 2% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1M, pH 7,4 durante 2h a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación se lavaron 3 veces en tampón cacodilato durante 10min, se deshidrataron en gradiente de etanol del 30% al 100% y óxido de propileno durante 10 min. Después se infiltraron durante 1h en una mezcla de óxido de propileno-resina (Epon)1:1 y se dejaron durante toda la noche en resina pura, posteriormente las muestras se polimerizaron en estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 14h. Los cortes ultrafinos fueron realizados con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S, y, posteriormente, montados sobre rejillas de cobre y sombreadas con carbón. Las muestras así preparadas quedaban listas para su observación con MET.

Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio electrónico de transmisión C. Zeiss EM 10C

### **8.2.- Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

*Preparación de muestras biológicas.* Las muestras se fijaron en una solución al 2% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación se lavaron en tampón cacodilato y se adhirieron con Poly-L-lisina. Se postfijaron con tetróxido de Osmio al 2% durante 1 hora. Se deshidrataron con gradiente de etanol.



Las muestras se metalizaron con oro y se analizaron en microscopio electrónico de barrido (Zeiss DSM-950).

**Preparación de cristales.** Las muestras fueron vaporizadas con carbono y analizadas en microscopio electrónico de barrido (Zeiss DSM-950) equipado con un sistema de microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX)(Link QX 2000). Las muestras fueron excitadas a 20 Kv y ventana de berilio. Una vez realizados los microanálisis correspondientes, las muestras se metalizaron con oro para la observación de la morfología de los cristales. Esto permite la obtención de imágenes de más calidad y mejor contrastadas.

## 9.- DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

La identificación de los cristales fue llevada a cabo por difracción de Rayos X usando un difractómetro Philips PW-1710. La calibración del aparato fue conseguida utilizando sílice estándar con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$ ), a un rango de 0 a  $60^\circ 2\theta$ , con pasos de  $0,4^\circ 2\theta$  y una velocidad de goniómetro de  $0,1^\circ 2\theta \text{ s}^{-1}$ .

## 10.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS FT-IR

Los espectros fueron obtenidos usando un espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier, Nicolet 20SXB, con paquete de software OMNIC v 1,1.

Para la realización de este tipo de análisis, de la biomasa seca tratada y no tratada con el metal, se toma la misma cantidad de cada tipo de muestra y se suspende en una solución de bromuro potásico al 1% en condiciones estándar (Merroun *et al.*, 2003). Los espectros de los pellets de KBr fueron registrados entre  $500$  y  $4000\text{cm}^{-1}$  a una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$  y a temperatura ambiente.



## 11.- ESPECTROSCOPIA EXAFS

Los espectros de absorción de rayos X del sub-nivel  $L_{III}$  de uranio fueron recogidos a temperatura ambiente en modo de la fluorescencia en Beamline Rossendorf (ROBL) en las grandes instalaciones del sincrotrón de Europa ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), en Grenoble (Francia), que usaba el monocromador de doble-cristal Si(111). La energía fue calibrada midiendo el espectro de la transmisión del nivel K Y de una hoja del itrio y definiendo el primer punto de la inflexión a 17038eV. La muestra de *M. xanthus*/uranio fue medida como muestras de biomasa seca. De cada muestra fueron recogidos ocho espectros. Las oscilaciones de EXAFS fueron extraídas de los datos sin tratar, promediados mediante la eliminación del fondo del pre-borde, usando un polinomio de primer orden, seguido por la eliminación de la absorción atómica  $\mu_0$  por técnicas de ajuste "spline" y normalizados mediante una función "Victoreen". Se aplicó una corrección del tiempo muerto. La energía de ionización,  $E_0$ , del electrón U  $L_{III}$ , fue arbitrariamente determinada a 17185 eV para todos los espectros calculados. Los espectros de EXAFS fueron analizados según los procedimientos estándar usando el programa EXAFSPAK. Las funciones de fase y de amplitud de difusión teóricas usados para el análisis de los datos fueron calculadas usando FEFF8.

## 12.- ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

El análisis químico de los iones metálicos en solución se realizó mediante un espectrómetro de absorción atómica PERKIN-ELMER mod. 5100, con cámara de grafito PERKIN-ELMER mod. 5100 ZL ZEEMAN, sistema de inyección PERKIN-ELMER FIAS-100, automuestrador PERKIN-ELMER AS-90, generador de Hidruros VARIAN, VGA-76, lámpara de cátodo hueco de diferentes elementos y digestor de microondas CEM, MDS-2000.



*IV.- RESULTADOS*

UNIVERSIDAD DE GRANADA

20 MAYO 2004

COMISION DE DOCTORADO







## CAPITULO I: INFLUENCIA DE DIFERENTES METALES PESADOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL CICLO DE VIDA DE *M. xanthus*.

En el presente capitulo se estudiará

A.- La concentración mínima inhibitoria de plata, cobalto, cromo, cobre, uranio, plomo, lantano y manganeso, sobre la cepa proliferante 422 de *M. xanthus*.

B.- Estudio del crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de diferentes concentraciones de metales pesados.

C.- La influencia de los metales pesados sobre el ciclo de vida de distintas cepas de *M. xanthus*.

### 1).- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS DISTINTOS IONES METÁLICOS (CMI)

Este primer experimento tenía como objetivo determinar la concentración mínima a partir de la cual los metales pesados (plata, cobalto, cromo, cobre, uranio, plomo, lantano y manganeso) inhiben el crecimiento de la cepa 422 de *M. xanthus*. Para ello se inocularon con un cultivo de 48 horas medios sólidos CTA previamente adicionados con las siguientes concentraciones de metales: 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 y 20 mM y se incubaron durante varios días a 28° C. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3. Como puede verse en esta tabla, la concentración mínima de cada metal a partir de la cual hay inhibición del crecimiento de la cepa proliferante 422 de *M. xanthus* es la siguiente:

| Metal     | CMIs (mM) |
|-----------|-----------|
| Plata     | 0,5       |
| Cobalto   | 1         |
| Cromo     | 2,5       |
| Cobre     | 2,5       |
| Uranio    | 10        |
| Plomo     | 10        |
| Lantano   | 2,5       |
| Manganeso | 20        |



Según los datos indicados en esta tabla, manganeso, plomo y uranio son los metales más tolerados por *M. xanthus*, mientras que en presencia de plata la bacteria muestra más sensibilidad indicando que este metal es el más tóxico para *M. xanthus*. El orden de toxicidad de los metales para *M. xanthus* 422 es el siguiente: Ag > Co > Cr = Cu = La > U = Pb > Mn.

**Tabla 3.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

| Conc. (mM)<br>Metal | 0,005 | 0,01 | 0,05 | 0,1 | 0,5 | 1 | 2,5 | 5 | 10 | 20 |
|---------------------|-------|------|------|-----|-----|---|-----|---|----|----|
| Plata               | +     | +    | +    | +   | -   | - | -   | - | -  | -  |
| Cobalto             | +     | +    | +    | +   | +   | - | -   | - | -  | -  |
| Cromo               | +     | +    | +    | +   | +   | + | -   | - | -  | -  |
| Cobre               | +     | +    | +    | +   | +   | + | -   | - | -  | -  |
| Uranio              | +     | +    | +    | +   | +   | + | +   | + | -  | -  |
| Plomo               | +     | +    | +    | +   | +   | + | +   | + | -  | -  |
| Lantano             | +     | +    | +    | +   | +   | + | -   | - | -  | -  |
| Manganeso           | +     | +    | +    | +   | +   | + | +   | + | +  | -  |

+ crecimiento; - ausencia crecimiento

## 2).- ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE *M. xanthus* 422 EN PRESENCIA DE DISTINTOS METALES PESADOS

Con el fin de estudiar el crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de distintos metales pesados se eligieron varias concentraciones de cada metal, incluida la CMI, y se hizo un seguimiento de la densidad óptica a 650nm durante varios días. Los iones metálicos elegidos para este estudio fueron: plata, cobalto, cromo, cobre, uranio, lantano, plomo y manganeso.

Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 12, 13, 14, 15, y 16.



La figura 12 presenta las curvas de crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de diferentes concentraciones de plata, según las cuales se puede comprobar que las bajas concentraciones de plata no tienen efecto sobre el crecimiento de la bacteria, pero cuando las células de *M. xanthus* se crecieron en medios conteniendo 0,5mM de plata, el crecimiento fue menor de manera que la densidad óptica se mantiene mas o menos sin variación durante todo el tiempo de incubación, lo que indica que el crecimiento fue inhibido a esta concentración del metal. Lo mismo ocurre en presencia de 1mM de cobalto, mientras que con 0,5mM de este último metal se muestra una fase exponencial un poco más larga y de menor pendiente que en su ausencia (Figura 13).

En cuanto al efecto del cromo sobre el crecimiento de la mixobacteria de ensayo, en la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse a la CMI de 2,5mM, el crecimiento se inhibe totalmente con una cierta tendencia a disminuir. No obstante, a una concentración de 1 y 0,5mM la densidad óptica alcanzada es ligeramente menor que respecto al testigo.

Respecto al cobre, los resultados obtenidos se presentan en la Figura 15. El crecimiento de *M. xanthus* 422 con las concentraciones 0,05mM y 0,1mM es parecido al control, las siguientes concentraciones mas altas 0,5mM y 1mM afectan al crecimiento y demuestran una fase exponencial mucho mas larga y con una pendiente marcadamente menor que la del testigo, mientras que la concentración 2,5mM es notablemente bactericida, provocando la lisis de las células inoculadas.

Con el uranio parece que las concentraciones probadas no tienen efecto inhibitorio sobre la bacteria ya que se ensaya hasta una concentración de 10mM lo que podría destacar la gran capacidad de *M. xanthus* de tolerar altas concentraciones de uranio (Figura 16).



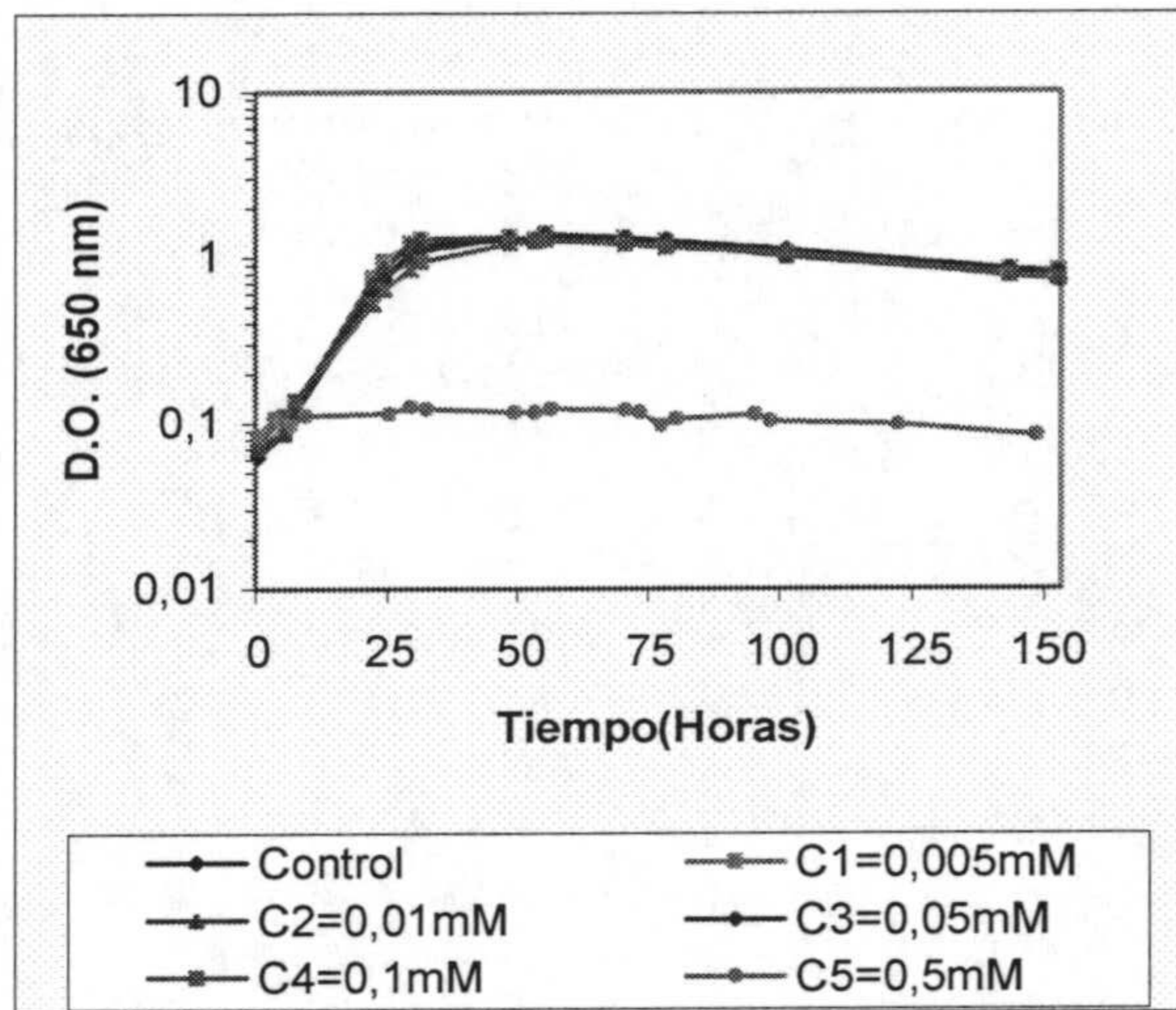


Figura 12.- Curvas de crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de plata

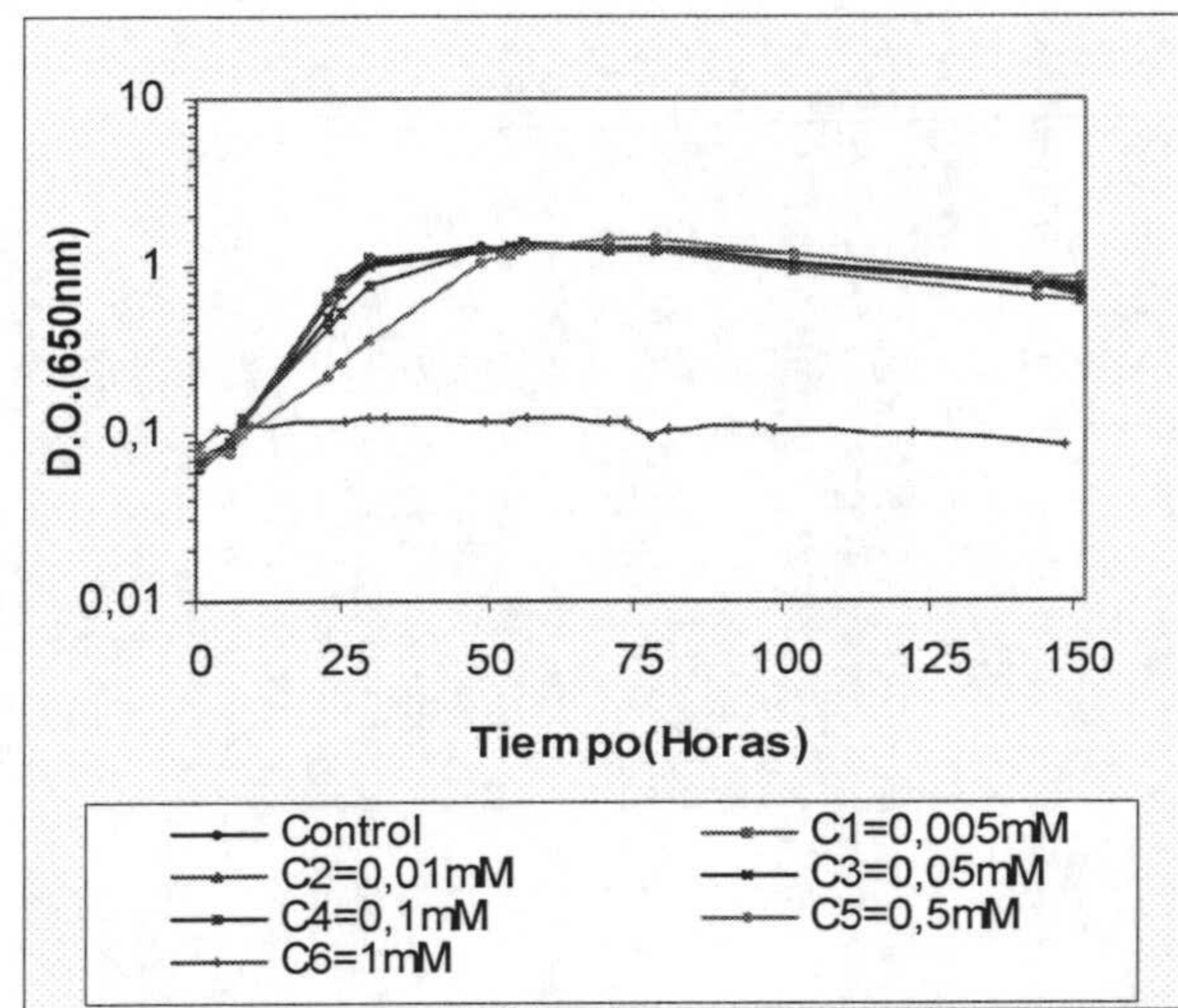


Figura 13.- Curvas de crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de cobalto

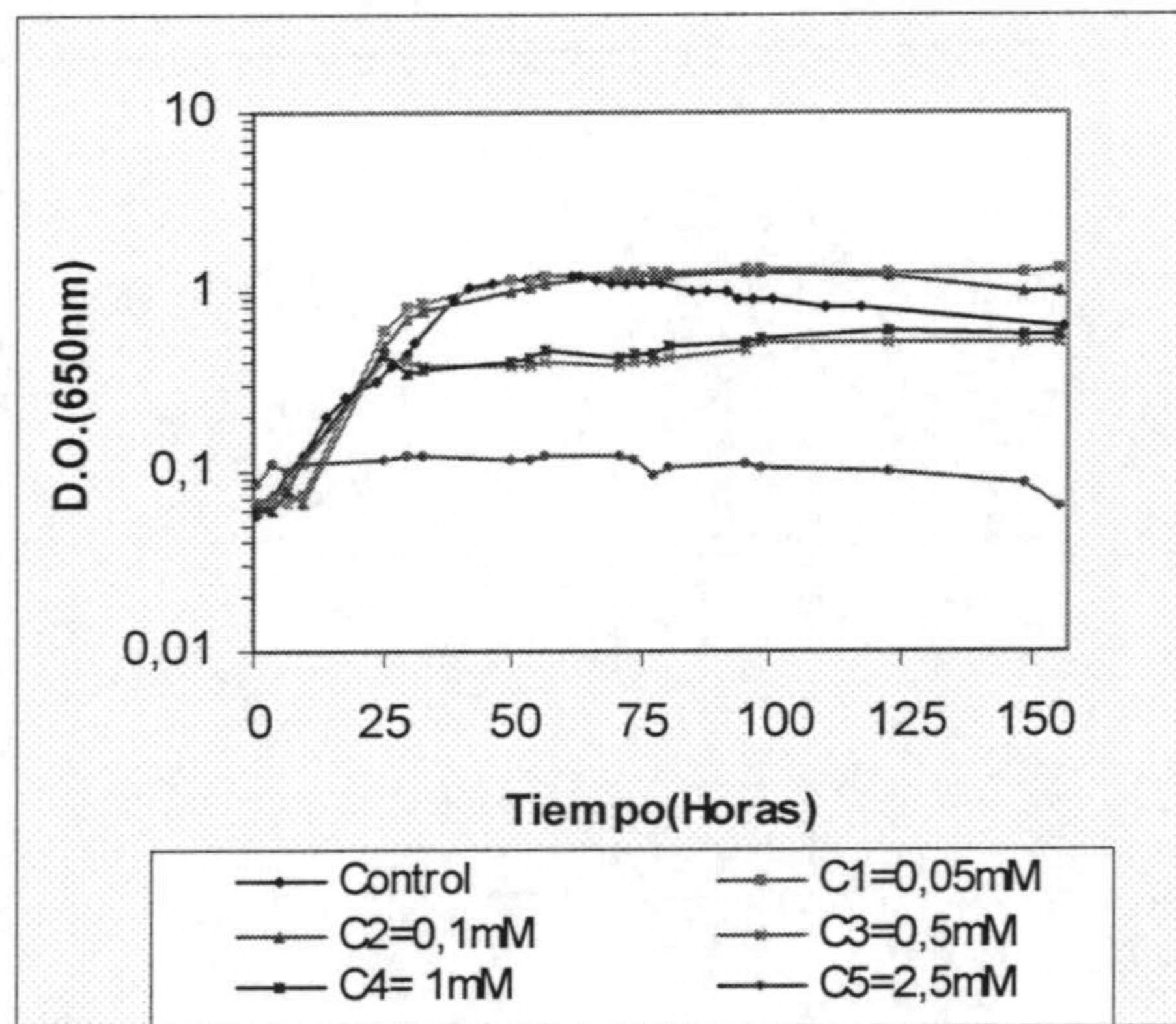


Figura 14.- Curvas de crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de cromo

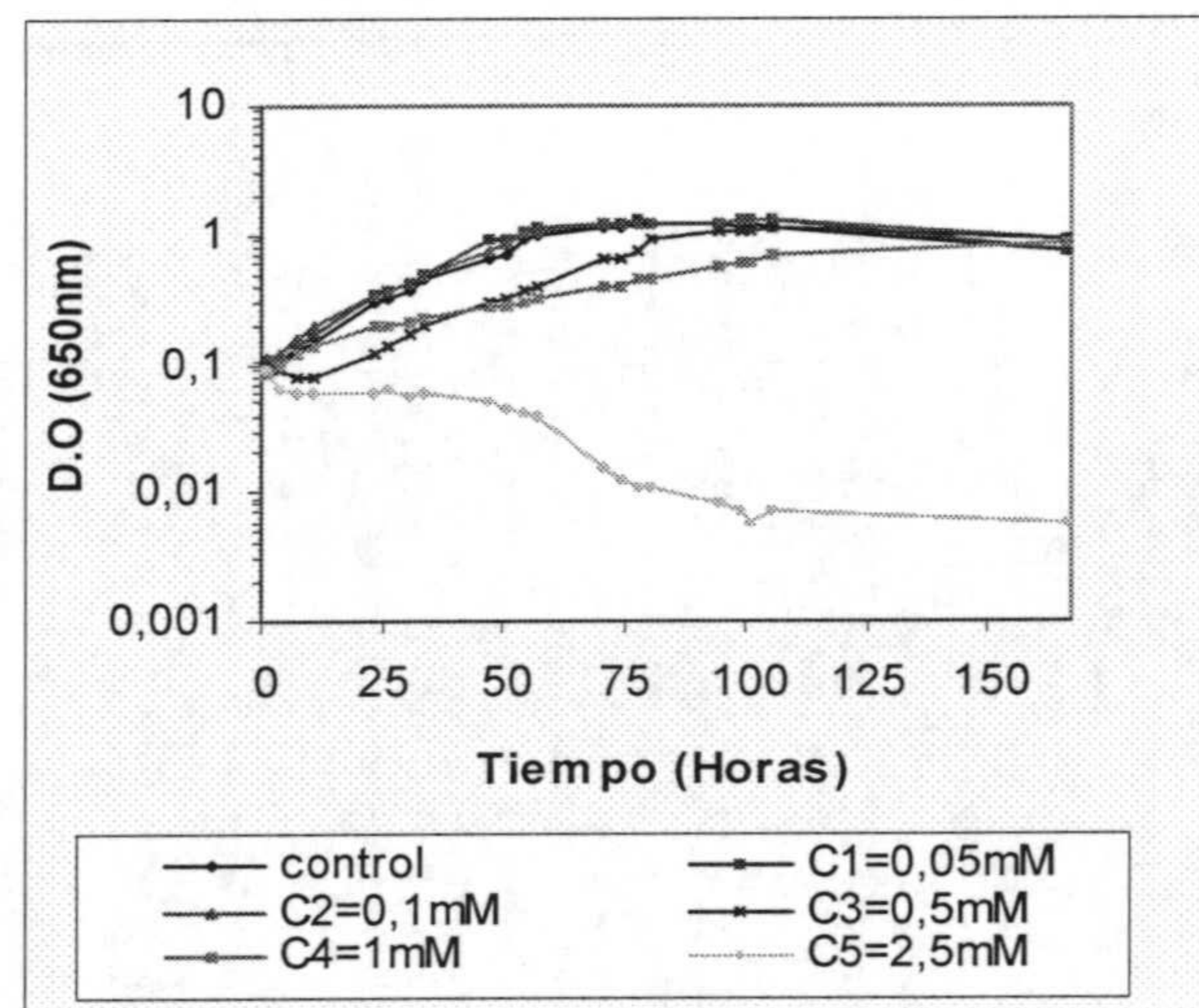


Figura 15.- Curvas de crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de cobre



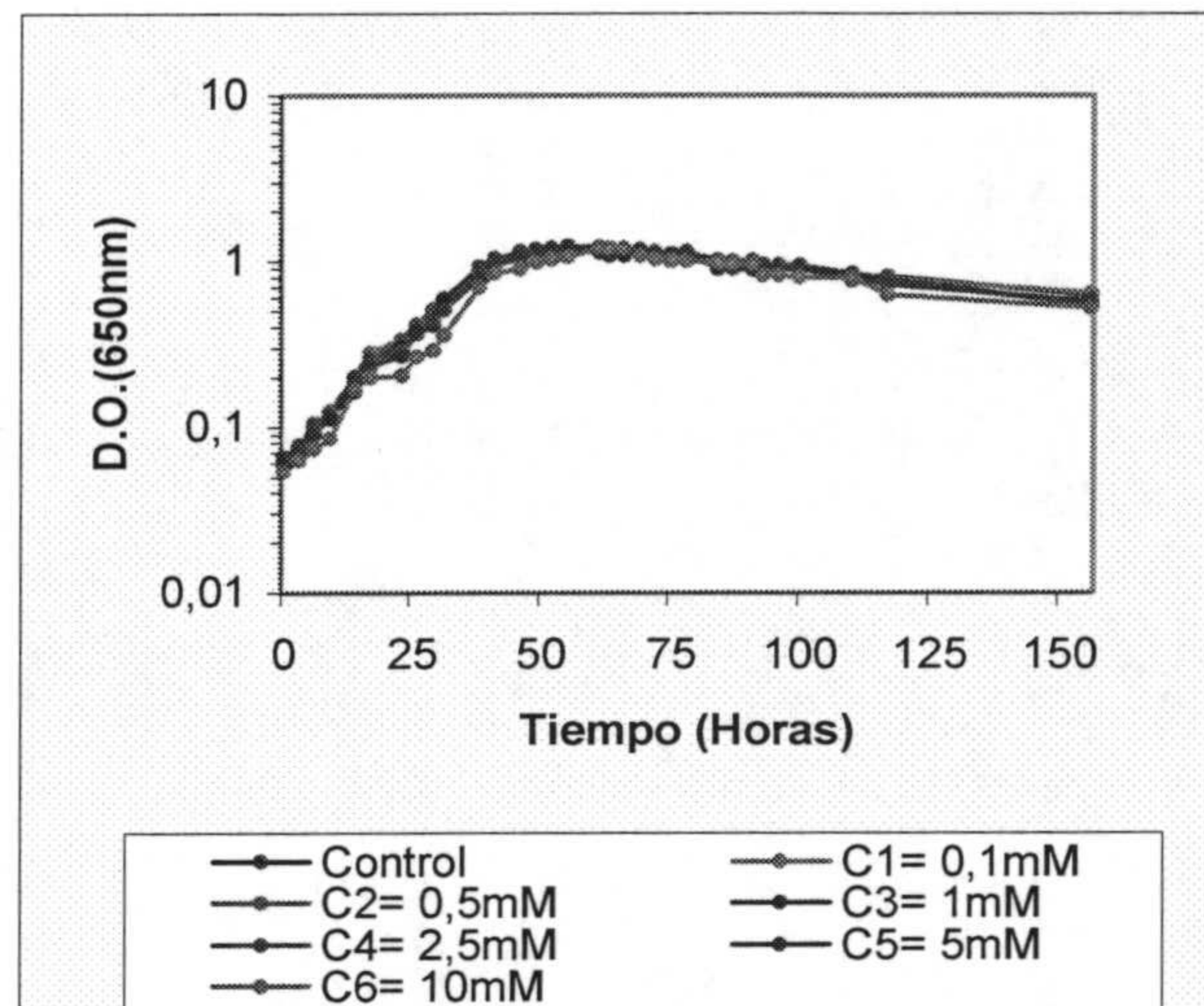


Figura 16.- Curvas de crecimiento de *M. xanthus* 422 en presencia de uranio

Las curvas de crecimiento de lantano, plomo, y manganeso no se han podido llevar a cabo por causa de la alta turbidez del medio en presencia de estos tres metales. Esta turbidez daba un aspecto muy denso a los cultivos y por consiguiente impedía tomar las medidas de la densidad óptica en el espectrofotómetro. Debido al movimiento por deslizamiento sobre superficies sólidas que presentan estas bacterias, tampoco es posible evaluar en número de células mediante el recuento de unidades formadoras de colonias.

### 3.- INFLUENCIA DE DISTINTOS METALES SOBRE EL CICLO DE DESARROLLO DE *M. xanthus*

Para llevar a cabo este estudio, y de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se procedió a comprobar el crecimiento, o no, de las distintas cepas de *M. xanthus* en los medios sólidos CYE y TPM adicionados con la CMI de cada metal. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, ya que todas las cepas de *M. xanthus* crecieron en los dos medios en presencia de las CMIs de los metales ensayados. Así que, para el estudio de la influencia de los metales pesados sobre el ciclo de vida de las distintas cepas de esta bacteria se han elegido la CMI y una concentración menor.



### A).- Efecto de los metales sobre la cepa 422 de *M. xanthus*

Para el estudio del efecto de los metales pesados sobre el ciclo de vida de la cepa 422 de *M. xanthus* se han utilizado los metales plata, cobalto, cromo, cobre, uranio, plomo, lantano, y manganeso a dos concentraciones diferentes, procediéndose de la manera descrita en Material y Métodos. Se ha hecho el estudio en dos medios diferentes CYE y TPM para estudiar el efecto sobre el crecimiento y la pigmentación, y el efecto sobre la formación de los cuerpos fructificantes. Los resultados de este estudio están indicados en la Tabla 4.

En la figura 17 se muestran las fotografías del aspecto de las colonias de la cepa salvaje (422) de *M. xanthus* en el medio CYE en función del tiempo de incubación, así como un detalle del borde de las mismas. En la figura se muestran también las fotografías del proceso de formación de cuerpos fructificantes de la cepa salvaje 422 en función del tiempo de incubación cuando se utiliza el medio TPM. Como puede observarse los cuerpos fructificantes están claramente formados a las 24 horas, permaneciendo estables cuando la incubación se prolonga a 48 y 72 horas.

Menos con el cromo y con el manganeso, en ningún caso de los demás metales ensayados se observa la formación de los cuerpos fructificante. En presencia de la plata se nota un claro efecto sobre el movimiento de las colonias, que aumenta conforme sube la concentración (Figura 18). El cromo no afecta al crecimiento pero sí al movimiento que se va viendo limitado en función del aumento de concentración. Se percibe también un cambio de la coloración de la colonia que se oscurece en comparación con el testigo. Además se observa la formación de los cuerpos fructificantes tanto con la concentración baja como con la alta (Figura 19). El cobre, al igual que el cromo, limita el movimiento e induce una pigmentación en las colonias que en este caso se ve más intensa en el borde de la colonia que en el centro, pero también afecta a la formación de los cuerpos fructificante al igual que la plata (Figura 20). El uranio afecta al movimiento de manera que las colonias aparecen con los bordes muy marcados, y tiene también algún efecto sobre el crecimiento que se retrasa hasta los 72h (Figura 21). Con el plomo aparece la inducción de una fuerte



pigmentación que se percibe a partir de las 48 horas en los bordes de las colonias y luego se propaga hacia el centro, conforme pasa el tiempo. El movimiento se ve también afectado por este metal, ya que las colonias se presentan con los bordes muy marcados (Figura 22). El lantano induce por su parte una ligera pigmentación y afecta al movimiento, que se inhibe tanto con la concentración alta como con la baja, mientras que el crecimiento se ve más afectado conforme aumenta la concentración utilizada (Figura 23). El manganeso, al igual que el plomo, induce una fuerte pigmentación, pero que en este caso se ve más uniforme en toda la colonia y no sólo en los bordes (Figura 24).

**Tabla 4.- Influencia de los metales sobre el ciclo de vida de *M. xanthus* 422**

| Metales   | Concentraciones de los metales (mM) | Crecimiento, movimiento y pigmentación   | Formación de cuerpos fructificantes             |
|-----------|-------------------------------------|--|---|
| Plata     | 0,1 y 0,5                           | - Aparece con borde marcado<br>- Conforme aumenta la concentración baja el crecimiento<br>- Aparecen cristales oscuros (Figura 18)       | No se forman cuerpos fructificantes (Figura 18) |
| Cobalto   | 0,5 y 1                             | No afecta ni al crecimiento ni a la pigmentación   | No se forman cuerpos fructificantes             |
| Cromo     | 1 y 2,5                             | - Color mas intenso y borde marcado<br>- Afecta al movimiento (Figura 19)  | Se forman cuerpos fructificantes                |
| Cobre     | 1 y 2.5                             | Con el tiempo aumenta la pigmentación y se limita el movimiento (Figura 20)  | No se forman cuerpos fructificantes             |
| Uranio    | 5 y 10                              | - Entre las concentraciones altas y bajas apenas existe diferencia de pigmentación<br>- No hay movimiento, borde muy marcado (Figura 21) | No se forman cuerpos fructificantes             |
| Plomo     | 5 y 10                              | - La coloración aumenta y el crecimiento se limita conforme sube la concentración<br>- El borde aparece muy marcado (Figura 22)          | No se forman cuerpos fructificantes             |
| Lantano   | 1 y 2,5                             | Conforme sube la concentración hay menos movimiento y menos pigmentación (Figura 23)   | No se forman cuerpos fructificantes             |
| Manganeso | 10 y 20                             | - Color naranja-marrón muy oscuro que aumenta con el tiempo<br>- Afecta al movimiento (Figura 24)  | Poca diferencia con el testigo                  |



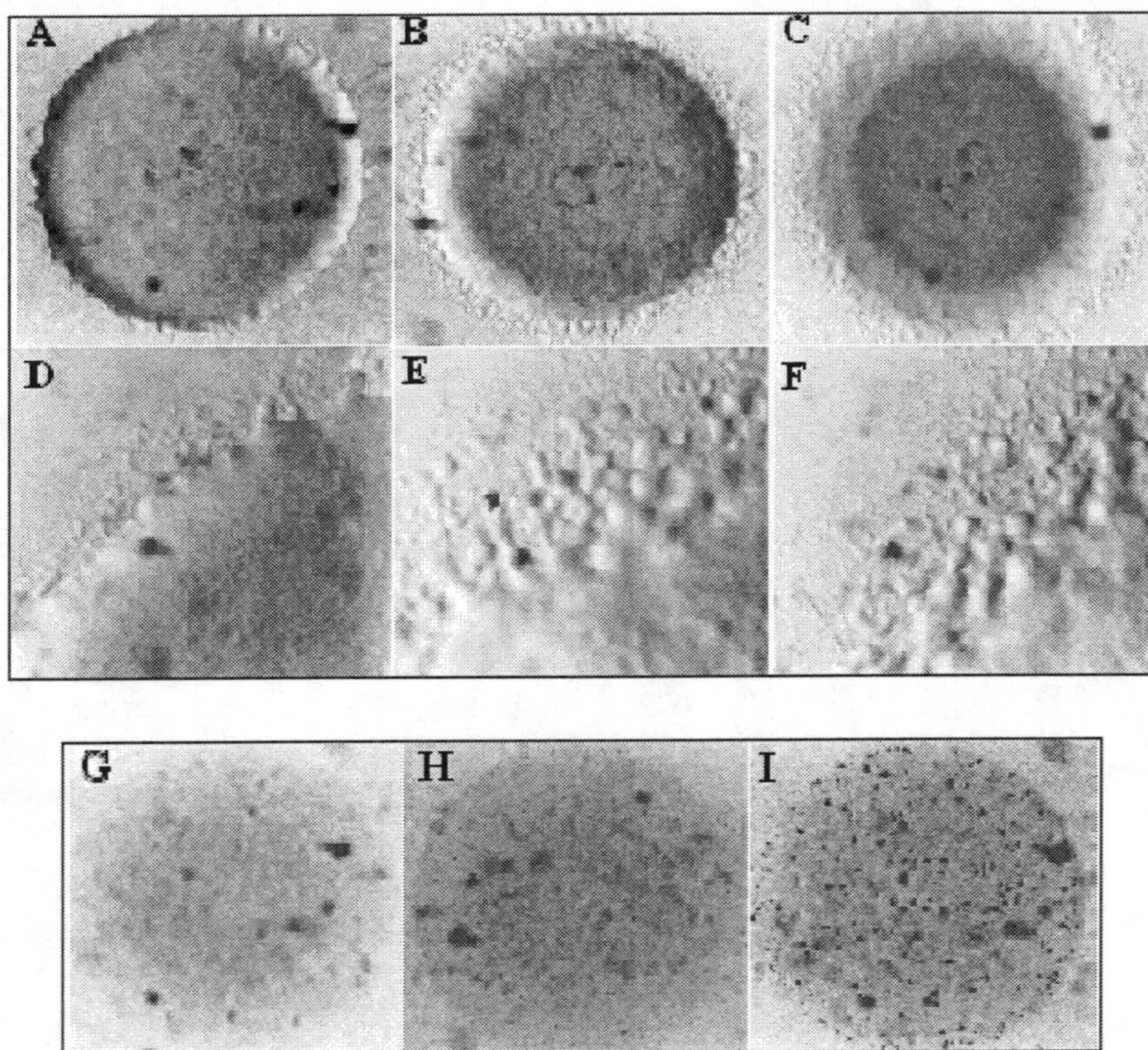


Figura 17.- Colonias de la cepa 422. En el medio CYE a las 24h (A, D), 48h (B, E), 72h (C, F). En el medio TPM a las 24h (G), 48h (H) y 72 (I). (A, B, C, G, H, I: X 3), (D, E, F: x 16)

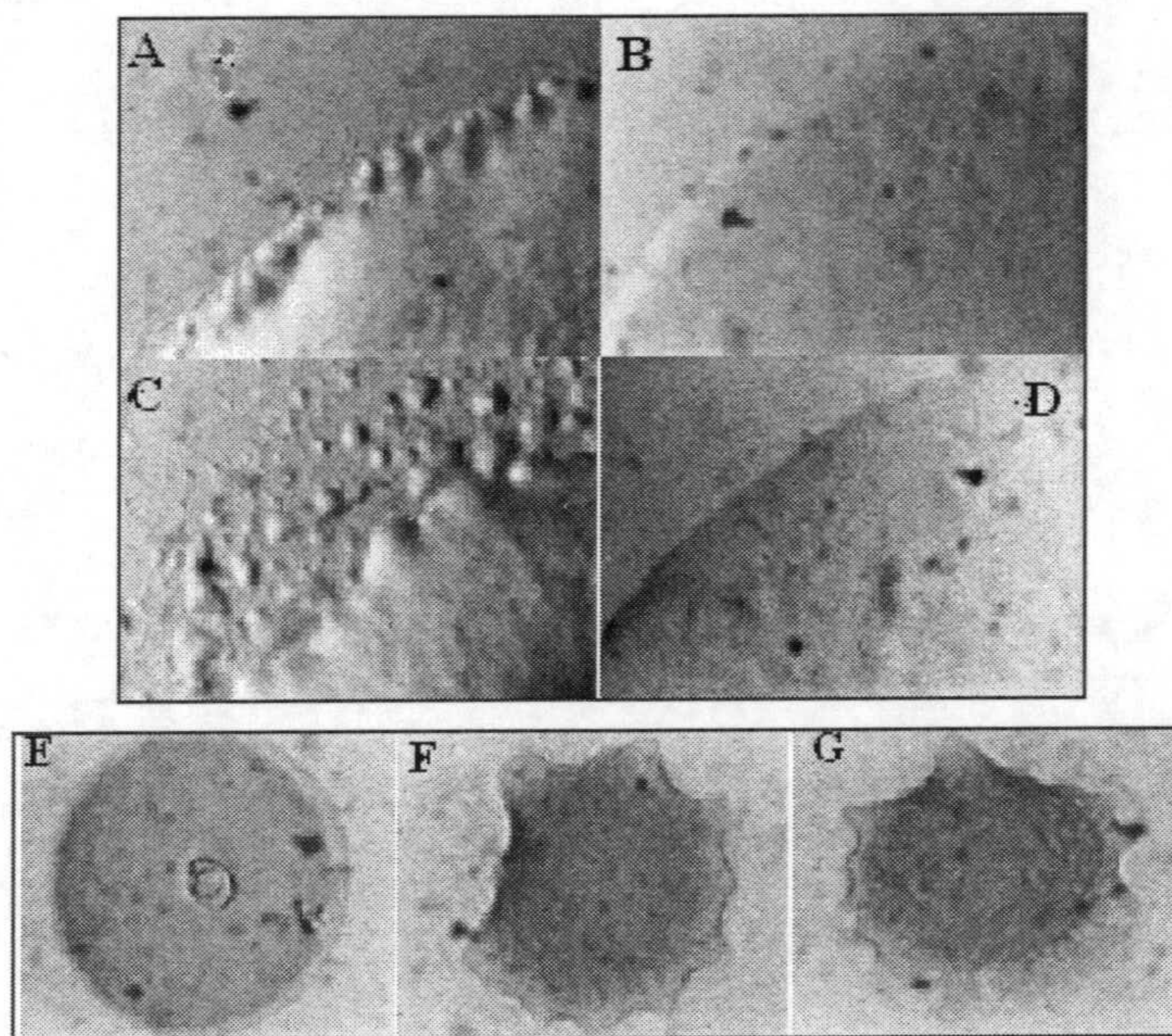


Figura 18.- Colonias de la cepa 422 en presencia de plata. En el medio CYE a 0,1mM a las 48h (A), 72h (C) y a 0,5mM a las 48h (B), y 72h (D). En el medio TPM a 0,1mM a las 24h (E), 48h (F) y 72h (G). (A, B, C, D: x 16) (E, F, G: x 3)



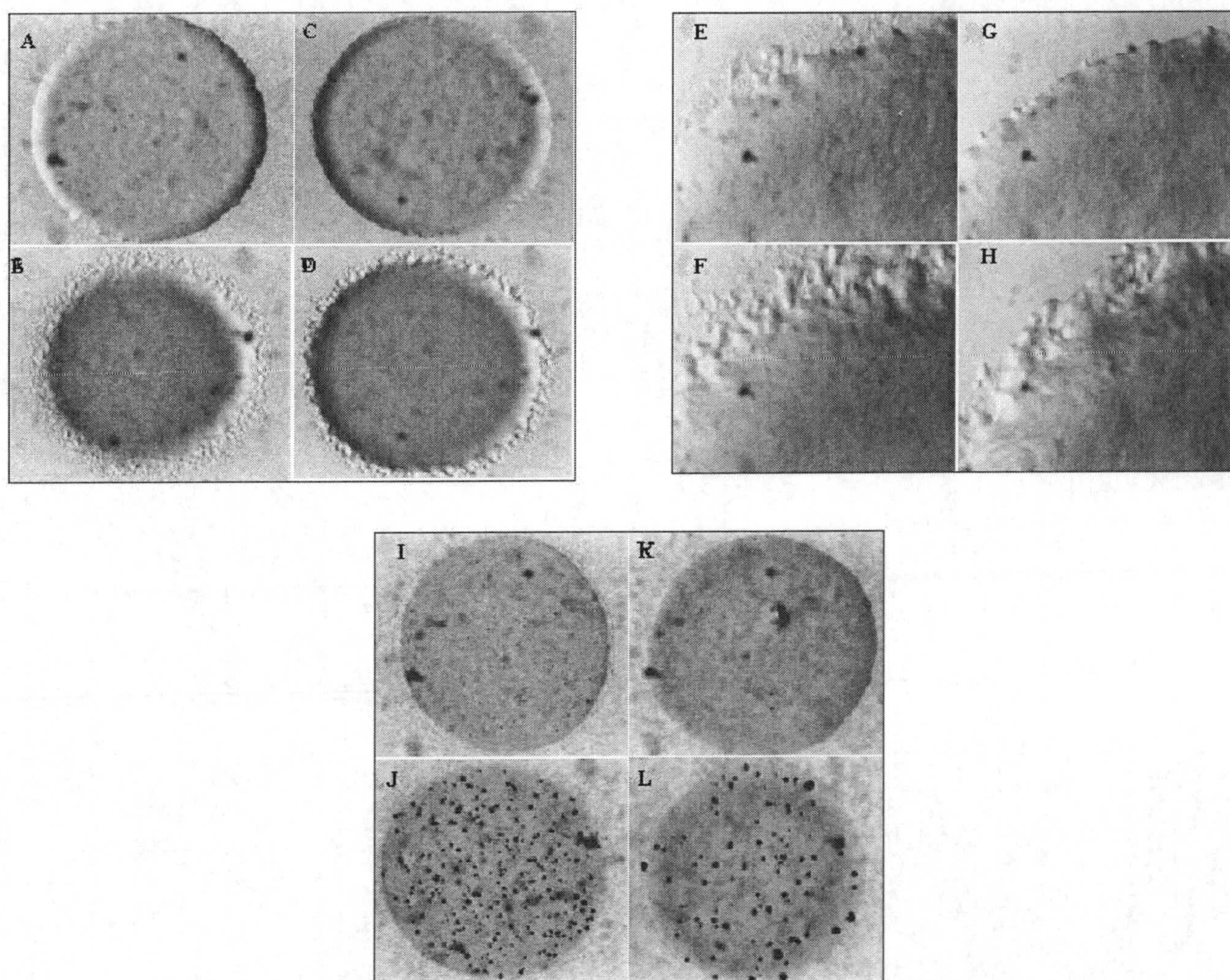


Figura 19.- Colonias de la cepa 422 en presencia de cromo. En el medio CYE a 1mM a las 24h (A, E) y 72h (B, F) y a 2,5mM a las 24h (C, G) y 48h (D, H). En el medio TPM a 1mM a las 48h (I), 72h (J) y a 2,5mM 48h (K), 72h (L). (A, B, C, D, I, J, K, L: X 3), (E, F, G, H: x 16)

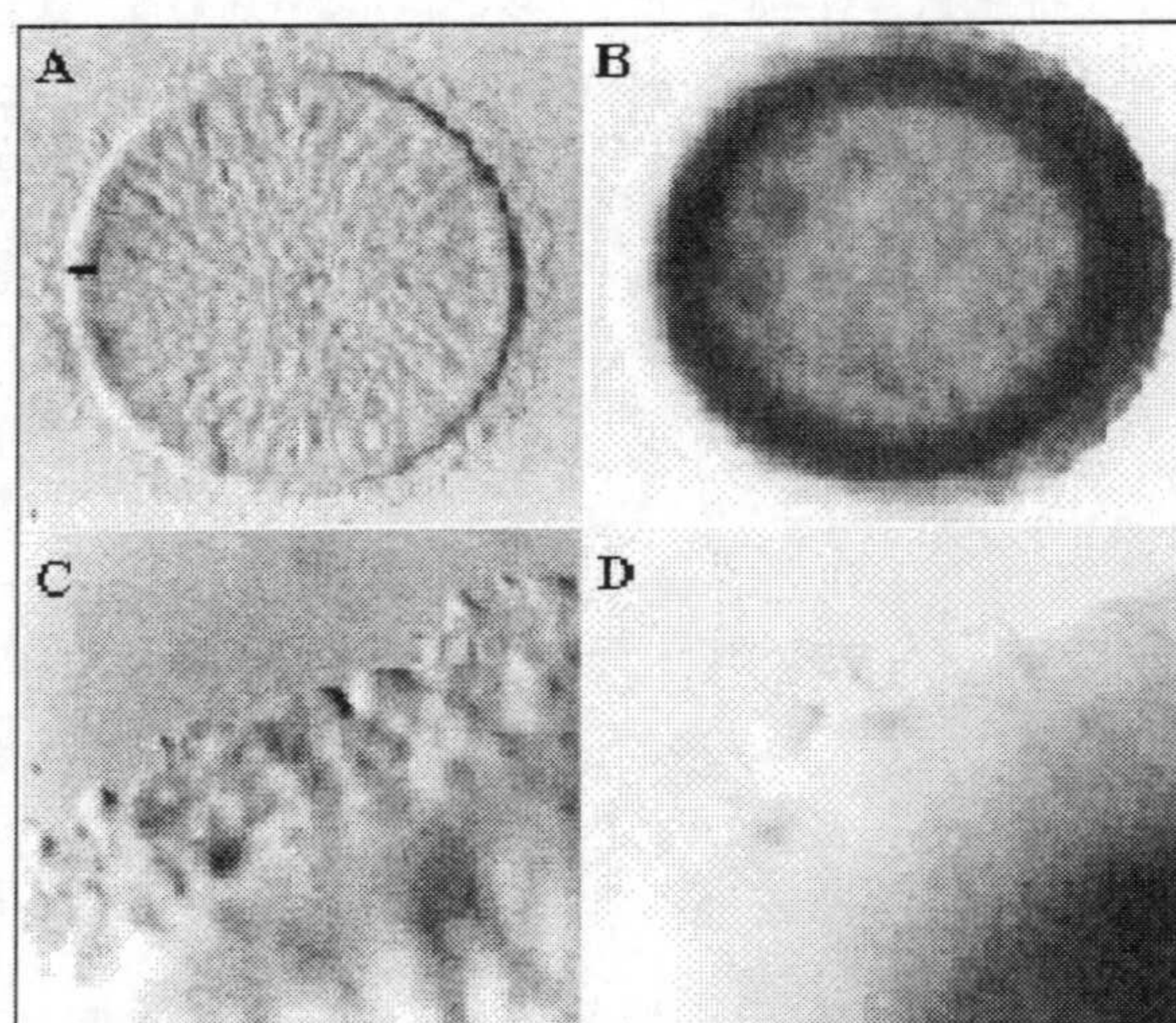


Figura 20.- Colonias de la cepa 422 en el medio CYE en presencia de cobre a 1mM a las 48h (A, C), 72h (B, D). (A, B: x 3), (C, D: x 16).



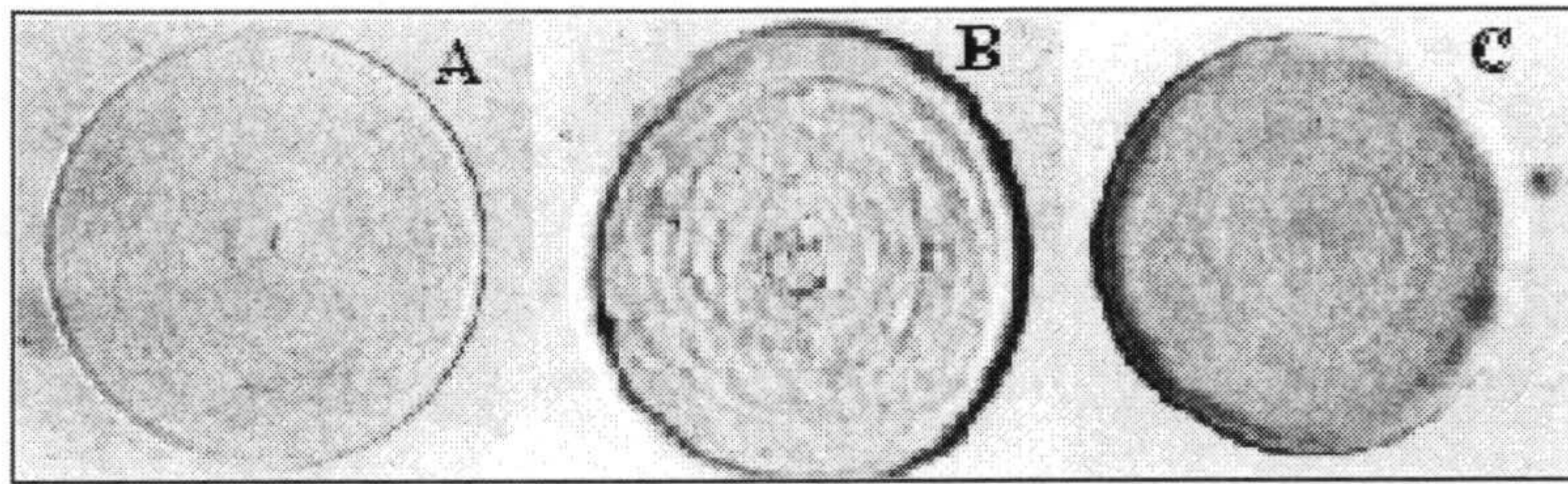


Figura 21.- Colonias de la cepa 422 en medio CYE en presencia de 5mM de uranio a las 24h (A), 48h (B), y 72h (C). (x3)

Figura 22.- Colonias de la cepa 422 en el medio CYE en presencia de 5mM de plomo a las 24h (A, D), 48h (B, E), 72h (C, F). (A, B, C: x 3) y (D, E, F: x 16)

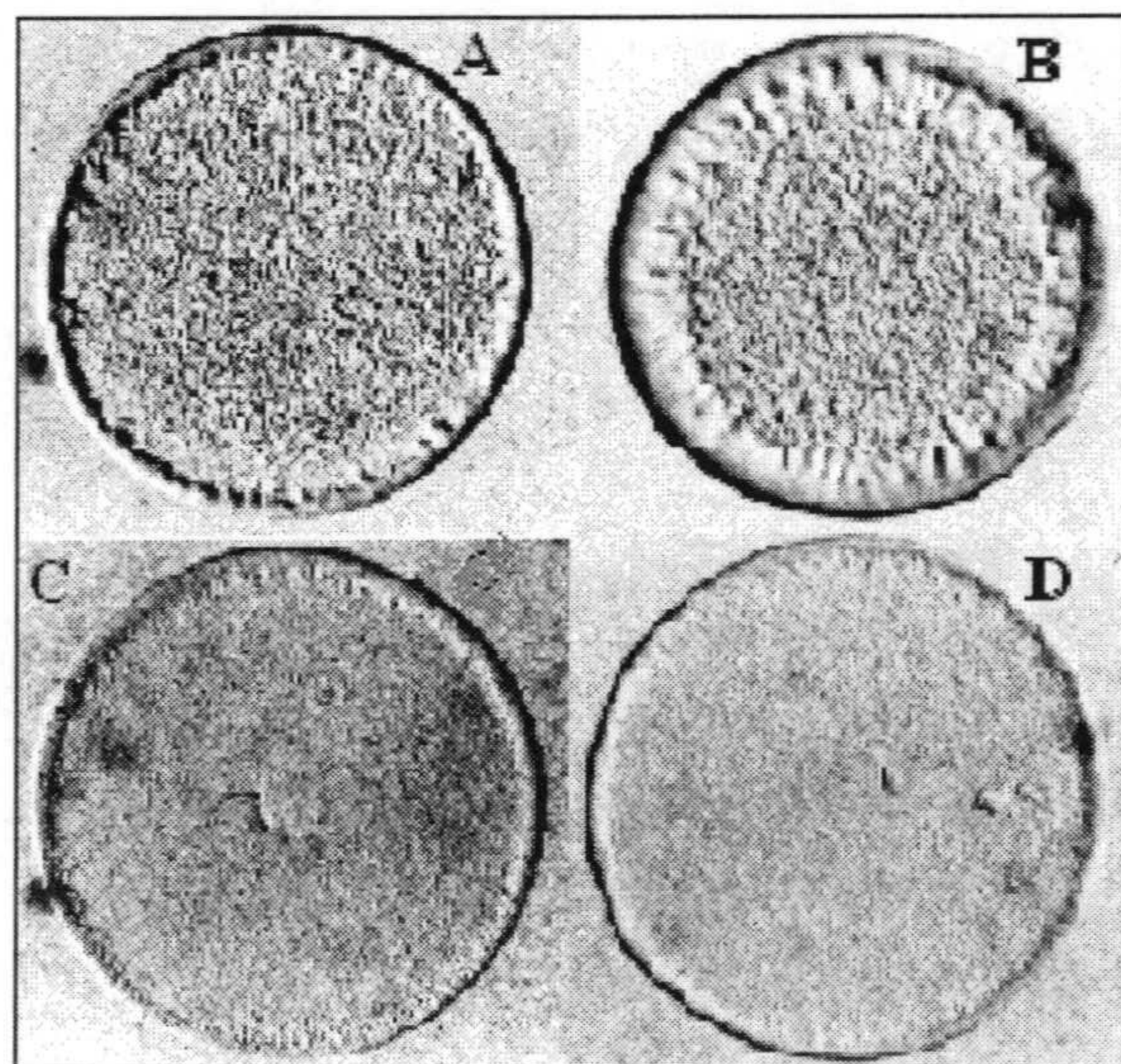
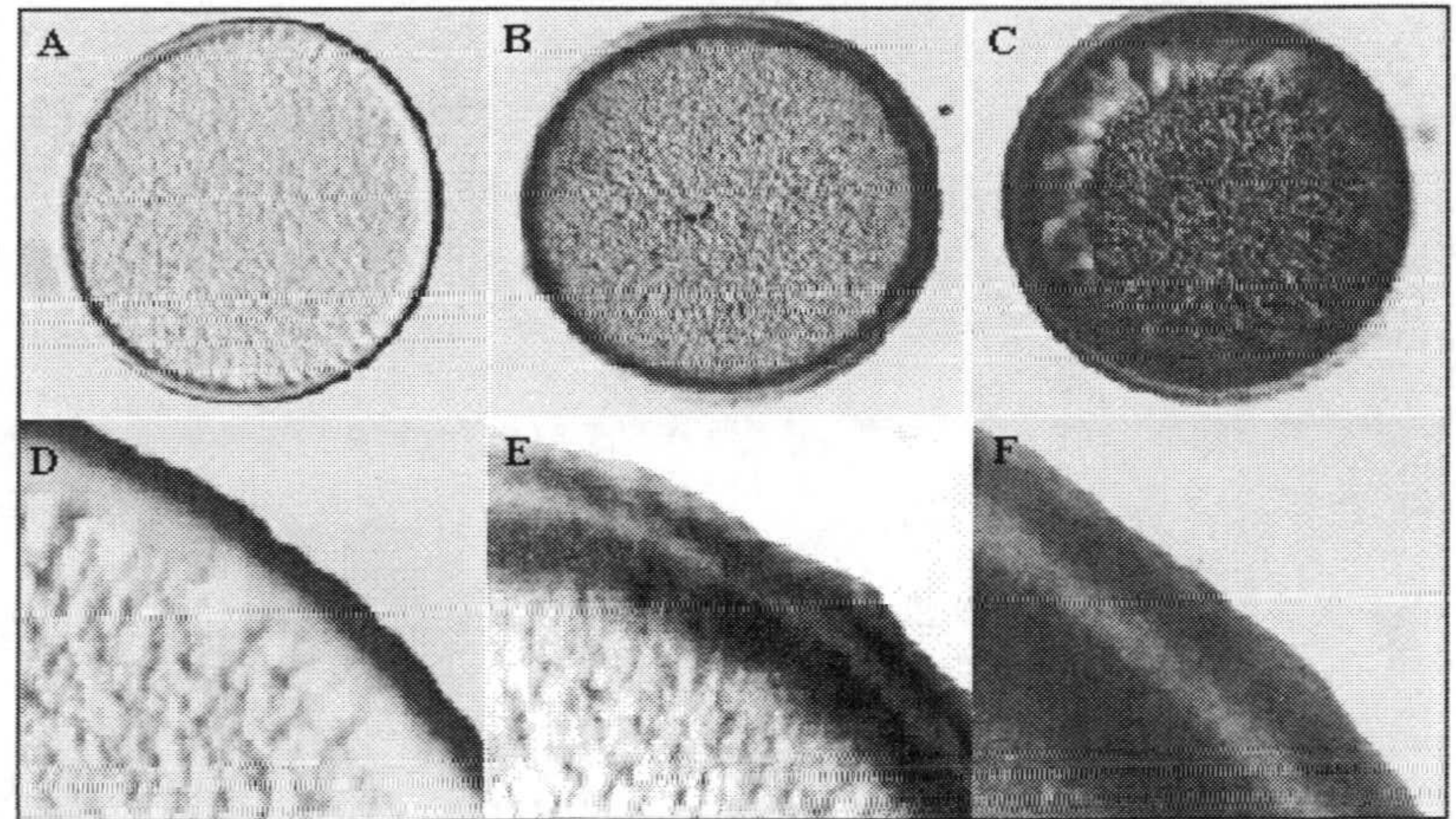


Figura 23.- Colonias de la cepa 422 en el medio CYE en presencia de lantano a 1mM a las 48h (A), 72h (B) y a 2,5mM a las 48h (C), 72h (D). (x 3,5)



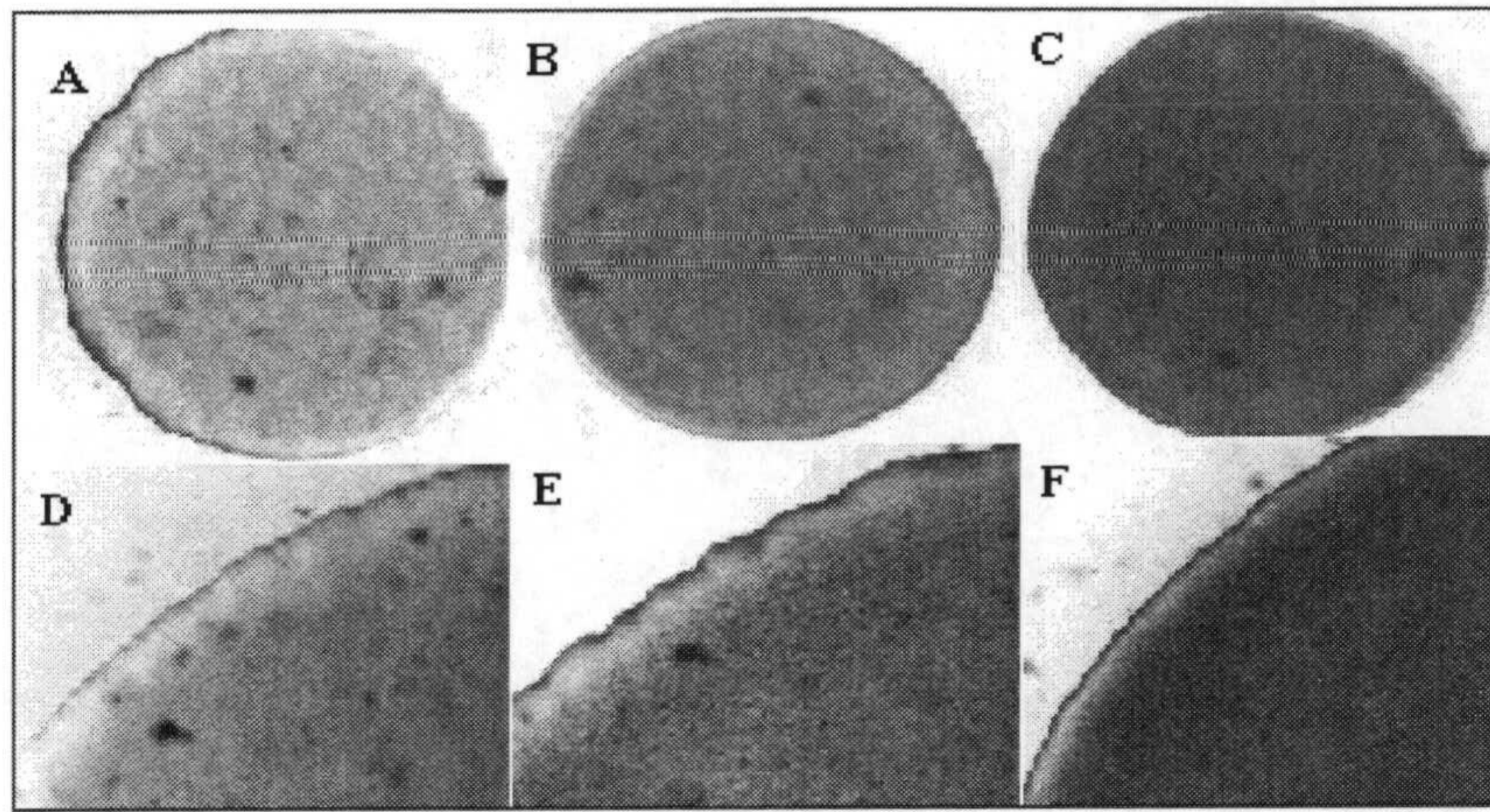


Figura 24.- Colonias de la cepa 422 en el medio CYE en presencia de manganeso a 10mM a las 24h (A, D), 48h (B, E), 72h (C, F). (A, B, C: x 3); (D, E, F: x 16)

#### B).- Efecto de los metales sobre las distintas cepas de *M. xanthus*

Para este estudio se utilizaron varios mutantes de *M. xanthus* afectados en diferentes etapas del movimiento (*DZF1*, *frz*, *csgA*, *dsp* y *mgl*) para observar el efecto de la plata, cobalto, cromo, cobre y manganeso sobre el ciclo de vida, y se utilizaron a las mismas concentraciones que con la cepa salvaje 422 de *M. xanthus*. Los resultados de este estudio están resumidos en la Tabla 5 y las fotografías están presentadas en las Figuras 25 a 30.

La cepa *DZF1* de *M. xanthus* se afecta por el cromo, el cobre y el manganeso, que inducen una pigmentación, la cual se observa más intensa en presencia de cobre que en presencia de los otros dos metales (Figura 25). Los cuerpos fructificantes de esta cepa se inhiben por la presencia de todos los metales ensayados menos en presencia de cromo y de manganeso (Figura 30).

El crecimiento de la cepa *frz* de *M. xanthus* se afecta por la presencia del cobre, de manera que tarda más tiempo en verse una colonia densa como la del testigo, e igual que la cepa anterior, el cobre, el cromo y el manganeso inducen la pigmentación que aumenta conforme sube la concentración del metal (Figura 26). La fructificación de esta cepa se ve inhibida por la presencia del cobre, mientras que con el manganeso los cuerpos fructificantes se ven más estructurados, parecidos a los de



la cepa *DZF1*. El resto de metales no tienen efecto ninguno en este sentido (Figura 30).

Con la cepa *dsp* no se afecta ni el crecimiento ni el movimiento mientras, que como ocurre en las demás cepas, se induce una ligera pigmentación en presencia de cromo, cobre, y manganeso (Figura 27). Además parece que el cromo, cobalto y manganeso inducen fuertemente la formación de los cuerpos fructificantes por esta cepa (Figura 30).

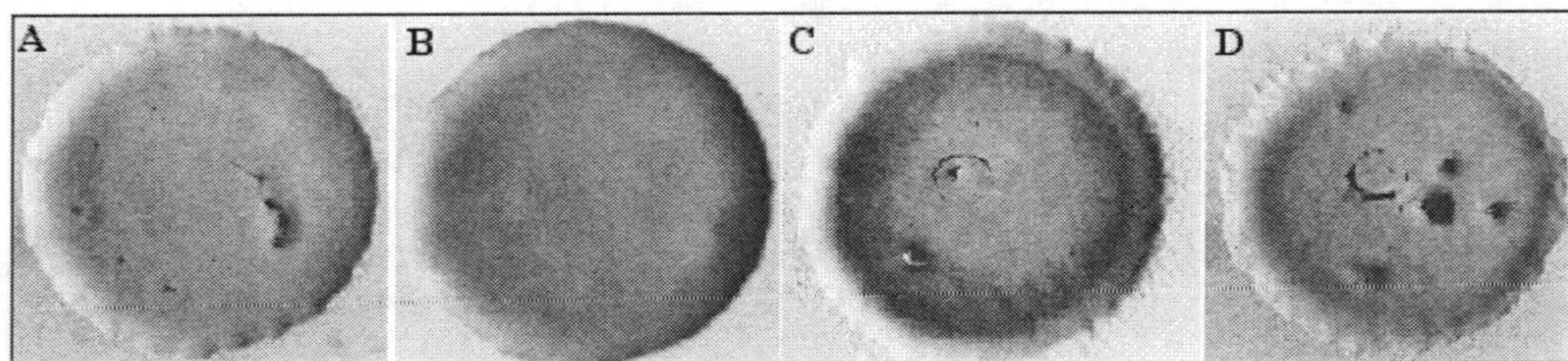
Los metales pesados ensayados influyen también sobre la cepa *csgA* induciendo la pigmentación en presencia de cobre y manganeso mientras que el cromo inhibe totalmente el crecimiento a la concentración de 2,5mM (Figura 28). Todos los metales ensayados parecen tener un efecto negativo sobre la agregación de las células de esta cepa, excepto el manganeso (Figura 30).

En presencia del cromo a 2,5mM el crecimiento de la cepa *mgI* se inhibe mientras que con los demás metales no se manifiesta ningún efecto sobre el crecimiento (Figura 29).



Tabla 5.- Influencia de los metales sobre el ciclo de vida de los mutantes de *M. xanthus*

| Metales   | Concentración de metales (mM) | Crecimiento, movimiento, pigmentación y formación de cuerpos fructificantes |  |  |   |                          |
|-----------|-------------------------------|---|--|--|---|--------------------------|
|           |                               | <i>DZF1</i>   | <i>frz</i>   | <i>dsp</i>   | <i>csgA</i>   | <i>mgl</i>               |
| Plata     | 0,1 y 0,5                     | Afecta a la fructificación y al crecimiento a 0,5mM                         | Afecta a la fructificación y al crecimiento a 0,5mM                          | Impide la agregación   | Impide la agregación  | No afecta al crecimiento |
| Cobalto   | 0,5 y 1                       | Inhibe la fructificación  | No afecta  | Estimula la agregación y la formación de los cuerpos fructificantes          | Impide la agregación  | No afecta al crecimiento |
| Cromo     | 1 y 2,5                       | Induce la pigmentación con 2,5mM y limita la fructificación                 | Con 2,5mM afecta algo a la velocidad de crecimiento e induce la pigmentación | Pigmentación más parda y estimula la fructificación                          | A 1mM la pigmentación mas parda y con 2,5mM crecimiento lento | Induce la pigmentación   |
| Cobre     | 1 y 2.5                       | Induce la pigmentación e impide la fructificación                           | Inhibe el crecimiento e inhibe la fructificación                             | Inhibe la agregación   | Pigmentación y afecta a la agregación                         | No afecta al crecimiento |
| Manganeso | 10 y 20                       | Induce la pigmentación y no afecta a la fructificación                      | Induce la pigmentación   | Induce la pigmentación y estimula la formación de los cuerpos fructificantes | Induce pigmentos oscuros pardos                               | Induce la pigmentación   |

Figura 25.- Colonias de la cepa *DZF1* en presencia de metales en el medio CYE. Testigo (A), cromo a 1mM (B), cobre a 1mM (C) y manganeso a 10mM (D). (x 3)



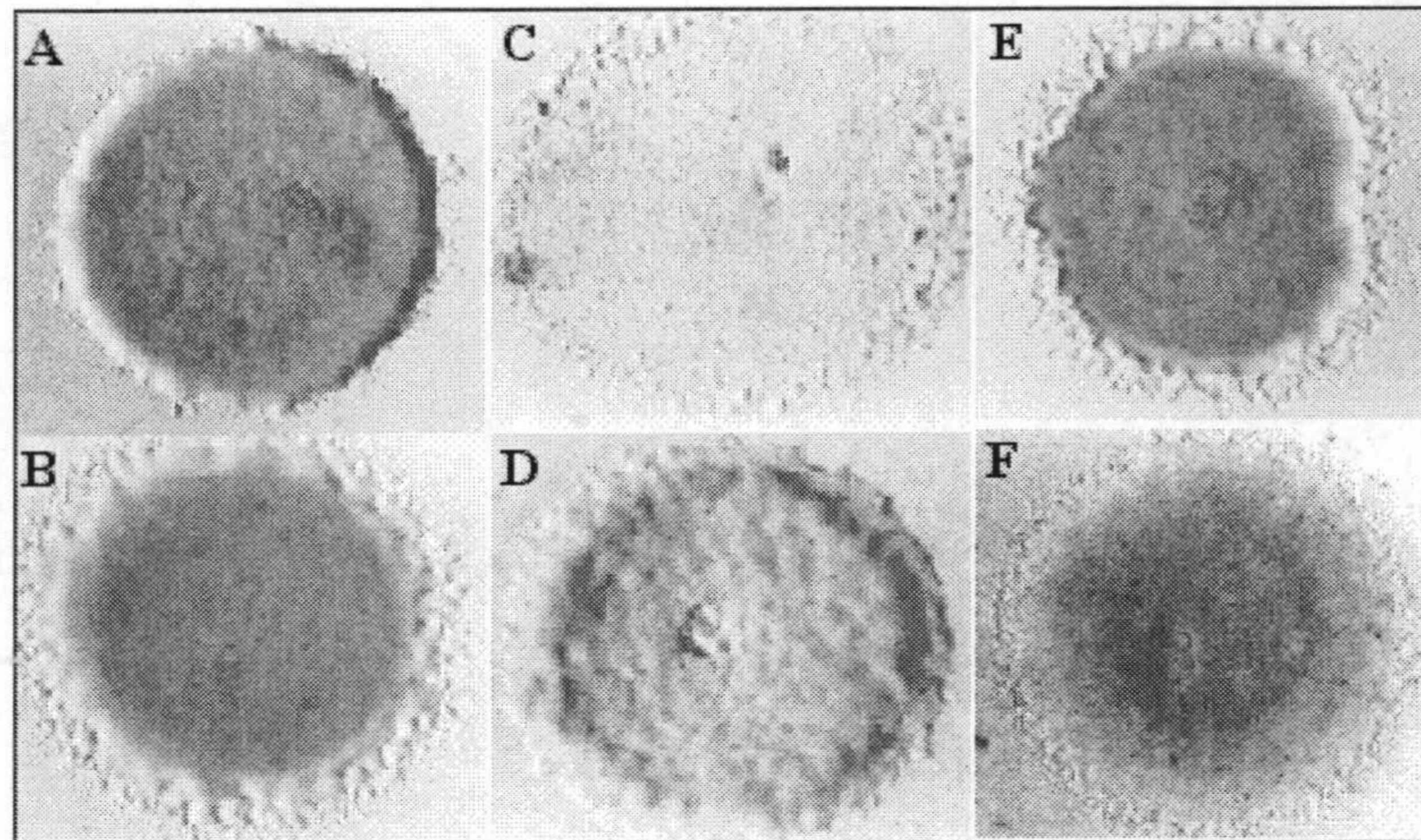


Figura 26.- Colonias de la cepa *frz* en presencia de metales en el medio CYE. Testigo a las 24h (A) y 72h (B), cobre a 1mM a las 24h (C) y 72h (D), cromo a 2,5mM a las 72h (E), manganeso a 20mM a las 72h (F). (x 3)

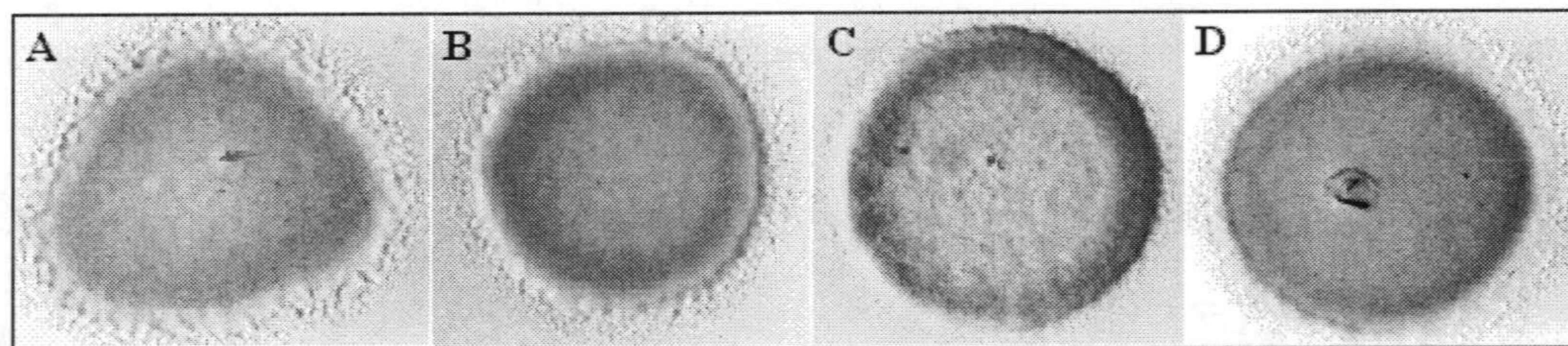


Figura 27.- Colonias de la cepa *dsp* en presencia de metales en el medio CYE a las 48h. Testigo (A), cromo a 2,5mM (B), cobre a 2,5mM (C) y manganeso a 20mM (D). (x 3)

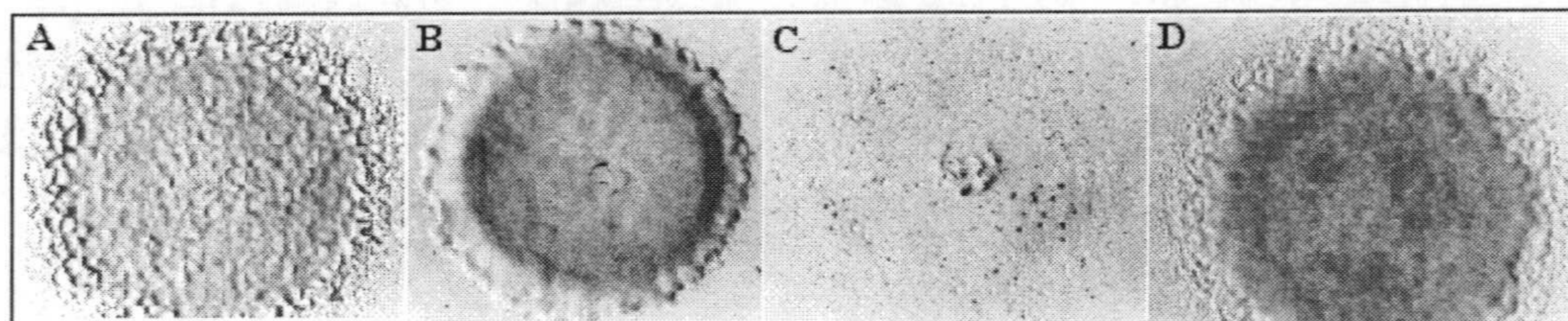


Figura 28.- Colonias de la cepa *csgA* en presencia de metales en el medio CYE a las 72h. Testigo (A), cobre a 1mM (B), cromo a 2,5mM (C), manganeso a 20mM (D). (x 3)



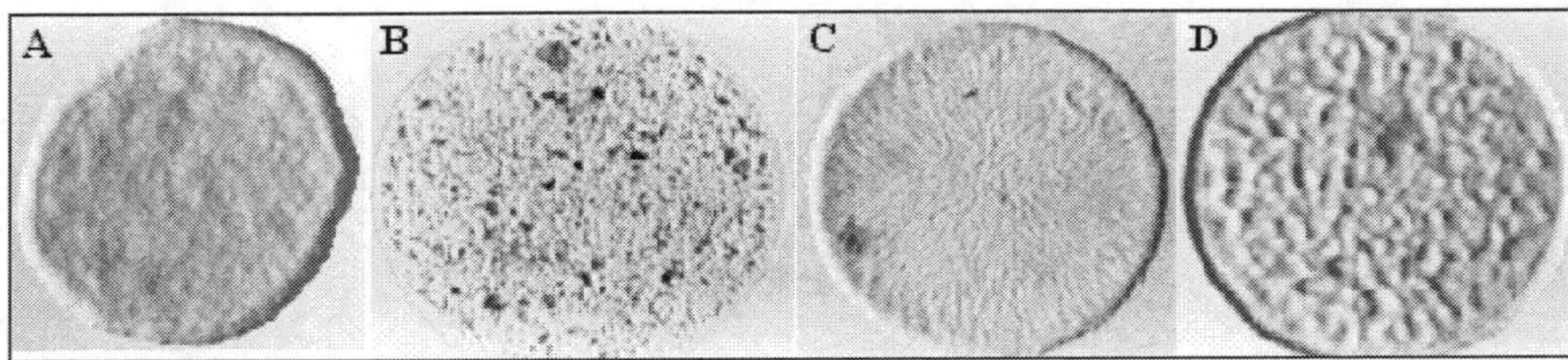


Figura 29.- Colonias de la cepa *mgl* en presencia de metales en el medio CYE a las 48h. Testigo (A), cromo a 2,5mM (B), cobre a 2,5mM (C) y manganeso a 20mM (D). (x 3)

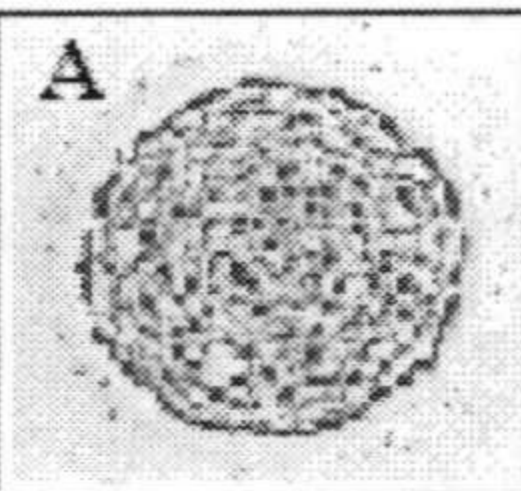
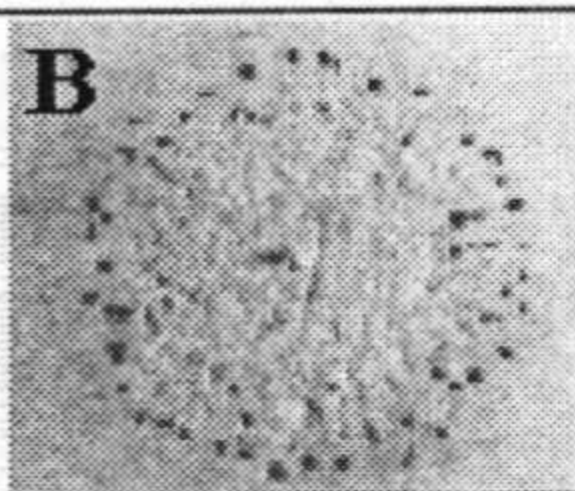
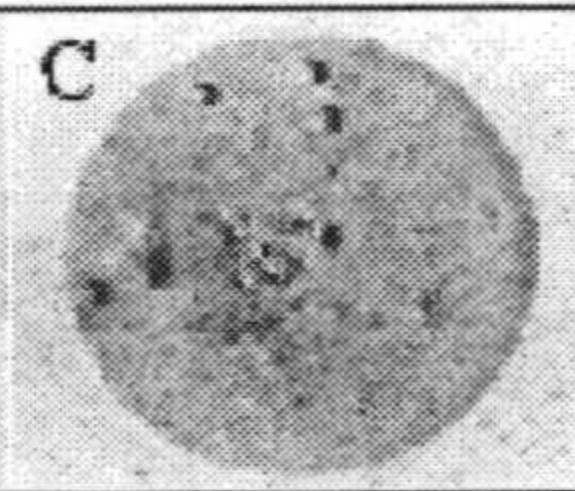
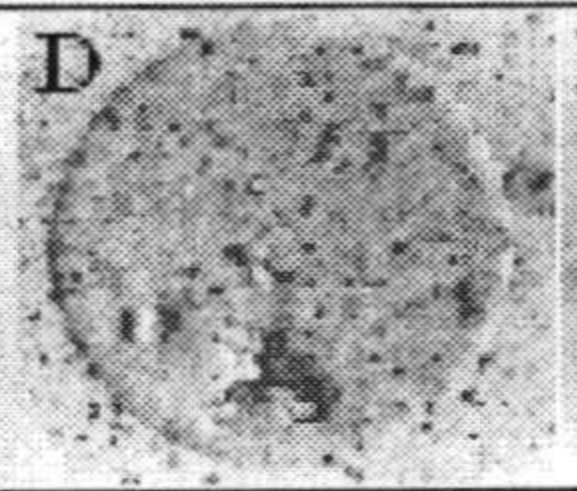
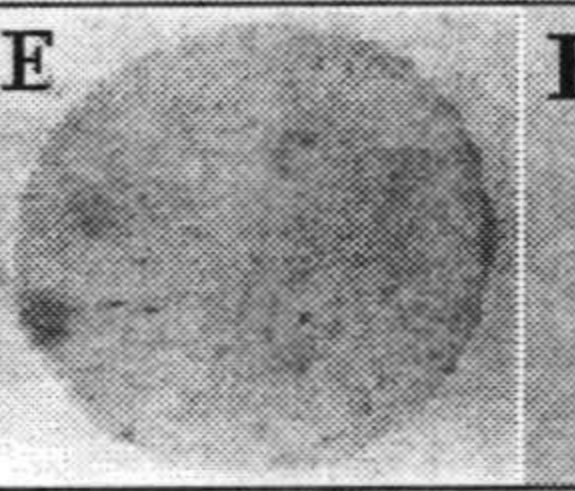
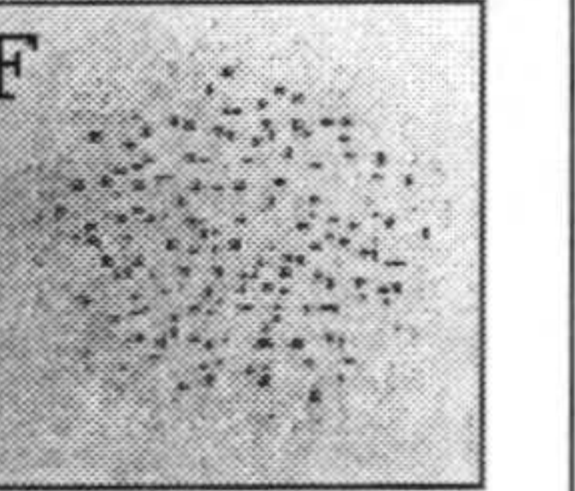
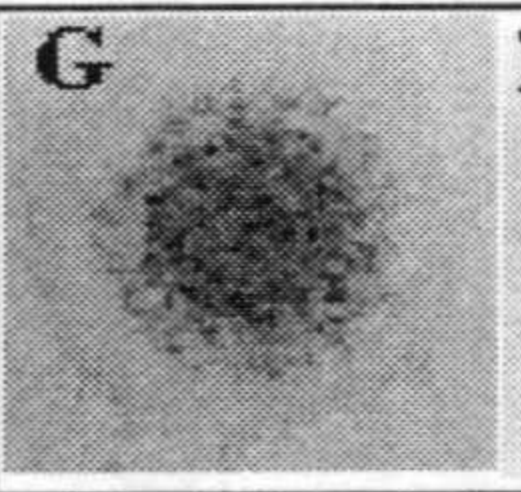
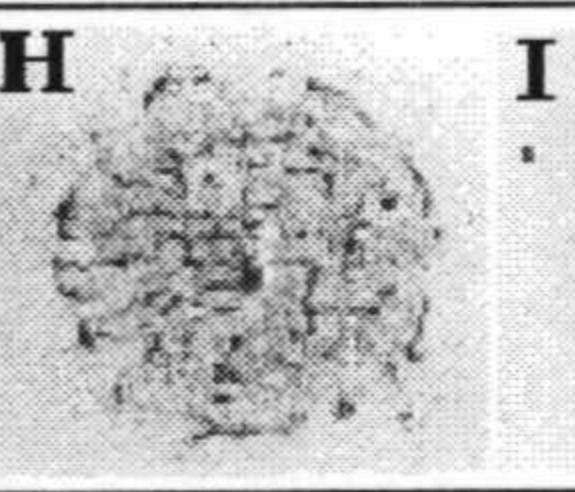
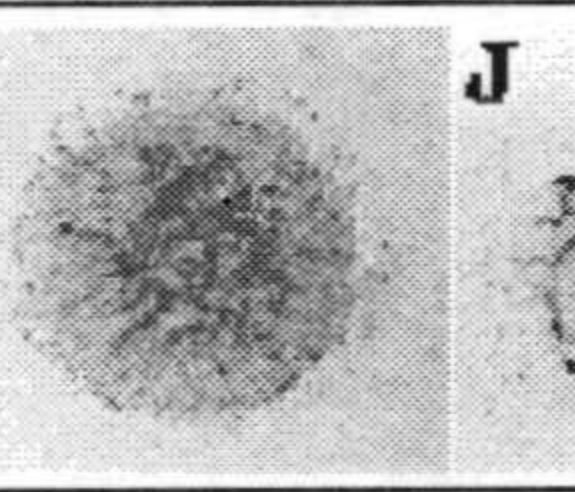
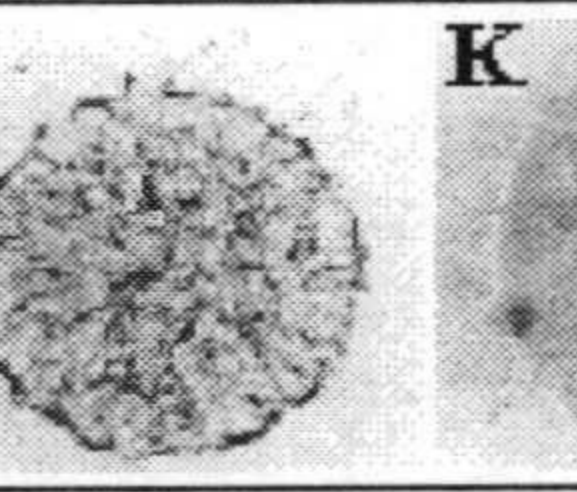

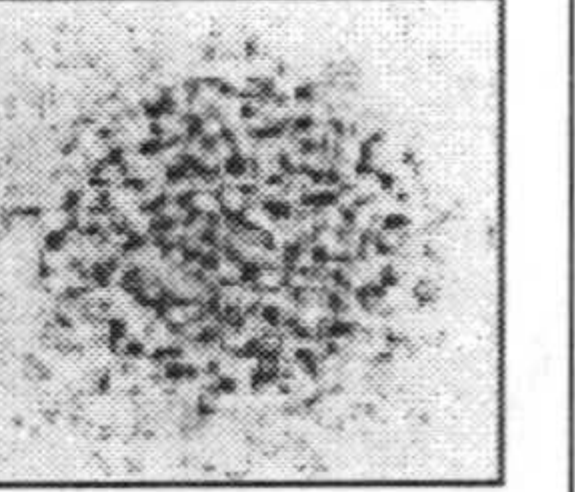
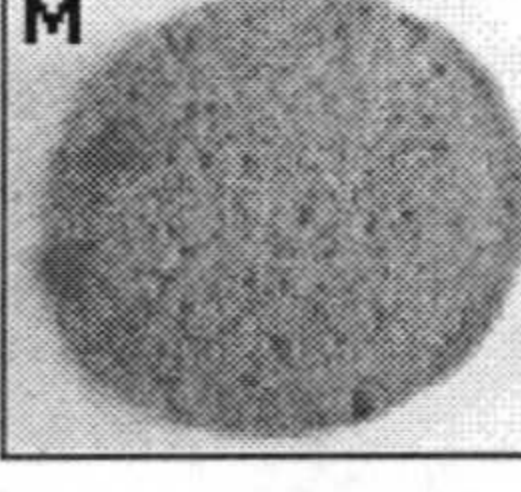
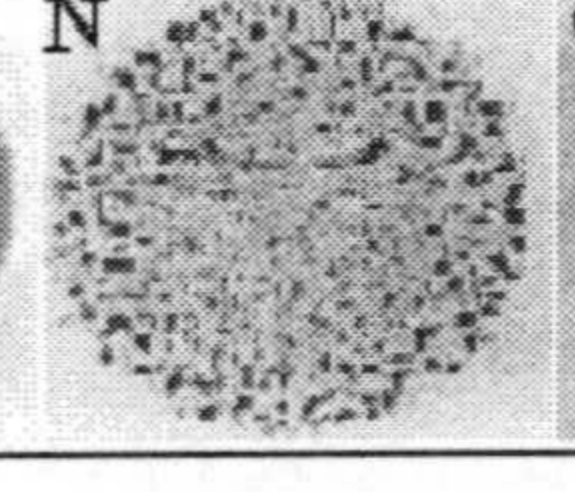
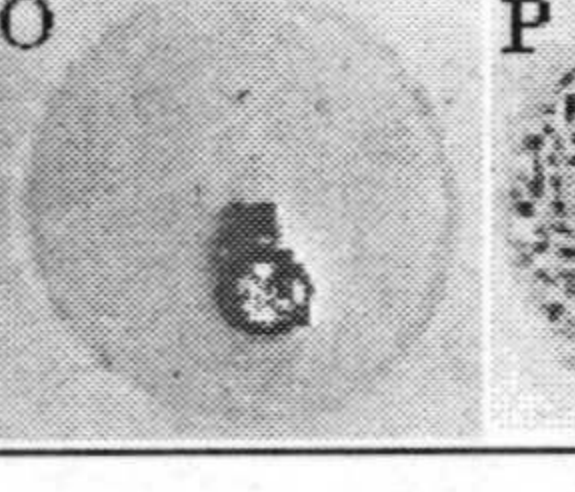
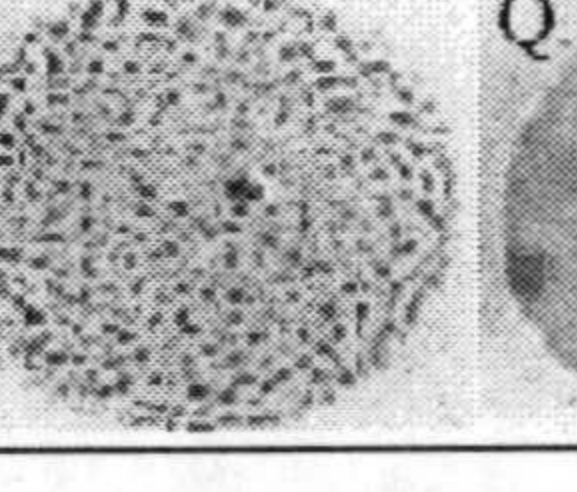
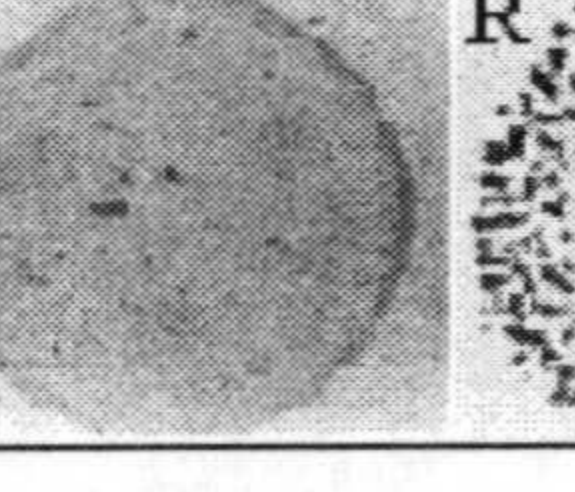
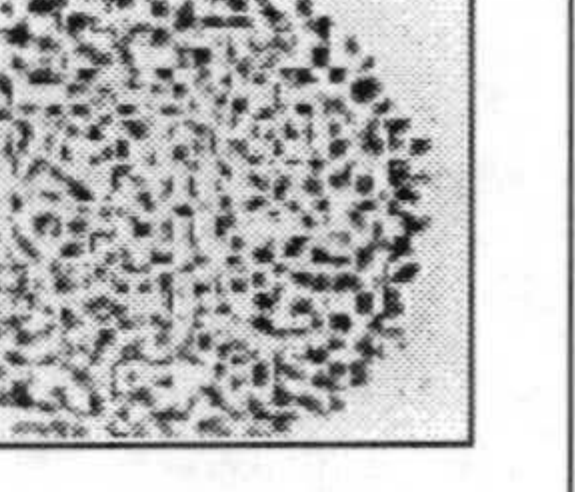
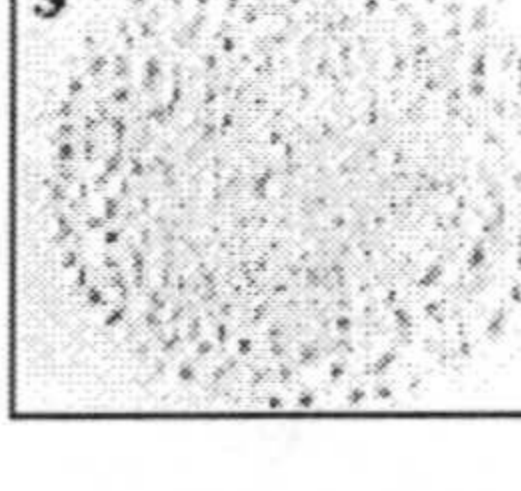
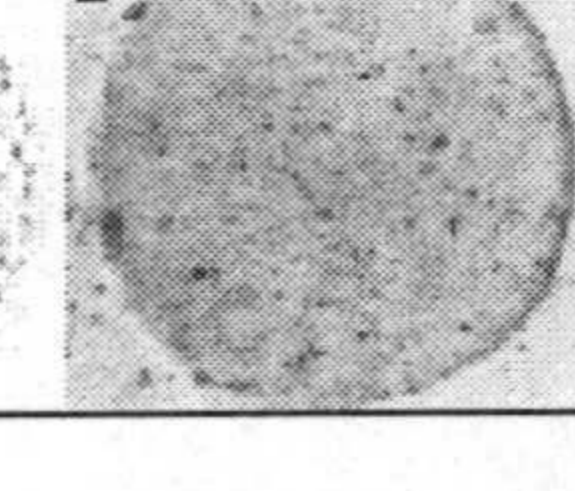

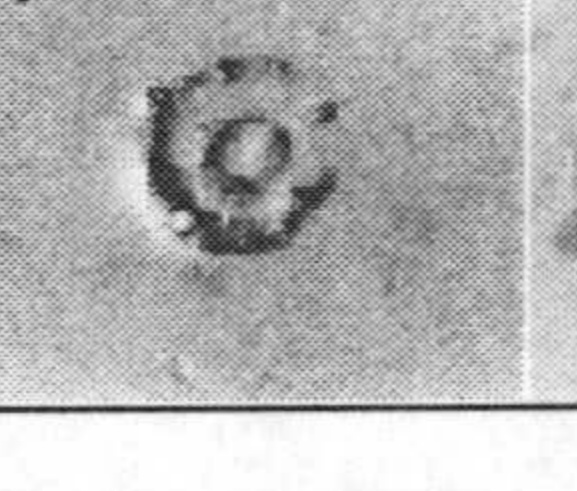

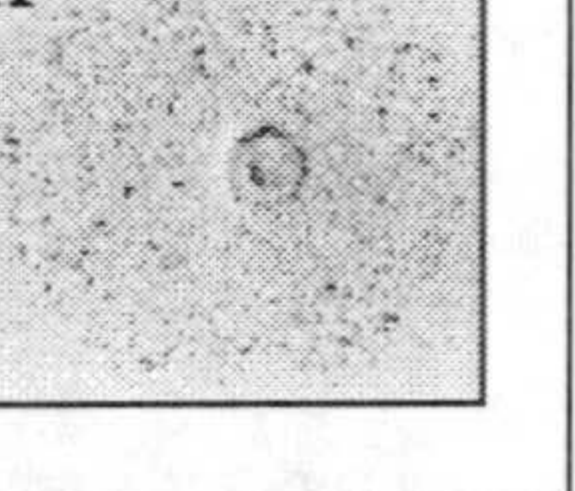
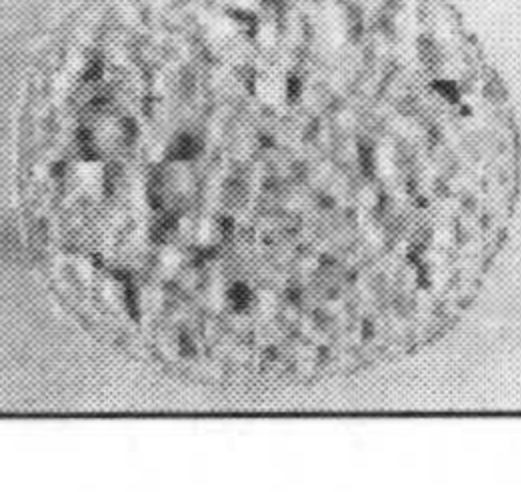
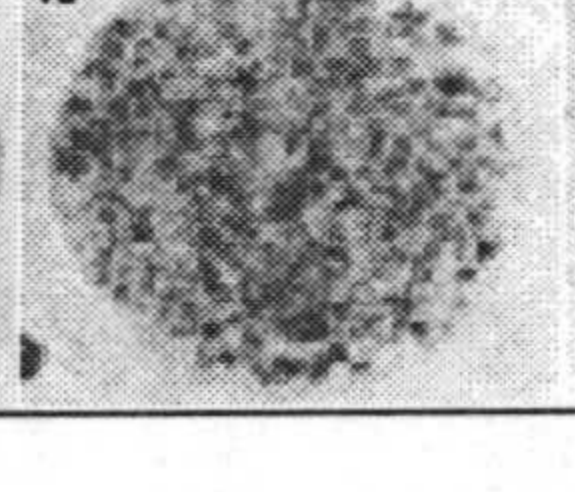

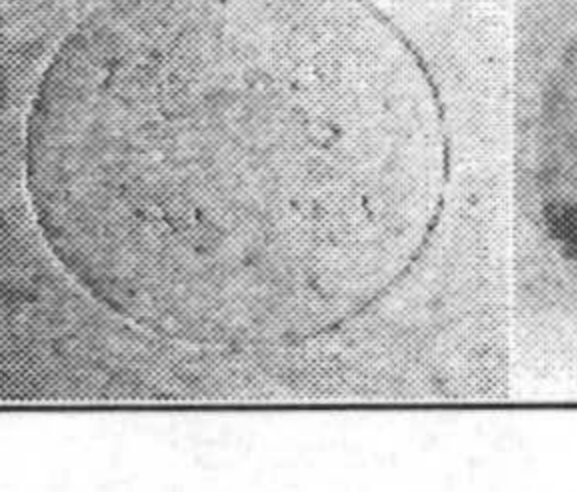

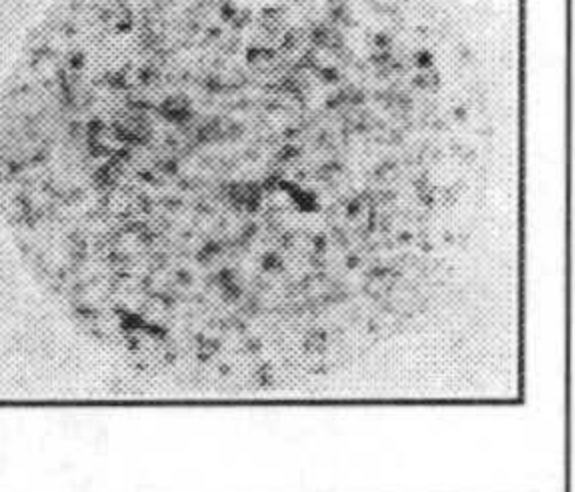
|             | Testigo   | Cr (2,5mM)  | Ag (0,5mM)   | Co (1mM)  | Cu (2,5mM)  | Mn (20mM)   |
|-------------|---|---|--|---|---|---|
| <i>DZFI</i> |   |   |   |   |   |   |
| <i>frz</i>  |  |  |  |  |  |  |
| <i>dsp</i>  |  |  |  |  |  |  |
| <i>csgA</i> |  |  |  |  |  |  |
| <i>mgl</i>  |  |  |  |  |  |  |

Figura 30.- Microfotografías de colonias de varias cepas de *M. xanthus* en presencia de los metales en medio TPM a las 72h (x 2).



## CAPITULO II.- BIOADSORCIÓN y FIJACIÓN DE METALES PESADOS POR *M. xanthus* 422

### 1.- FIJACIÓN DE METALES POR CÉLULAS PROLIFERANTE DE *M. xanthus* 422. EL CASO DE LA PLATA.

La Tabla 6 resume los resultados obtenidos en el paso 1 y el paso 2 de la serie de experimentos realizados siguiendo el esquema mostrado en la Figura 9 de Material y Métodos.

**Tabla 6.- Fijación de plata por células proliferantes de *M. xanthus* 422**

| Paso                                     | Medios         | Crecimiento después de (días) |    |
|--|----------------|-------------------------------|----|
|  |                | 4                             | 10 |
| 1<br>(Inoculando desde cultivo original) | CT + 0,1mM Ag  | -                             | -  |
|  | CT + 0,5mM Ag  | -                             | -  |
|  | CTA + 0,1mM Ag | +                             | +  |
|  | CTA + 0,5mM Ag | -                             | -  |
| 2<br>(Inoculando desde CTA + 0,1mM)      | CT + 0,1mM Ag  | +                             | +  |
|  | CT + 0,5mM Ag  | -                             | -  |
|  | CTA + 0,5mM Ag | +                             | +  |

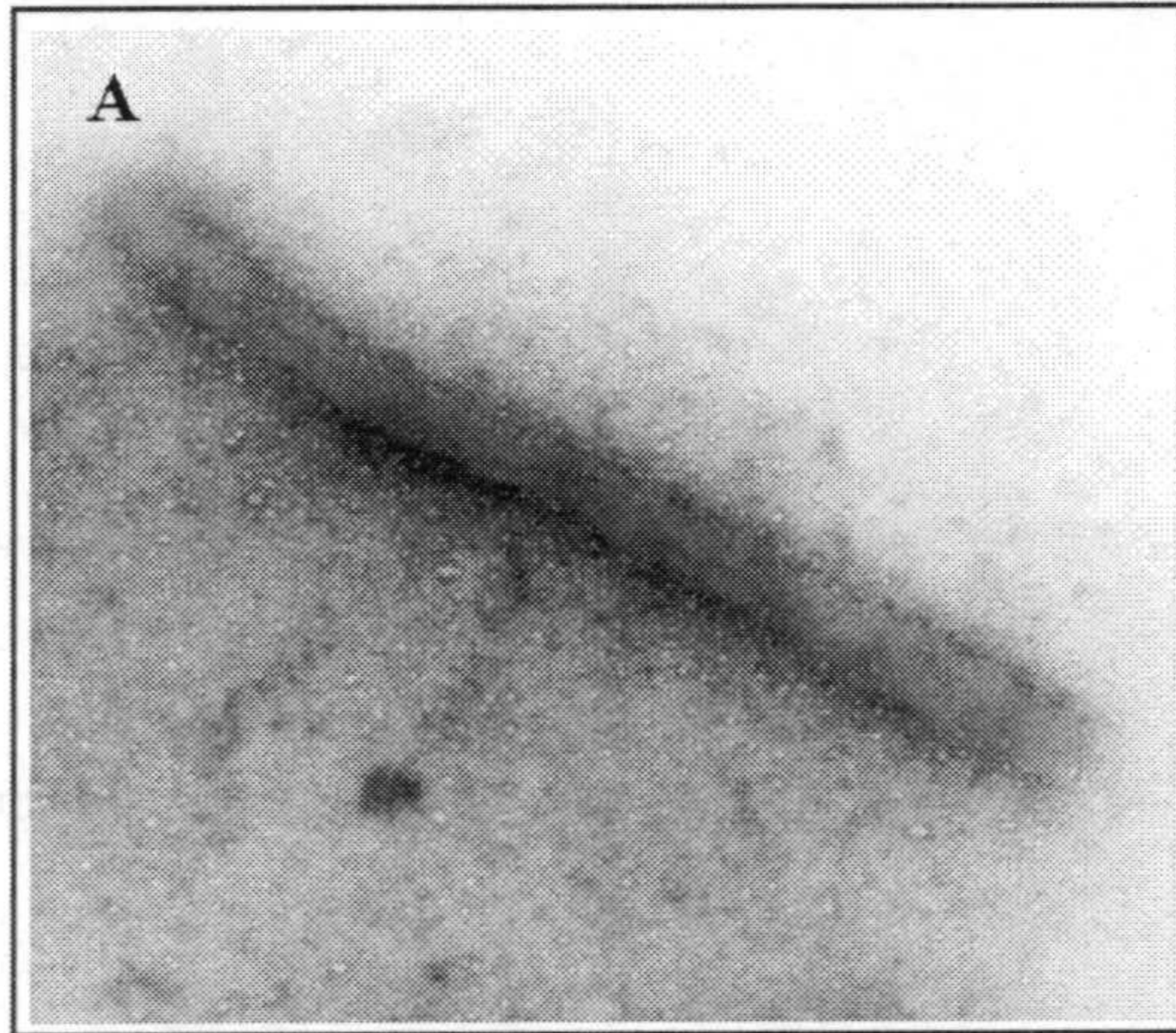
+, Crecimiento; -, Ausencia de crecimiento

En el paso 1, donde los medios adicionados de plata a la concentración correspondiente se inoculan desde un cultivo original de 48 horas, la bacteria sólo crece en el medio sólido (CTA + 0,1mM Ag). Y en el paso 2, donde se inoculan los medios desde la placa crecida en el paso anterior, el crecimiento fue alcanzado en los dos medios, sólido (CTA + 0,5mM Ag) y líquido (CT + 0,1mM Ag).

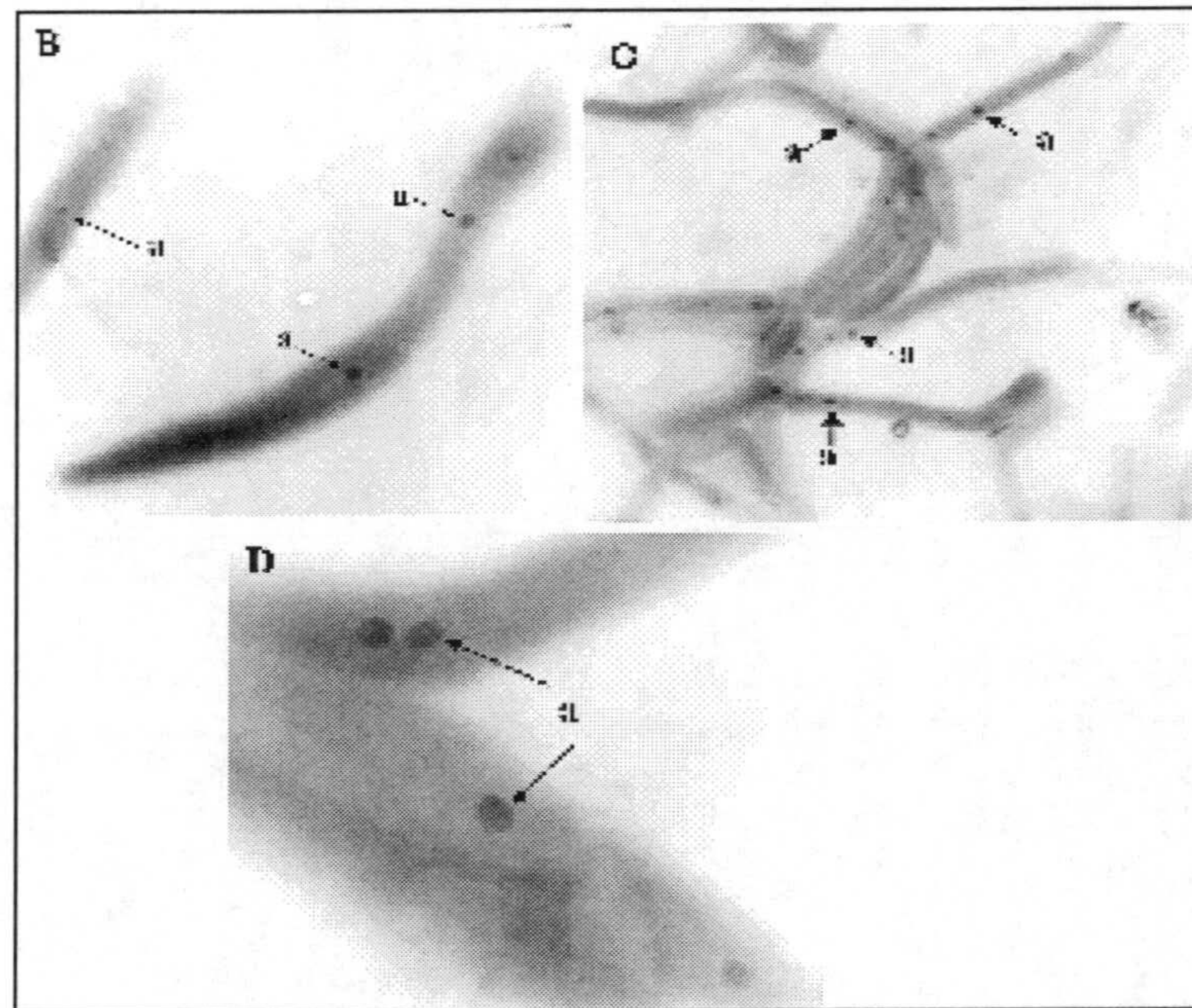
La observación de las muestras con MET pone de manifiesto el distinto comportamiento del microorganismo, en relación con la plata, según se cultive en el medio sólido o líquido. En la Figura 31 se puede observar como, alrededor de las células procedentes del medio líquido, existe una nube densa a los electrones de acumulo de plata, probablemente debida a la gran cantidad de plata acumulada sobre



el polisacárido extracelular (EPS). Las células de los medios sólidos (Figura 32) demuestran la presencia de varios cuerpos densos de plata intracelulares. En este contexto, se nota una cierta diferencia entre las células de los medios CTA + 0,1mM Ag y CTA + 0,5mM Ag, con respecto al número de cuerpos densos a los electrones cuyo número aumenta cuando aumenta la concentración de plata en el medio de cultivo.



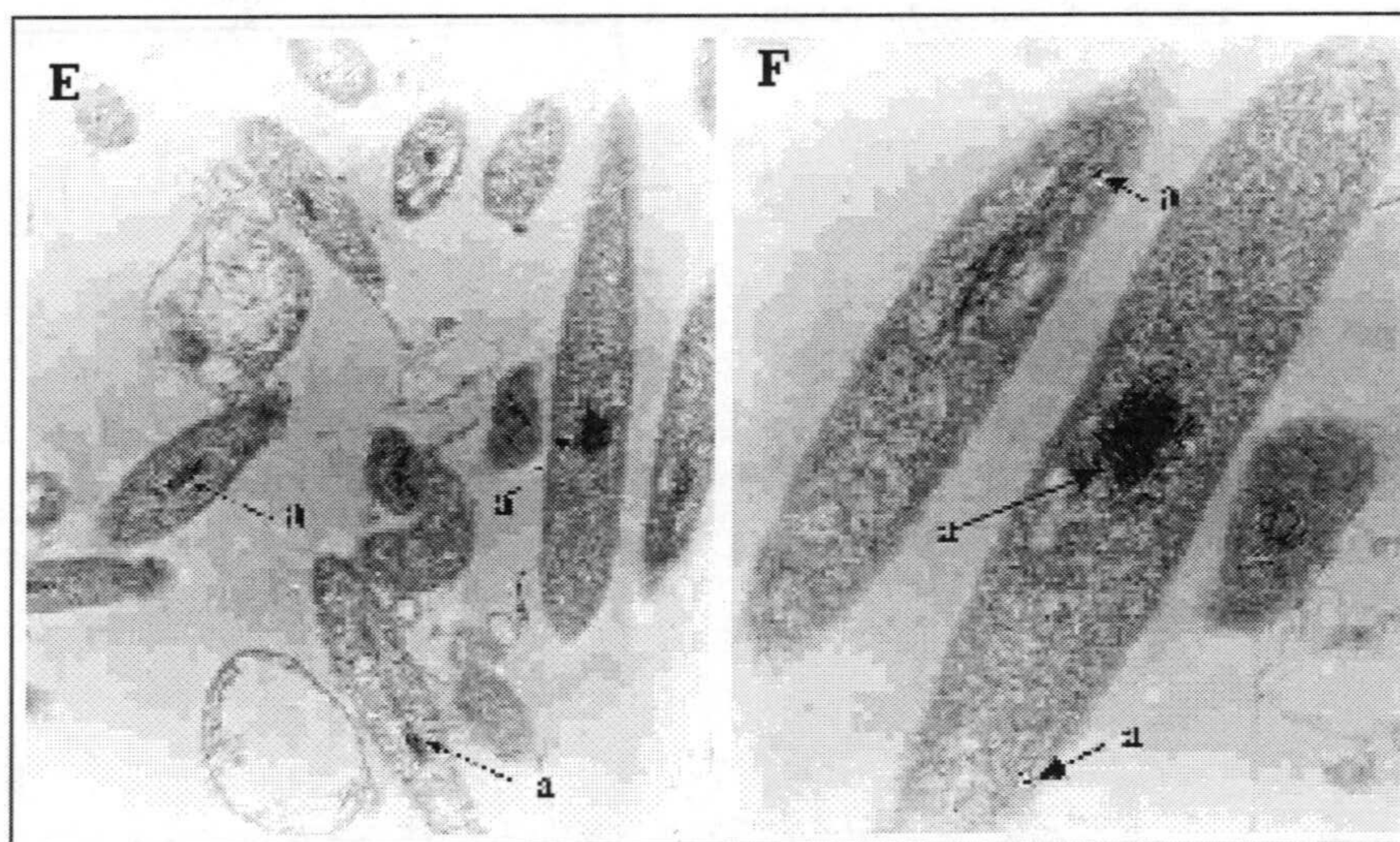
**Figura 31.-** Observación por MET de depósitos electrón-densos alrededor de las células cultivadas en medio líquido CT con 0,1mM de plata (x 20000).



**Figura 32.-** Observación por MET de los acúmulos electrón densos (a) dentro de las células obtenidas en CTA: B.- con 0,1mM (x 16000) y C.- con 0,5mM (x 6300) de plata. D.- es un detalle de B (x 40000).



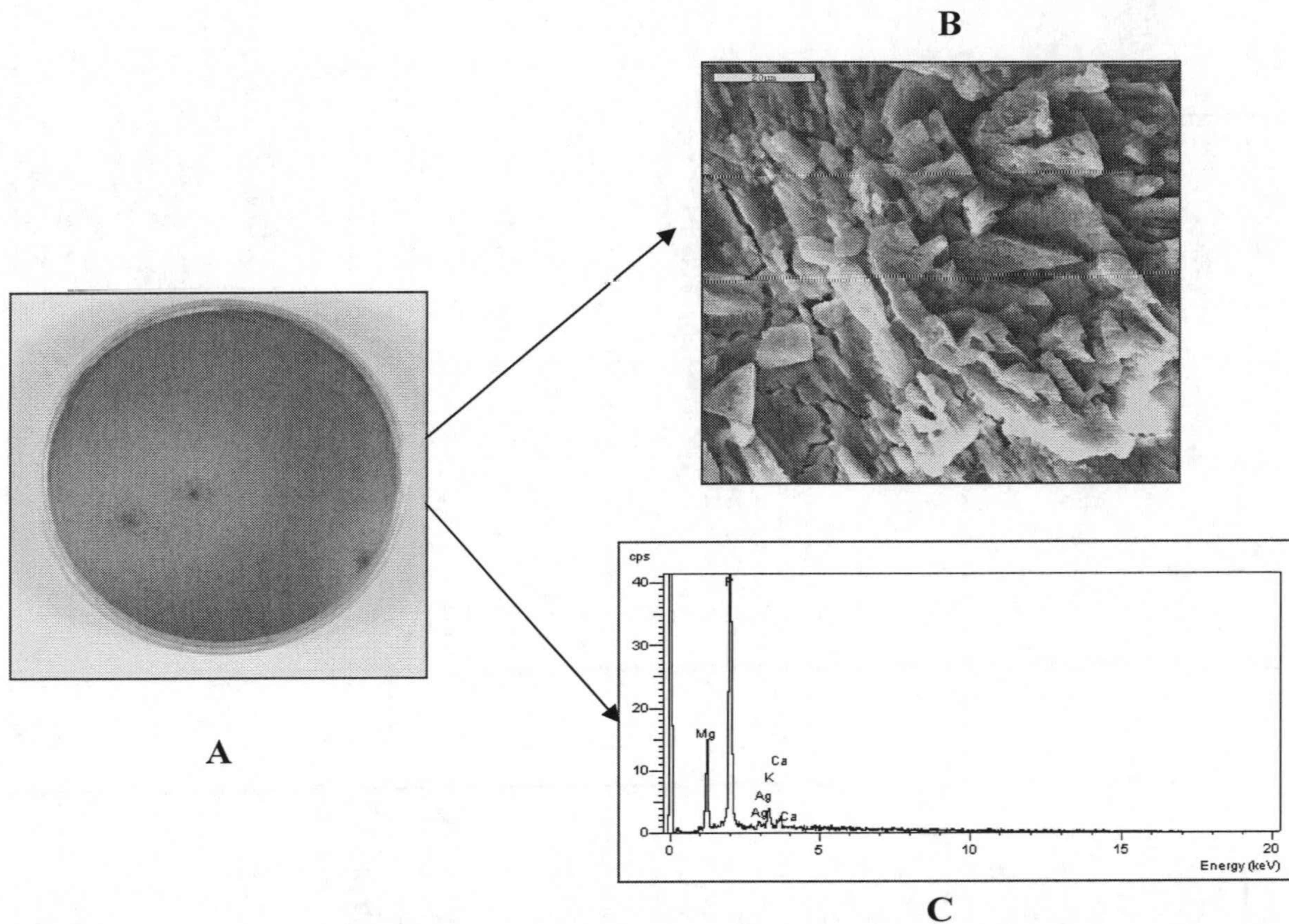
Por otra parte, al observar las secciones ultrafinas de las muestras procedentes de CT + 0,1mM Ag, infiltradas en resina Epon (Figura 33), se detectó una diferencia considerable con las células enteras observadas anteriormente. La plata acumulada alrededor de las células desapareció (posiblemente por causa del lavado) y aparecieron cuerpos densos a los electrones céntricos. Además, se vieron en algunas células cuerpos densos minúsculos. Es posible que no se vean estos cuerpos en muestras tomadas directamente del cultivo porque la gran cantidad de plata acumulada alrededor de la célula impide la observación. En los cultivos de control, no se detectaron ni los cuerpos densos a los electrones intracelulares ni esa especie de nube que rodea a las células cultivadas en medio líquido en presencia de plata.



**Figura 33.- Observación por MET de cortes ultrafinos de células de *M. xanthus* obtenidas en CT con 0,1mM de plata (x 16000 y x 40000 respectivamente).**

Además, en el medio sólido CTA con 0,5mM de plata se ha podido notar la formación de precipitados cristalinos de color oscuro y de tamaño diferente alrededor y dentro de las colonias de *M. xanthus*. Estos cristales han sido observados por MEB microscopia electrónica MEB y analizados por EDX, como puede observarse en la Figura 34.





**Figura 34.-** Precipitados cristalinos producidos por células proliferantes de *M. xanthus* 422 en medio CTA con 0,5mM de plata. A) Placa de Petri, donde se observan colonias y precipitados; B) cristales observados con MEB; C) microanálisis de los cristales, por EDX.

## 2.- FIJACIÓN DE URANIO POR CÉLULAS NO PROLIFERANTE de *M. xanthus* 422. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE LOS COMPLEJOS FORMADOS.

La fijación del uranio por la cepa no proliferante de *M. xanthus* 422 ha sido demostrada en trabajos anteriores (González Muñoz *et al.*, 1997), de manera que se ha comprobado que esta bacteria es un buen bioabsorbente de este metal. El presente trabajo es una continuación de estos estudios previos, y con ello se intenta diferenciar aquellos grupos funcionales implicados en la fijación del metal de los que no lo están. Para llevar a cabo este experimento se ha procedido según el método descrito en Material y Métodos. La espectroscopía de infrarrojos fue usada para determinar los grupos funcionales implicados en la formación de complejos con el uranio.



Mientras que la espectroscopía EXAFS se ha usado para tener información estructural y electrónica acerca del uranio presente en los complejos formados.

### 2.1.- Determinación de los grupos funcionales por espectroscopía Infrarroja

La Figura 35 presenta el espectro de infrarrojos ( $500$  a  $4000$   $\text{cm}^{-1}$ ) de la biomasa no proliferante de *M. xanthus* sin tratamiento con uranio.

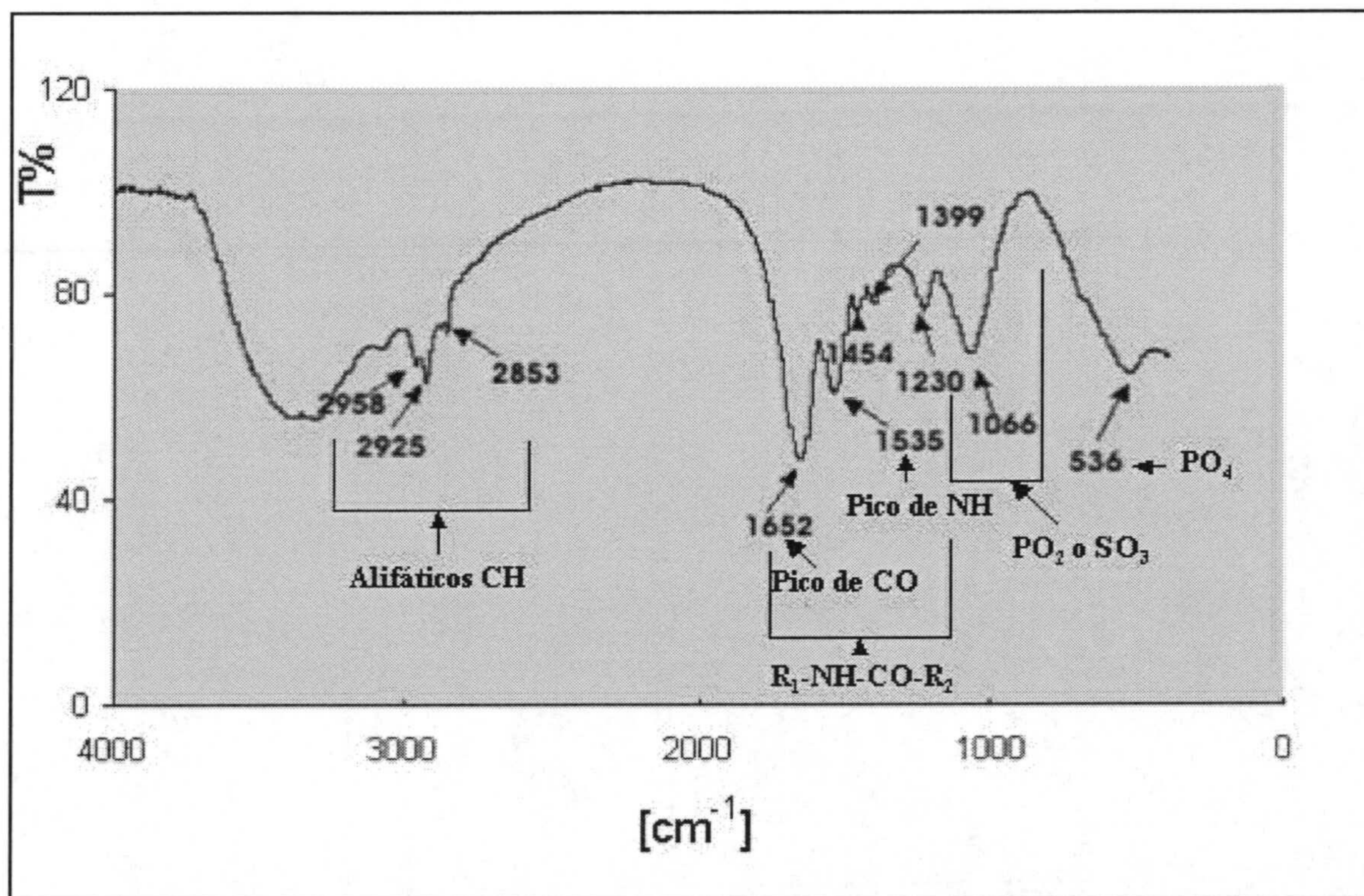


Figura 35.- Espectro de infrarrojos de la biomasa seca de *M. xanthus* 422 sin ningún tratamiento

En esta figura podemos observar que existen varias frecuencias; la banda a  $1535$   $\text{cm}^{-1}$  y  $1652$   $\text{cm}^{-1}$  esta asignada a los picos del grupo (NH) y del grupo (CO) pertenecientes al grupo amida (CONH) primario y secundario respectivamente (banda de la amida I y II). En el espectro también se pueden observar picos de absorción entre  $3000$  y  $2800$   $\text{cm}^{-1}$  los cuales se atribuyen a los alifáticos C-H, indicando la presencia de los grupos alquilo  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  y CH. Además, la zona entre



1000 y  $1300\text{ cm}^{-1}$  contiene contribuciones de grupos fosfato y/o sulfato. Estos grupos derivan de varios componentes celulares como péptidos, fosfolípidos, peptidoglucano, etc, los cuales son capaces de fijar metales.

La biomasa tratada con uranio fue secada y molida en polvo bajo las mismas condiciones usadas para la preparación de la biomasa sin tratar. Las Figuras 36 y 37 presentan los espectros correspondientes a la biomasa tratada con uranio a pH 3 y pH 4,5 respectivamente. A diferencia del testigo, aquí aparece una banda de absorción a  $889\text{ cm}^{-1}$  originada por la vibración asimétrica del ión uranilo. Los espectros de infrarrojos de la biomasa de *M. xanthus* tratada con uranio revelan un cambio significativo en los picos de absorción correspondientes a los grupos fosfato que muestran números de onda más altos ( $570\text{ cm}^{-1}$  y  $1083\text{ cm}^{-1}$ ) que los de la biomasa sin tratar.

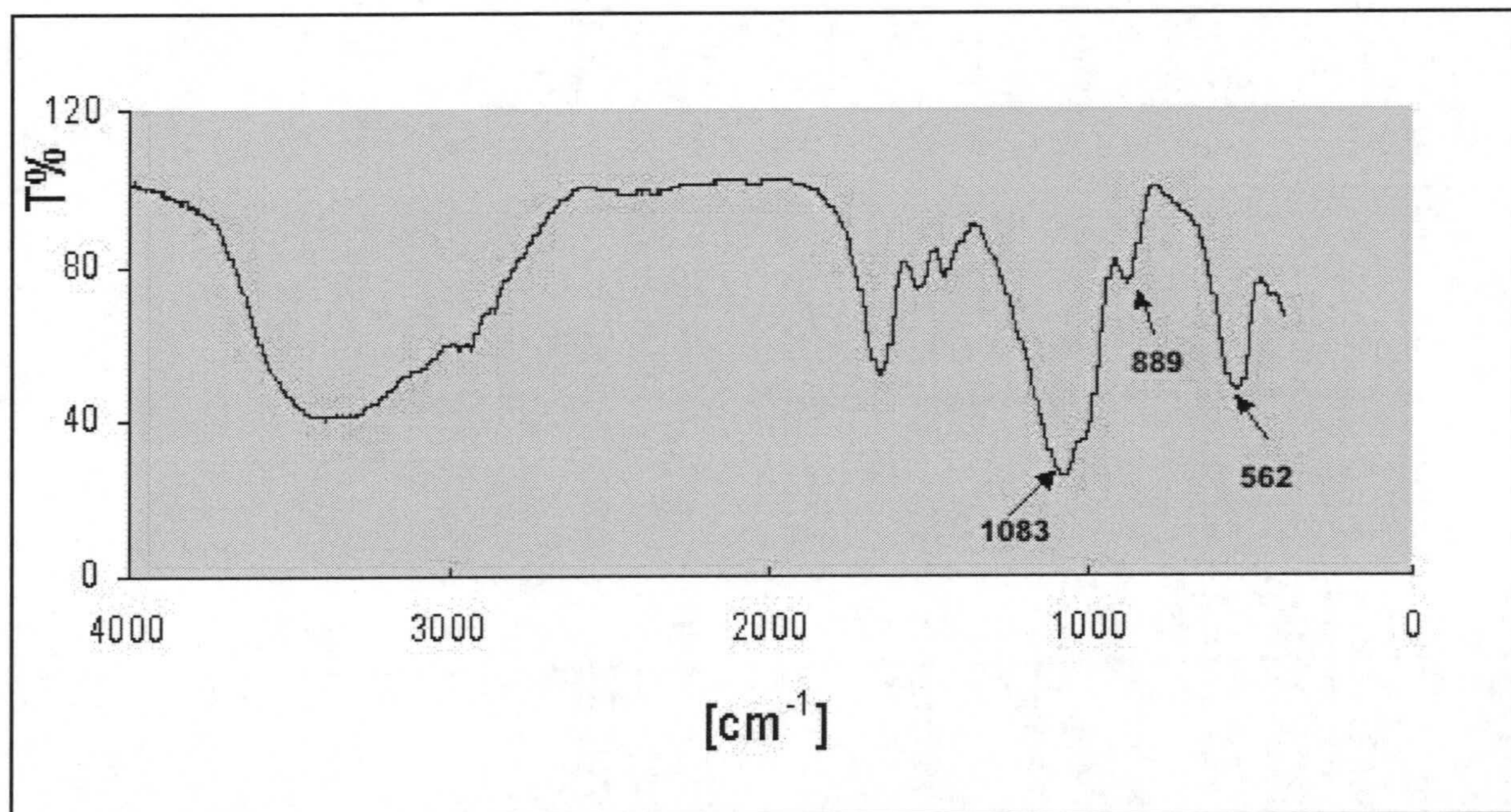
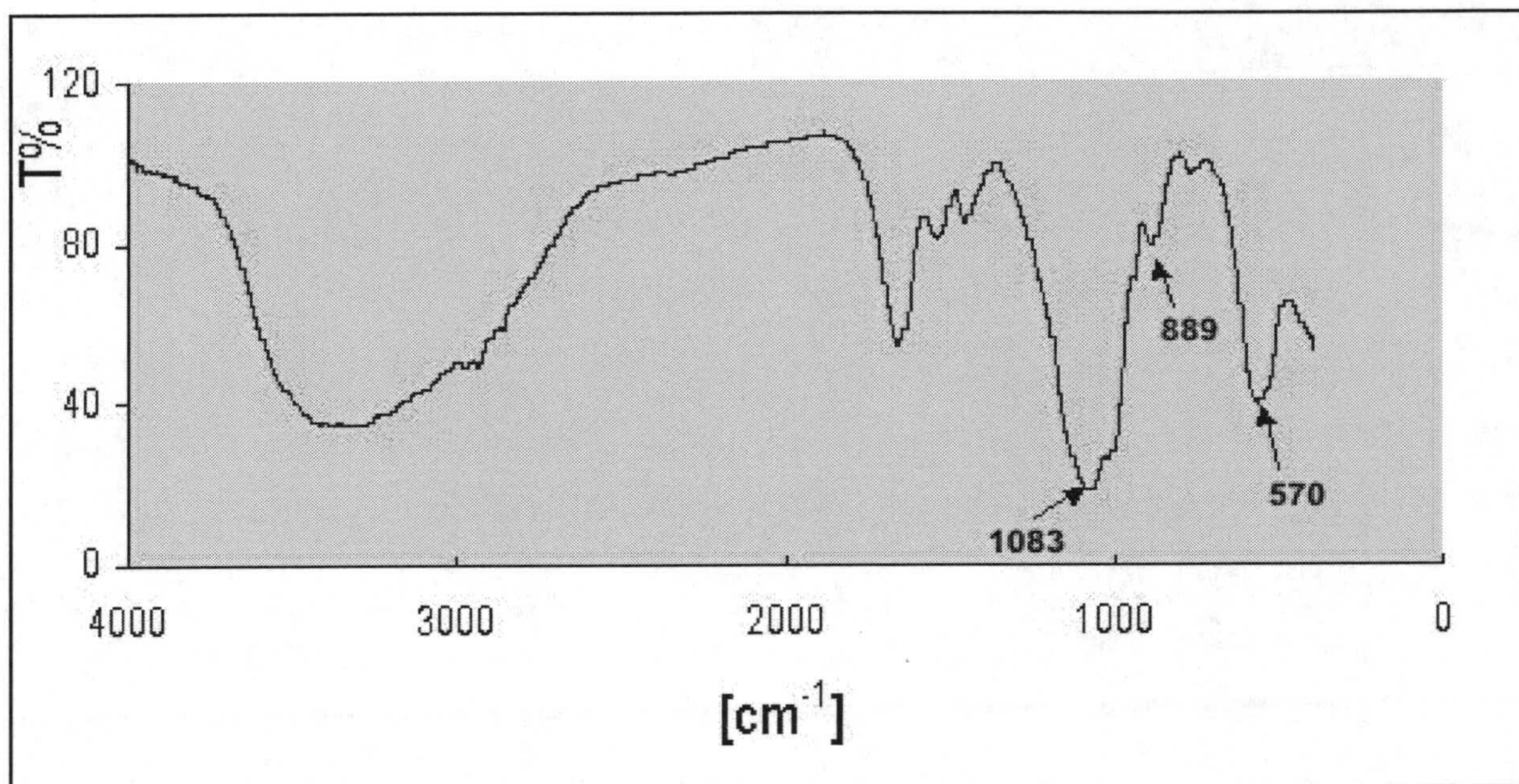


Figura 36.- Espectro de infrarrojos de biomasa seca de *M. xanthus* tratada con 1mM de uranio a pH 3 durante 24 horas





**Figura 37.-** Espectro de infrarrojos de biomasa seca de *M. xanthus* tratada con 1mM de uranio a pH 4,5 durante 24 horas

Con el fin de validar estas observaciones, en el caso de los cambios ocurridos después del tratamiento de *M. xanthus* con uranio y para averiguar si hay alguna diferencia espectral entre los complejos formados en los dos casos de tratamiento a pH 3 y a pH 4,5, se ha calculado la diferencia de los espectros de infrarrojos entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  (espectro de las células sin tratar menos los espectros de las células tratadas en cada caso). Los resultados presentados en las figuras 38 y 39 indican la presencia de varios picos de absorción. En la figura 38, que corresponde a la diferencia entre los espectros de células tratadas con uranio pH 3 y el testigo, se pueden distinguir 4 picos: 800 y 880  $\text{cm}^{-1}$  que son característicos de la vibración del ión uranilo, y 1025 y 1090  $\text{cm}^{-1}$  son atribuidos a los grupos fosfato. Mientras que en el caso de la muestra a pH 4,5 (Figura 39), además de todos estos picos se puede distinguir la presencia de otro pico más, a 925  $\text{cm}^{-1}$ , que está en la banda de los grupos fosfato.



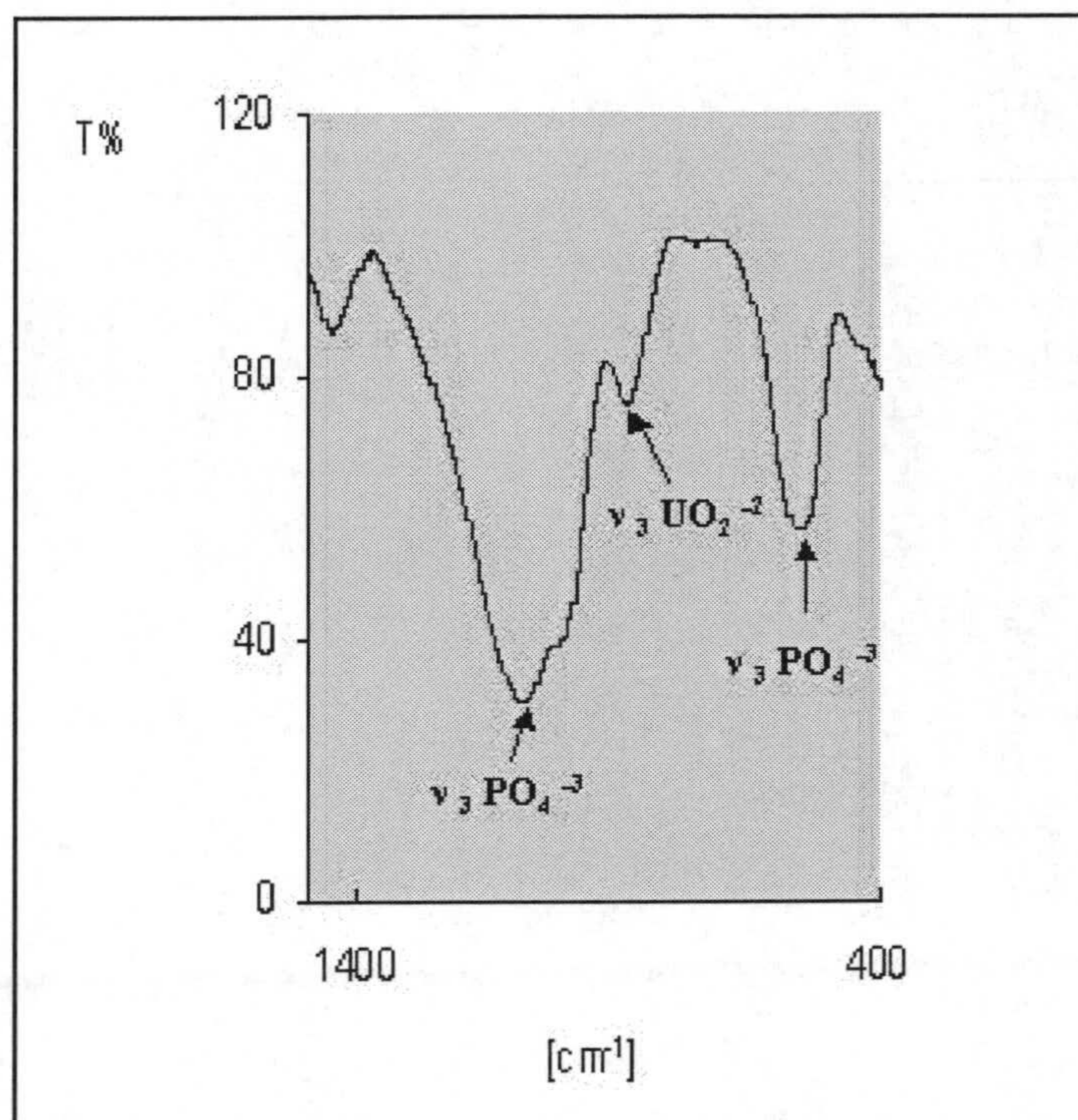


Figura 38.- Espectro de infrarrojos de las células tratadas con uranio a pH 3 menos el espectro de las células no tratadas de *M. xanthus* (espectro de sustracción)

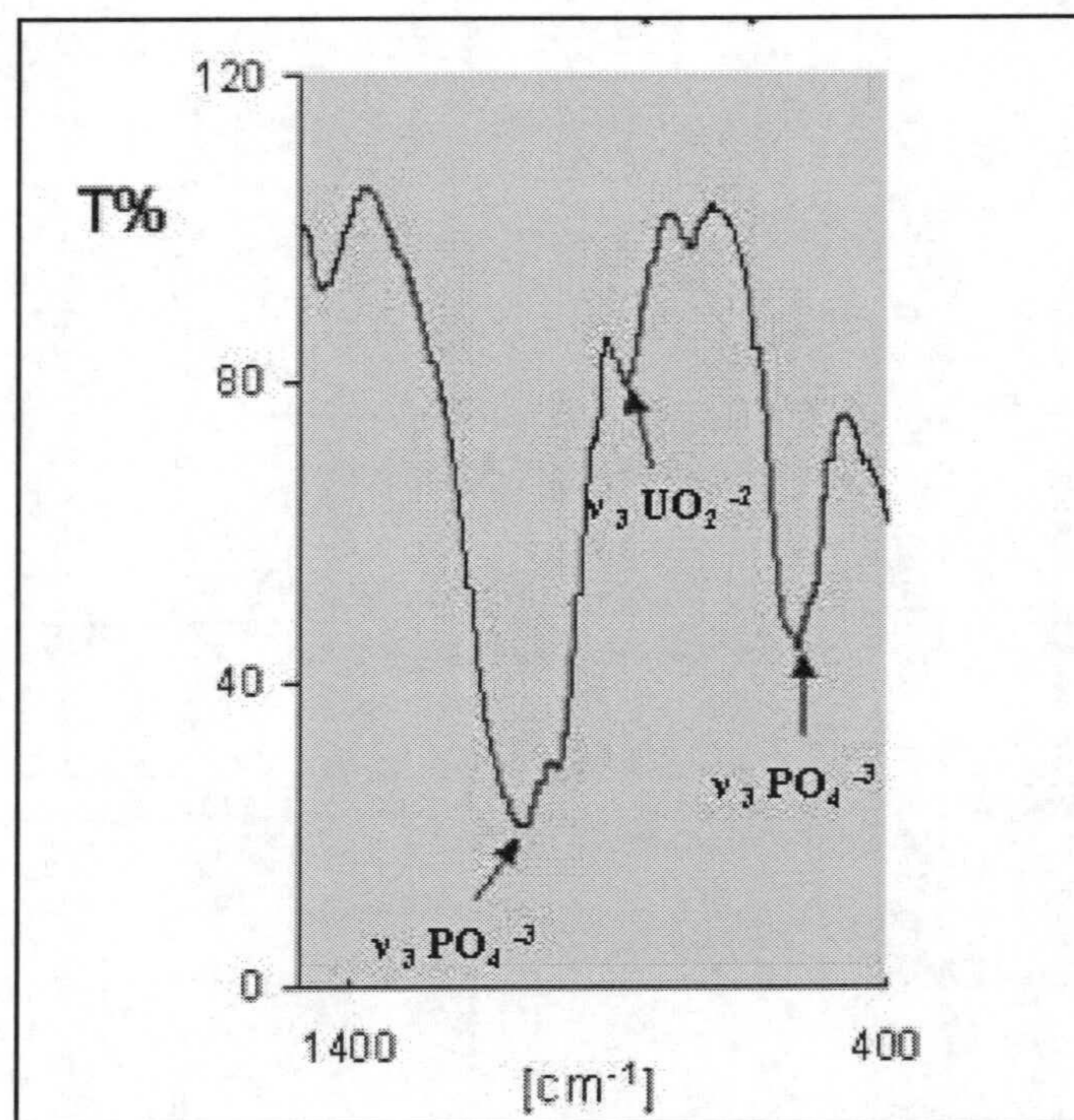


Figura 39.- Espectro de infrarrojos de las células tratadas con uranio a pH 4,5 menos el espectro de las células no tratadas de *M. xanthus* (espectro de sustracción)



## 2.2.- Determinación de la naturaleza de los grupos funcionales por espectroscopía EXAFS

Los espectros de EXAFS (izquierda) y sus correspondientes transformadas de Fourier (derecha) de los complejos de uranio formados por *M. xanthus* a pH 2 y 4,5 están representados en la Figura 40. Los parámetros estructurales de los complejos de uranio formados por *M. xanthus* a valores de pH 2 y 4,5 y del modelo meta-autunita están resumidos en la Tabla 7.

El modelo usado para modular las dos muestras es el meta-autunita  $[\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  (Figura 41). Se trata de una fase mineral de fosfatos de uranilo, en la cual el uranilo está unido a cuatro fosfatos (Makarov y Ivanov, 1960). Los 2 espectros EXAFS parecen ser diferentes y en las transformadas de Fourier se ve la presencia de 4 picos.

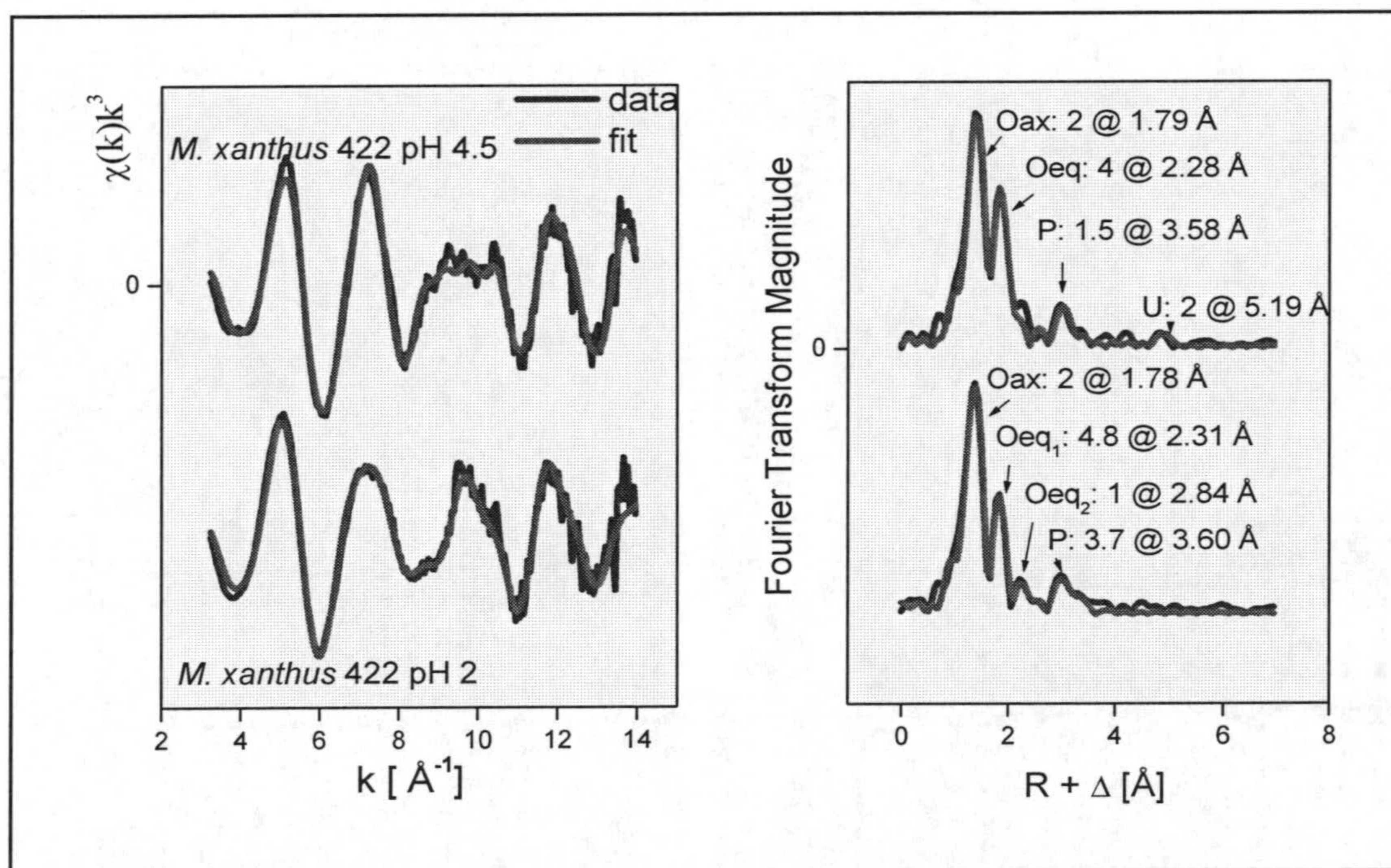
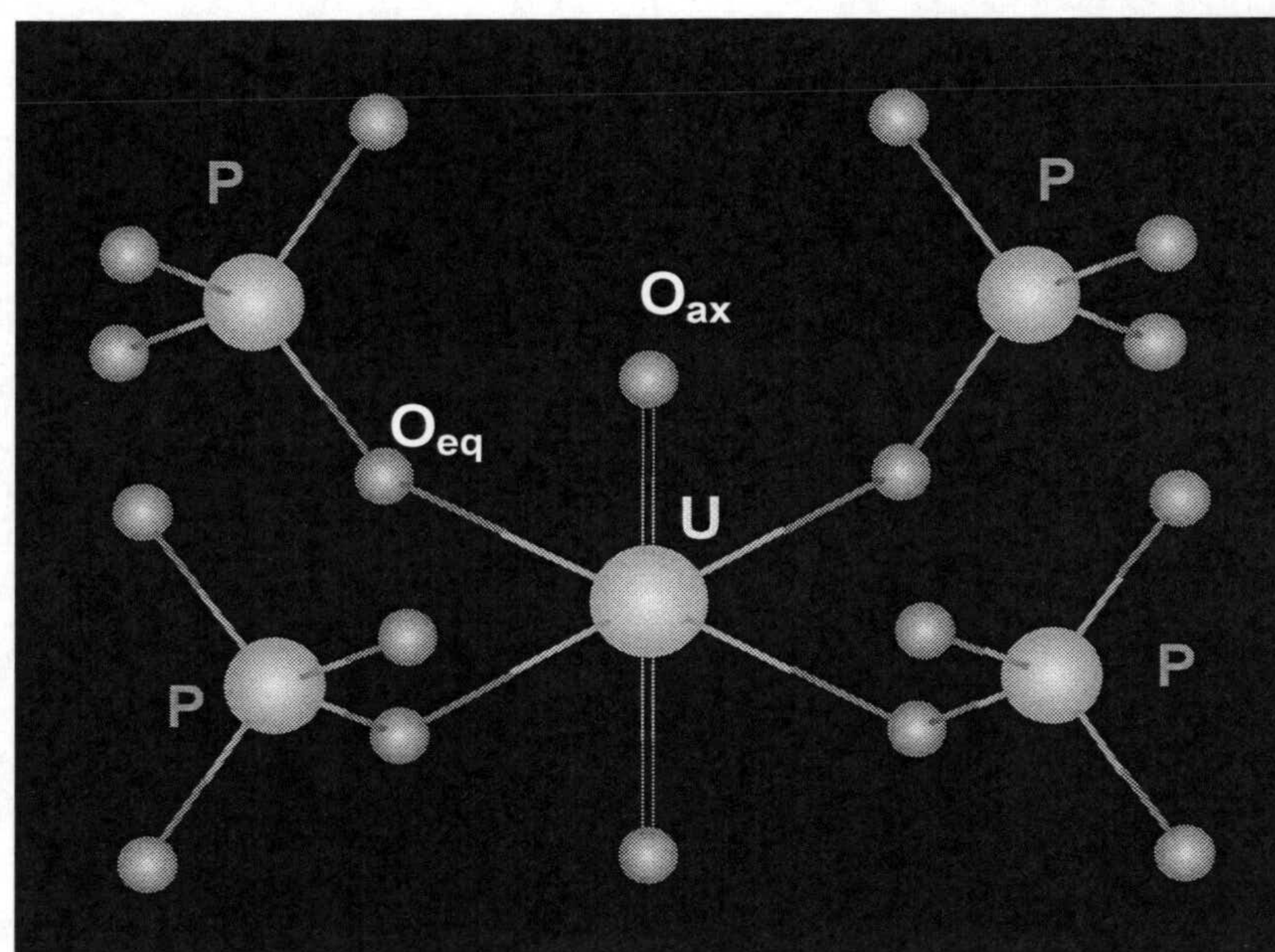


Figura 40.- Espectros de EXAFS (izquierda) de los complejos de uranio formados por *M. xanthus* 422 y sus correspondientes transformadas de Fourier (derecha) a pH 2 y 4,5





|                   |          |
|-------------------|----------|
| U-O <sub>ax</sub> | ~ 1.77 Å |
| U-O <sub>eq</sub> | 2.32 Å   |
| U-P               | 3.59 Å   |

**Figura 41.- Modelo estructural de la meta-autunita [Ca(UO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O]**

En las dos muestras (pH 2 y 4,5), el uranilo está coordinado a dos átomos de oxígeno en el plano axial (primer pico) a una distancia de 1,77 Å. El segundo pico corresponde a la interacción entre el uranilo y los átomos de oxígeno en el plano ecuatorial. En el caso de la muestra de pH 2 la distancia de enlace es  $2,31 \pm 0,02$  Å y el número de coordinación es de 4,8; sin embargo en el caso de pH 4,5 la distancia es de  $2,28 \pm 0,02$  Å y el número de coordinación es de 4.

El mejor ajuste a pH 2 se consigue mediante incluir otro pico de oxígeno (3er pico) a una distancia de  $2,84 \pm 0,02$  Å. Este pico no aparece en la muestra a pH 4,5. Sin embargo, las dos muestras presentan un pico a una distancia de  $3,58 \pm 0,02$  Å que corresponde, en los dos casos, a la interacción de U con el fósforo.

Finalmente, a una distancia de  $5,19 \pm 0,02$  Å aparece un pico en la muestra del pH 4,5 que se ha atribuido a la interacción de U-U.



Tabla 7.- Parámetros estructurales de los complejos de uranio formados por *M. xanthus* 422 a pH 2 y 4,5

| Muestra       | Esfera de coordinación     | N <sup>a</sup><br>(numero de coordinación) | R[Å] <sup>b</sup><br>(distancia radial del enlace) | σ <sup>2</sup> [Å <sup>2</sup> ] <sup>c</sup> | ΔE[eV] |
|---------------|----------------------------|--|--|---|--------|
| pH 2          | U-O <sub>ax</sub>          | 2 <sup>d</sup>                             | 1.78   | 0.0019  | -13.7  |
|               | U-O <sub>eq1</sub>         | 4.8(4)                                     | 2.31   | 0.0055  |        |
|               | U-O <sub>eq2</sub>         | 1 <sup>d</sup>                             | 2.84   | 0.0010  |        |
|               | U-P                        | 3.7(5)                                     | 3.60   | 0.0010  |        |
|               | U-O <sub>eq1</sub> -P (MS) | 7.4  | 3.72   | 0.0010  |        |
| pH 4.5        | U-O <sub>ax</sub>          | 2 <sup>d</sup>                             | 1.79   | 0.0018  | -12.6  |
|               | U-O <sub>eq</sub>          | 4(2)                                       | 2.27   | 0.0040  |        |
|               | U-P                        | 1.5(5)                                     | 3.58   | 0.0017  |        |
|               | U-U                        | 1.9(6)                                     | 5.19   | 0.008 <sup>d</sup>                            |        |
| Meta-autunita | U-O <sub>ax</sub>          | 2.2(1)                                     | 1.76   | 0.0045  | -11.0  |
|               | U-O <sub>eq</sub>          | 3.9(2)                                     | 2.29   | 0.0026  |        |
|               | U-P                        | 2.3(3)                                     | 3.60   | 0.008 <sup>d</sup>                            |        |
|               | U-U                        | 2.7(6)                                     | 5.20   | 0.008 <sup>d</sup>                            |        |

a.- Los errores en el número de coordinación es  $\pm 25\%$  y desviación estándar calculada mediante el programa EXAFSPAK están dadas entre paréntesis.

b.- Error en la distancia es de  $\pm 0.02 \text{ \AA}$

c.- Debye-Waller factor: es un factor que describe los efectos del desorden térmico y estático

d.- Valor mantenido constante durante el proceso de calculación

### 3.- Fijación de metales por minerales precipitados por *M. xanthus*

Para determinar cuales son los minerales producidos, las muestras han sido analizados por difracciones de Rayos X según ha sido se ha descrito en Material y Métodos. Como se puede ver en la Tabla 8, *M. xanthus* precipitó carbonatos como vaterita cuando se añadió cobalto, cromo o cobre al medio de cultivo y weddelita y calcita en presencia del manganeso, con una proporción de 1:1. Mientras que de los fosfatos esta bacteria precipitó estruvita en todos los casos.



**Tabla 8. Análisis por difracción de Rayos X de los minerales producidos por *M. xanthus* en presencia de los metales**

| Medio<br>Metal  | CTF       | M-3                                    |
|-----------------|-----------|--|
| Cobalto 0,5mM   | Estruvita | Vaterita                               |
| Cromo 0,1mM     | Estruvita | Vaterita                               |
| Cobre 1mM       | Estruvita | Vaterita                               |
| Manganeso 2,5mM | Estruvita | Calcita y Weddelita,<br>proporción 1:1 |

### 3.1.- Precipitación de fosfatos

Las morfologías, microanálisis y diagramas de difracción de rayos X se indican en las Figuras (42 a 55). El mineral obtenido en el medio CT-F es, en todos los casos, estruvita, de acuerdo con el análisis de DRX (Figura 55).

La estruvita producida por *M. xanthus* ha sido observada por MEB y analizada por microanálisis EDX y DRX, lo que nos ha permitido obtener fotografías y microanálisis de los cristales producidos en el medio CT-F. La Figura 42 demuestra cristales típicos de estruvita de aproximadamente 200µm de largo. Los picos detectados en el microanálisis (Figura 43) han sido de Mg y P, típicos picos de estruvita, junto con un pequeño pico de K.



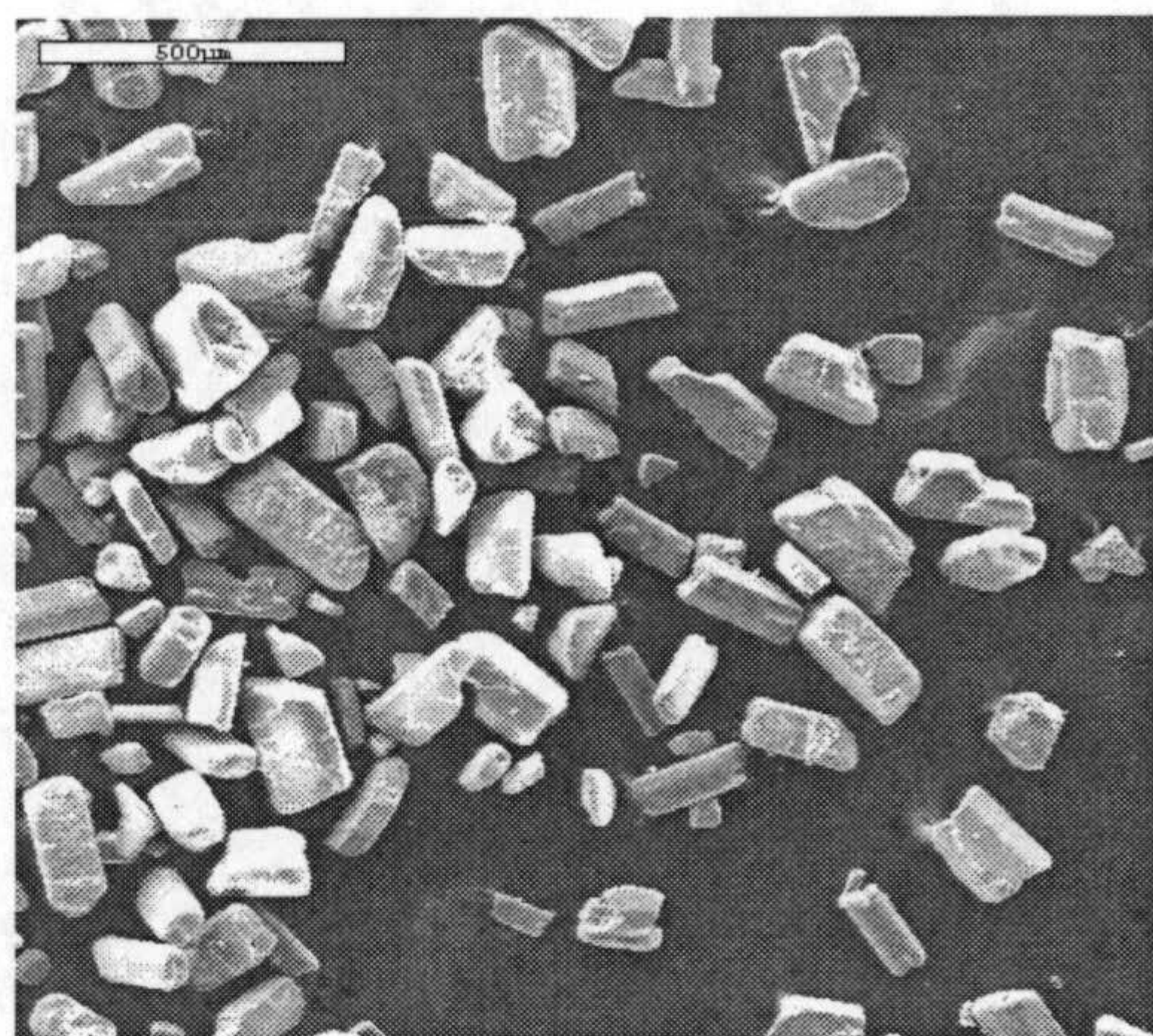


Figura 42.- Cristales de estruvita producidos por *M. xanthus* en el medio CT-F. Control.

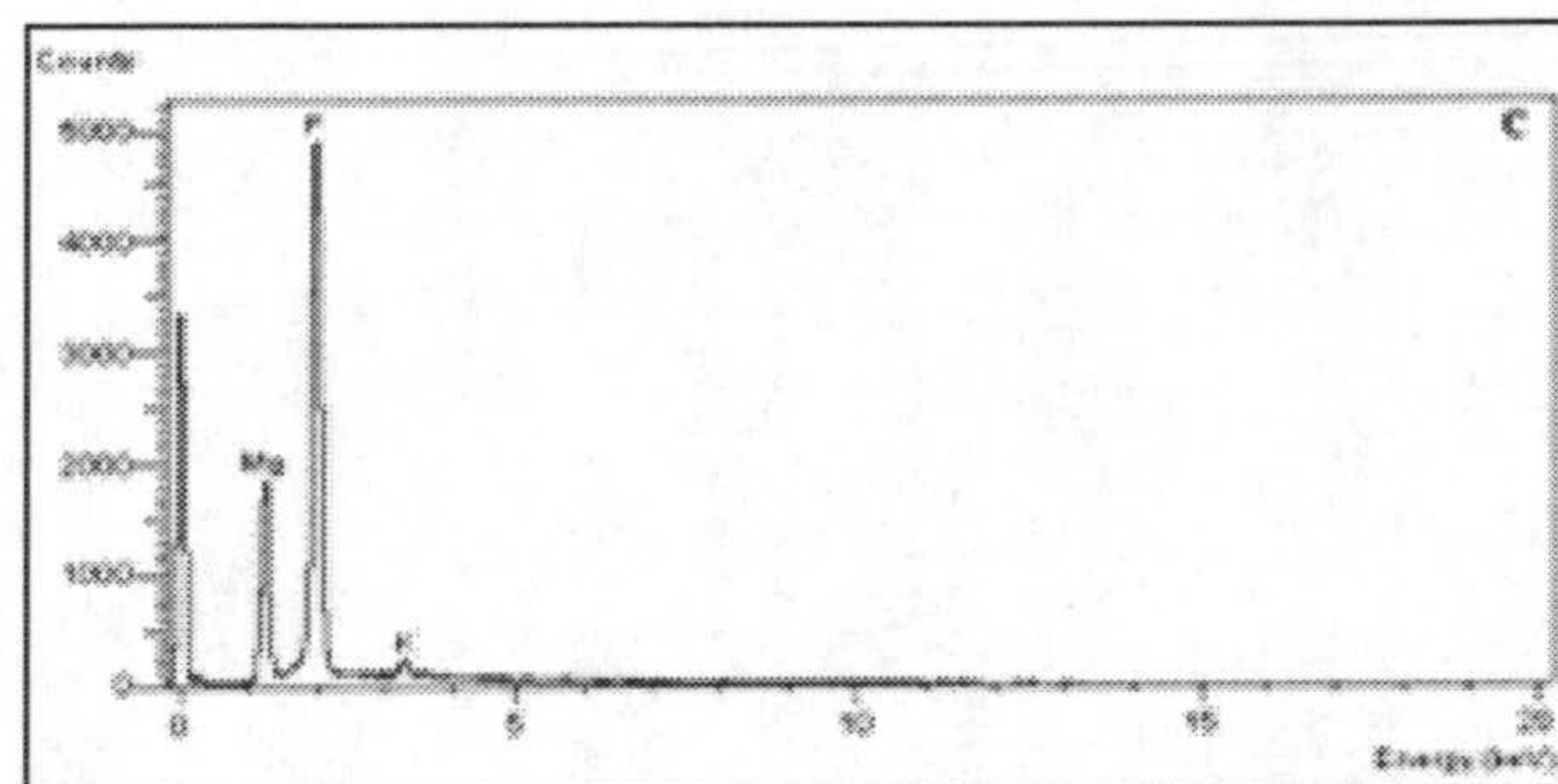


Figura 43.- Microanálisis de cristales de estruvita control



Figura 44.- Cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 0,1mM de cobalto



Figura 45.- Cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 0,2mM de cobalto

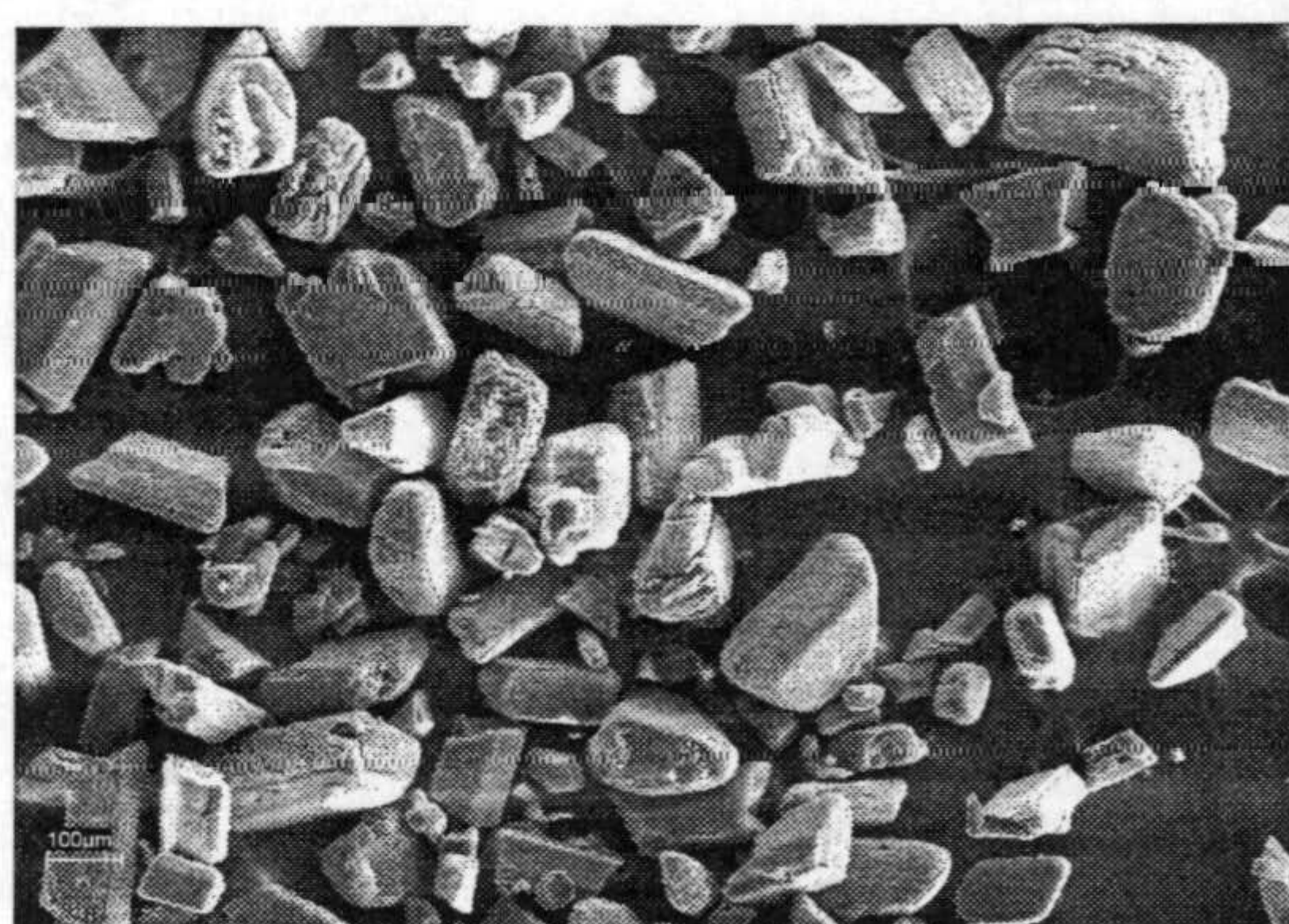


Figura 46.- Cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 0,3mM de cobalto

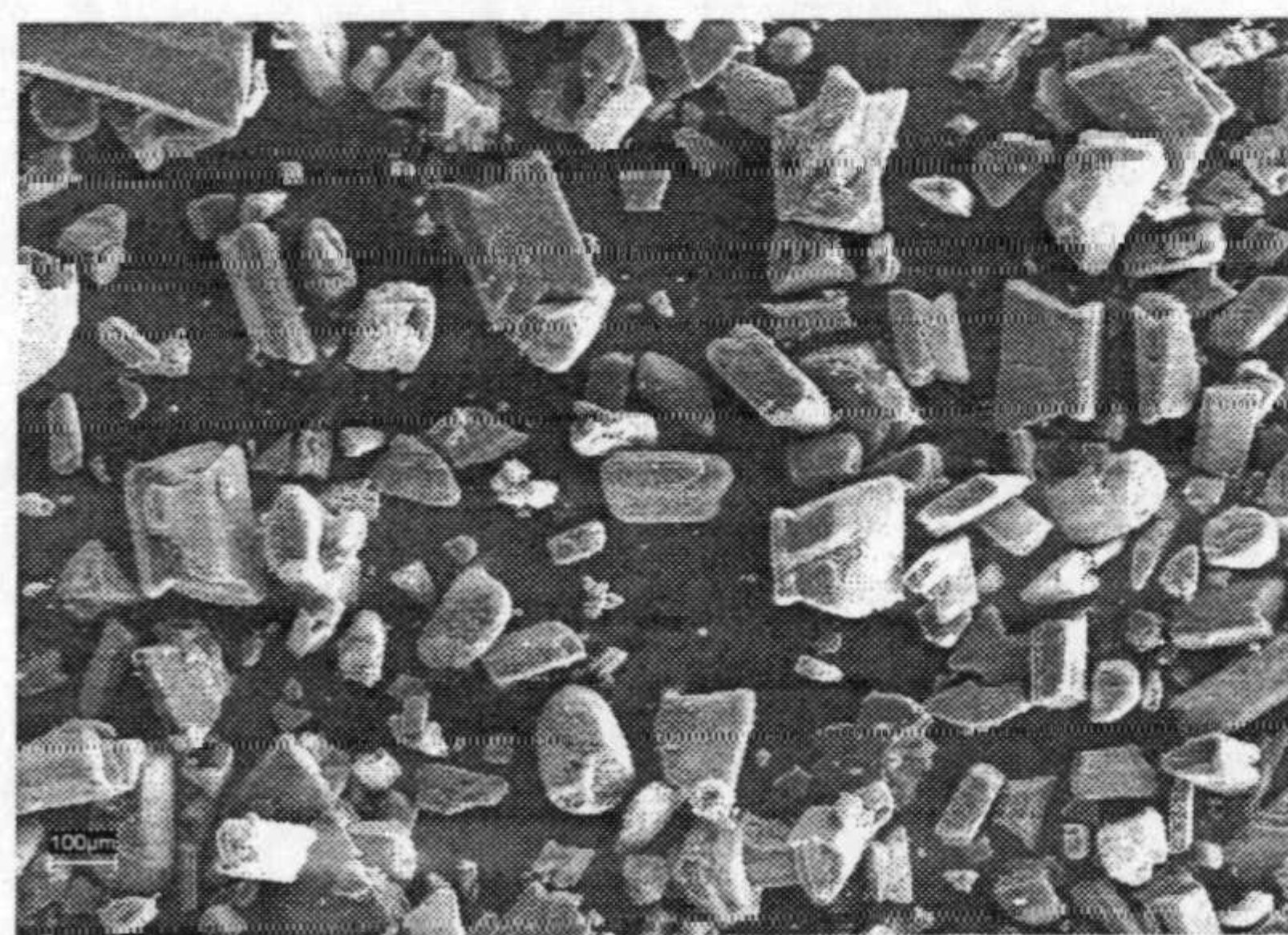
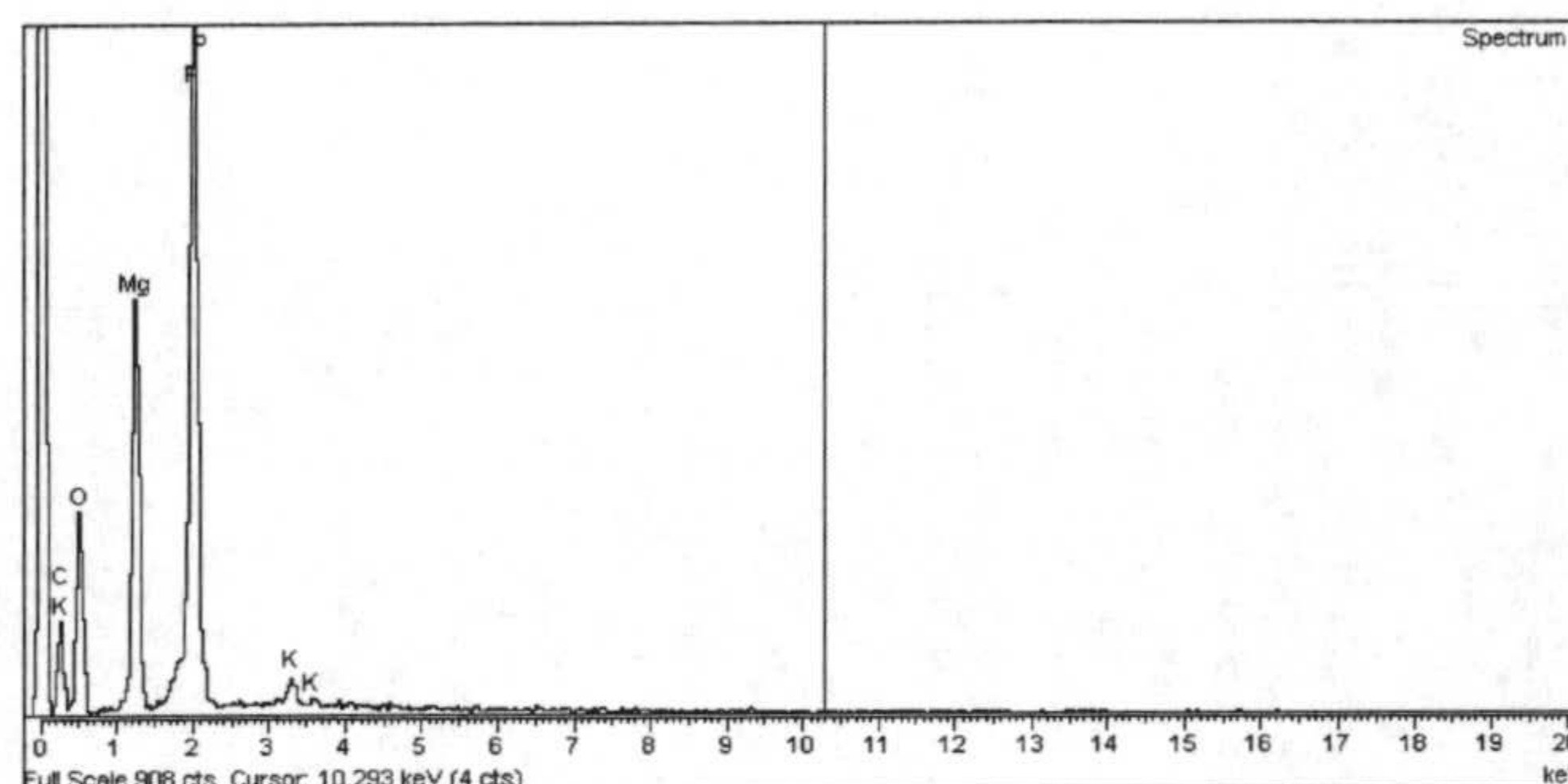


Figura 47.- Cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 0,5mM de cobalto



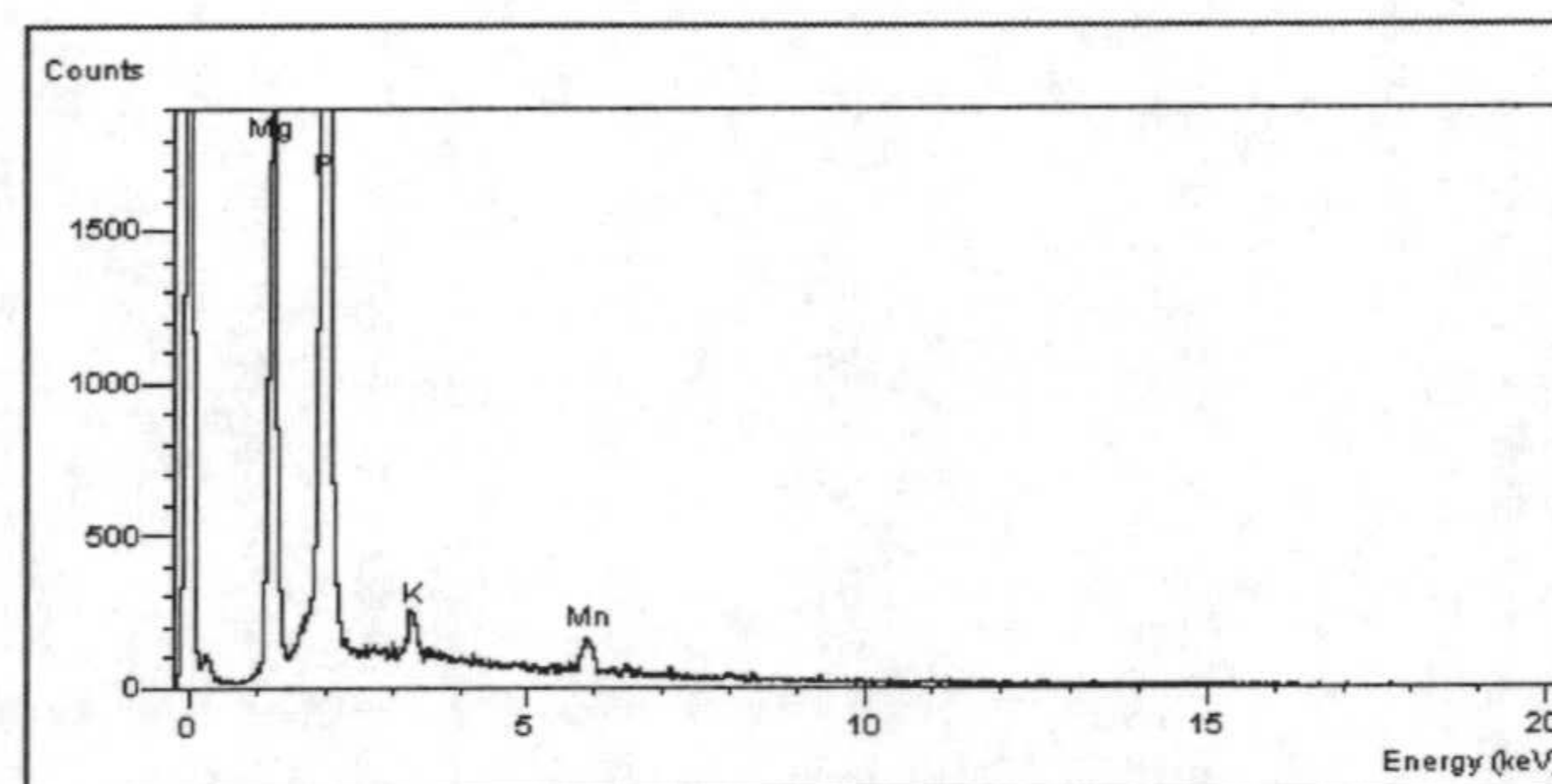


**Figura 48.-** Microanálisis de los cristales de estruvita producidos por *M. xanthus* en el medio CT-F en presencia de 0,5mM cobalto

Las Figuras 44, 45, 46 y 47 muestran los cristales de estruvita formados por *M. xanthus* en presencia de diferentes concentraciones de cobalto. Según estas figuras podemos ver que los cristales se presentan con tamaños diferentes según la concentración del cobalto. Por otra parte, la observación minuciosa de los mismos pone de manifiesto que la porosidad de los minerales formados aumenta, en relación al incremento en la concentración del metal. El microanálisis de estos cristales (Figura 48) confirma que se trata de estruvita por la aparición de los picos Mg y P típicos de ésta.



**Figura 49.-** Cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 2,5mM de manganeso



**Figura 50.-** Microanálisis de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 2,5mM de manganeso.



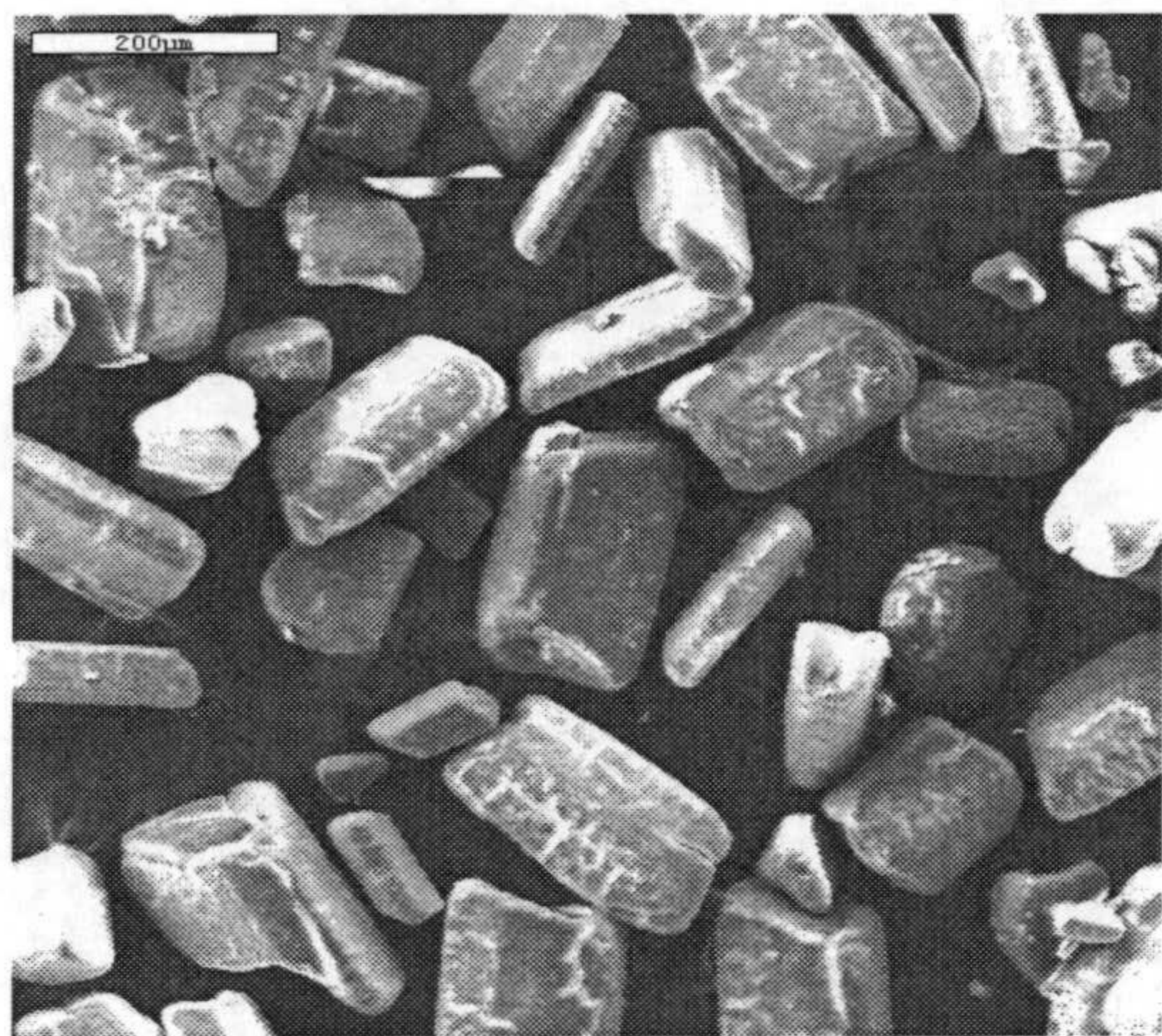


Figura 51.- Cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 0,1mM de cromo

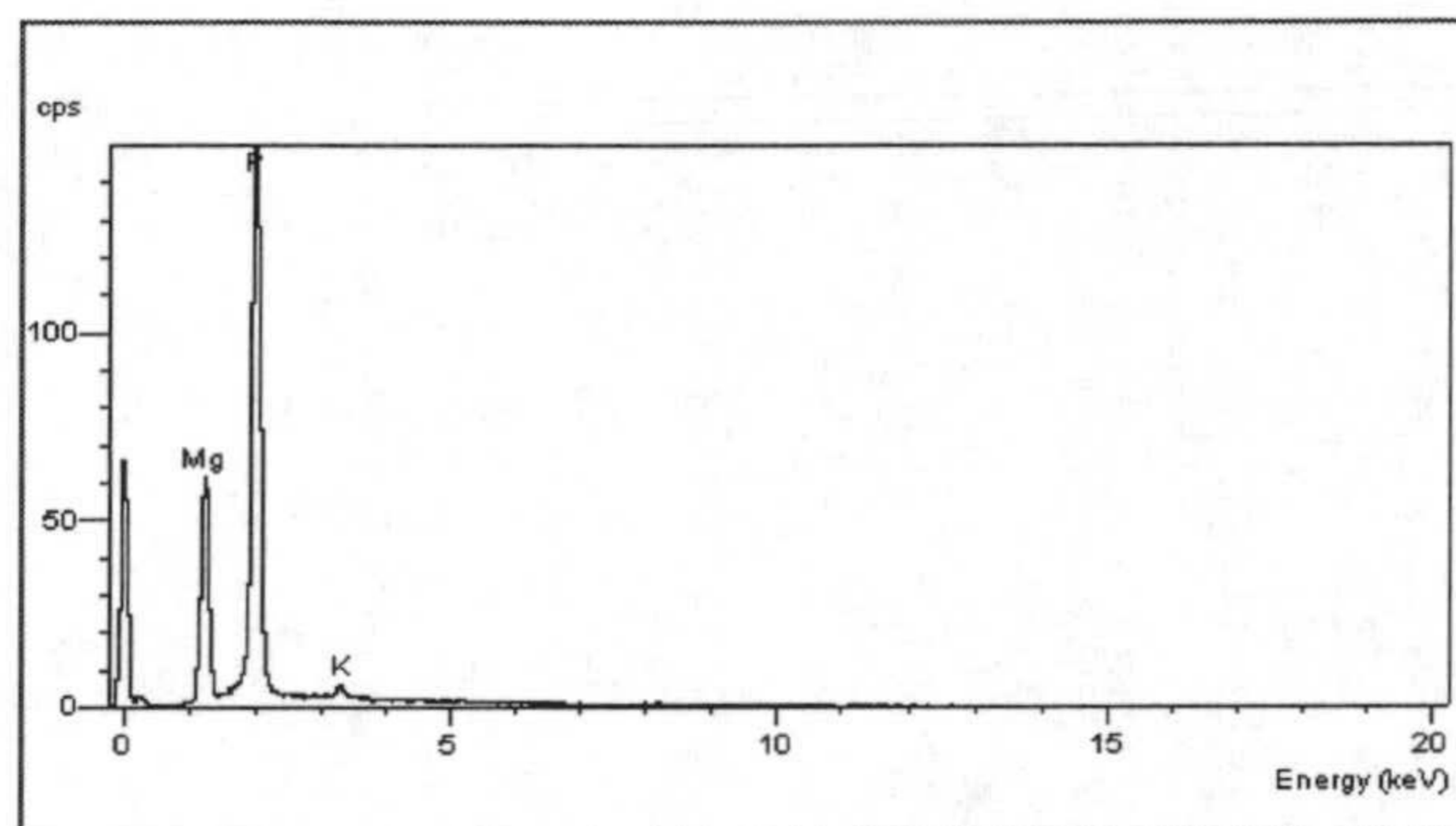


Figura 52.- Microanálisis de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 0,1mM de cromo

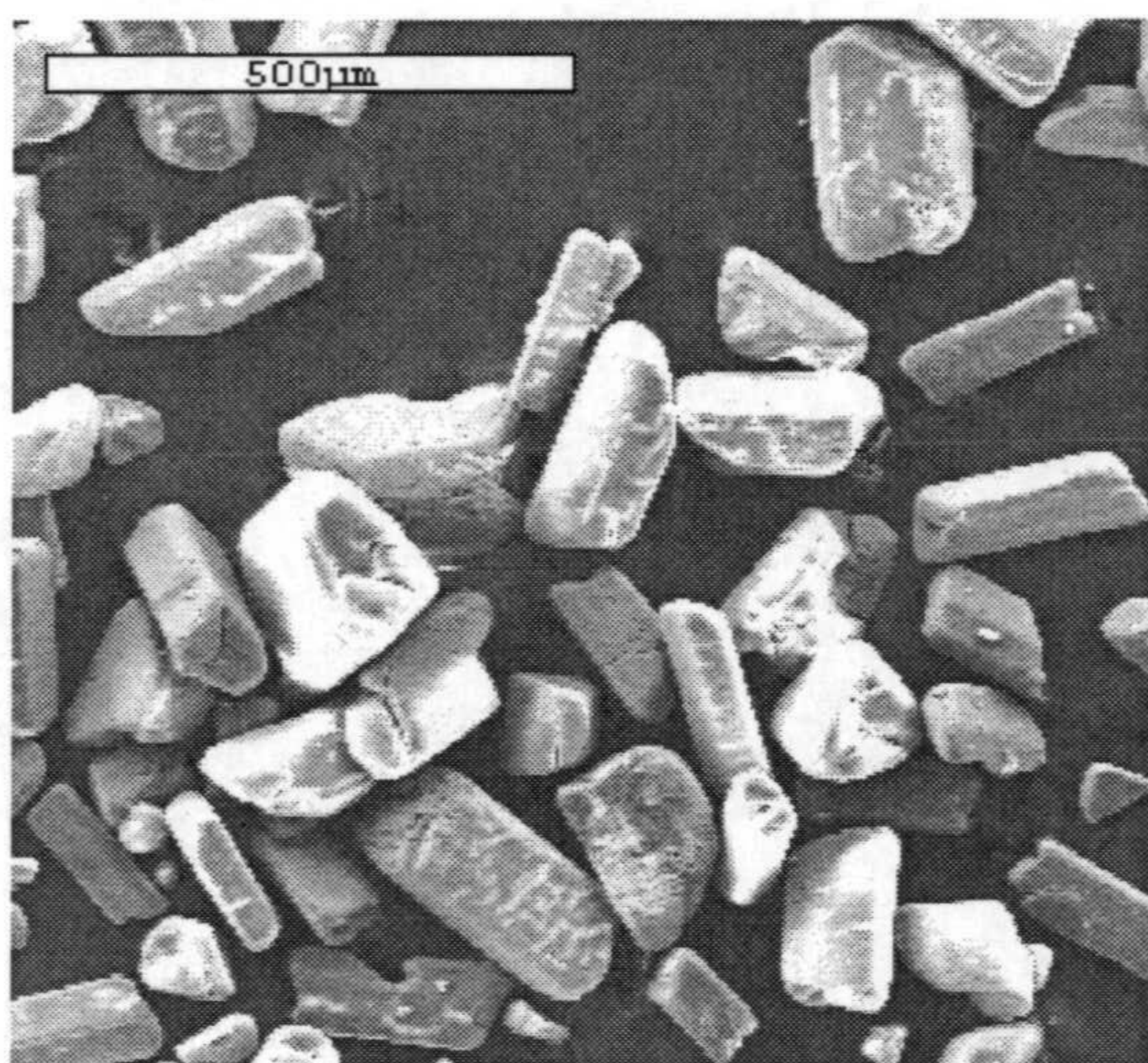


Figura 53.- Cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 0,1mM de cobre

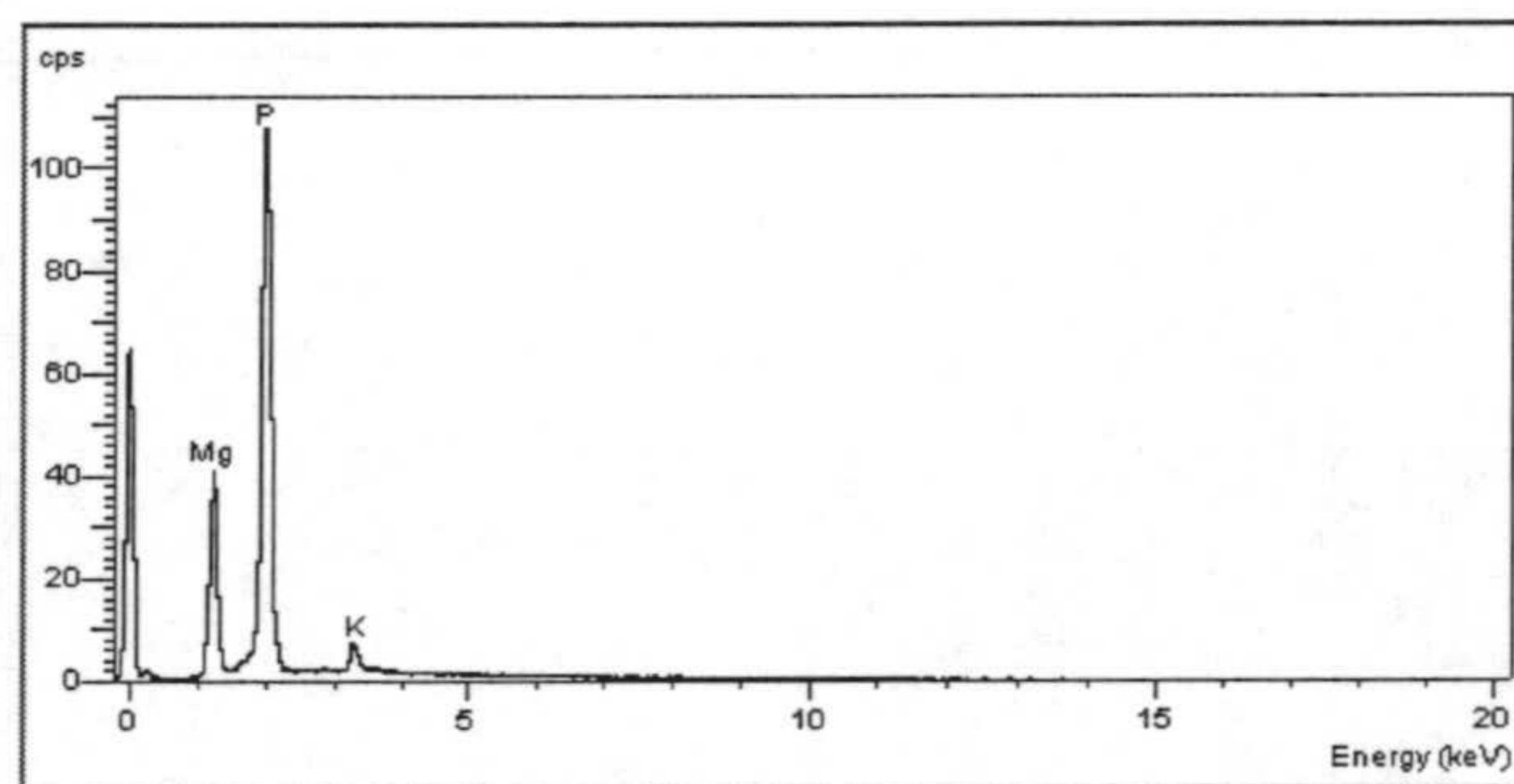


Figura 54.- Microanálisis de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de 1mM de cobre.

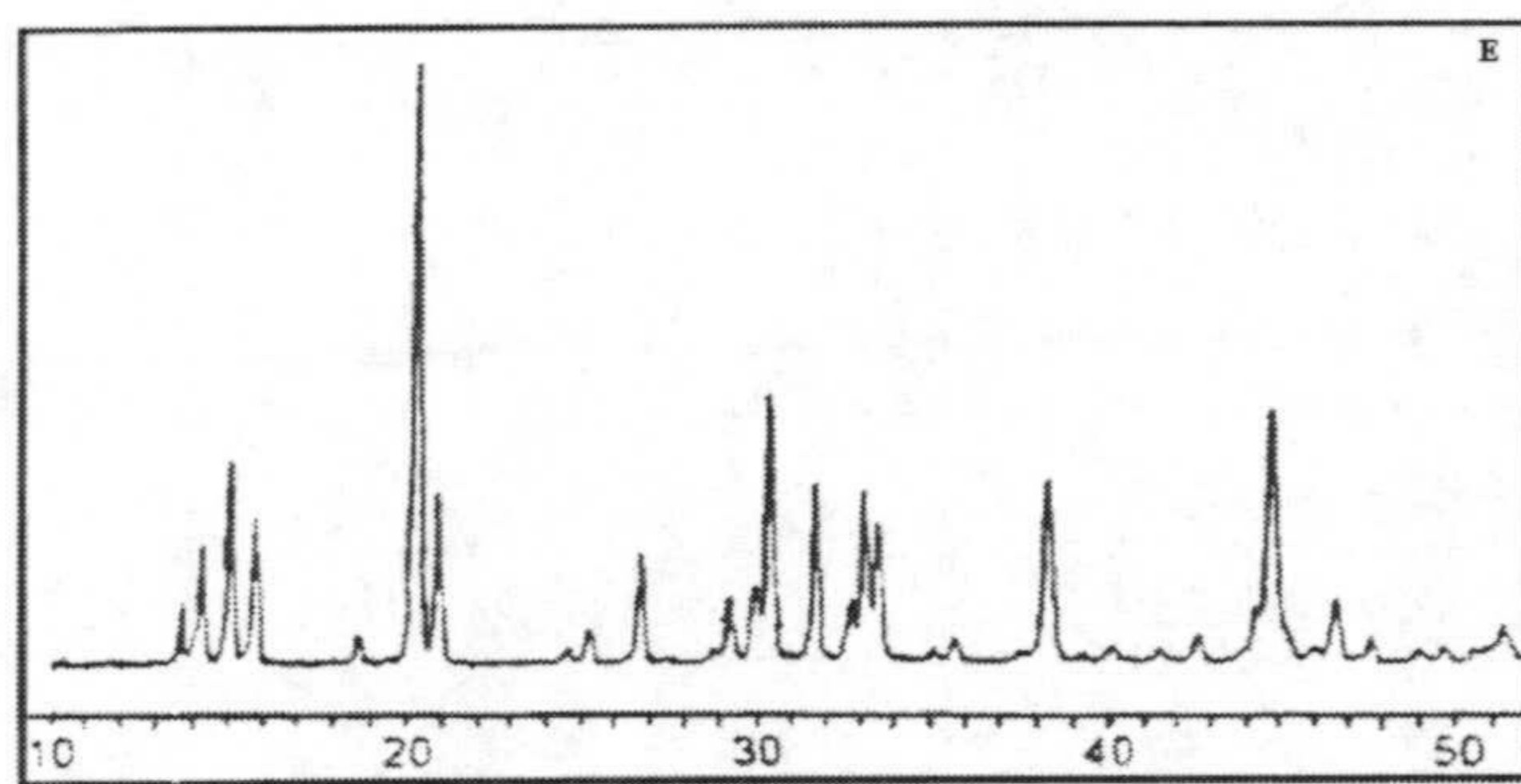


Figura 55.- Diagrama de difracción de rayos X de los cristales de estruvita producidos por *M. xanthus* 422, en el medio CT-F sin y con metales.



En la Figura 49 se muestran cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de manganeso los cuales si se comparan con el testigo se ve claramente que son cristales de diferente tamaño. Su correspondiente microanálisis (Figura 50) demuestra un pico claro de Mn además de Mg y P. Los cristales producidos en presencia de cromo (Figura 51) y cobre (Figura 53) son muy parecidos a los del control y, sus microanálisis (Figuras 52 y 54) indican que se trata de estruvita. El diagrama de difracción de rayos X de los cristales obtenidos en todos los casos es similar y se muestra en la Figura 55.

### 3.2.- Precipitación de carbonatos

En el caso de los minerales producidos en el medio M-3, sistemáticamente se trata de vaterita, salvo en el caso de los cultivos realizados en presencia de manganeso, en que el polimorfo de carbonato cálcico producido es calcita y, además, se produce weddelita. No obstante esto, la observación de los cristales en MEB y los microanálisis, indican que la presencia de los metales tiene una marcada influencia en el desarrollo de diversos tipos de cristales. En el testigo (Figura 56), las morfologías corresponden claramente con las formas esferulíticas características de la vaterita. Además, el microanálisis de estos cristales (Figura 57) demuestra picos de Ca y la confirmación por difracción de rayos X (Figura 58) da los picos típicos en 25, 27, 33, 44 y 50 permite concluir que el mineral formado es vaterita. Pero en presencia de los metales aparecen formas fibrosas en las que, además, frecuentemente se detecta la presencia de P.

En presencia de cobalto el mineral formado es también vaterita (Figura 59) lo que se ha confirmado por el Ca del microanálisis (Figura 60) y los picos del diagrama de difracción de rayos X (Figura 61). El cobre tiene una notable influencia sobre los cristales de vaterita (Figura 62), aparecen formas fibrosas y de morfología muy diferente a las encontradas en el control. El microanálisis (Figura 63) muestra, además, del Ca y P un pequeño pico de Si y el diagrama de difracción de rayos X (Figura 64) confirma la presencia de vaterita.



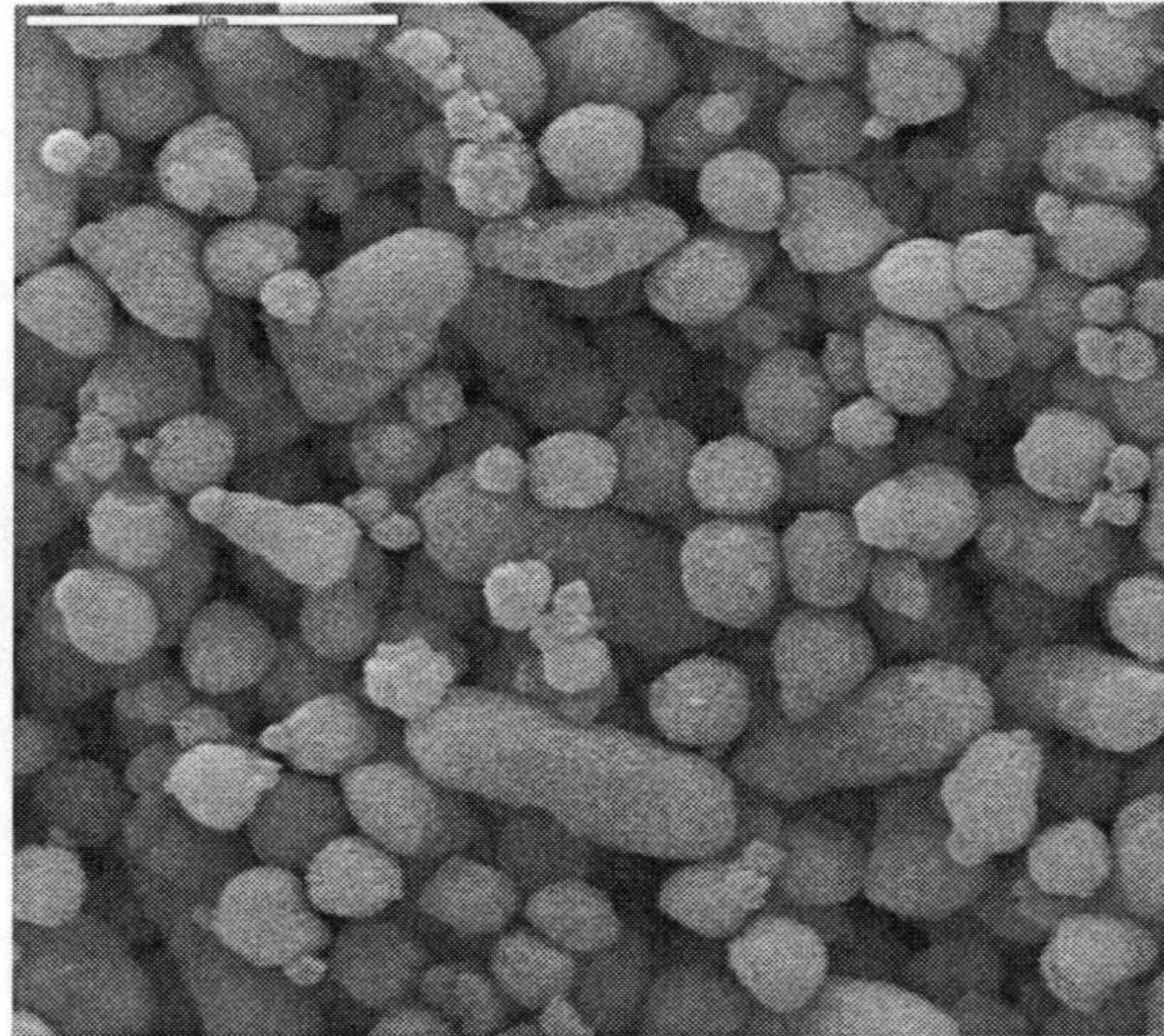


Figura 56.- Cristales de vaterita producidos por *M. xanthus* en el medio M-3

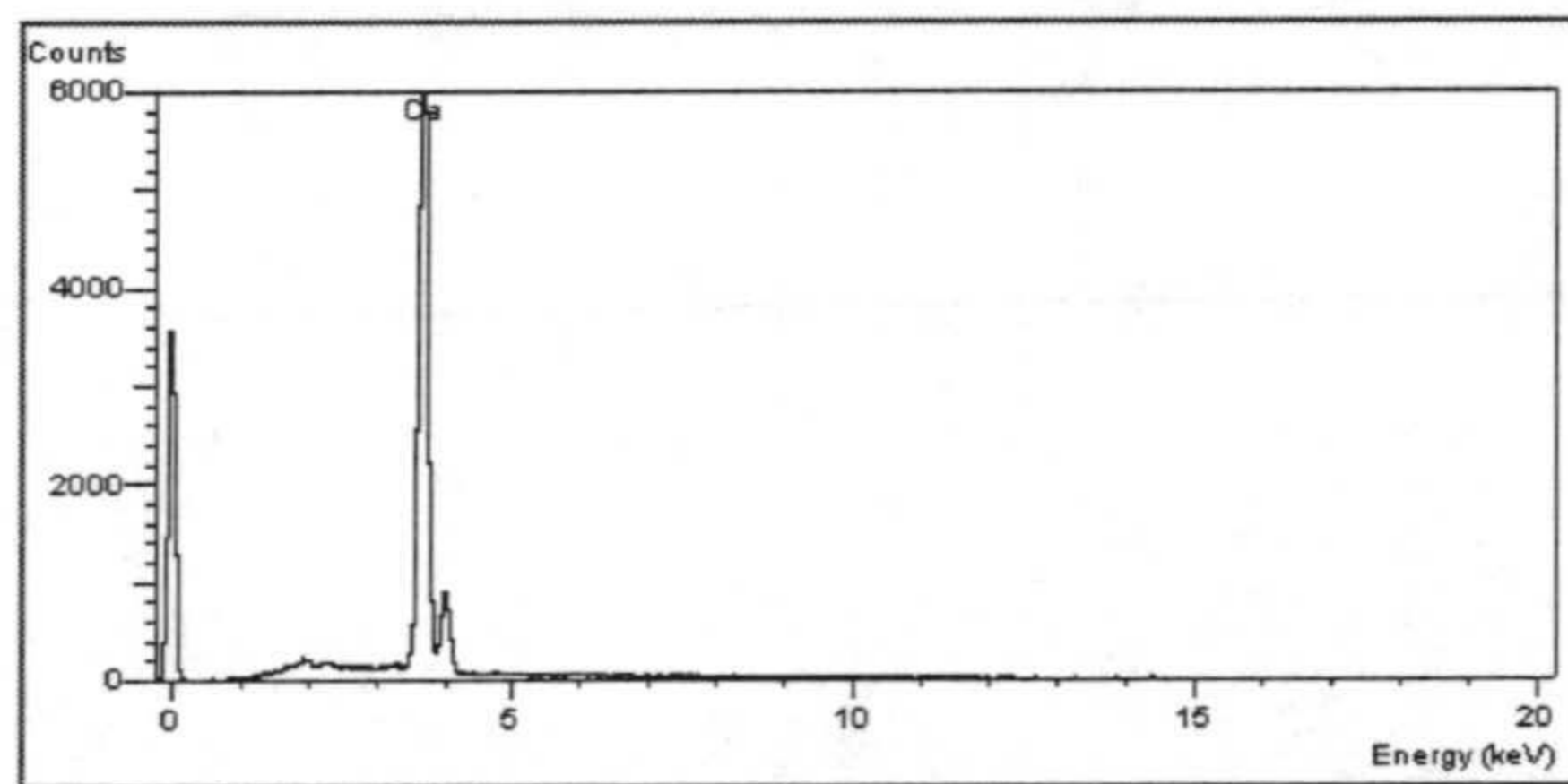


Figura 57.- Microanálisis (EDX) de los cristales producidos por *M. xanthus* en el medio M-3.

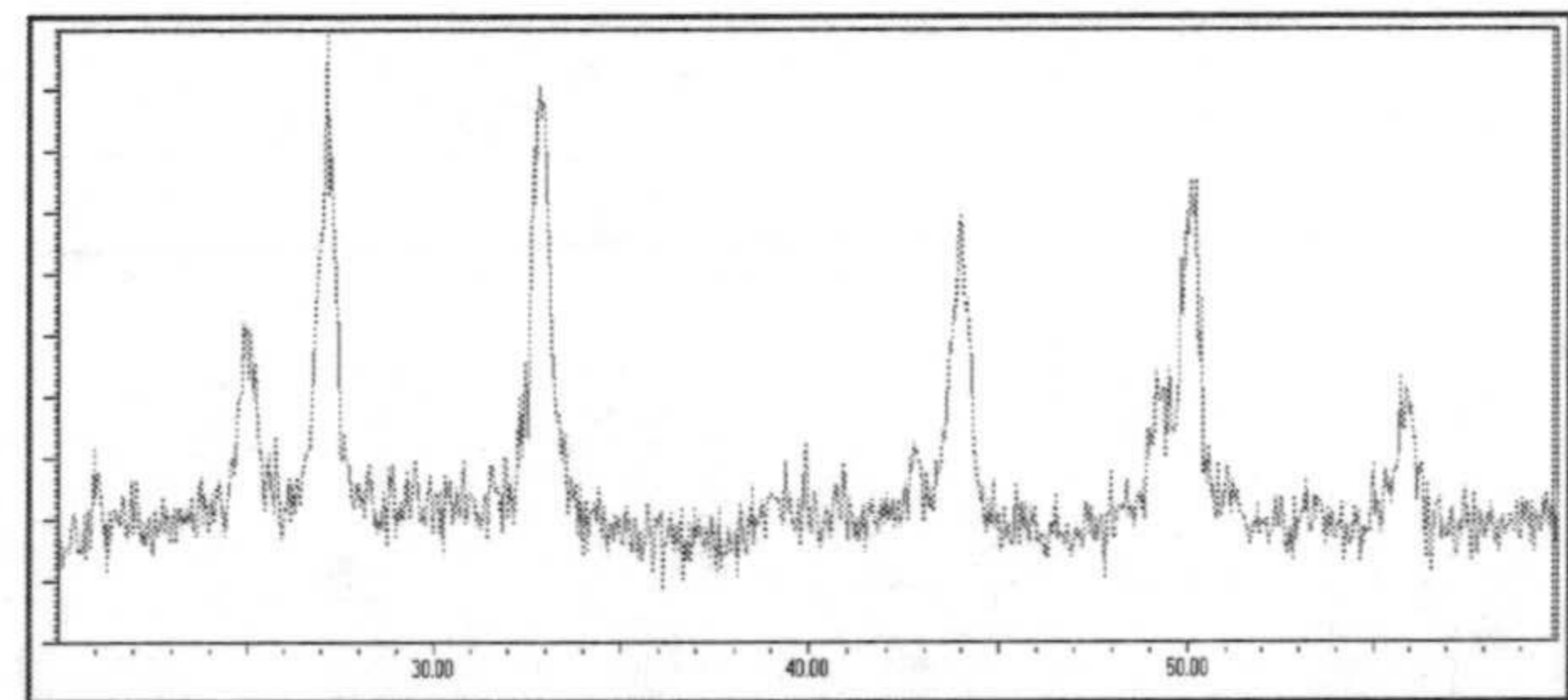


Figure 58.- Diagrama de difracción de rayos X de los cristales producidos por *M. xanthus* en el medio M-3.

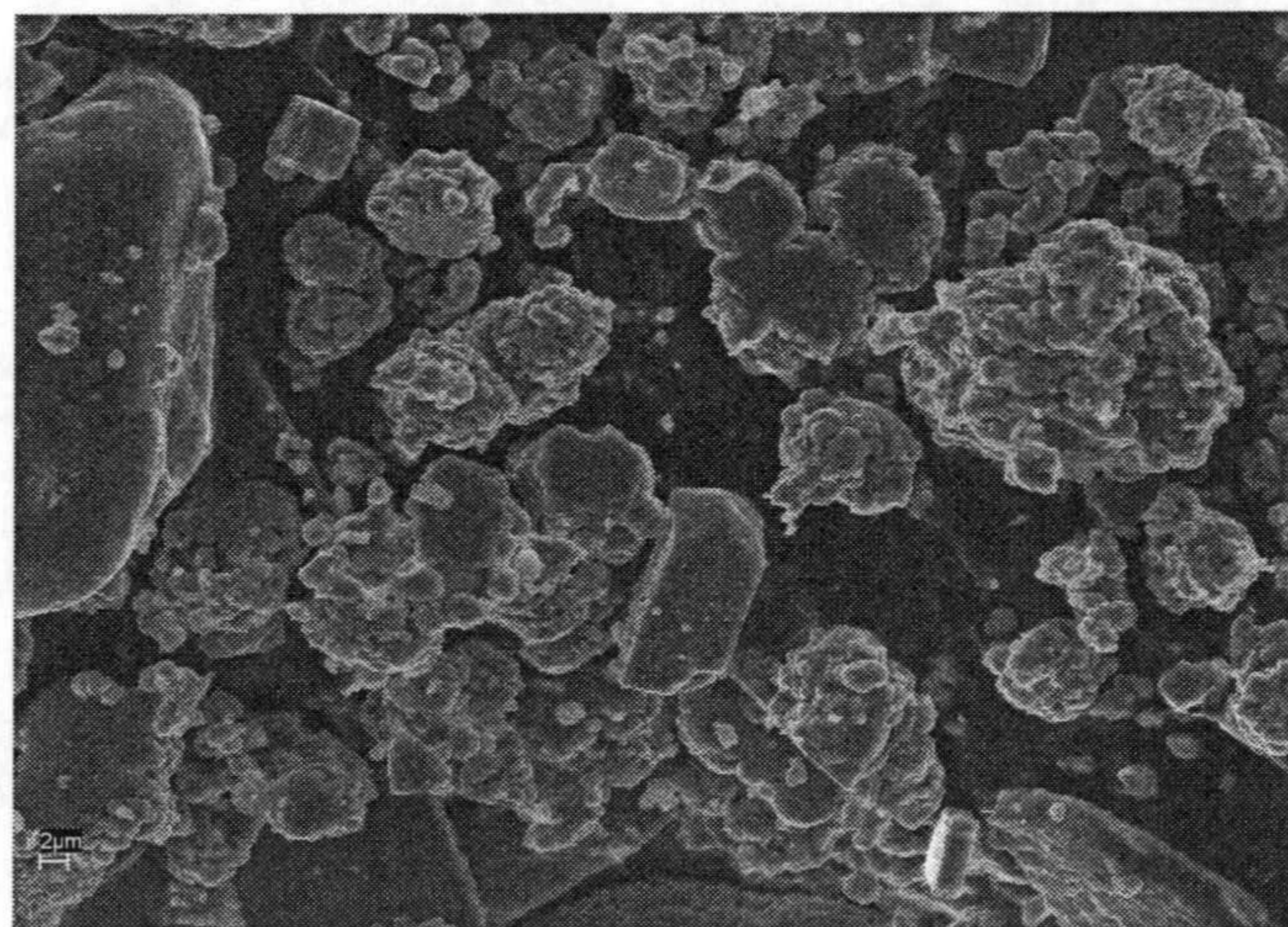


Figura 59.- Cristales de vaterita producidos por *M. xanthus* en el medio M-3 en presencia de 0,5mM de cobalto



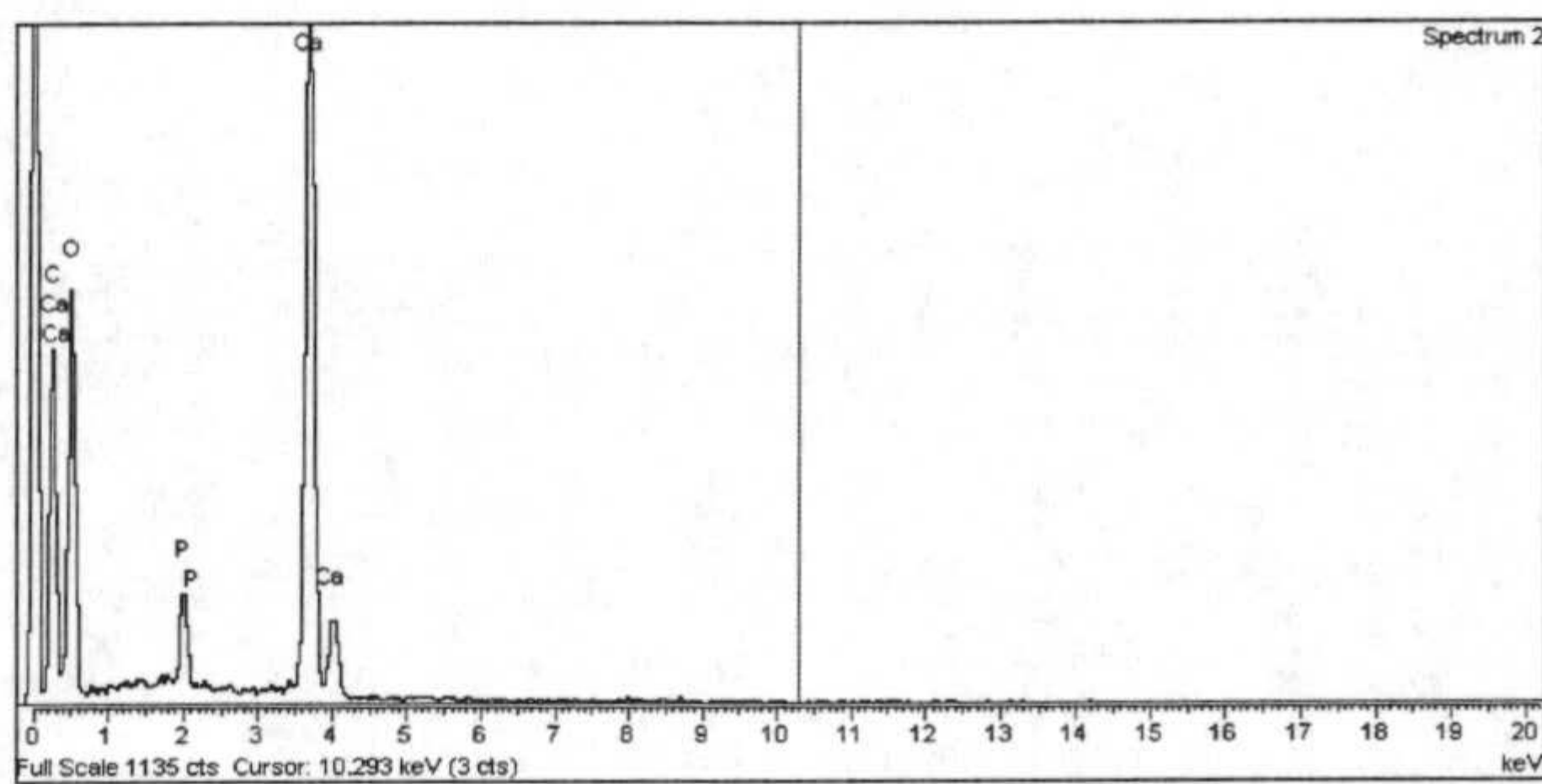


Figura 60.- Microanálisis de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de cobalto

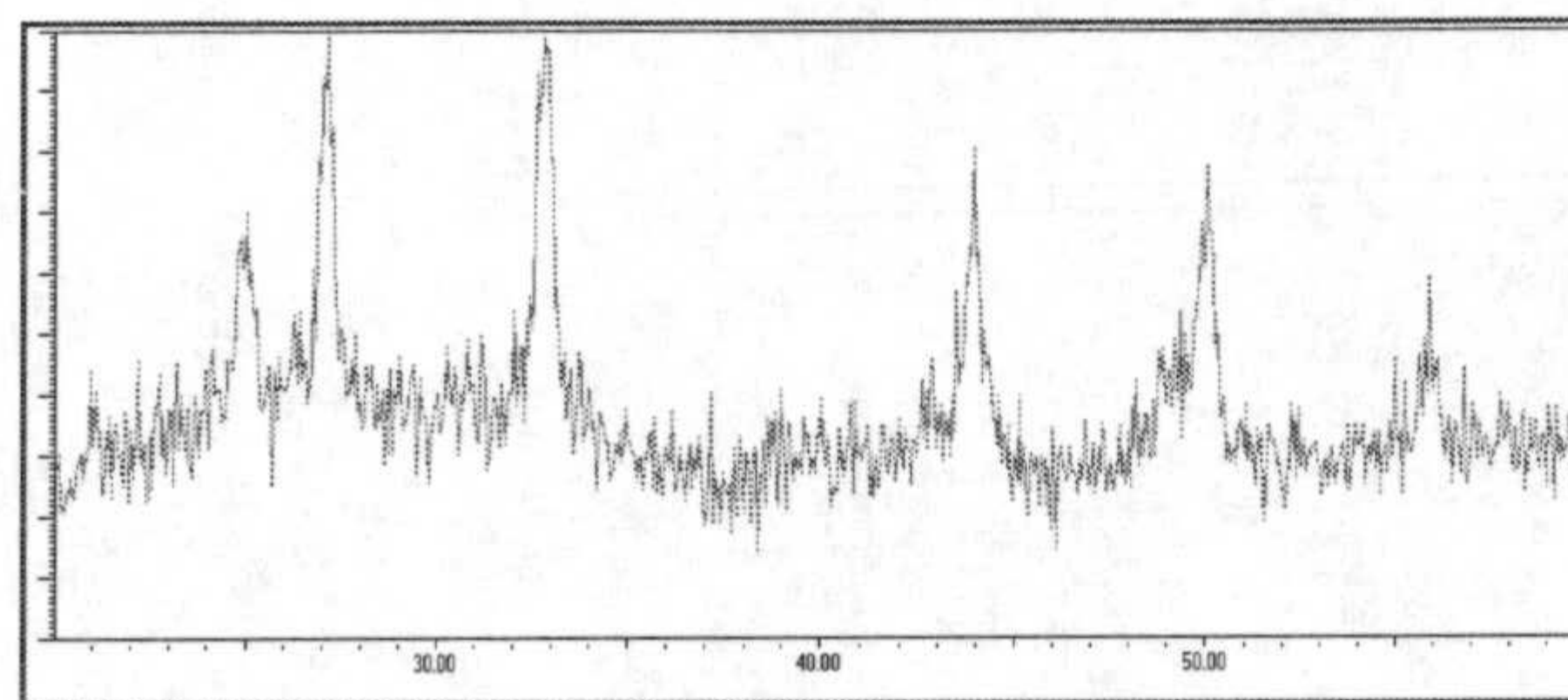


Figura 61.- Diagrama de difracción de rayos X de los cristales producidos en presencia de cobalto

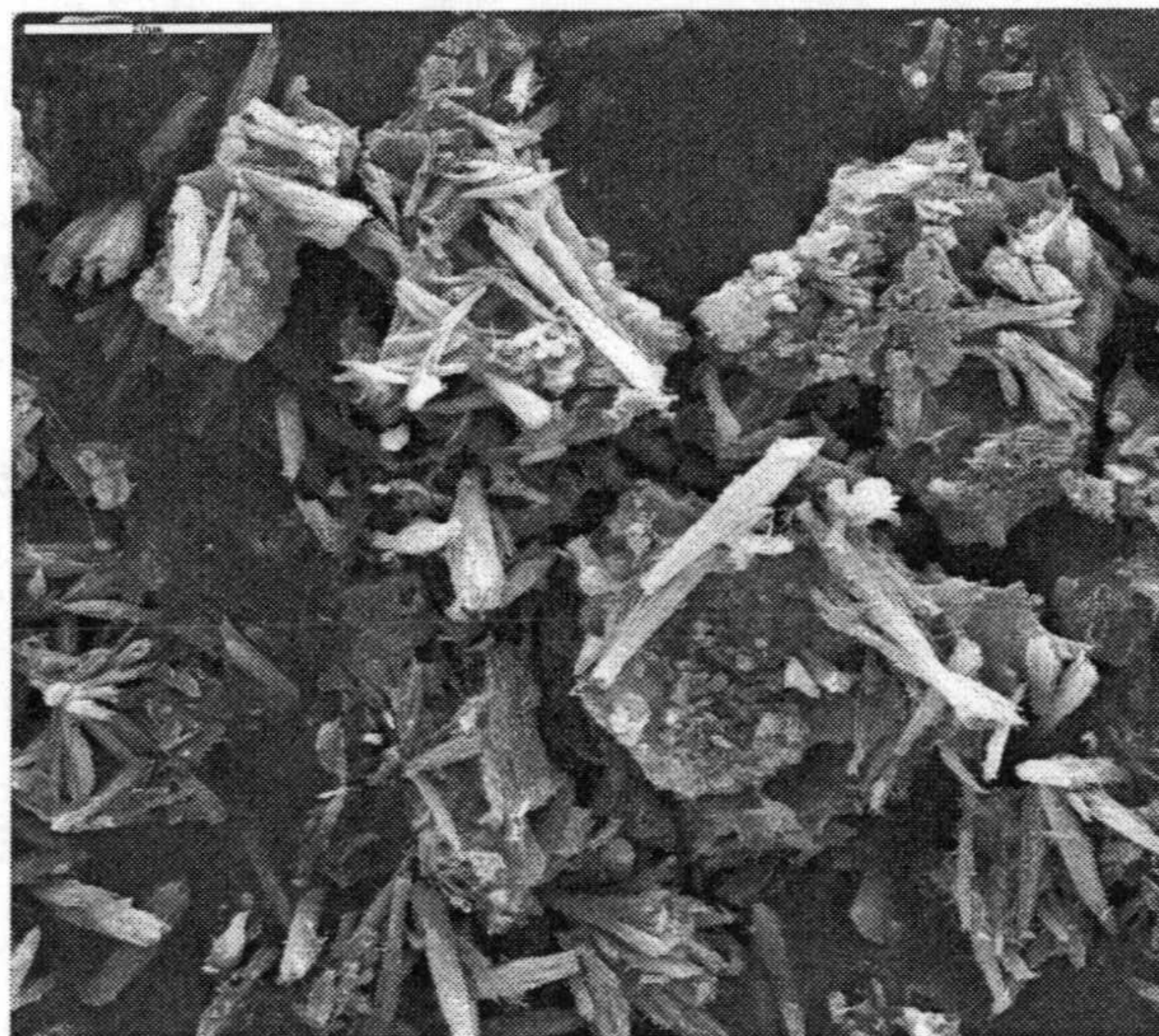


Figura 62.- Cristales producidos por *M. xanthus* en el medio M-3 en presencia de 1mM de cobre

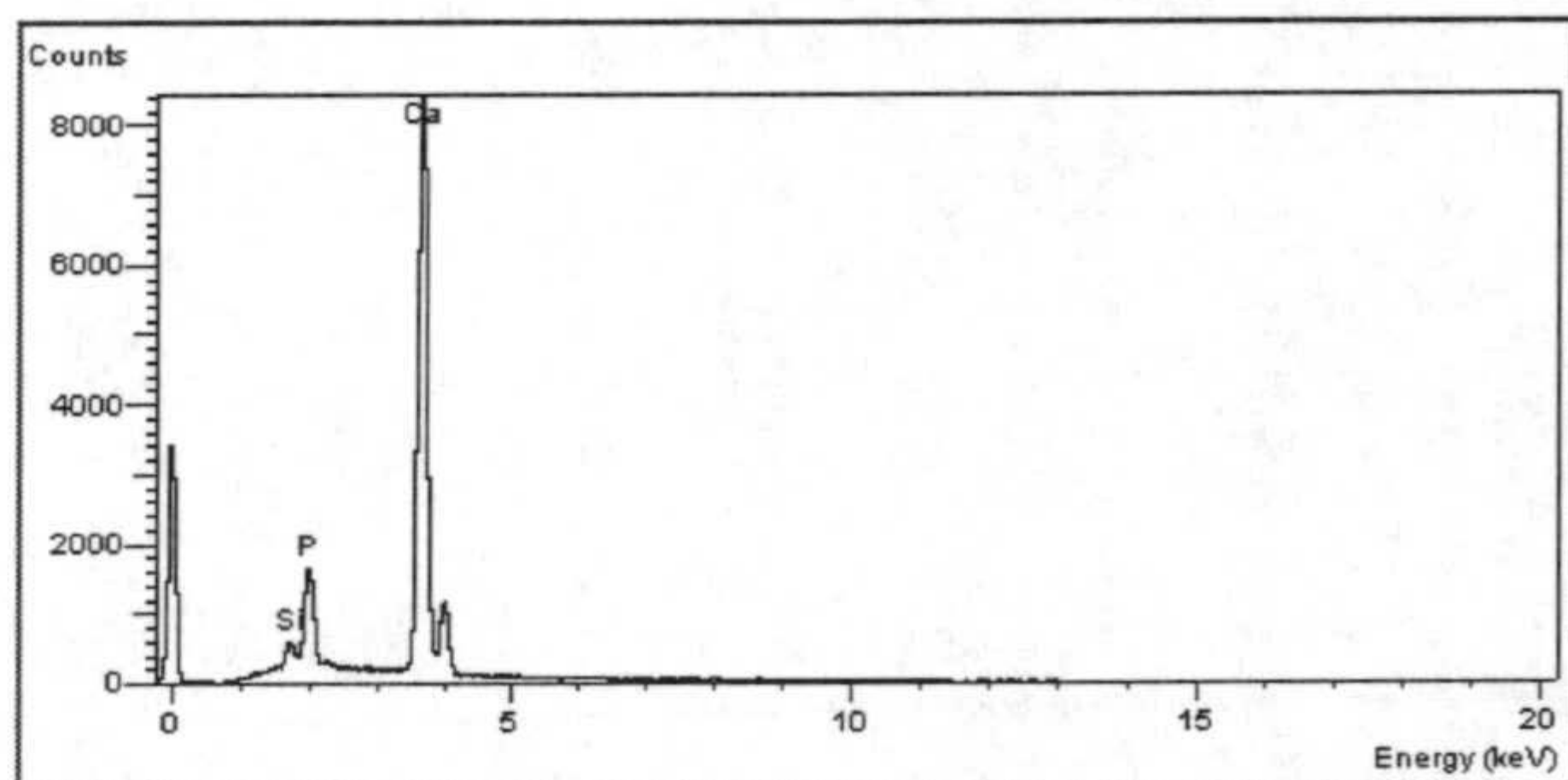


Figura 63.- Microanálisis de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de cobre

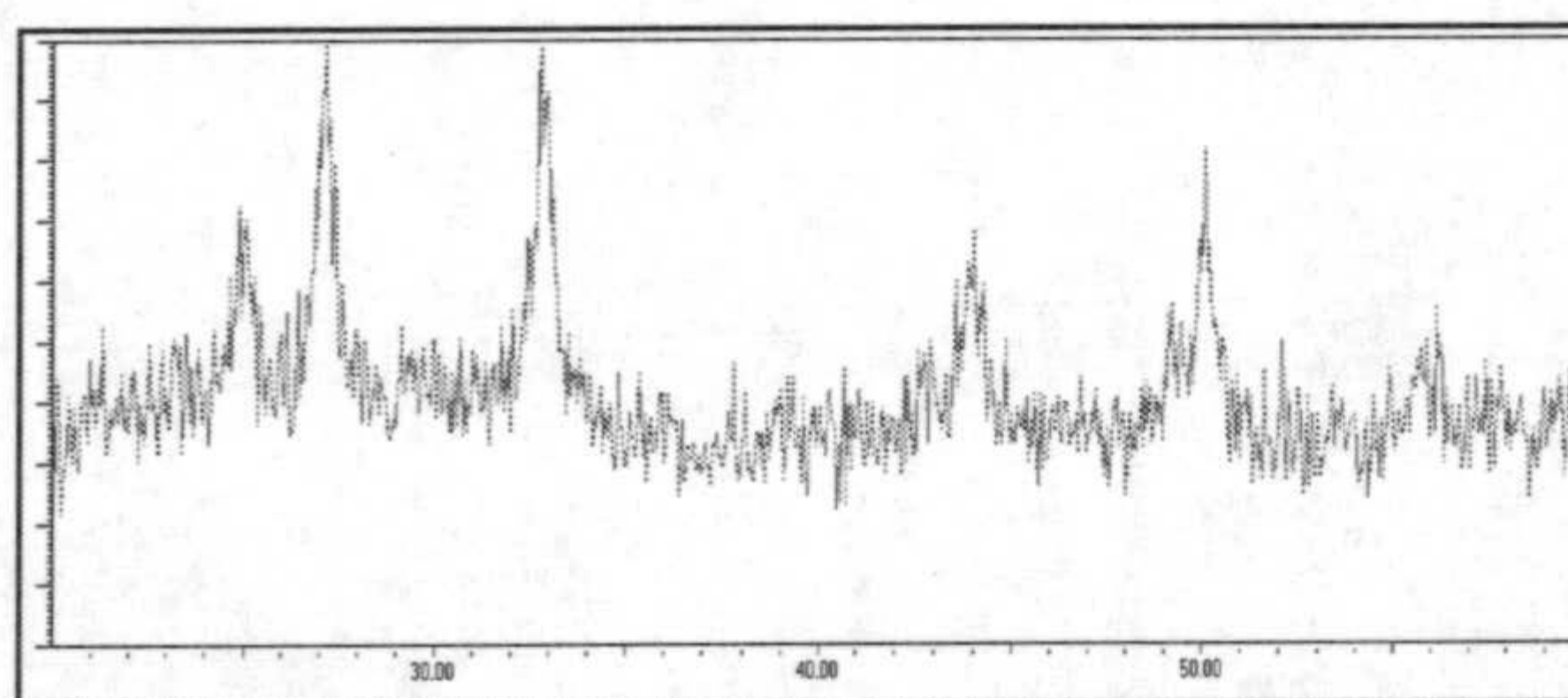


Figura 64.- Diagrama de difracción de rayos X de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de cobre



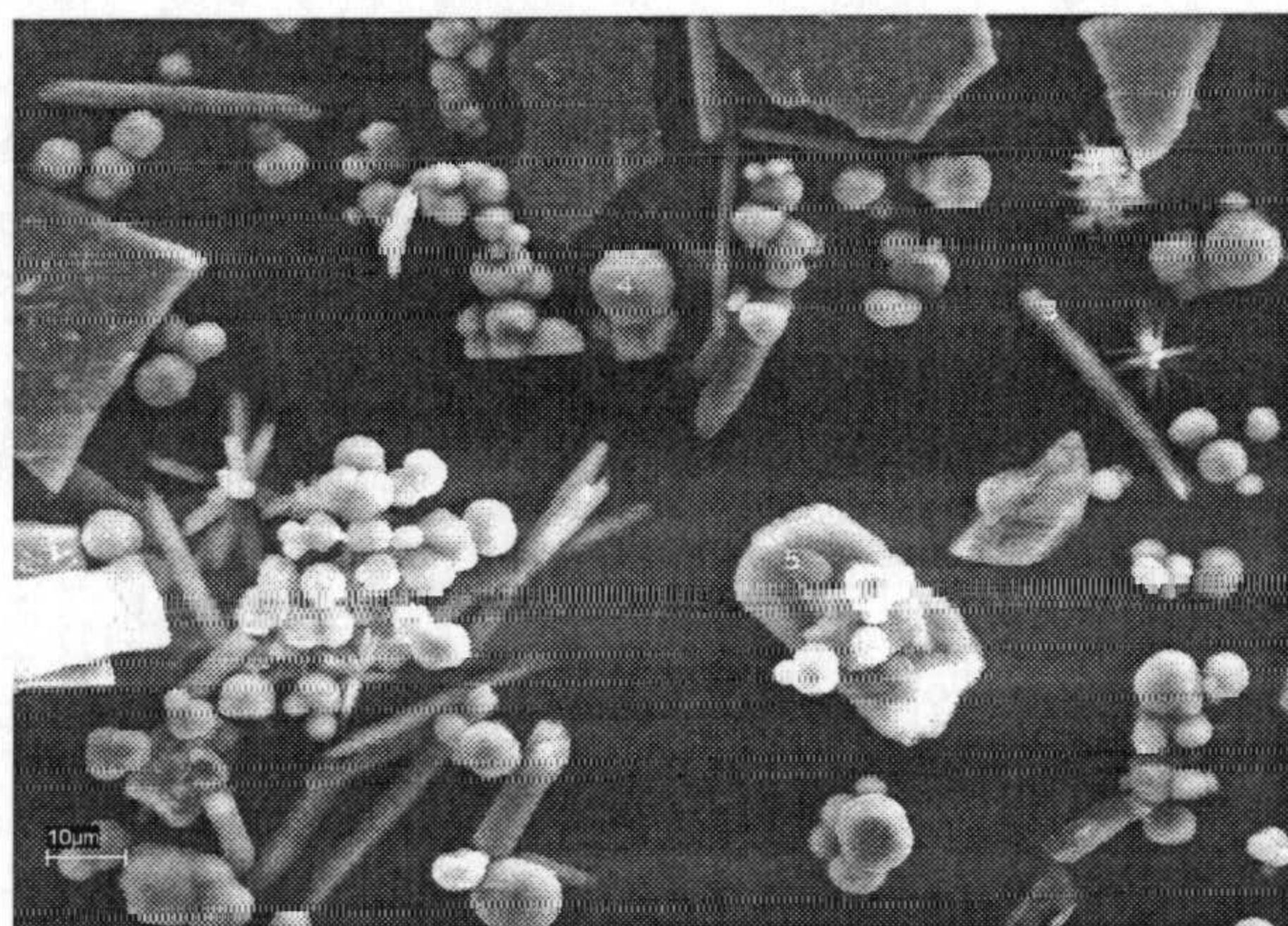


Figura 65.- Cristales producidos por *M. xanthus* en el medio M-3 en presencia de 0,1mM de cromo.

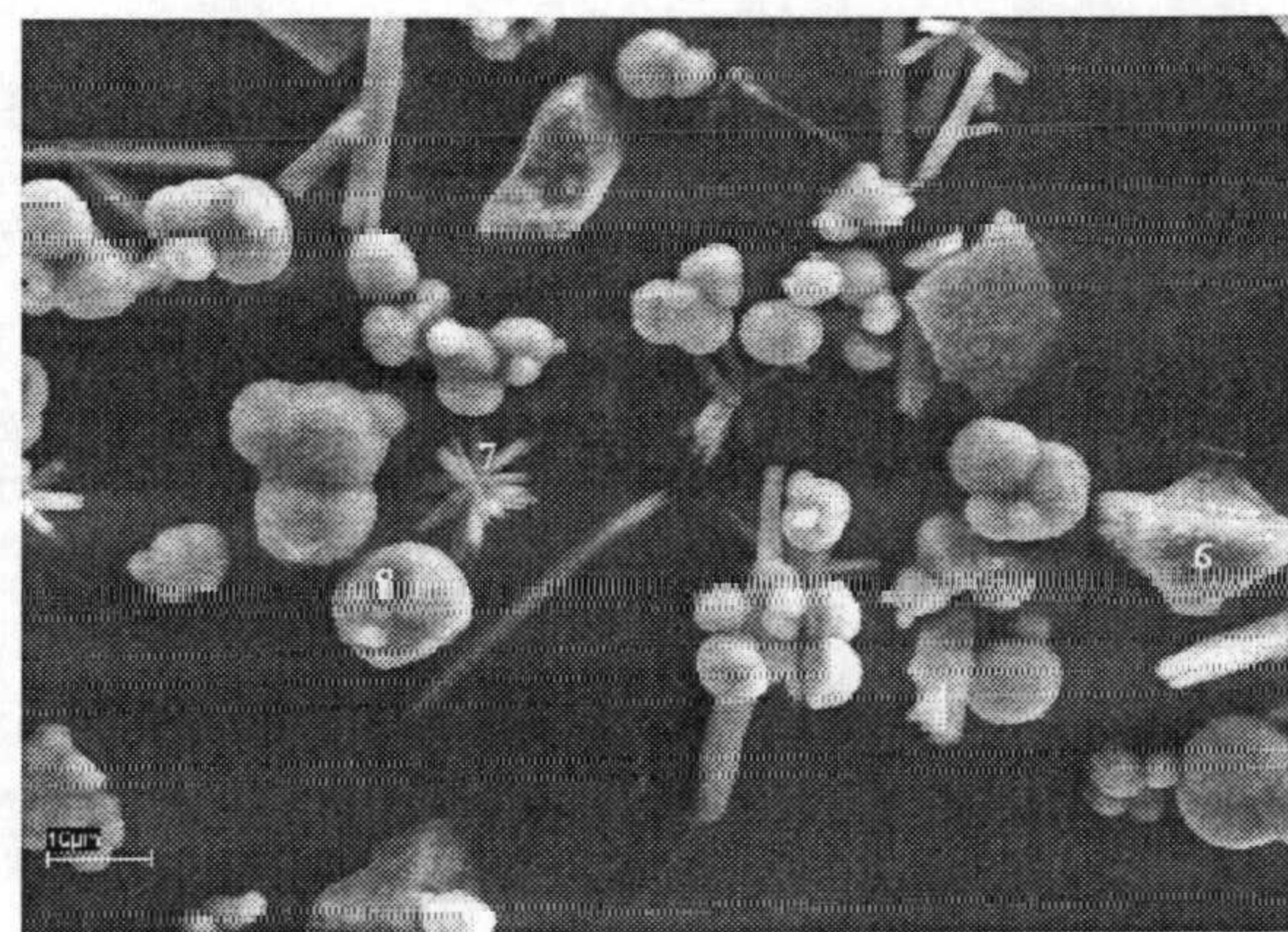


Figura 66.- Cristales producidos por *M. xanthus* en el medio M-3 en presencia de 0,1mM de cromo

El cromo ha sido el metal que ha inducido la formación de cristales con mayor diversidad de morfologías. Los números de 1 al 7, con que se han marcado las diferentes morfologías (Figuras 65 y 66) tienen sus correspondientes microanálisis en las Figuras 67 a 73. En estos microanálisis, las morfologías 1 y 2 muestran la misma composición: mayoritariamente Ca y P (Figura 67 y 68). Las morfologías 3 corresponden a las formas fibrosas observadas anteriormente y su microanálisis (Figura 69) contiene relativamente poco de Ca. Las estructuras 4 son formas esferulíticas parecidas a las formas 1 y 2 un poco más alargadas y su microanálisis (Figura 70) muestra la presencia de Ca pero no de P.

Las estructuras 5 y 6 corresponden a formas cúbica y prismática, respectivamente y ambas dan en los microanálisis Ca, Mg y P (Figuras 71 y 72). Por último los cristales 7 son formas fibrosas parecidas a las formas 1 pero sin las pequeñas bolitas que aparecen sobre las formas fibrosas de 1. El microanálisis de este tipo de cristales muestra únicamente Ca (Figura 73), a diferencia de los demás cristales. La Figura 74 presenta el diagrama de difracción de rayos X de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia del metal.



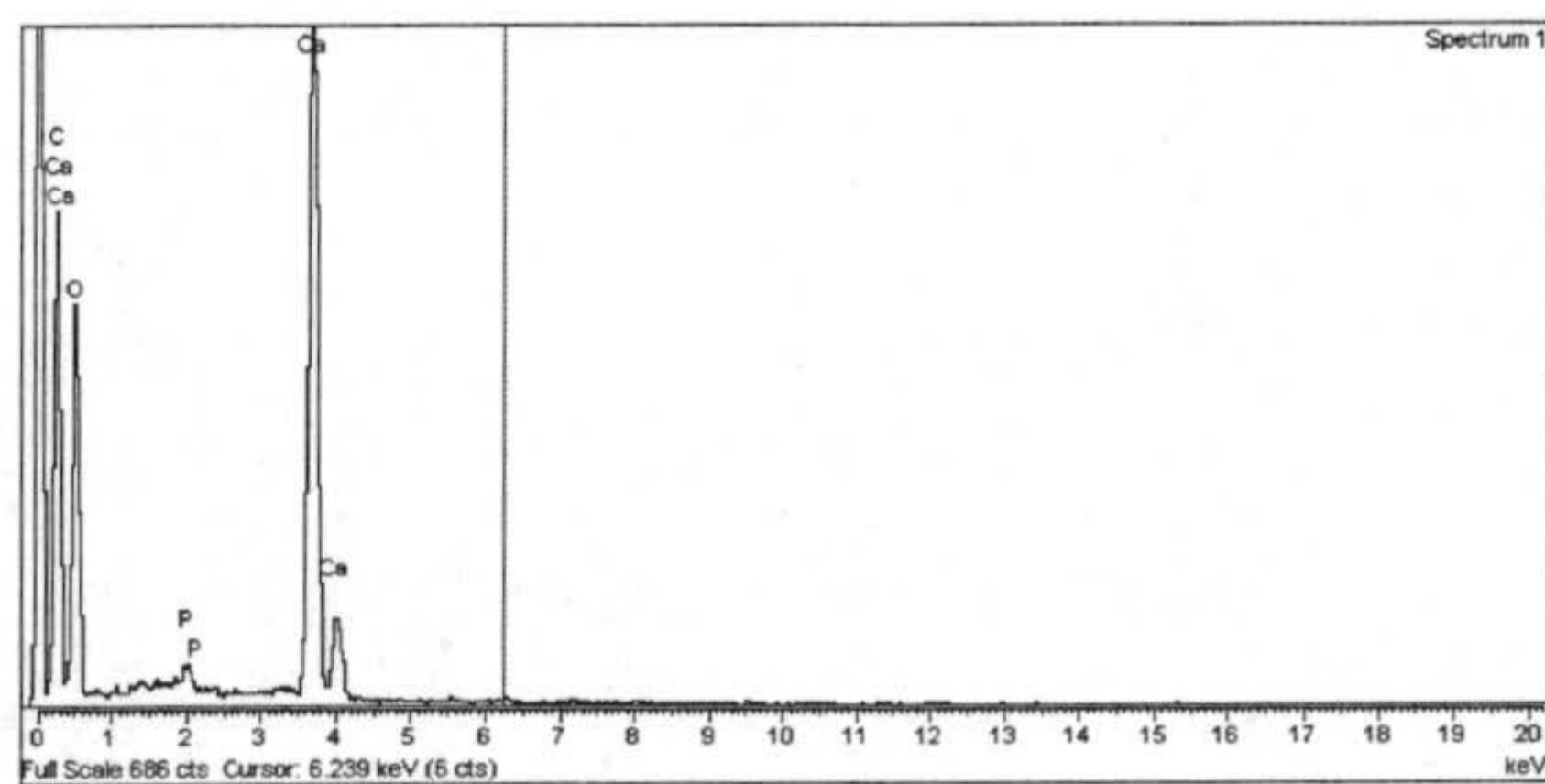


Figura 67.- Microanálisis de los cristales tipo 1 producidos por *M. xanthus* en presencia de cromo.

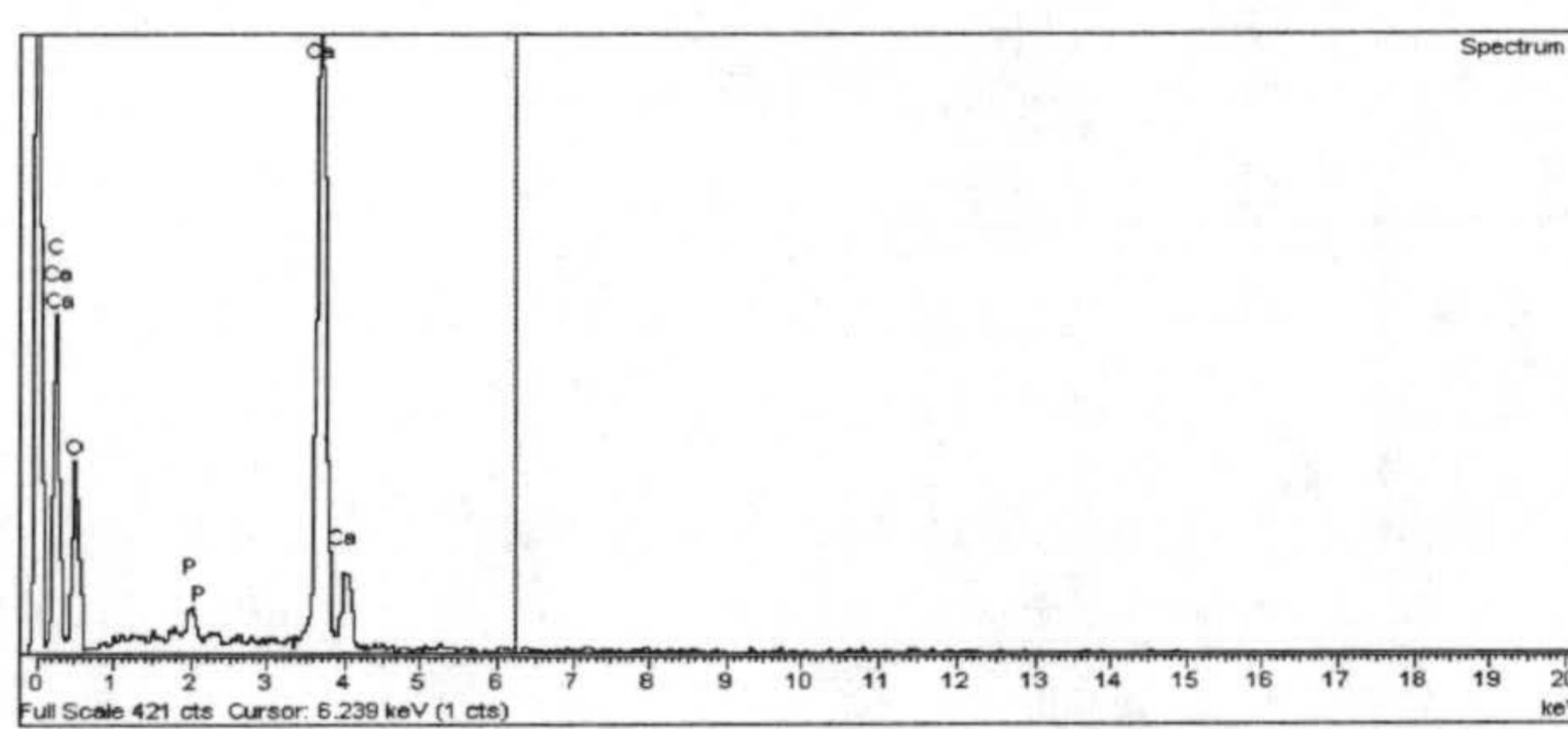


Figura 68.- Microanálisis de los cristales tipo 2 producidos por *M. xanthus* en presencia de cromo.

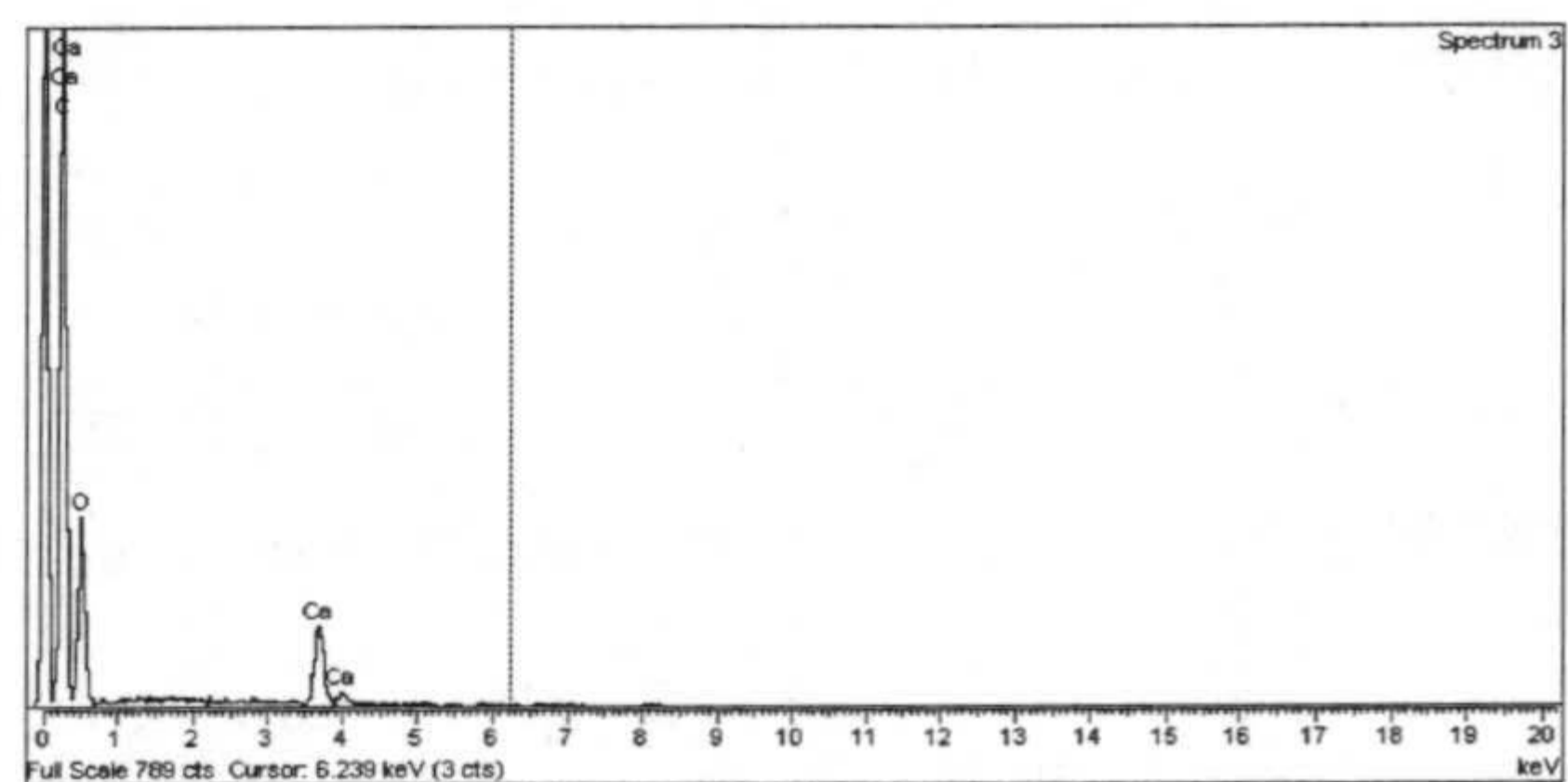


Figura 69.- Microanálisis de los cristales tipo 3 producidos por *M. xanthus* en presencia de cromo.

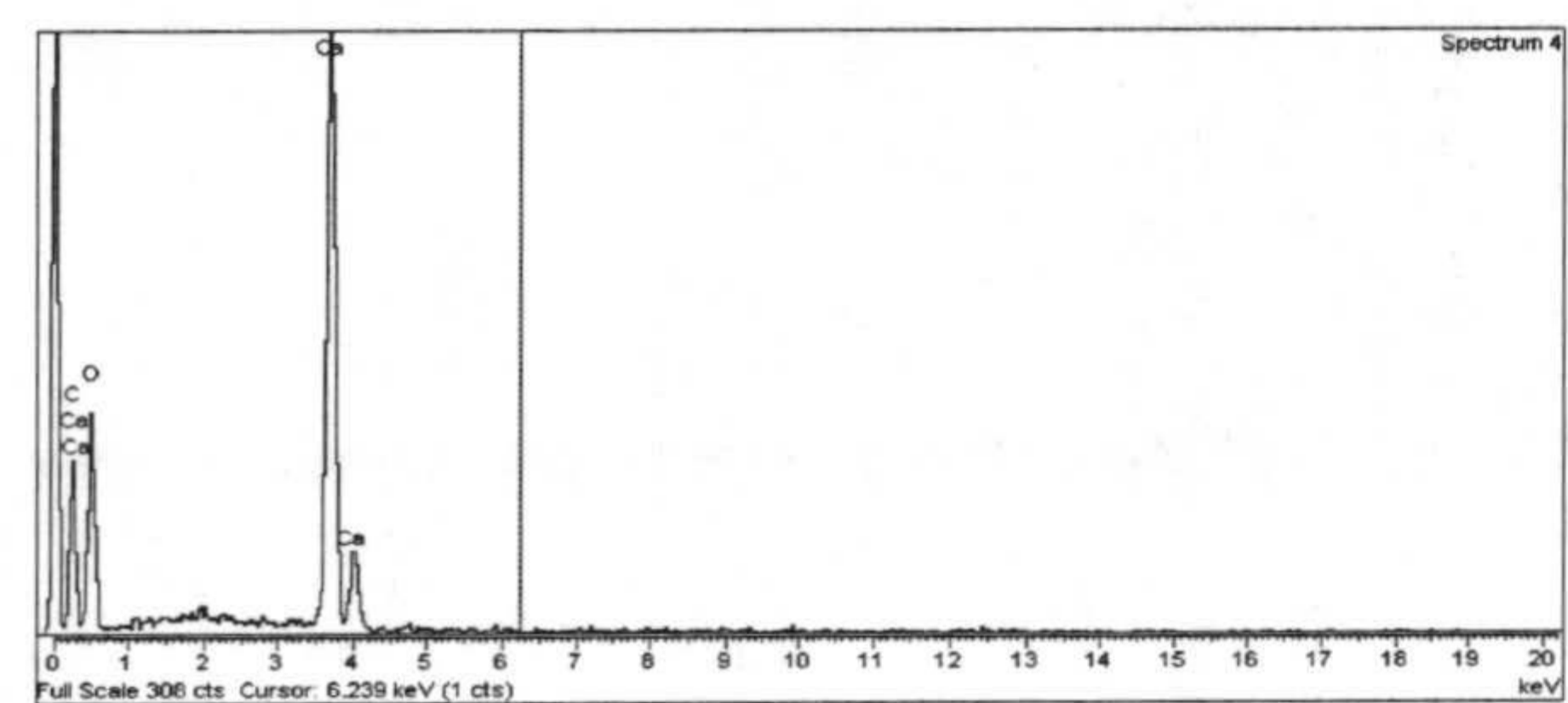


Figura 70.- Microanálisis de los cristales tipo 4 producidos por *M. xanthus* en presencia de cromo.

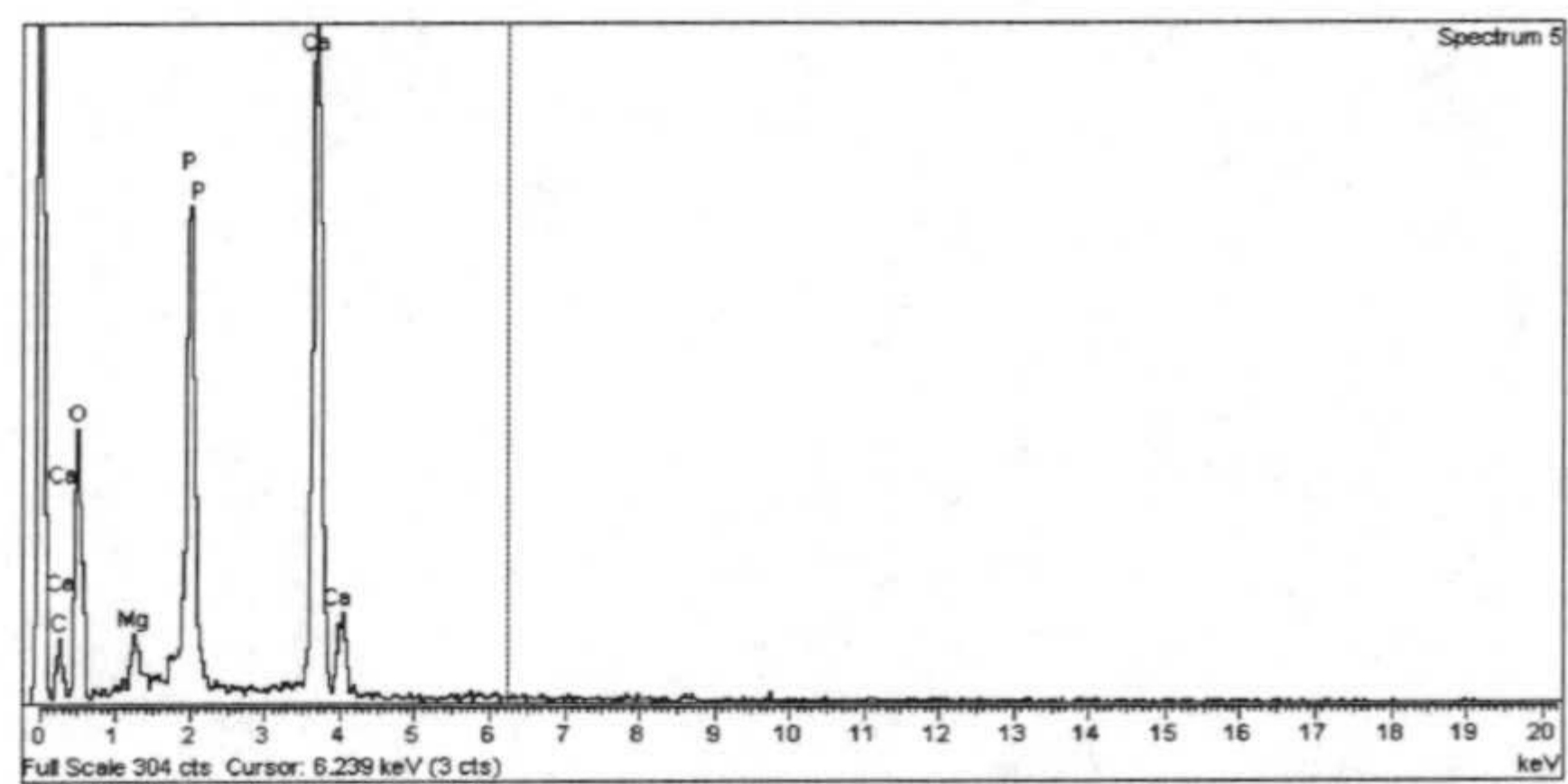


Figura 71.- Microanálisis de los cristales tipo 5 producidos por *M. xanthus* en presencia de cromo.

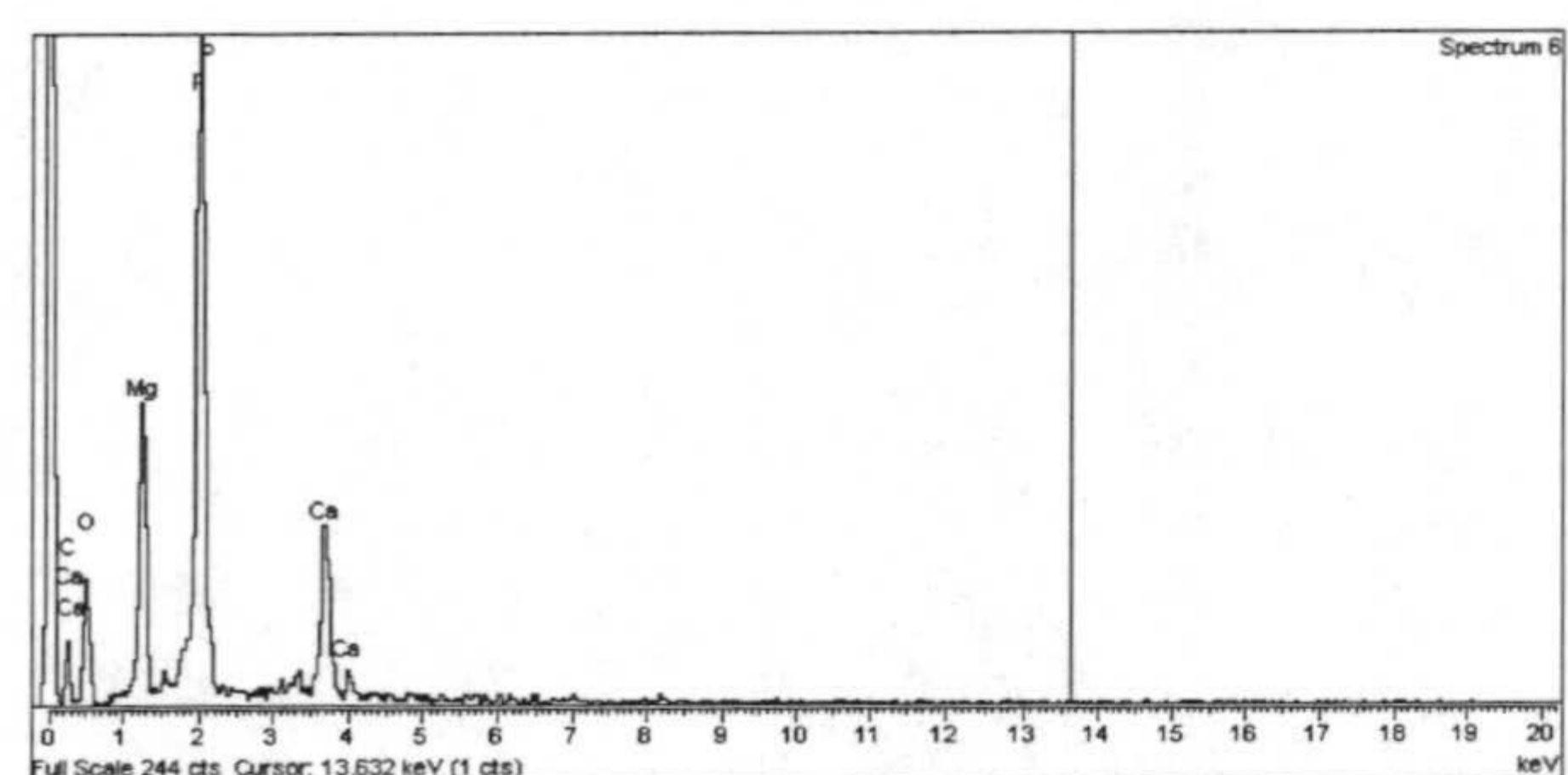


Figura 72.- Microanálisis de los cristales tipo 6 producidos por *M. xanthus* en presencia de cromo.

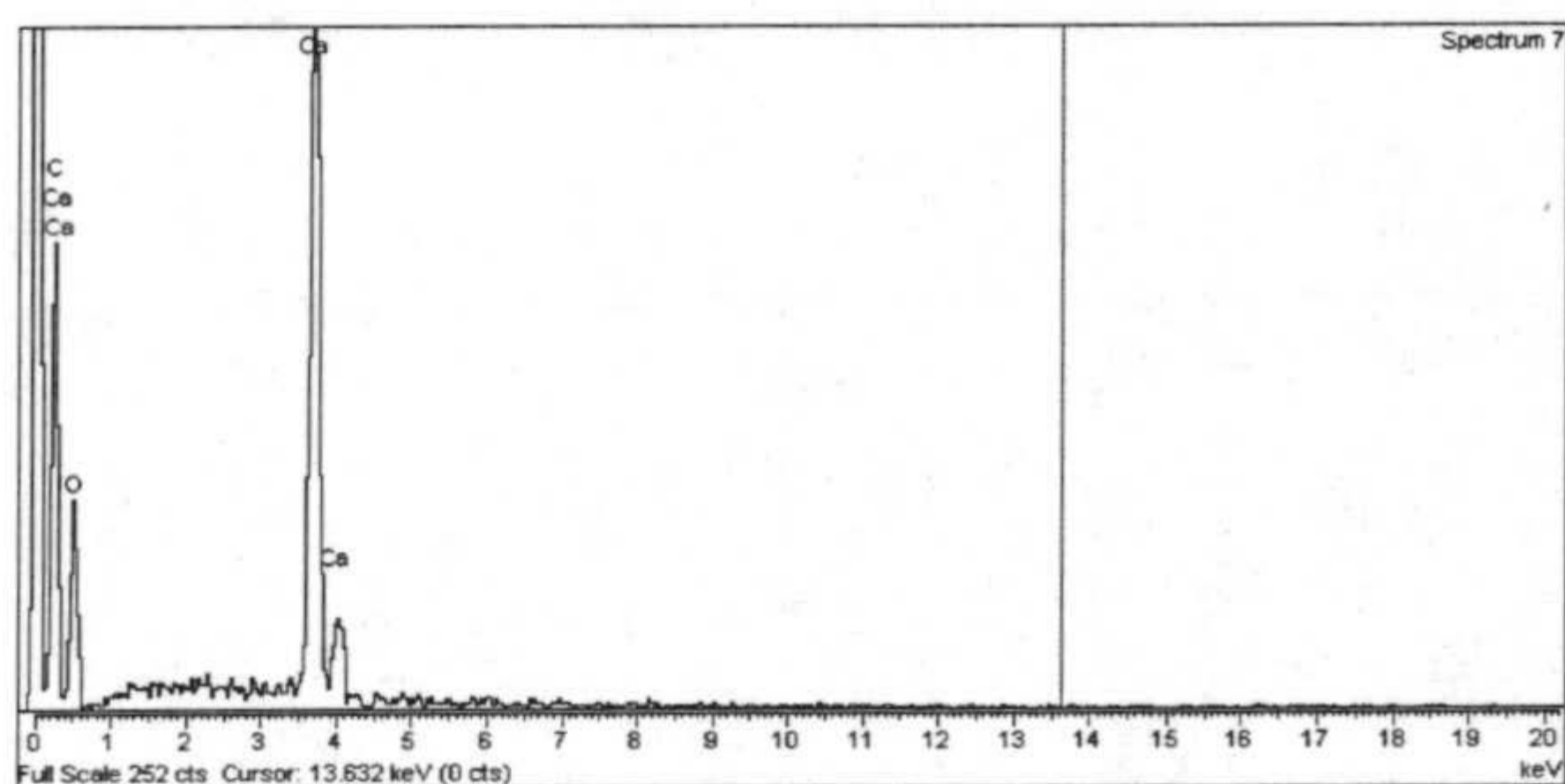


Figura 73.- Microanálisis de los cristales tipo 7 producidos por *M. xanthus* en presencia de cromo.

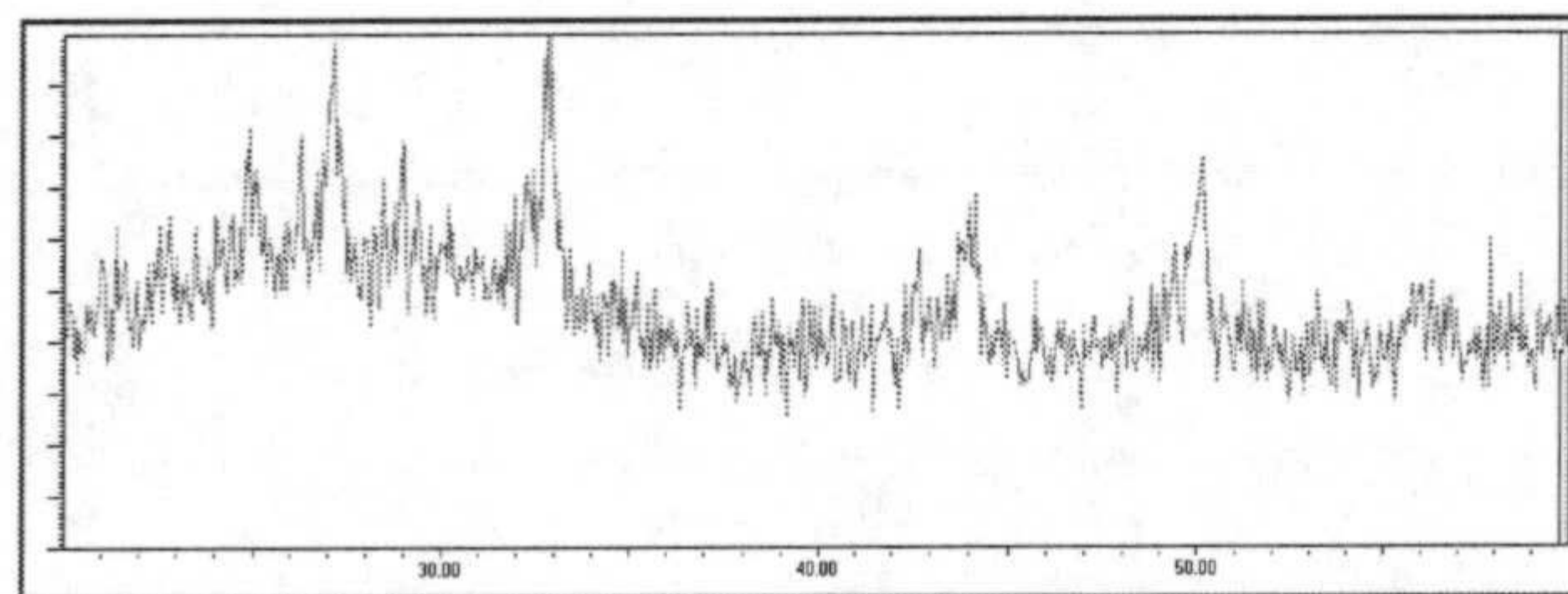


Figura 74.- Diagrama de difracción de rayos X de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de cromo



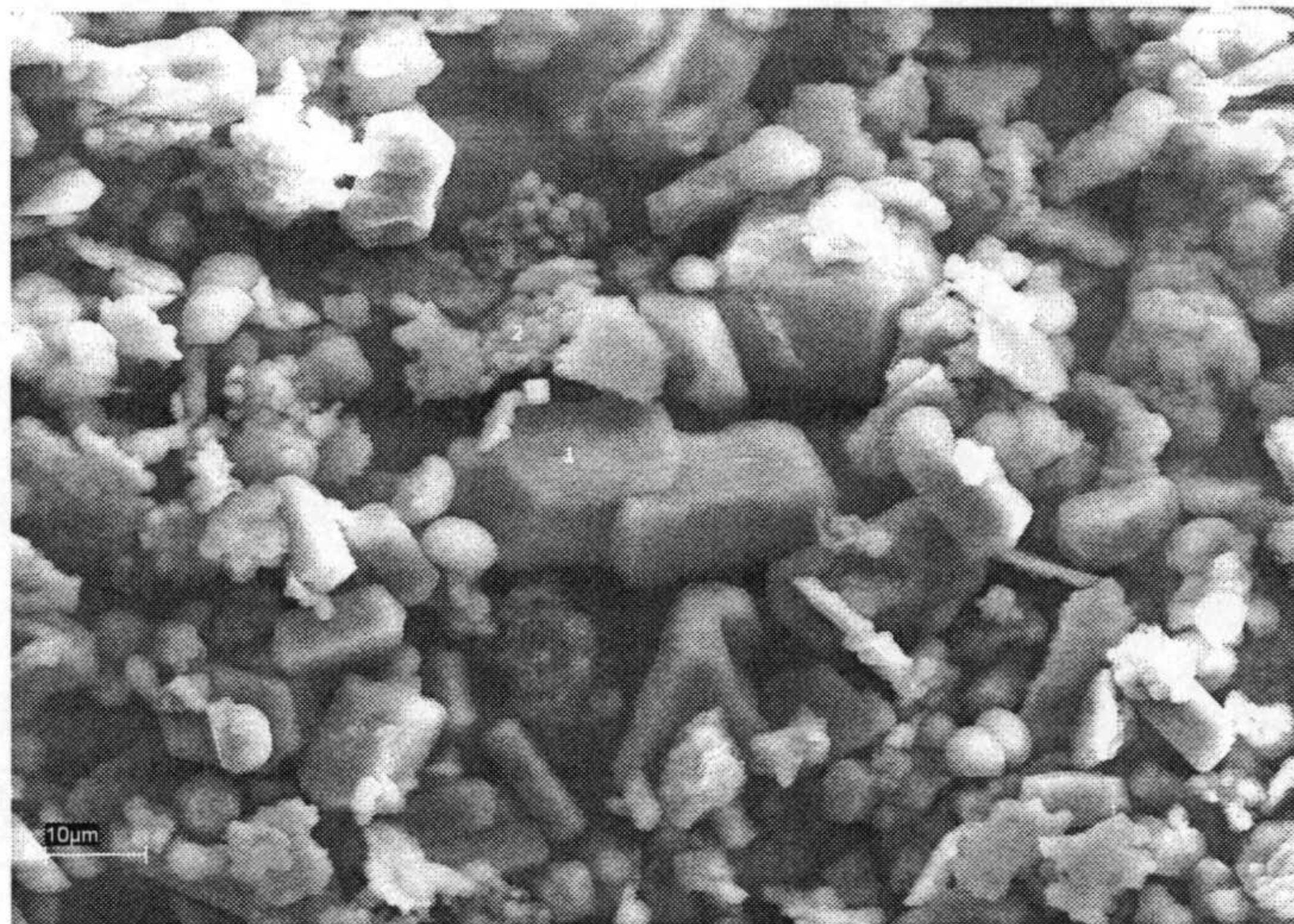


Figura 75.- Cristales producidos por *M. xanthus* en el medio M-3 en presencia de 2,5mM de manganeso.

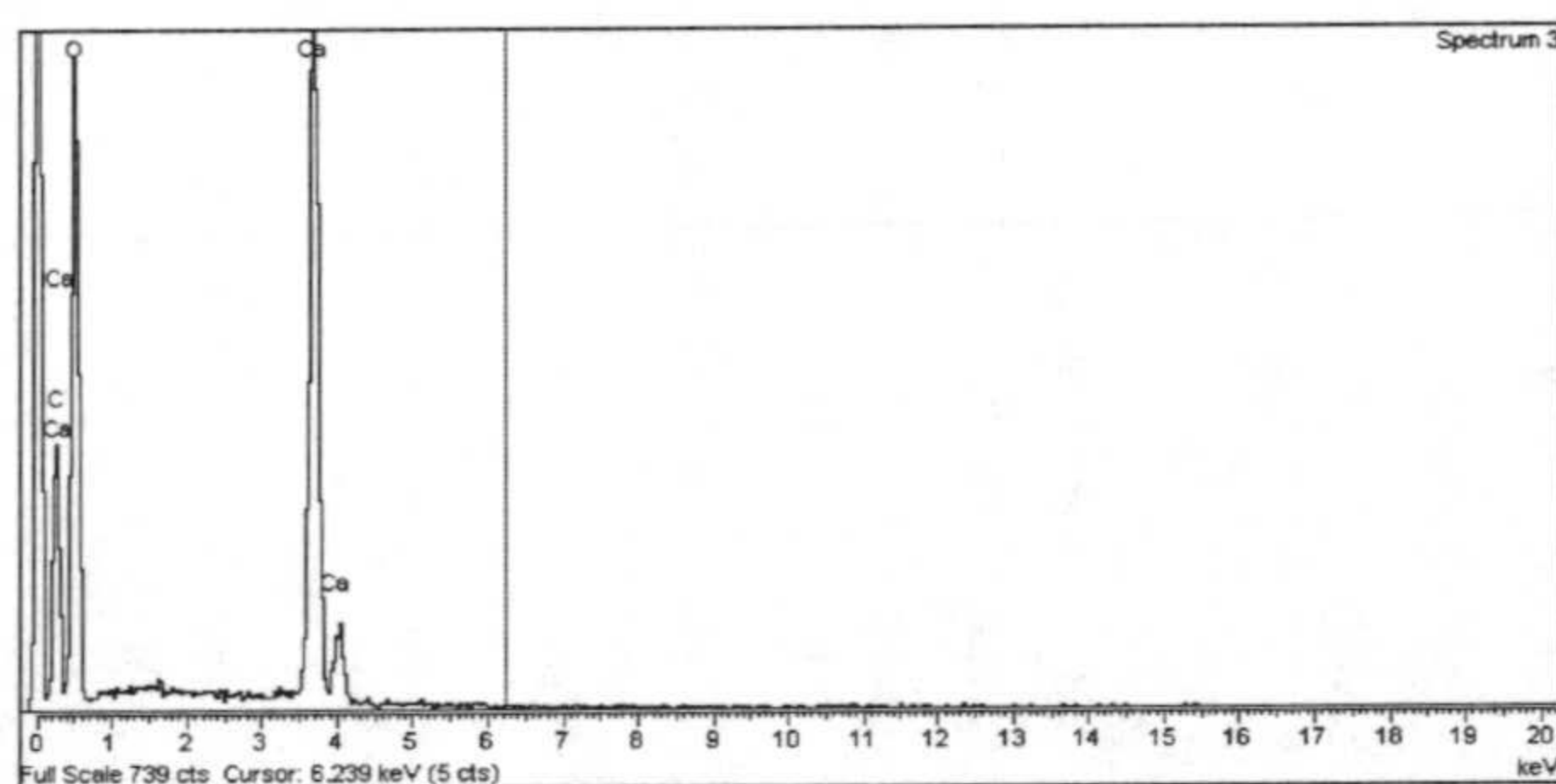


Figura 76.- Microanálisis de los cristales tipo 1 producidos por *M. xanthus* en presencia de manganeso.

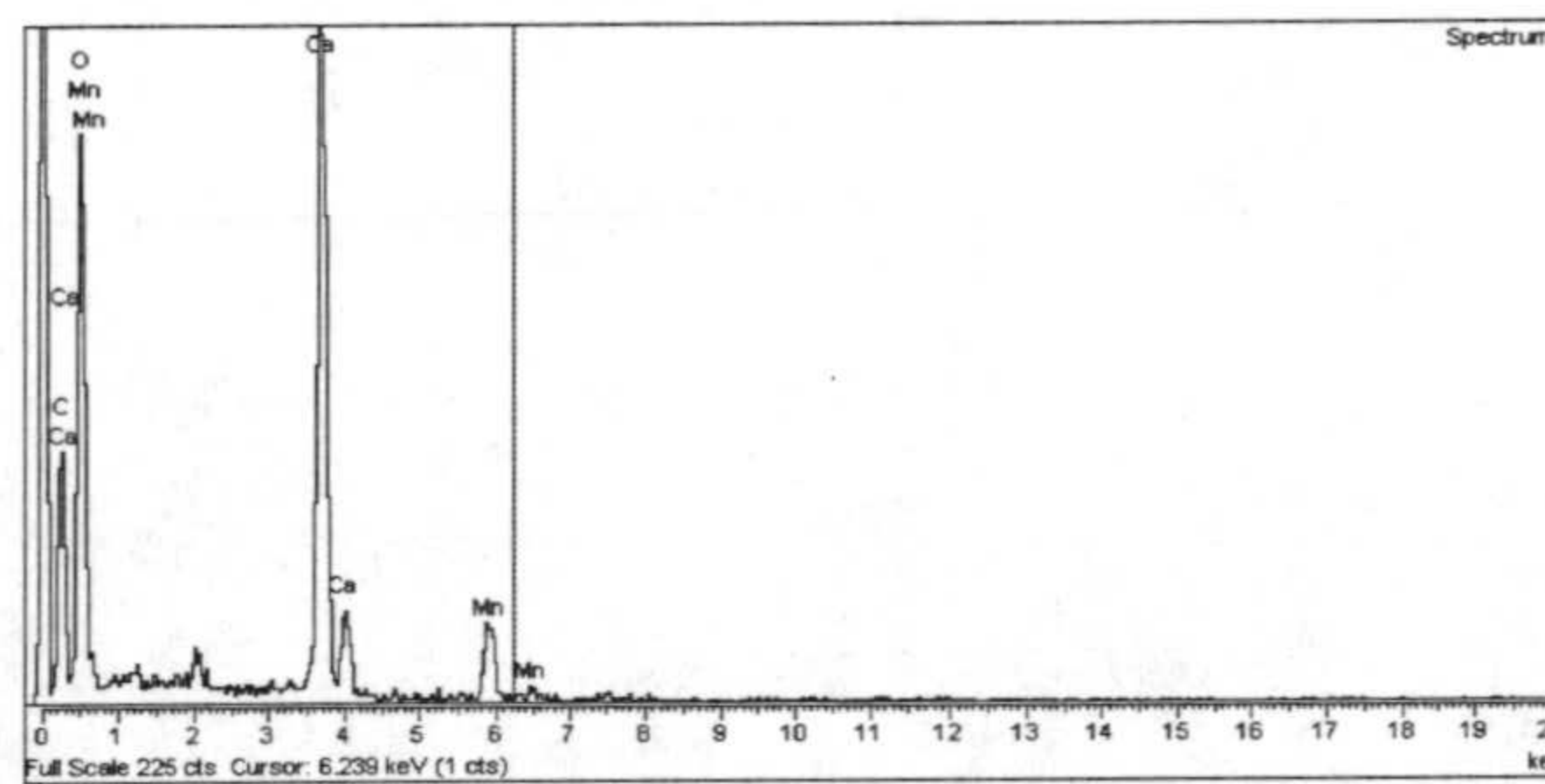


Figura 77.- Microanálisis de los cristales tipo 2 producidos por *M. xanthus* en presencia de manganeso

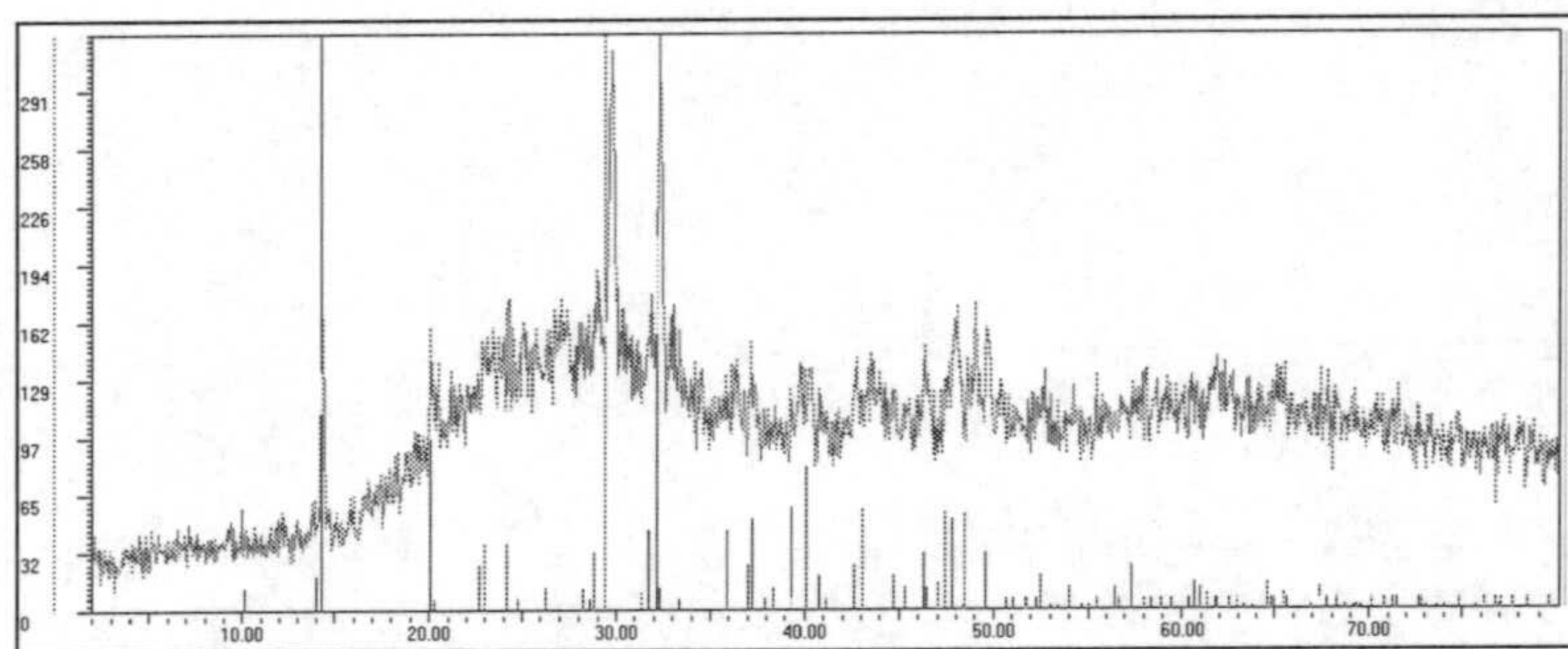


Figura 78.- Diagrama de difracción de rayos X de los cristales producidos por *M. xanthus* en presencia de manganeso.



Los minerales precipitados en presencia de manganeso (Figura 75) demuestran dos tipos de cristales marcados en la figura por los números 1 y 2, y que corresponden respectivamente a las formas cúbicas de superficie homogénea y las bolitas de superficie rugosa. El microanálisis del cristal 1 (Figura 76) muestra la presencia sólo de Ca mientras que el de las estructuras 2 (Figura 77) muestra además del Ca la presencia de un pico de Mn lo que demuestra la clara diferencia entre los dos cristales. Todo esto se ha podido confirmar por difracción de rayos X (Figura 78) donde el diagrama demuestra la clara presencia de dos tipos de minerales, calcita y weddelita en la misma proporción.

A lo largo del proceso de precipitación de carbonatos por *M. xanthus*, en presencia de los metales pesados ensayados, se ha ido midiendo la variación del pH en función del tiempo. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 9.

**Tabla 9.- Medidas del pH de los cultivos de *M. xanthus* en el medio M-3 en función del tiempo**

| Muestra / Días | Testigo | Co   | Cr   | Cu   | Mn   |
|----------------|---------|------|------|------|------|
| 1              | 7,95    | 7,87 | 8,00 | 7,88 | 7,85 |
| 3              | 8,28    | 8,09 | 8,22 | 8,30 | 7,93 |
| 5              | 8,16    | 8,10 | 8,10 | 8,33 | 7,86 |
| 7              | 8,35    | 8,2  | 8,3  | 8,5  | 7,85 |
| 10             | 8,45    | 8,25 | 8,4  | 8,5  | 7,8  |
| 15             | 8,2     | 8,3  | 8,5  | 8,6  | 7,8  |
| 20             | 8,37    | 8,28 | 8,54 | 8,4  | 7,72 |
| 30             | 8,29    | 8,01 | 8,32 | 8,34 | 7,53 |



### CAPITULO III.- BIOPELÍCULA

Se ha investigado la formación de biopelícula de *M. xanthus*. El establecimiento de la biopelícula se ha ensayado con cultivos proliferantes de *M. xanthus* sobre dos tipos de soporte: una arcilla inerte en forma de bolitas porosas registrada bajo el nombre de FILTROLITE (1) y otro soporte, (2), arcilloso poroso concretamente residuos de ladrillo procedente del rechazo por roturas por deficiente manipulación, pero con cocción correcta. En todos los experimentos se realizaron controles utilizando los mismos medios de cultivo sin inocular y en las mismas condiciones. En ningún caso se detectó la producción y establecimiento de la biopelícula en los controles.

La observación de las muestras se ha hecho con MEB, que además han sido analizadas por EDX.

#### 1.- FORMACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LA BIOPELÍCULA DE *M. xanthus* 422

El establecimiento de la biopelícula se ha llevado a cabo inoculando matraces del medio M-9, a los que se había adicionado la misma cantidad (40g) de material soporte previamente esterilizado, con cultivos de células proliferante de *M. xanthus* e incubando durante varios días en agitación moderada. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 79 a 89.

En la Figura 79 podemos ver la fotografía del soporte 1, sin ningún tratamiento y su correspondiente microanálisis mostrando la presencia de Ca, Si y un pequeño pico de Fe. La Figura 80 corresponde al soporte 2.



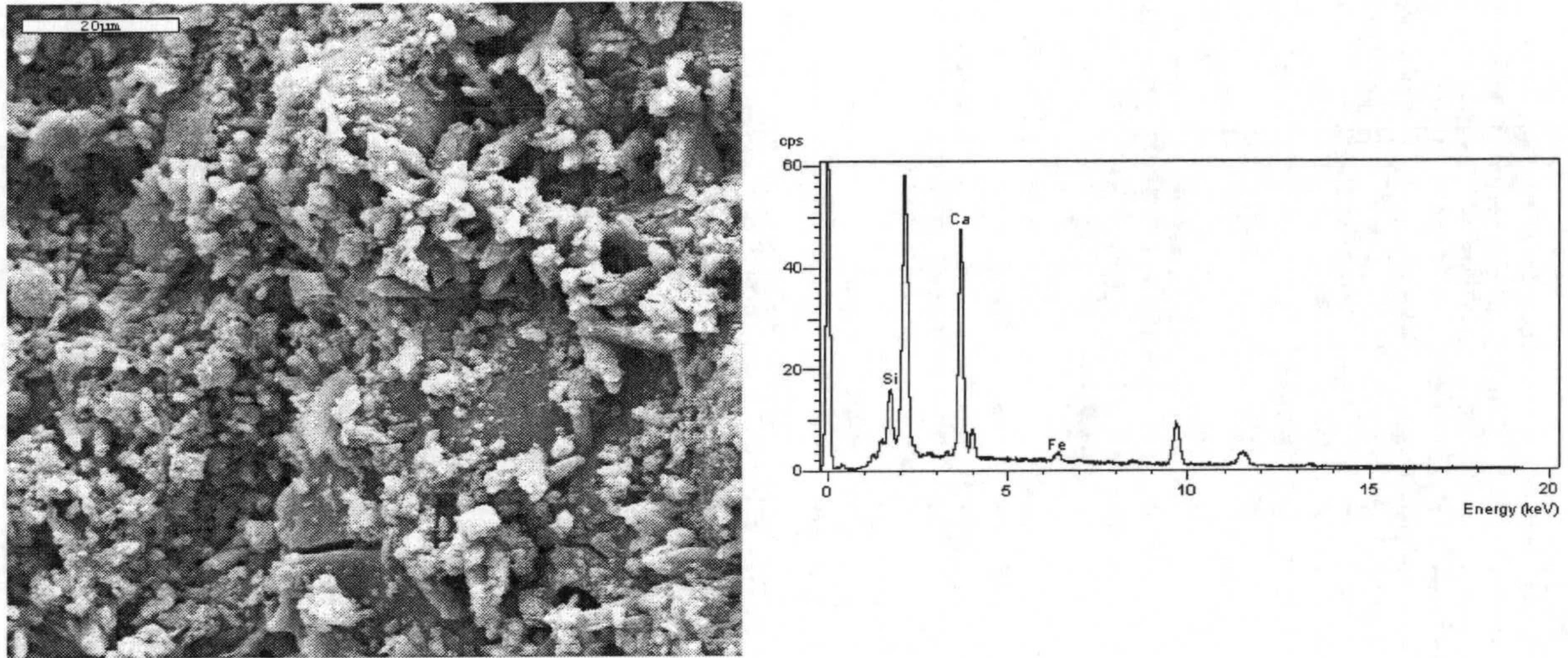


Figura 79.- Fotografía y microanálisis del soporte 1 sin ningún tratamiento utilizado para la formación de biopelícula de *M. xanthus* observado por MEB

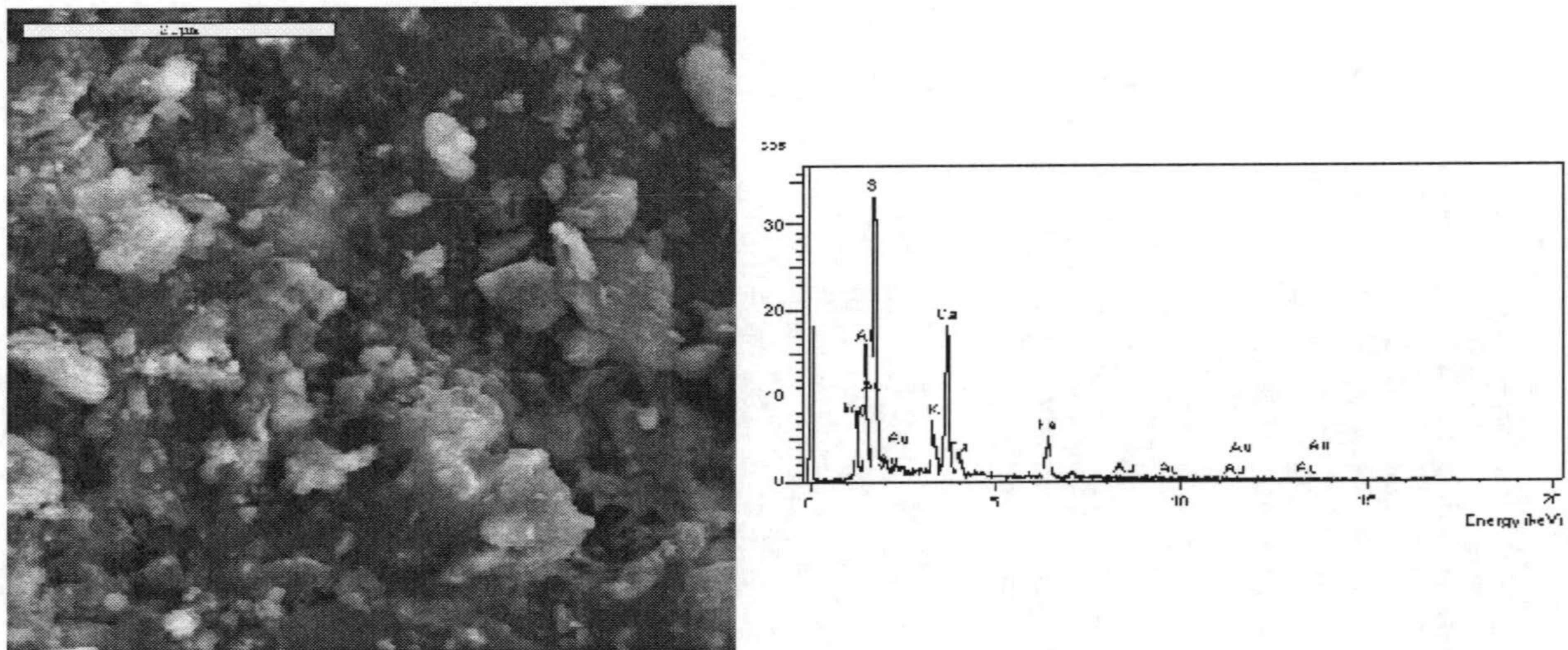
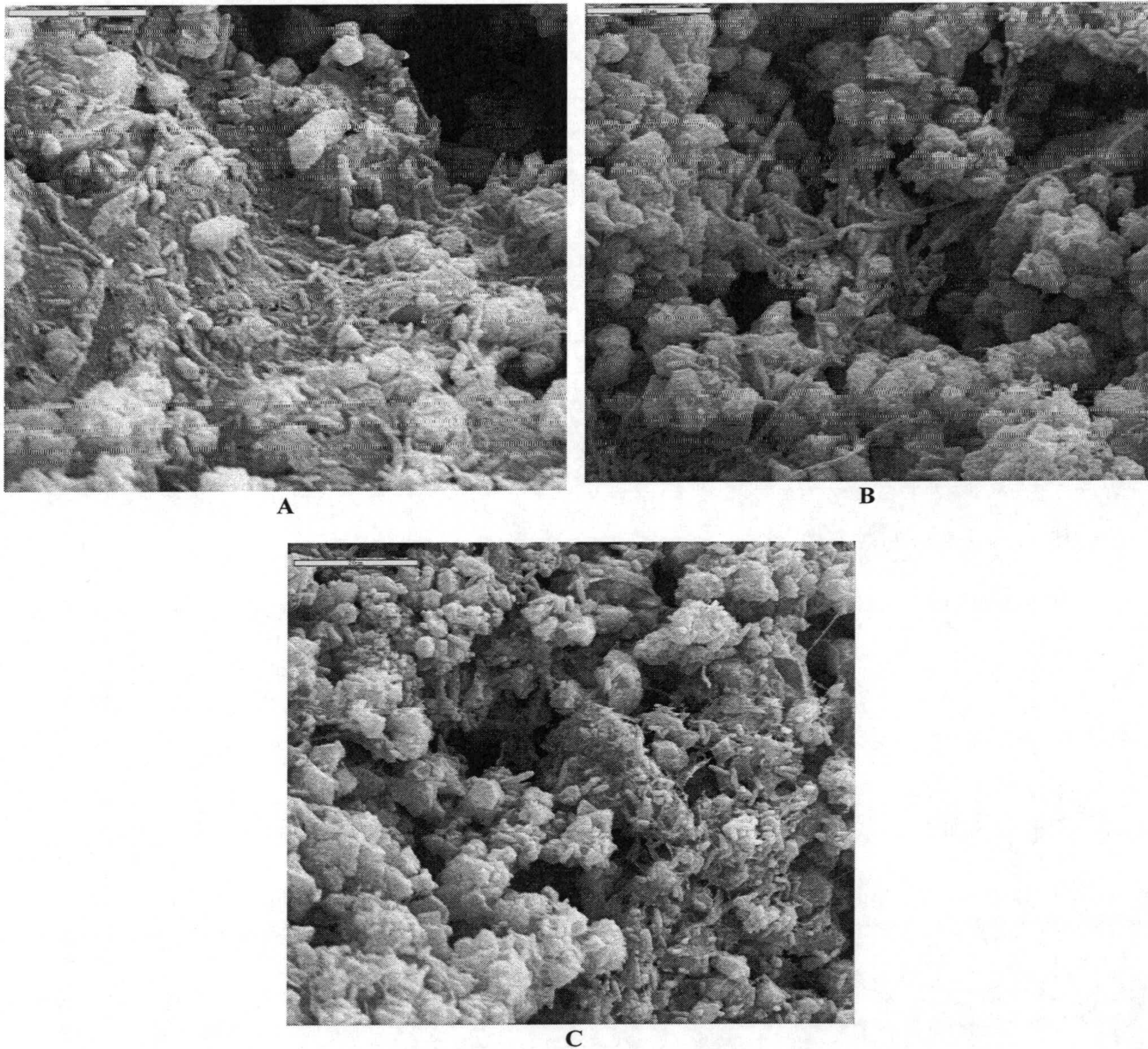


Figura 80.- Fotografía y microanálisis del soporte 2 sin ningún tratamiento utilizado para la formación de biopelícula de *M. xanthus* observado por MEB (barra, 20µm).

La formación de biopelícula se puede percibir a simple vista y aparece en forma de una fina capa mucosa sobre la superficie del soporte. Por MEB, podemos observar la biopelícula de *M. xanthus* completamente establecida sobre el soporte 1 (Figura 81) y también sobre el soporte 2 (Figura 85). Se ve claramente la forma típica de las células de *M. xanthus* centradas en grupo y rodeadas por una capa fina mucosa. Los microanálisis de la biopelícula formada sobre los dos soportes (Figuras 82 y 86), muestran los mismos componentes del soporte sin biopelícula, con aparición de un pequeño pico de K. La formación de la biopelícula viene



acompañada por la formación, además, de dos tipos de cristales, unos con formas triangulares y otros cristales de aspecto redondo que muestran la presencia de agujeros que posiblemente corresponden a huellas de bacterias que se mineralizaron (Figuras 83 y 87). El microanálisis de estos cristales indica que contienen calcio (Figuras 84 y 88)



**Figura 81.-** Biopelícula establecida por *M. xanthus* sobre el soporte 1 observada por MEB. (A x 200000; B x 175000; C x 225000).



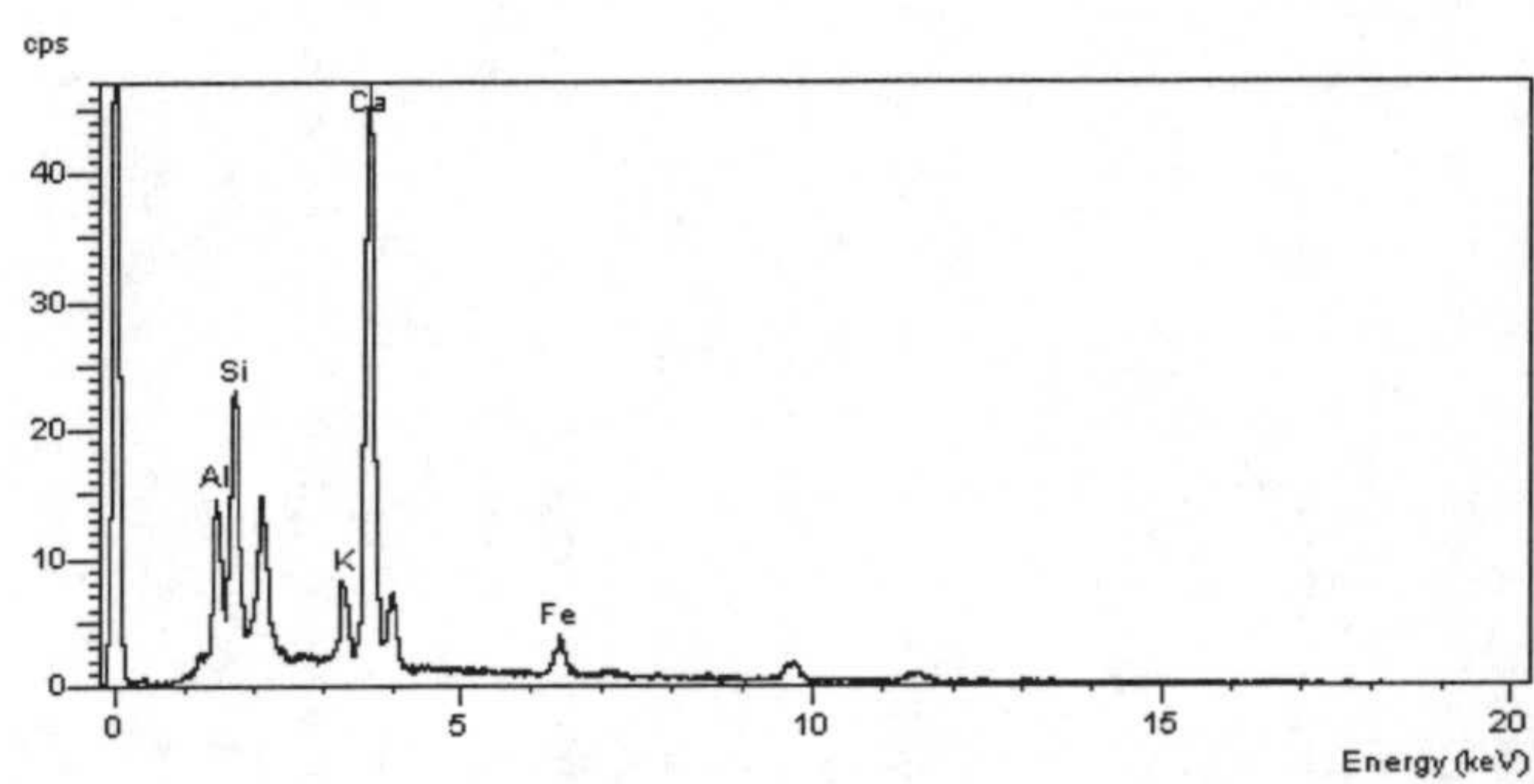


Figura 82.- Microanálisis (EDX) del soporte 1 con la biopelícula establecida por *M. xanthus*

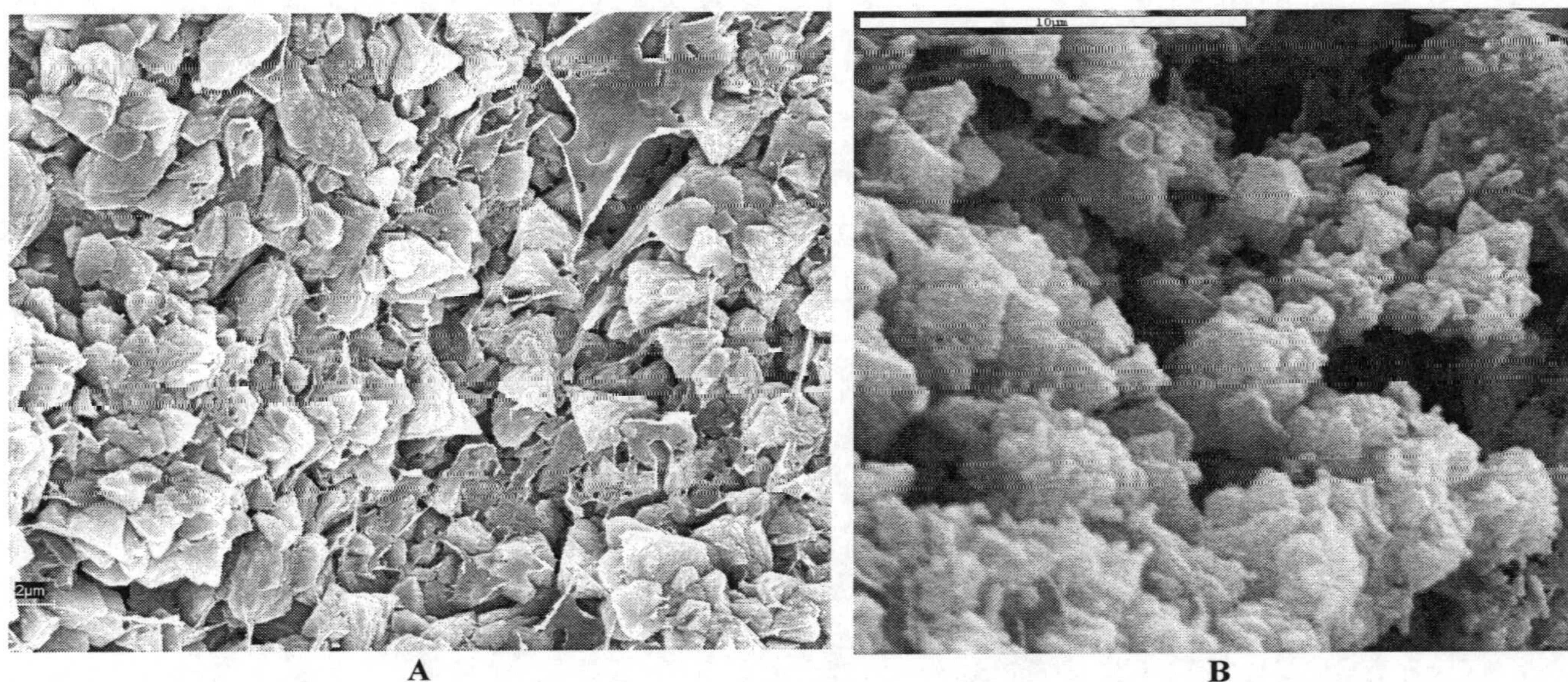


Figura 83.- Cristales formados por *M. xanthus* sobre el soporte 1 observados con MEB. (A x 500000)

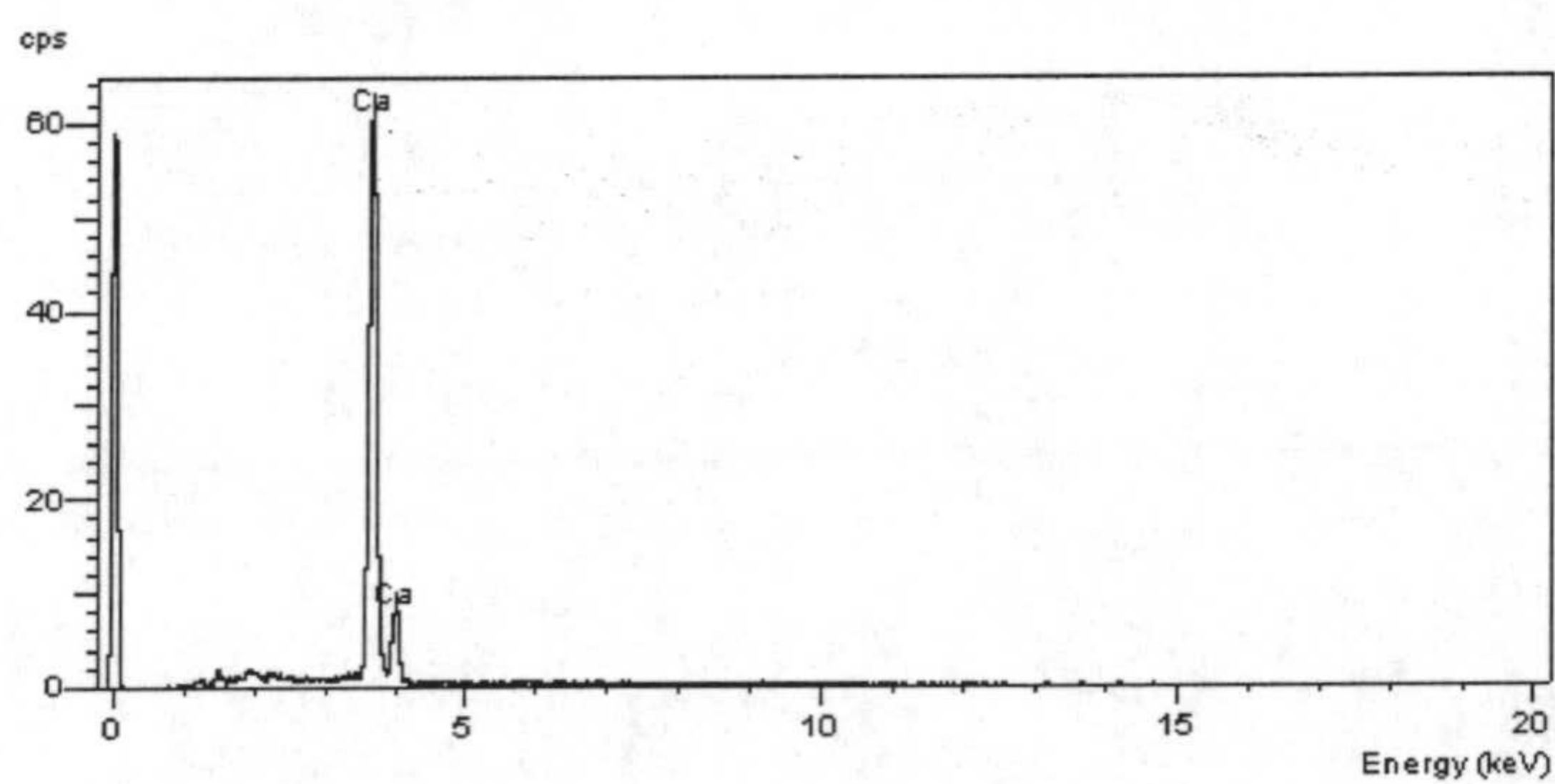


Figura 84.- Microanálisis por EDX de los cristales formados por *M. xanthus* sobre el soporte 1



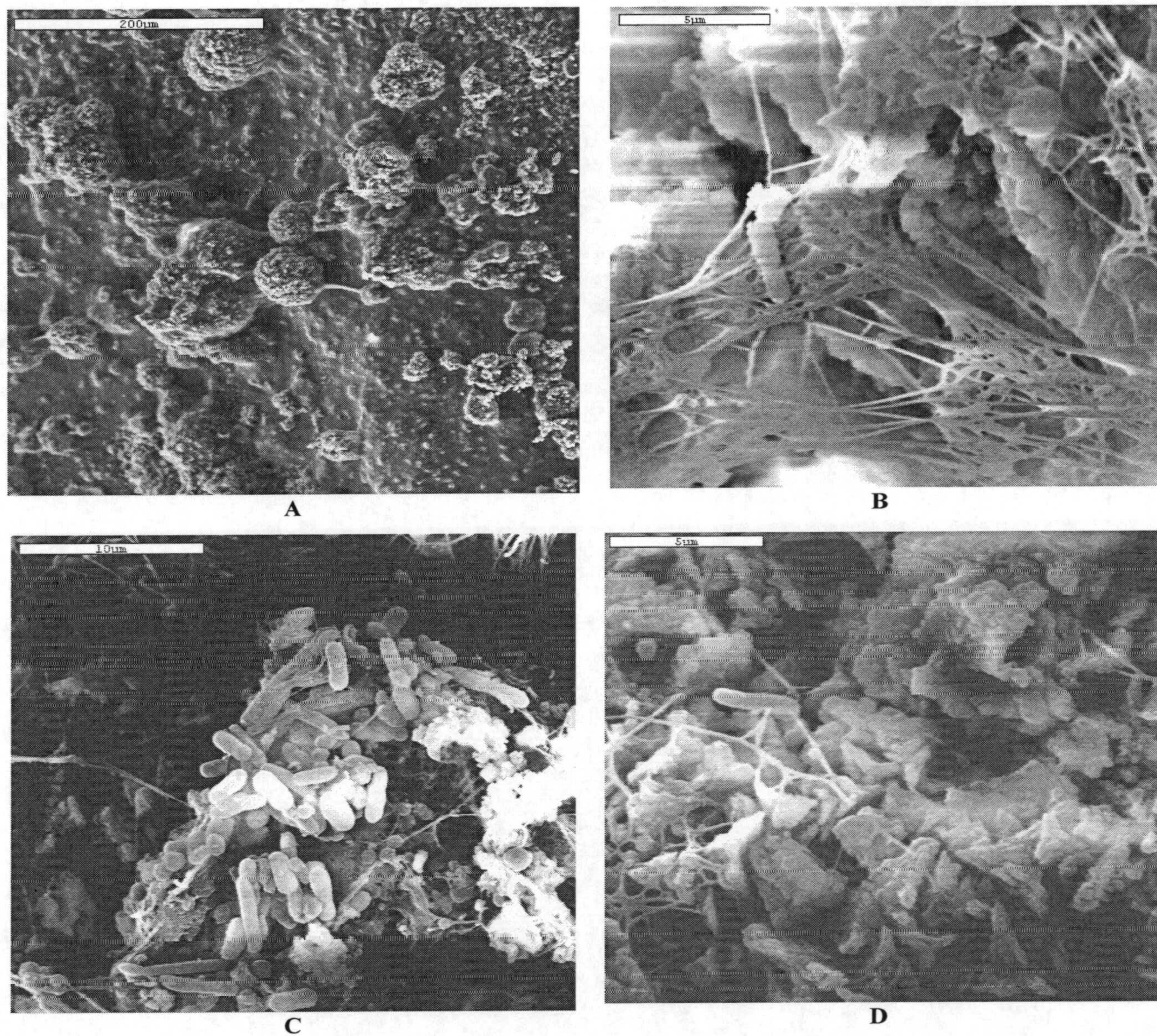


Figura 85.- Biopelícula establecida por *M. xanthus* sobre el soporte 2 observada por MEB. (A x 20000; B x 800000; C x 300000; D x 700000).

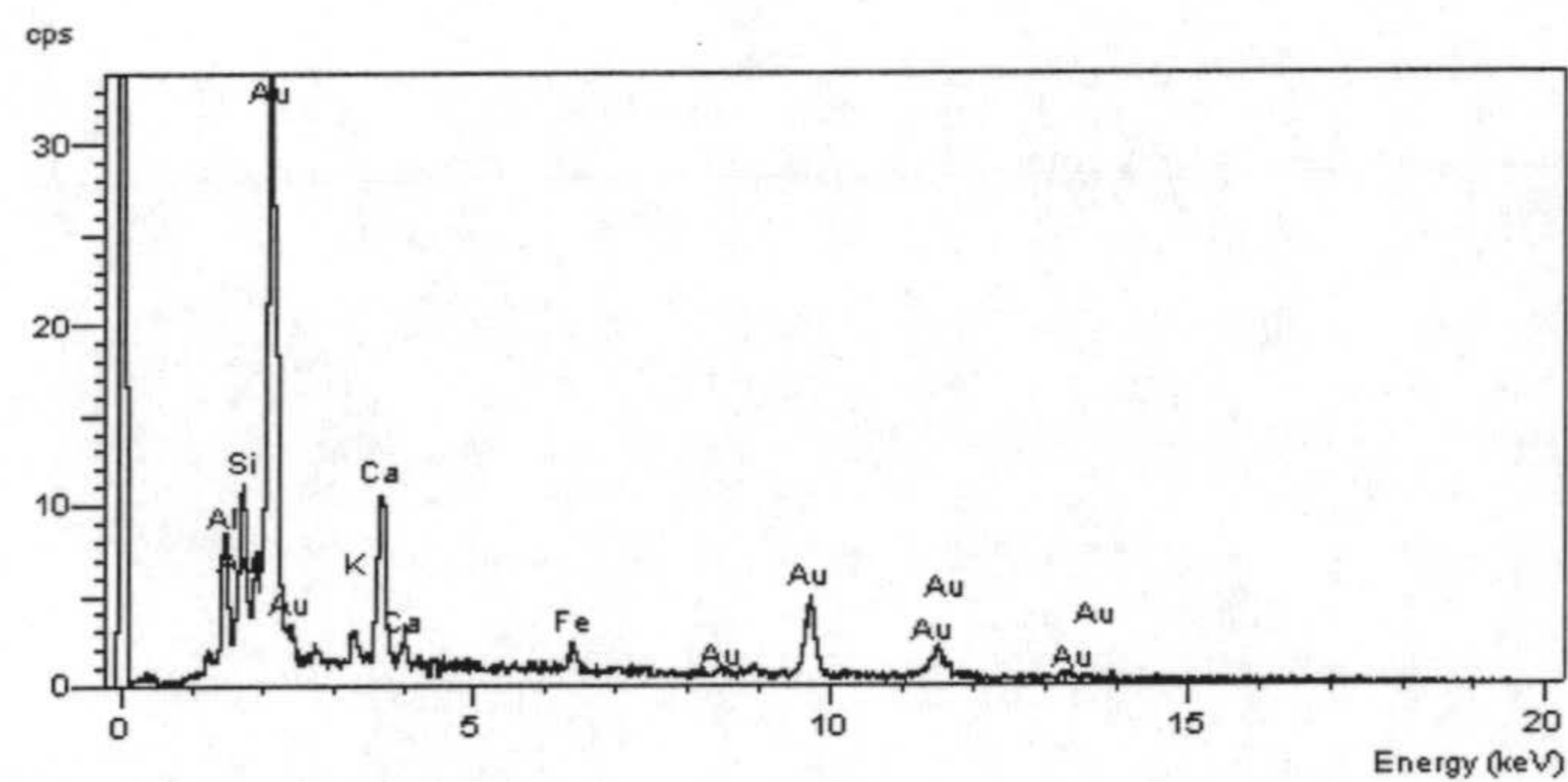


Figura 86.- Microanálisis (EDX) del soporte 2 con la biopelícula establecida por *M. xanthus*



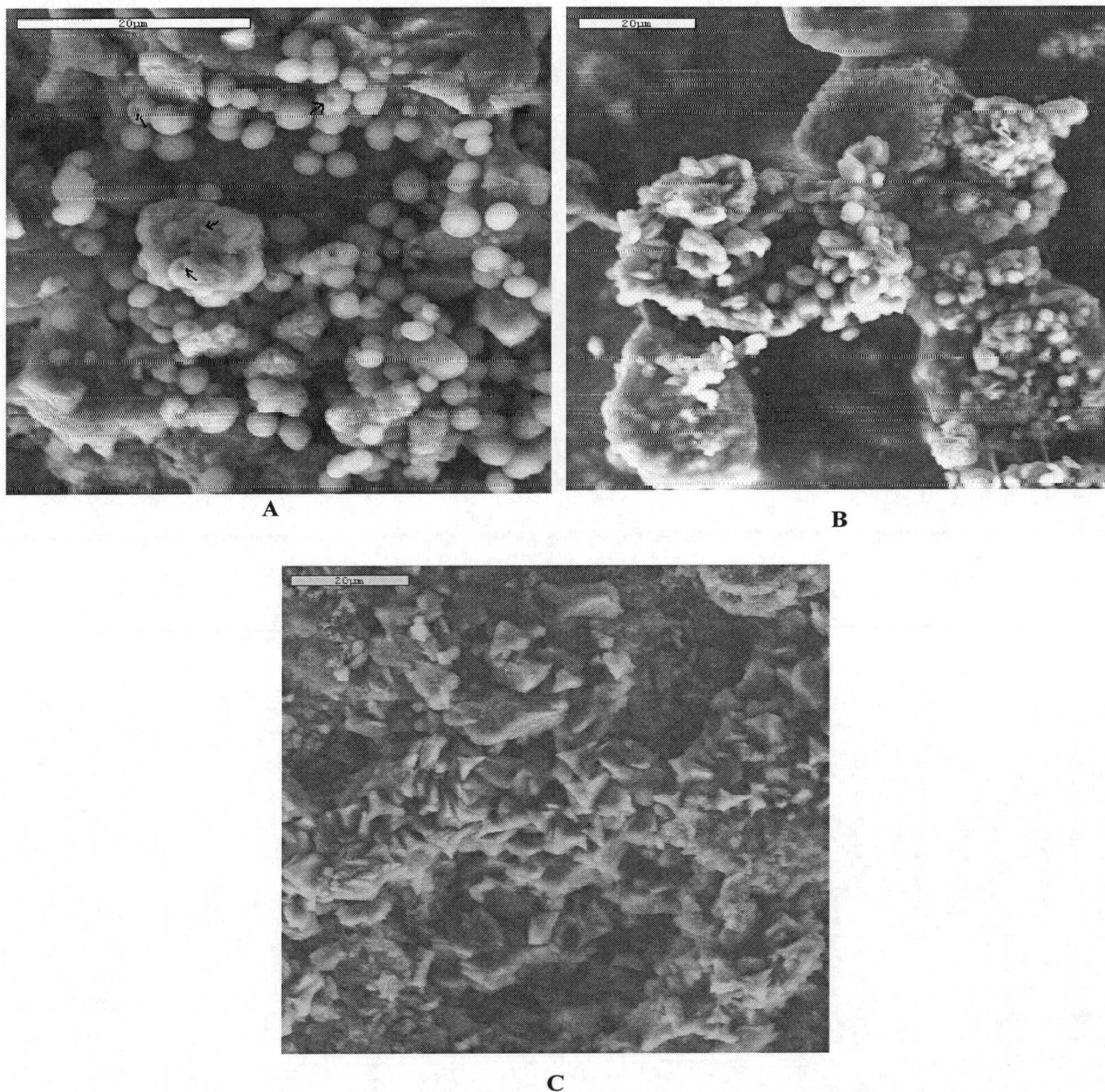
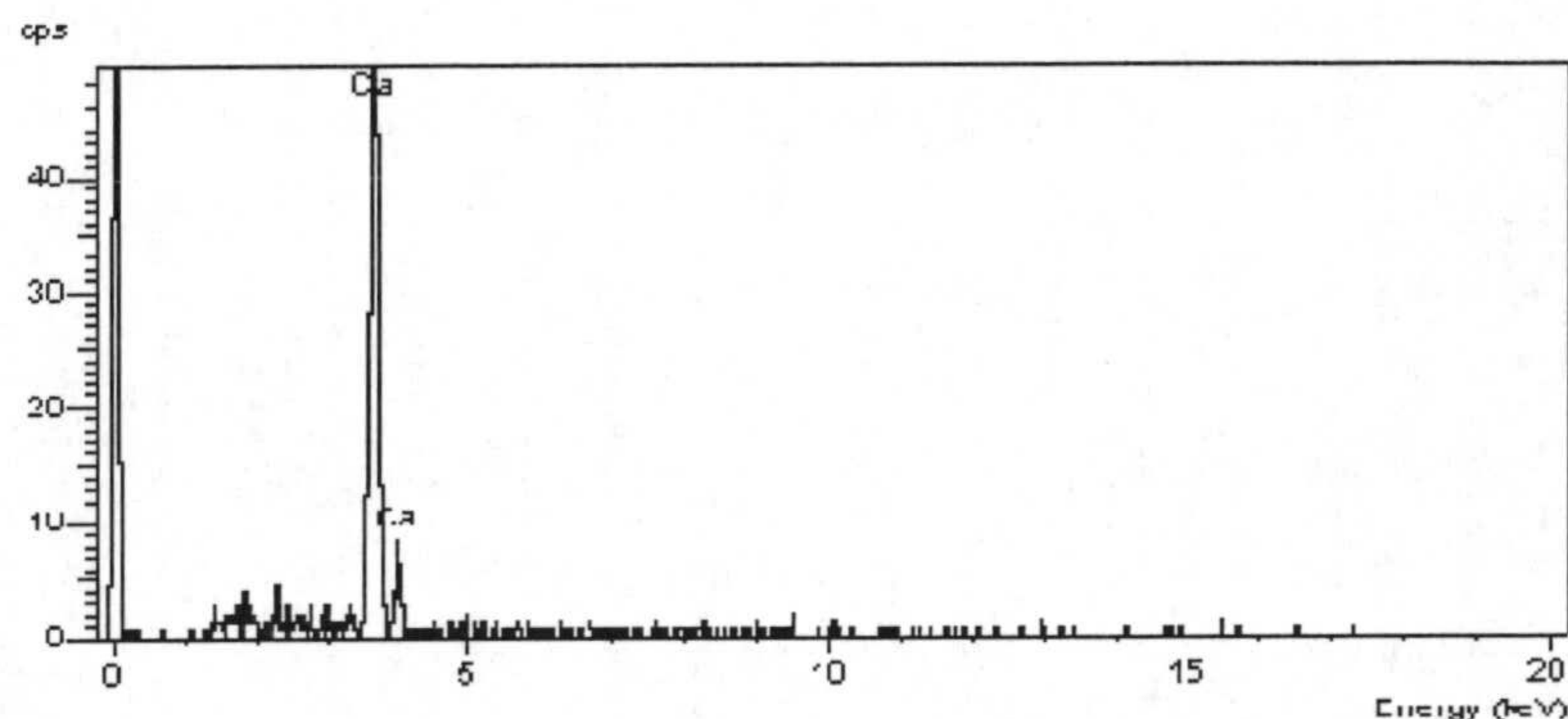


Figura 87.- Cristales formados por *M. xanthus* sobre el soporte 2 observados con MEB. A, B y C.- Diferentes morfologías obtenidas. (Barra, 20 µm).





D

Figura 88.- Microanálisis (EDX) de los cristales formados por *M. xanthus* sobre el soporte 2

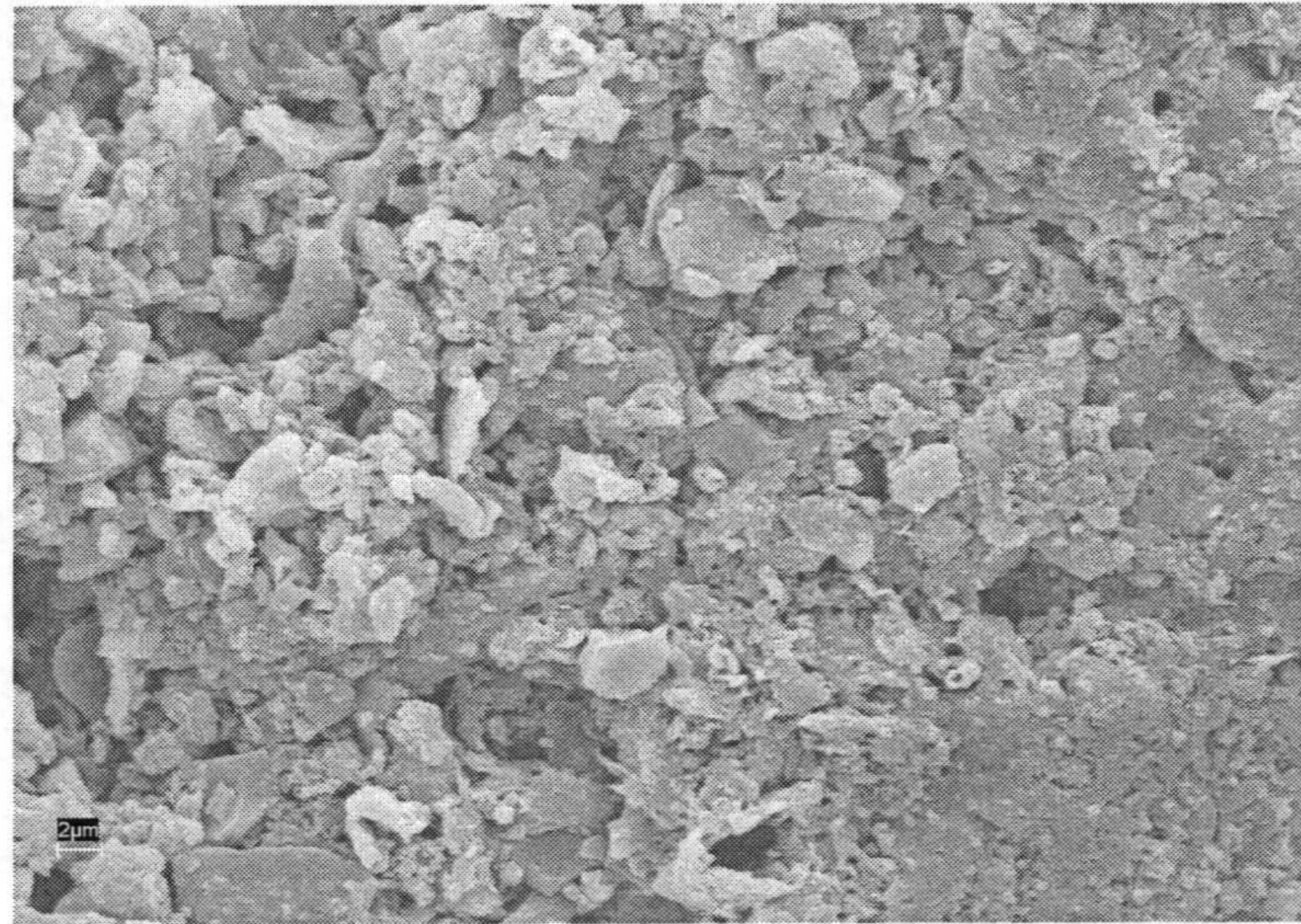
## 2.- INFLUENCIA DE LOS METALES PESADOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *M. xanthus*

Para llevar a cabo este experimento se ha procedido de la misma manera que para la formación de biopelícula sola. Para ello, se han inoculado matraces con 100ml del mismo medio de cultivo M-9, adicionado de la misma cantidad del relleno tipo 1, con células proliferantes de *M. xanthus*, que se incubaron durante diez días en agitación moderada. Transcurrido el tiempo necesario para la formación de la biopelícula se decantó el medio de cultivo y se reemplazó por 100ml de solución del metal a la concentración correspondiente, incubándose en agitación durante 2 horas a 28° C. Los metales utilizados fueron: cobalto a 0,4mM; cromo a 0,4mM; manganeso a 0,4mM y cobre a 1mM a pH entre 4 y 6 para evitar su precipitación. Estas concentraciones han sido elegidas de manera que sean toleradas por la bacteria sin provocar su muerte, de acuerdo con los resultados del capítulo I. Para cada metal se ha hecho un control, procediendo de la misma manera, pero usando material soporte sin inocular. Los resultados obtenidos están presentados en las Figuras 89 a 102.

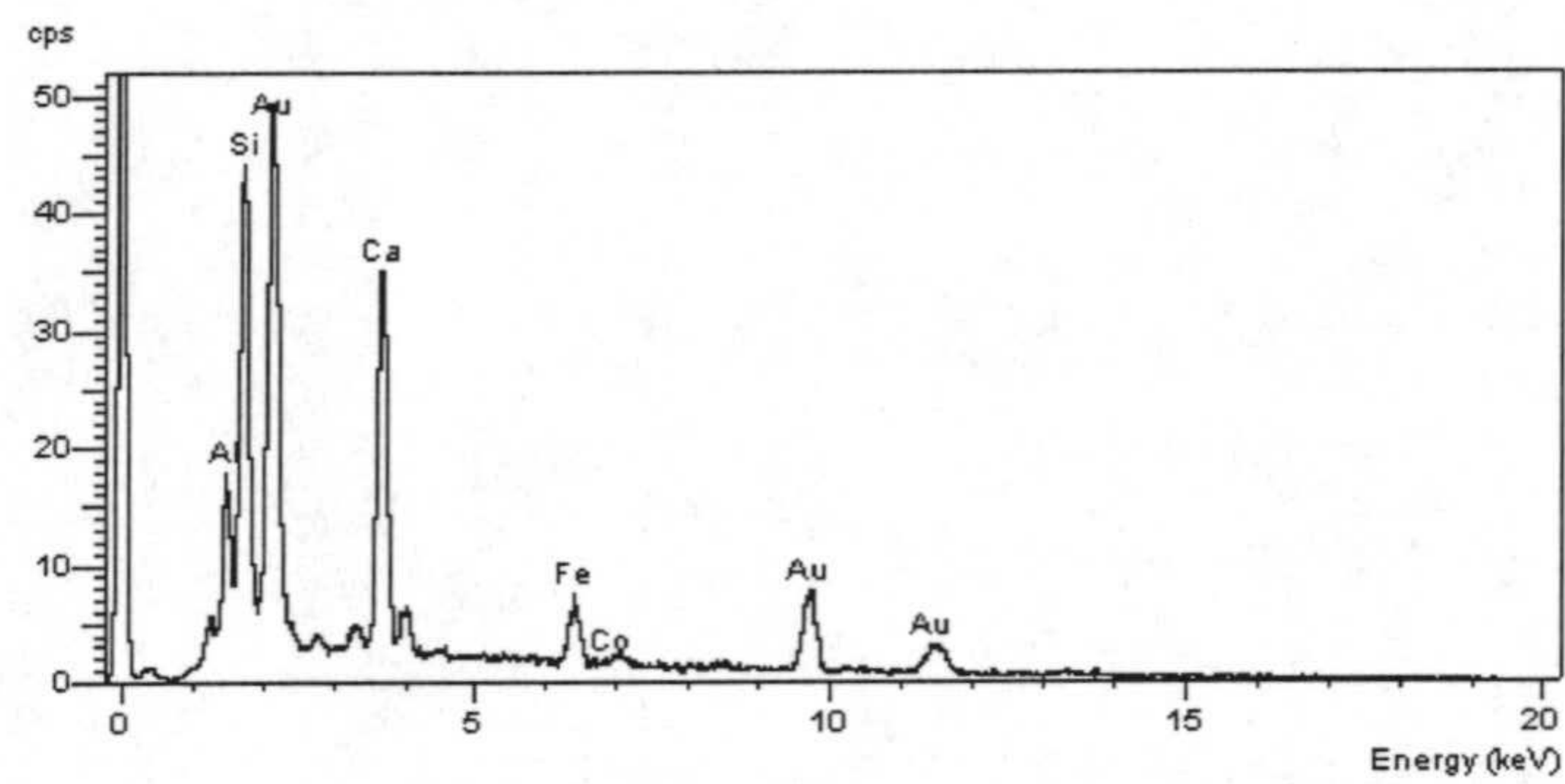
La Figura 89 muestra fotografía del soporte control en presencia del cobalto y su correspondiente microanálisis. El contacto con el cobalto ha permitido el establecimiento de una biopelícula densa, las células aparecen como ordenadas una junto a la otra y completamente envueltas con el velo de manera que fuera de esta cubierta no se encuentra ningún grupo de células lo que se ve claramente en la Figura 90. Su correspondientes microanálisis (Figura 91), muestran todos los



componentes normalmente presentes en el soporte, con la presencia de un pequeño pico de cobalto.



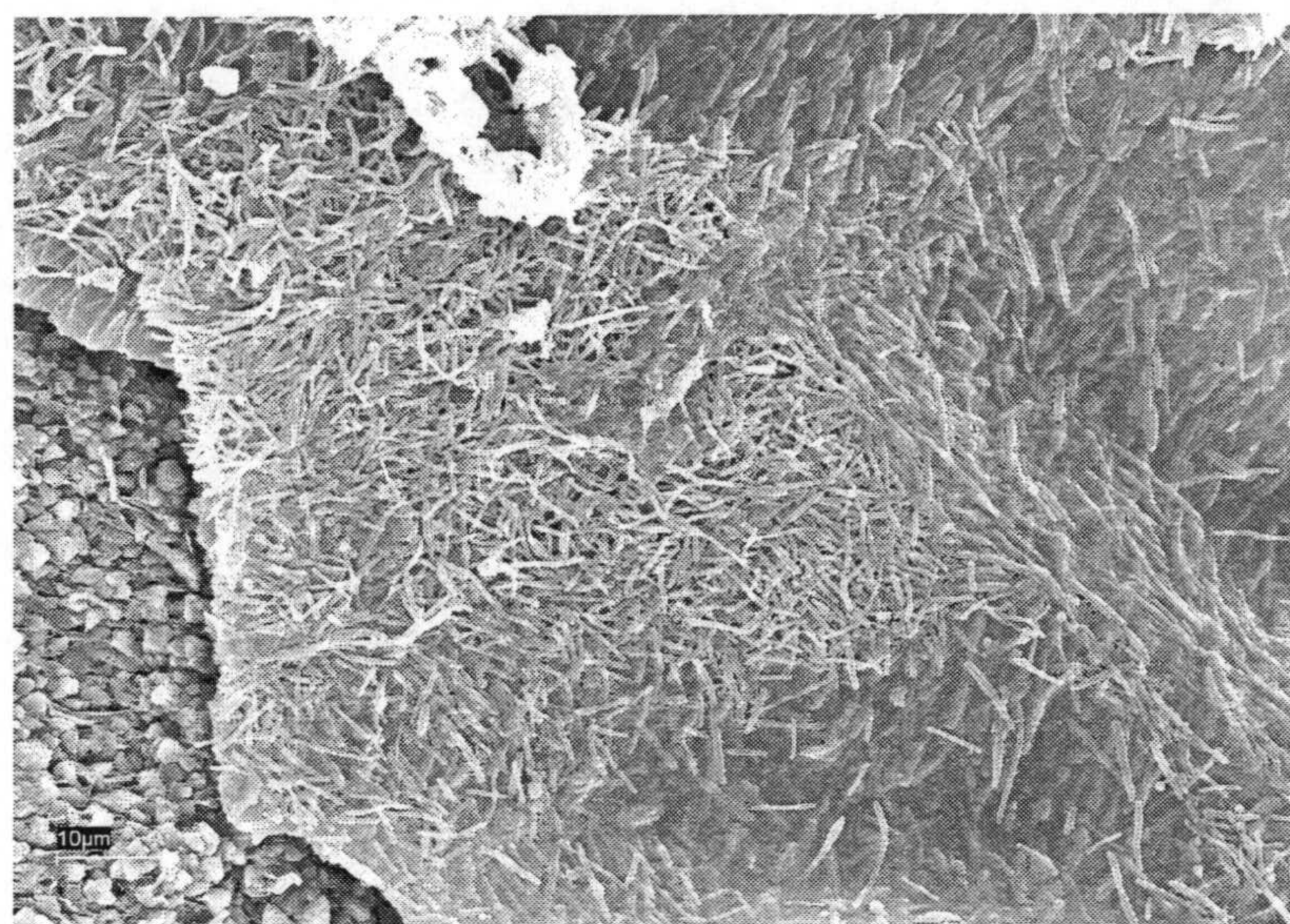
A



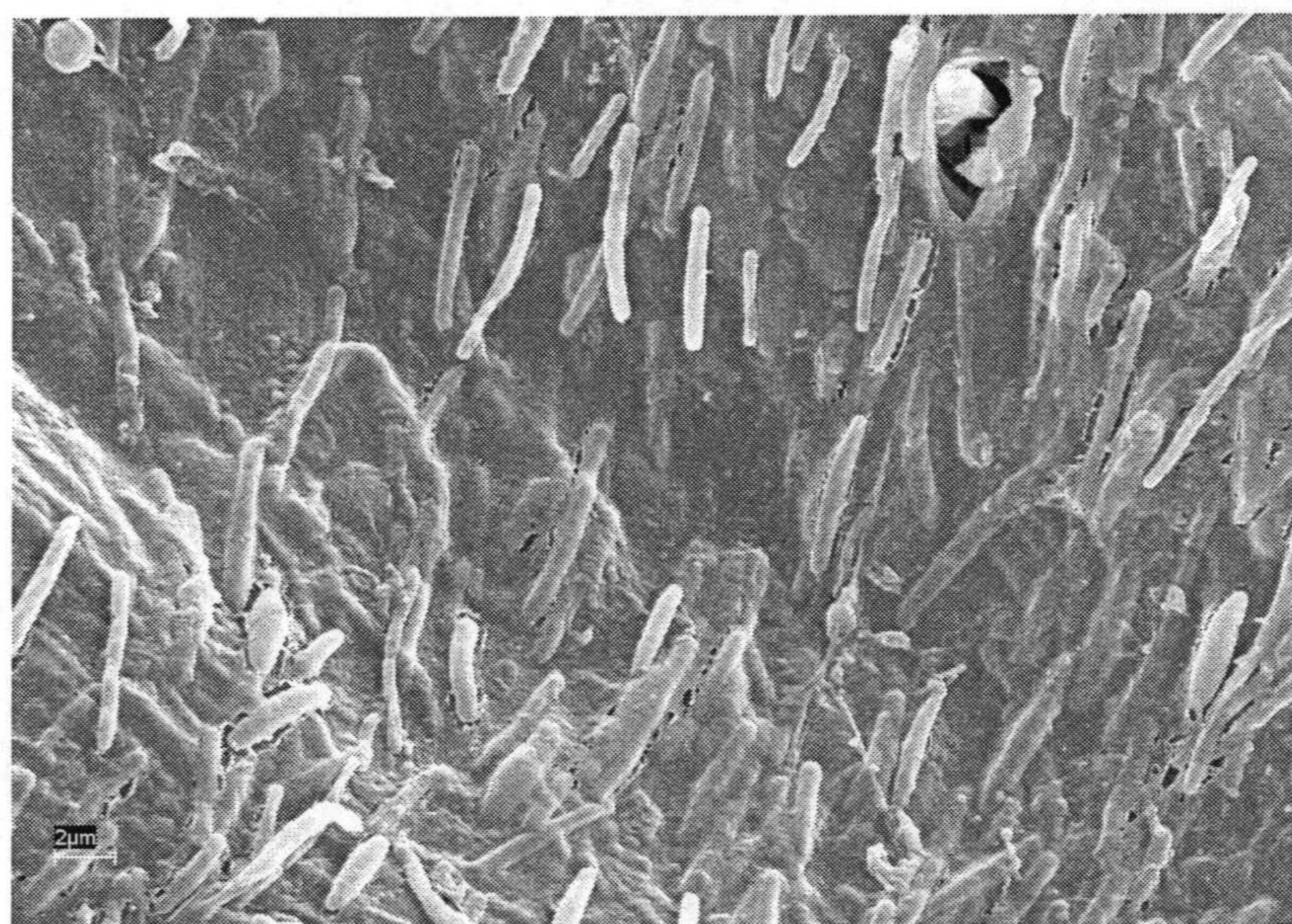
B

Figura 89.- Soporte sin biopelícula en presencia de cobalto observado con MEB. A: Control sin inocular; B: Microanálisis por EDX, correspondientes a A.





A



B

Figura 90.- Biopelícula formada por *M. xanthus* en presencia de cobalto observada con MEB

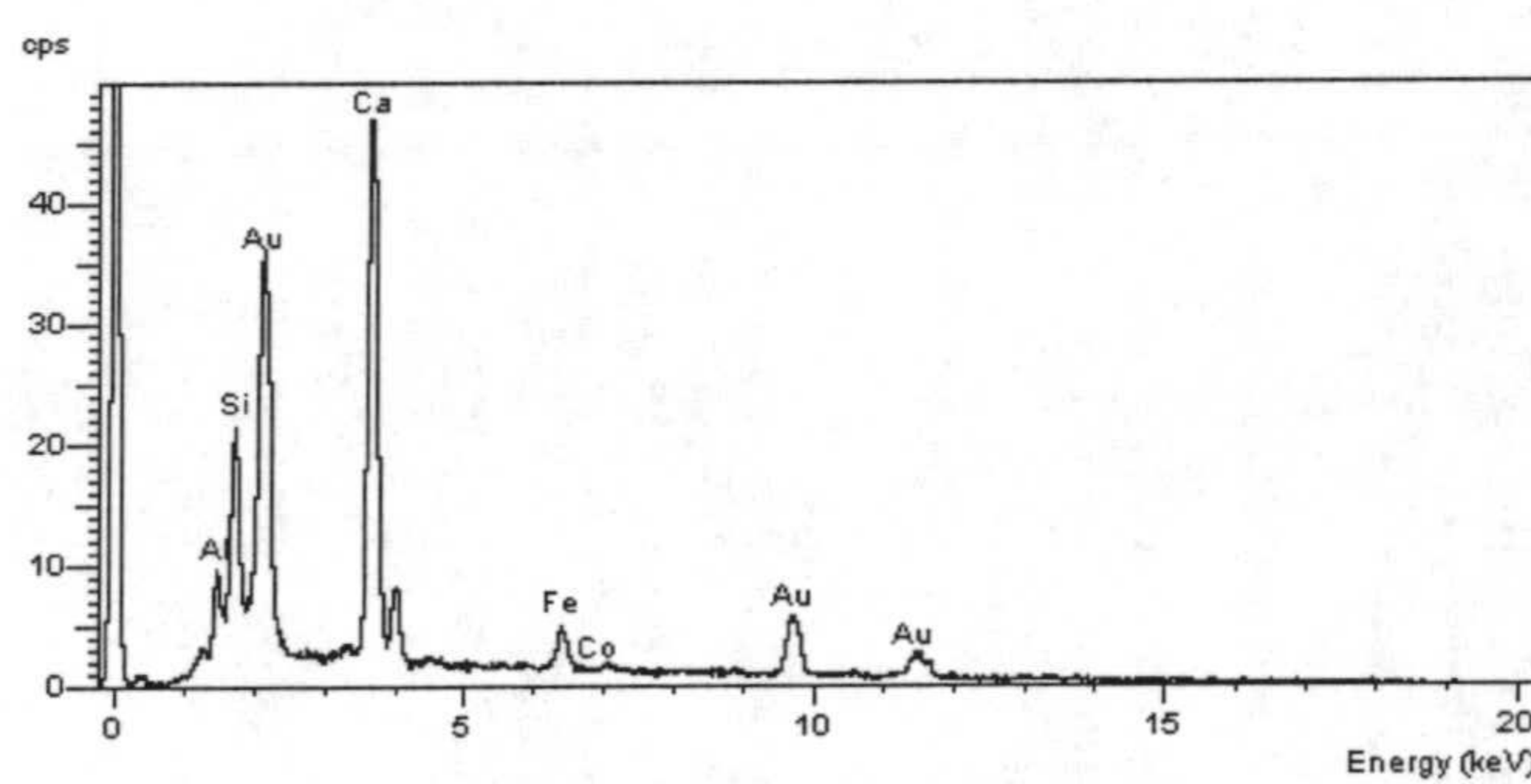
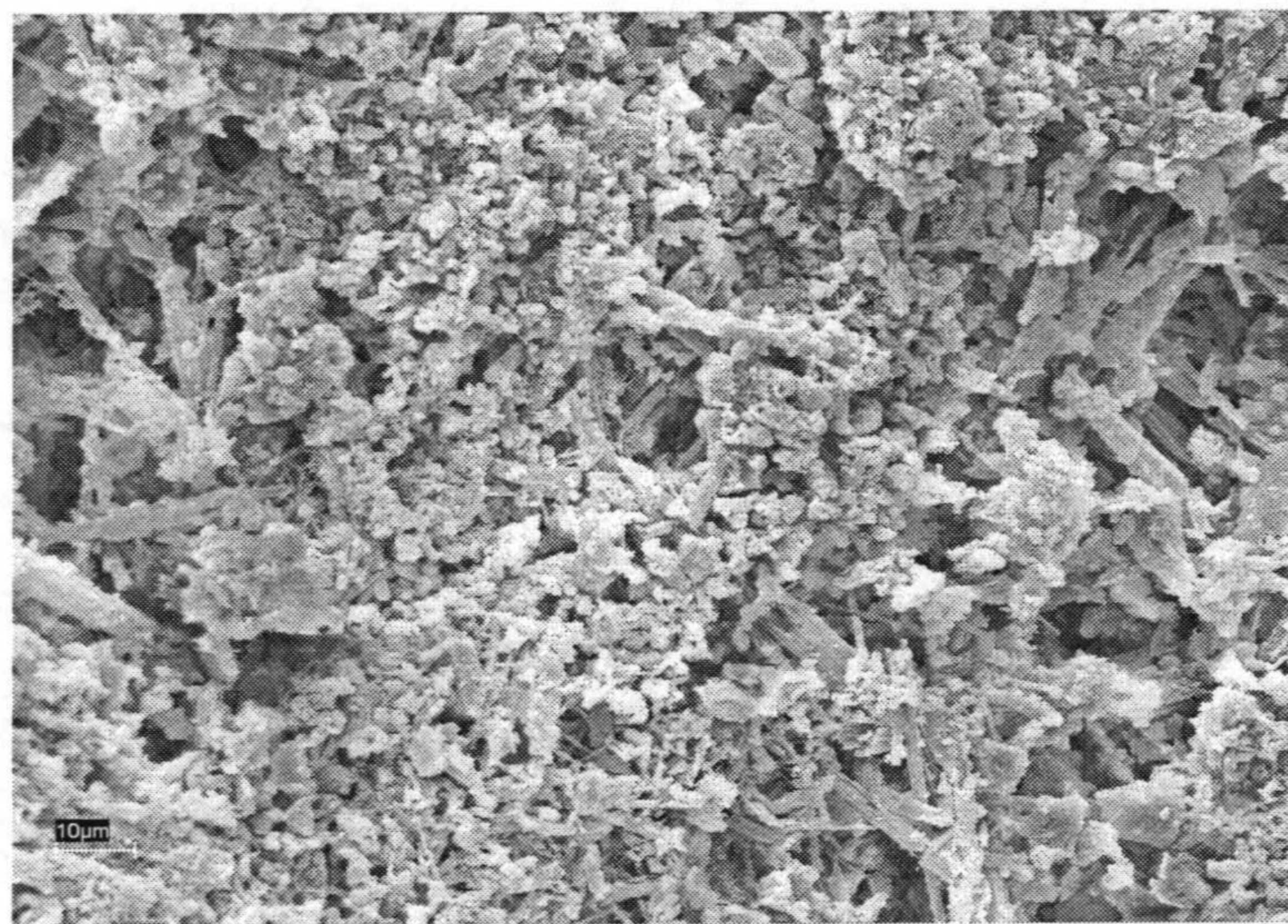


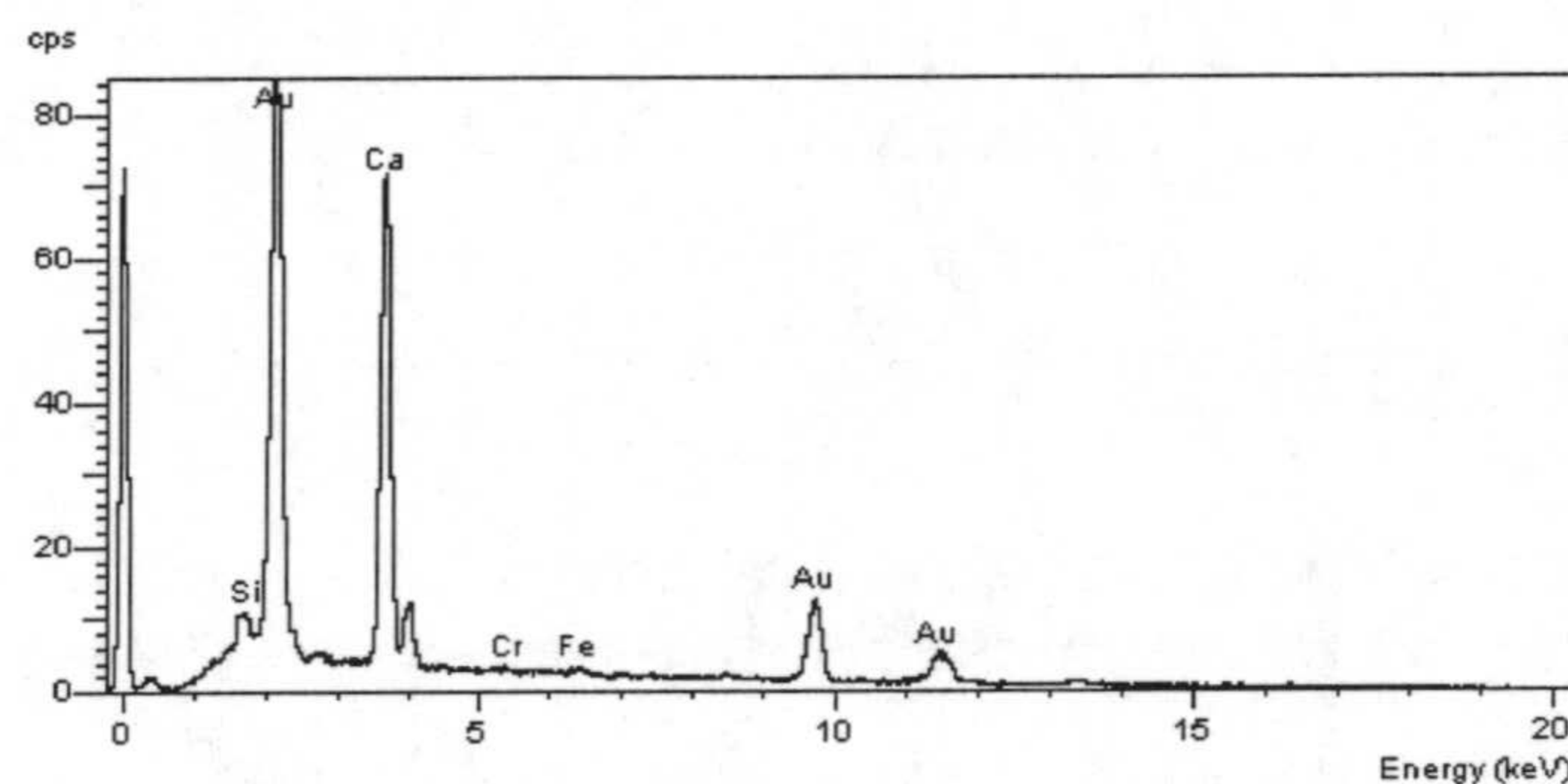
Figura 91.- Microanálisis (EDX) del soporte con la biopelícula formada por *M. xanthus* en presencia de cobalto, correspondiente a A y B.



En presencia del cromo, como con el metal anterior, las células se encuentran cubiertas con un velo fino (Figura 93). El microanálisis correspondiente muestra los picos de Ca, Si y un poco de hierro (Figura 94). Se puede observar, también, la aparición de muchos cristales de diversos tipos. Se ve claramente la formación de unas fibras de forma alargada formando como una red encima del soporte (Figura 95B) y otros de forma redonda (Figura 95A). La Figura 92 muestra fotografía del soporte control en presencia del cromo y su correspondiente microanálisis.



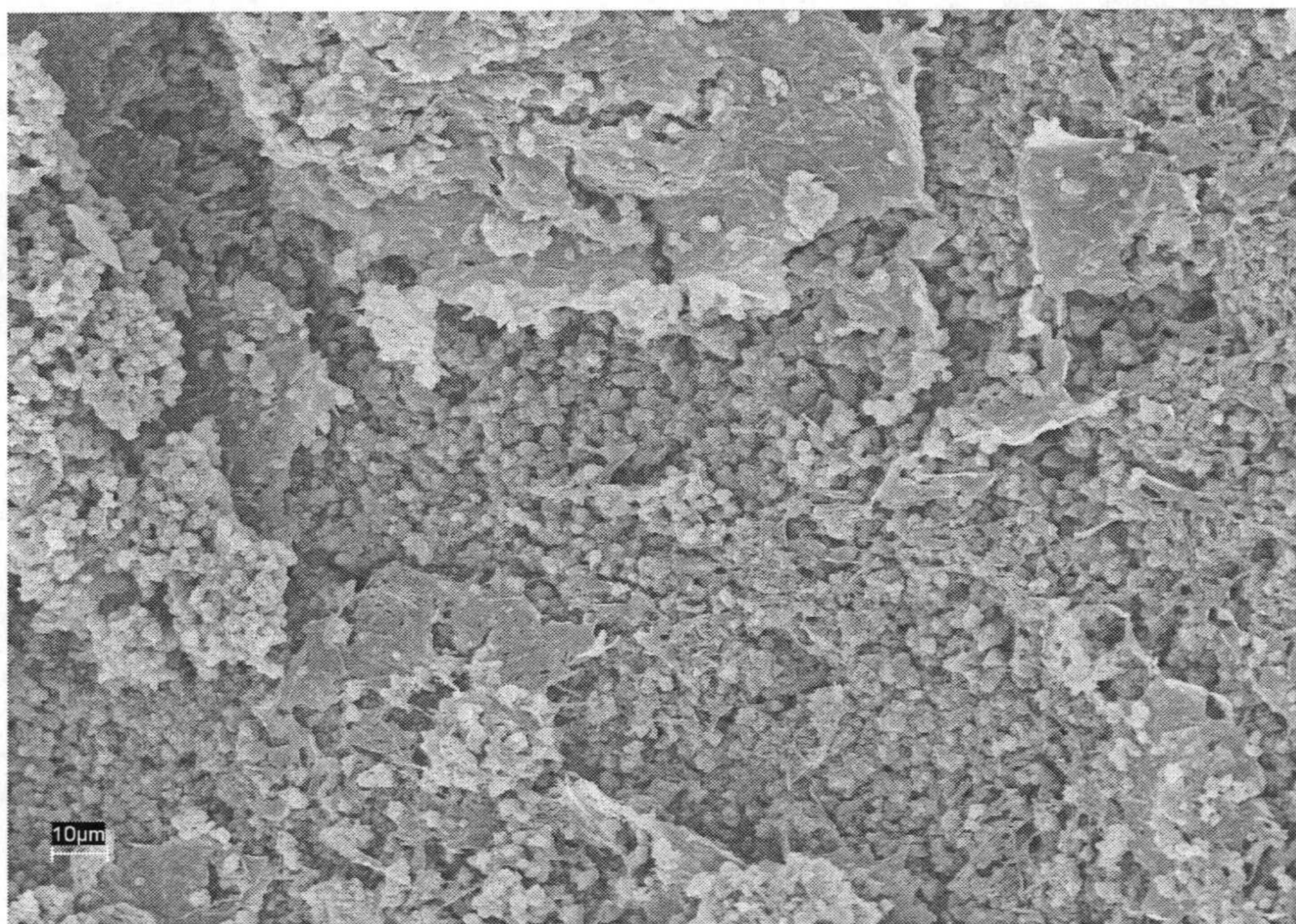
A



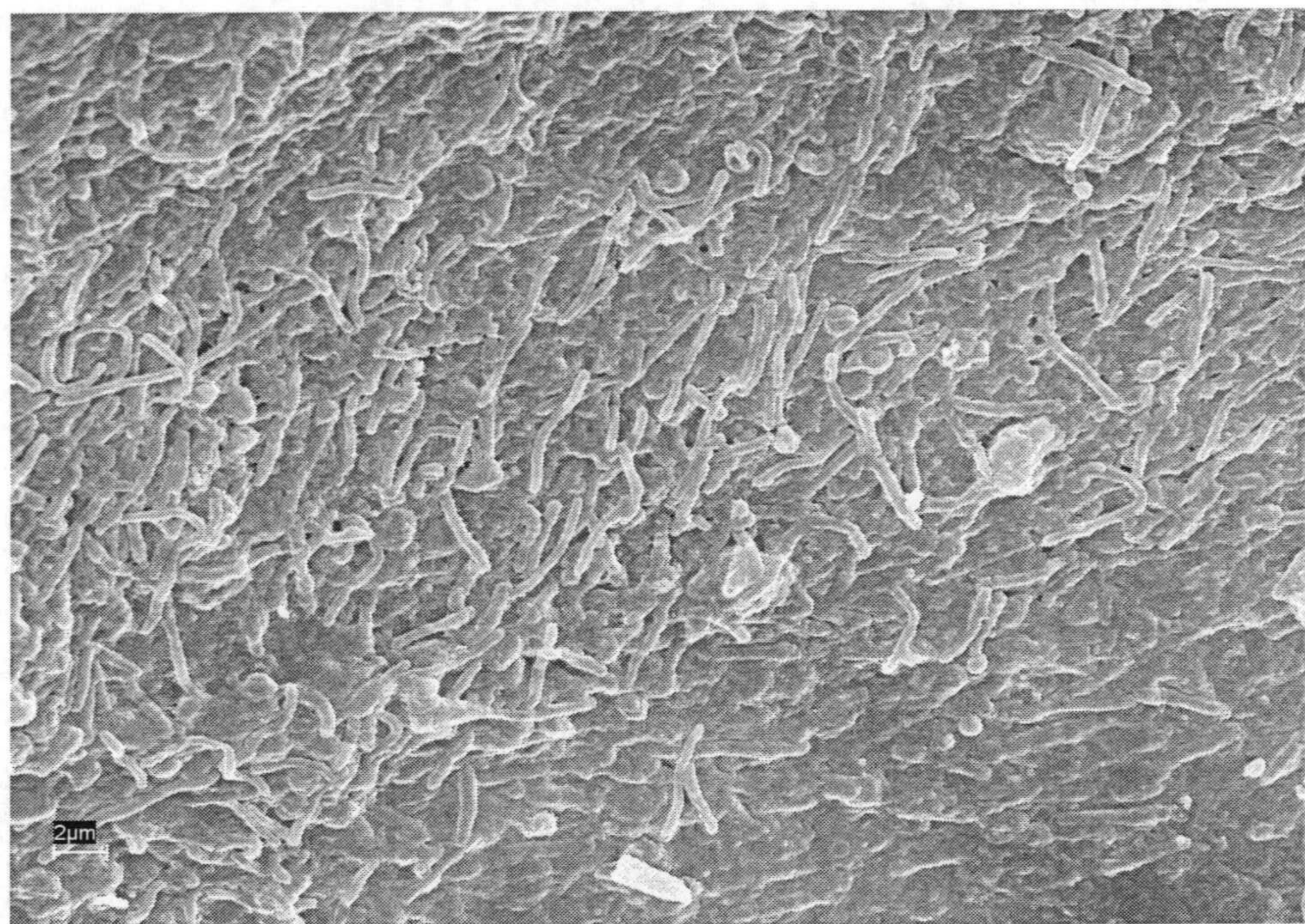
B

Figura 92.- Soporte sin biopelícula en presencia de cromo observado con MEB. A: control sin inocular; B: Microanálisis por EDX correspondientes a A





A



B

Figura 93.- Biopelícula formada por *M. xanthus* en presencia de cromo observada con MEB. (A x 60000 y B x 500000)



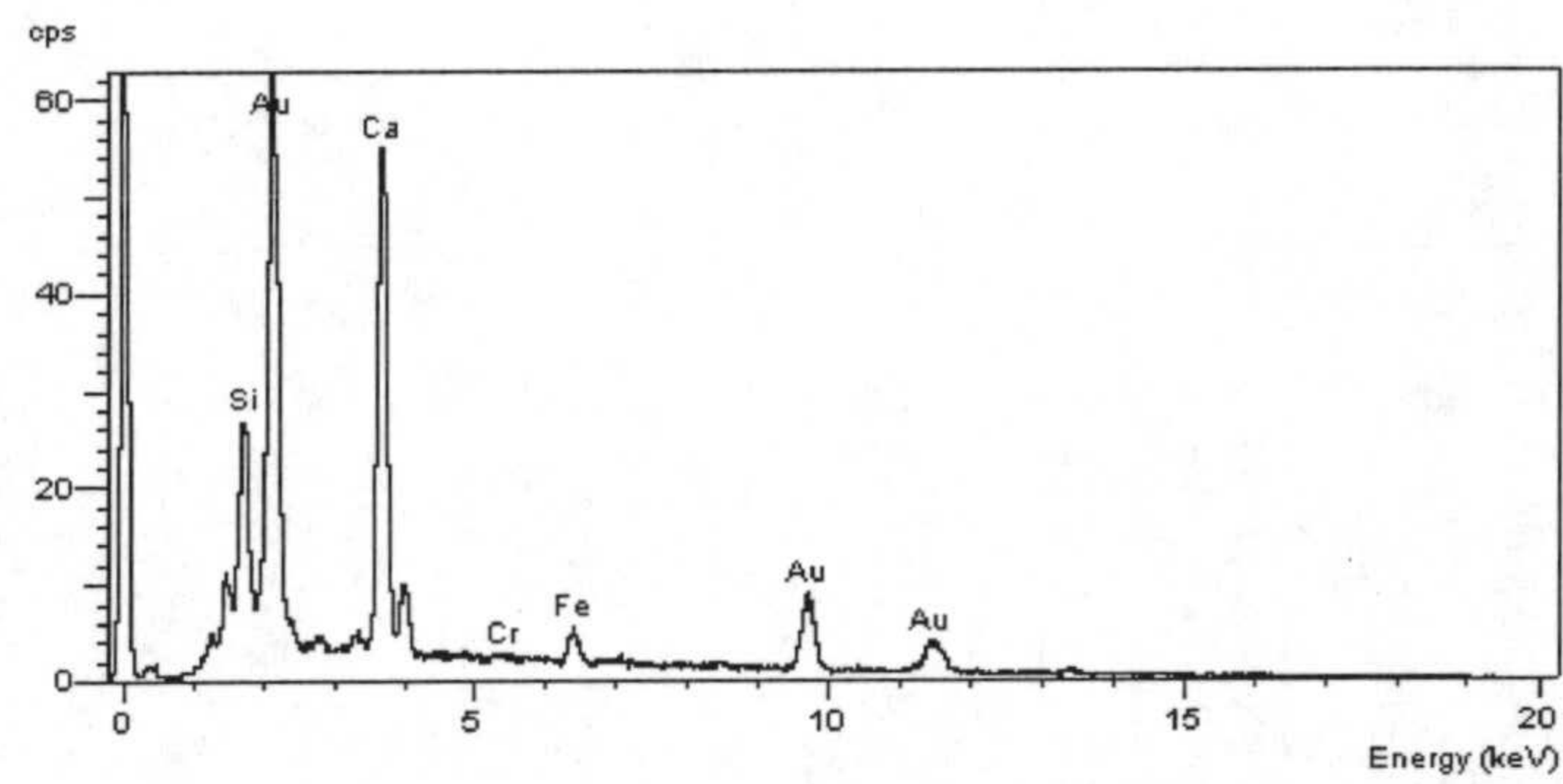
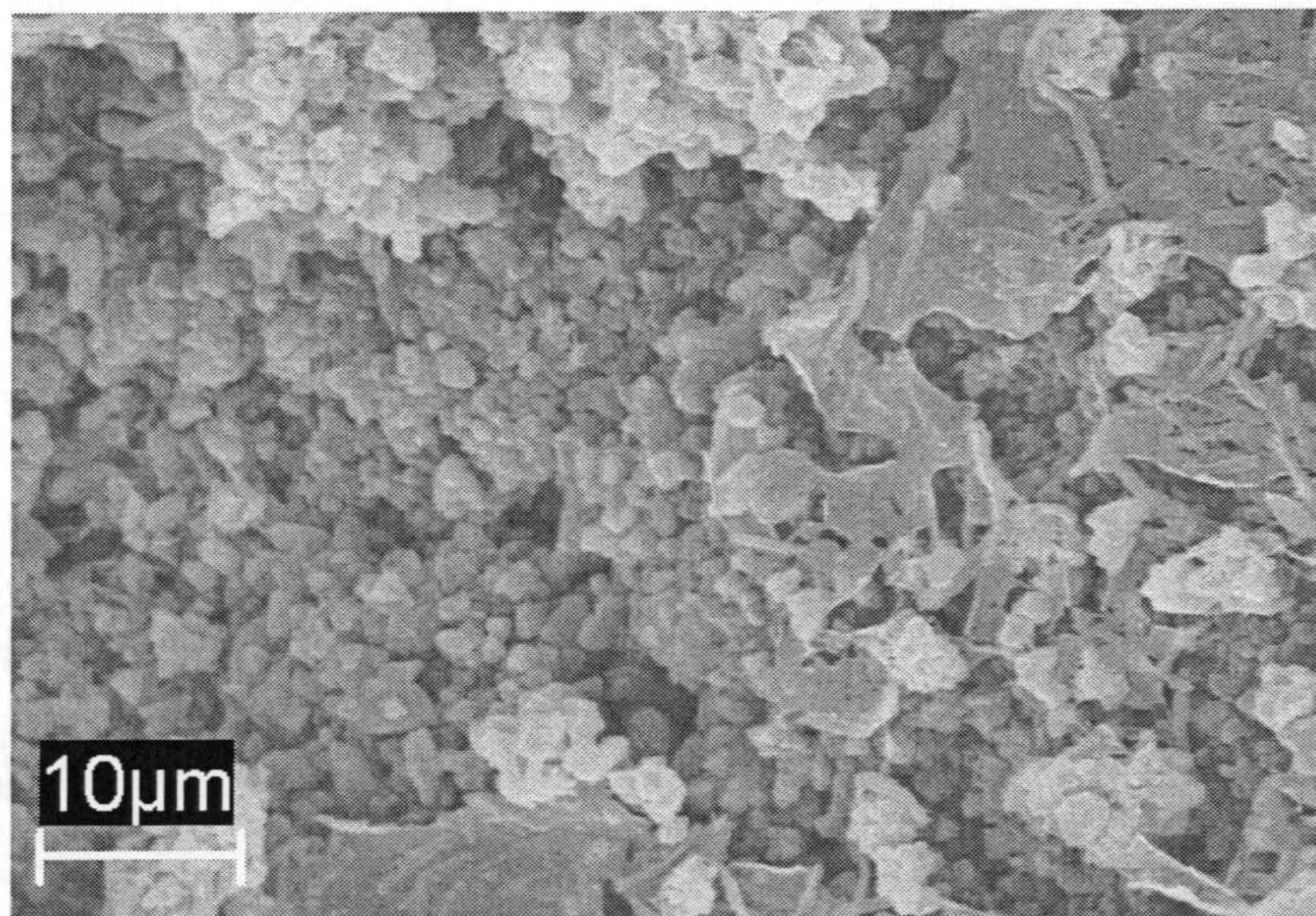
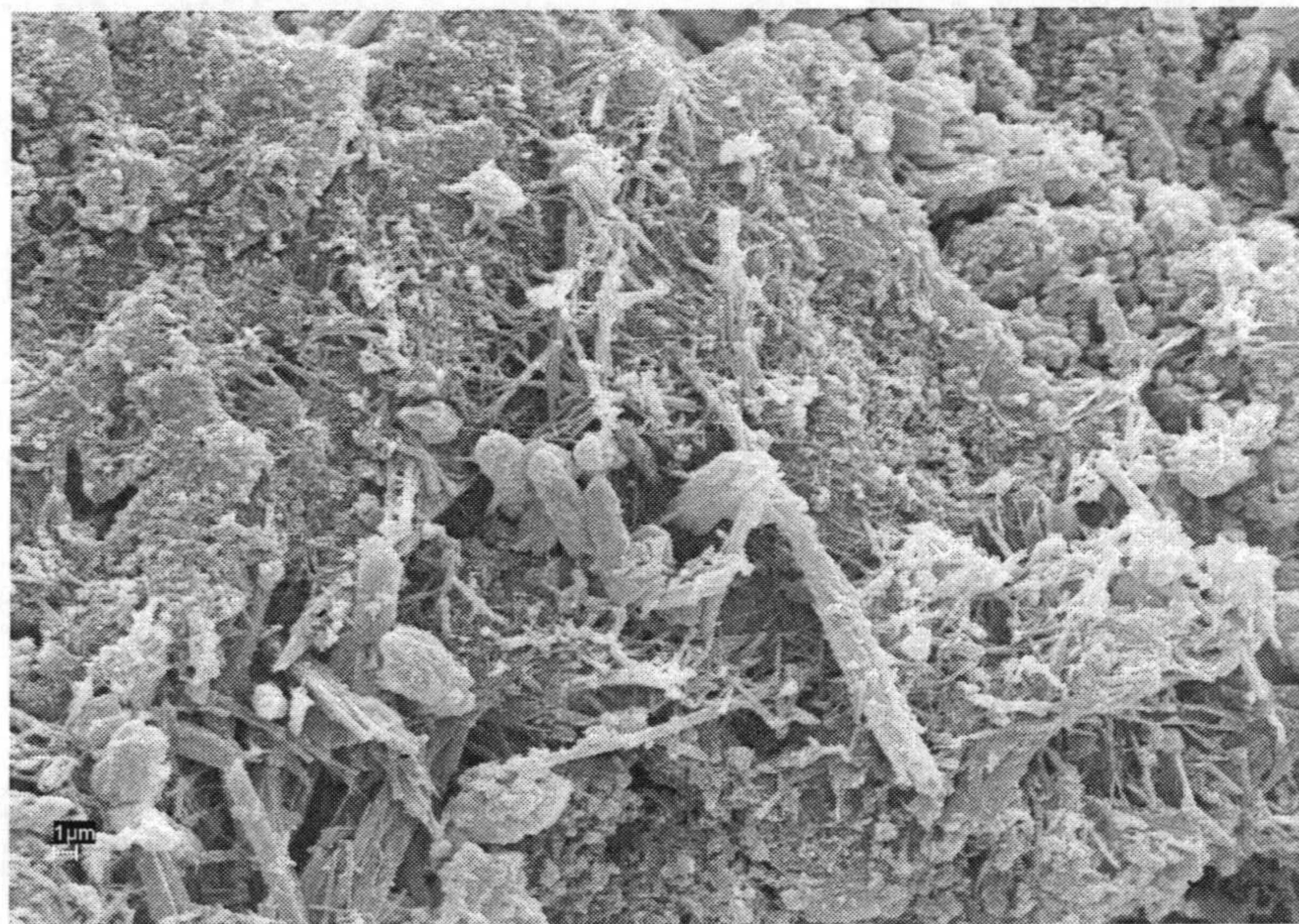


Figura 94.- Microanálisis (EDX) del soporte con la biopelícula formada por *M. xanthus* en presencia de cromo, correspondiente a A y B



A

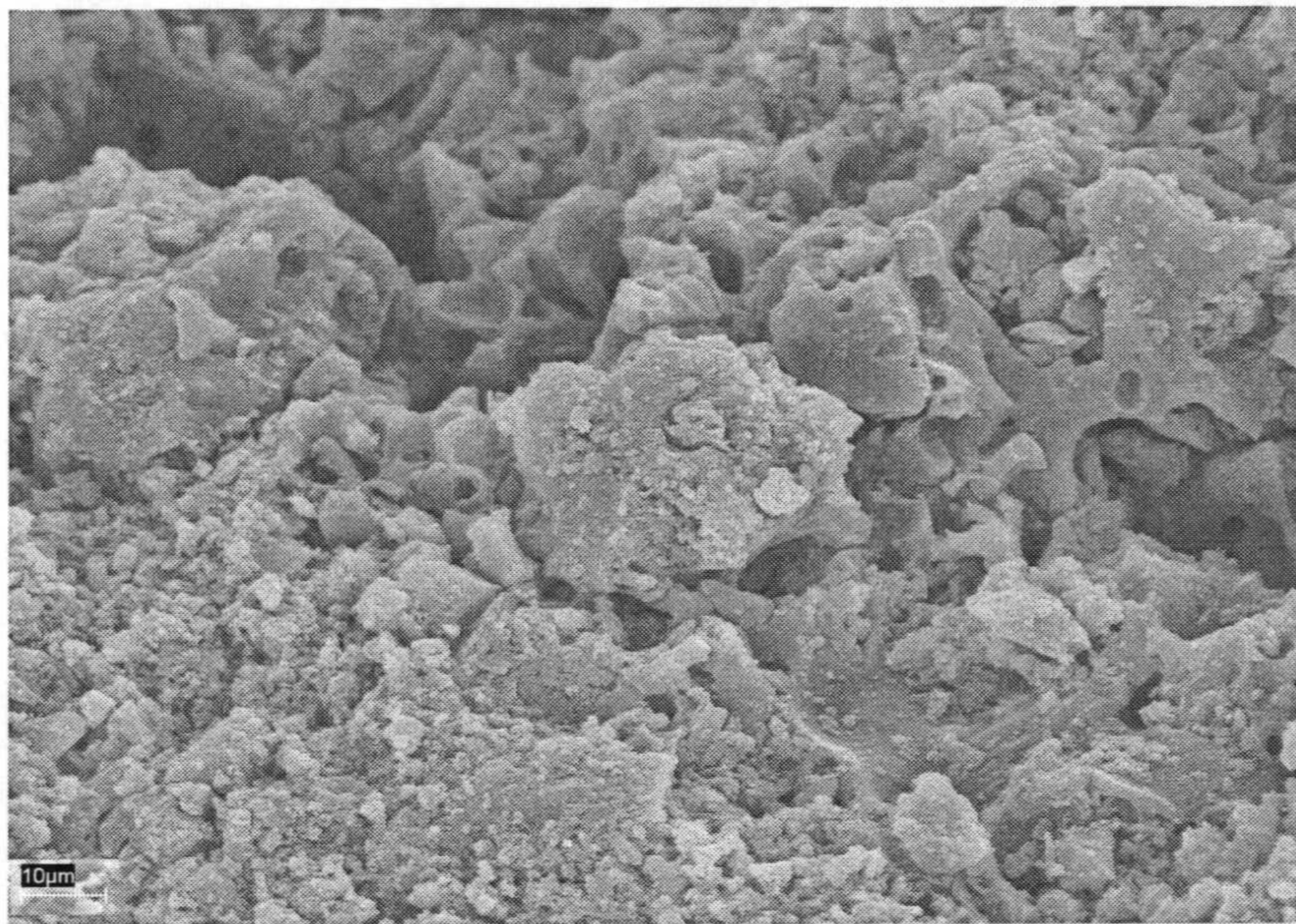


B

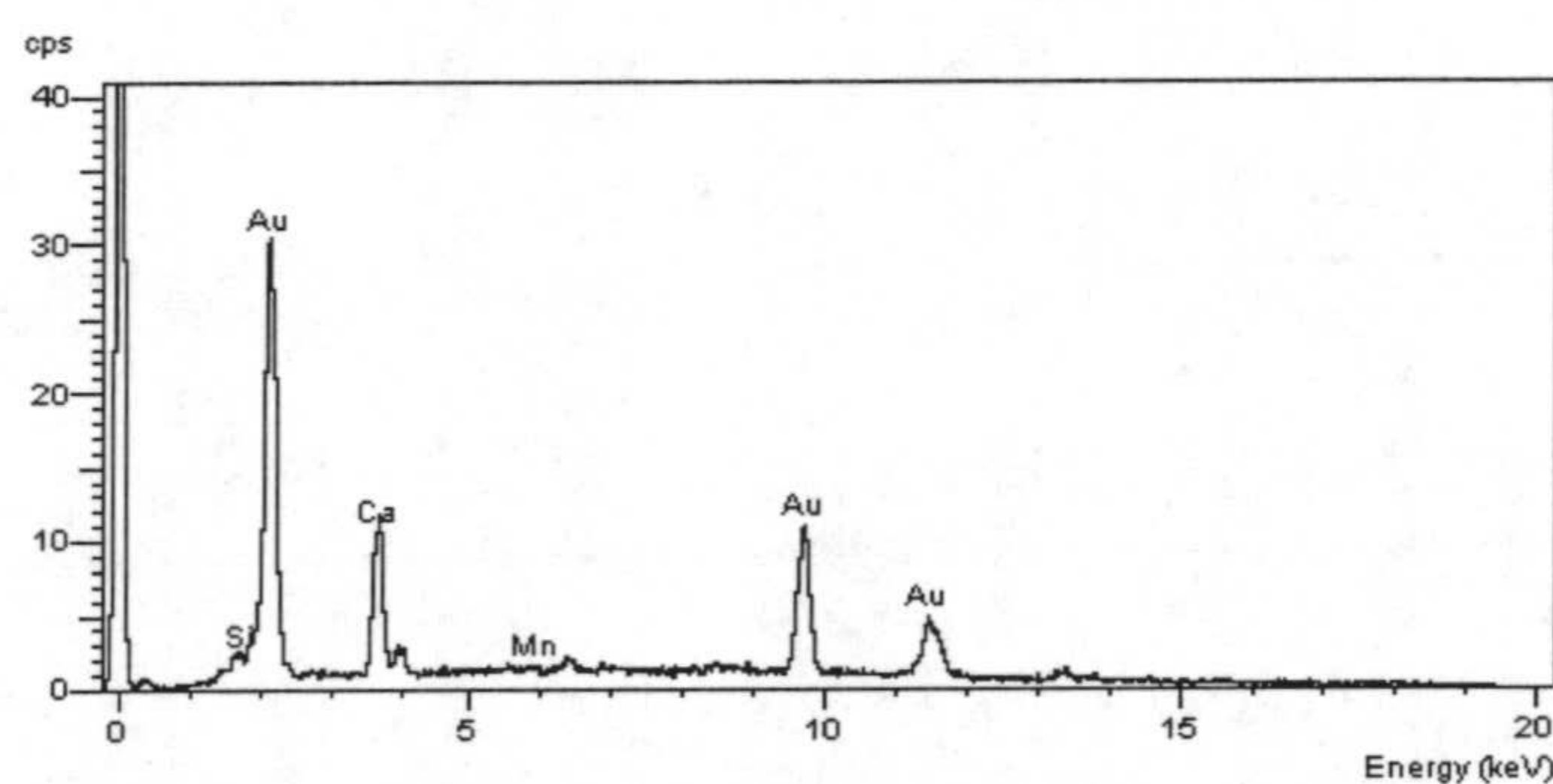
Figura 95.- Cristales precipitados alrededor de las células de *M. xanthus* en presencia de cromo, observados por MEB



En presencia del manganeso la biopelícula se ha establecido también perfectamente y las células se ven en perfecto estado, en gran cantidad y cubiertas por esta capa fina recién formada (Figura 97). En el microanálisis, Figura 98, se muestran los mismos picos del testigo sin tratamiento. En este caso también, se ve la presencia de muchos cristales formados alrededor de las células y otros cristales de tamaño muy pequeño precipitados encima de las células (Figura 99). La fotografía del testigo muestra la piedra con mejor estado que con el metal anterior (Figura 96).



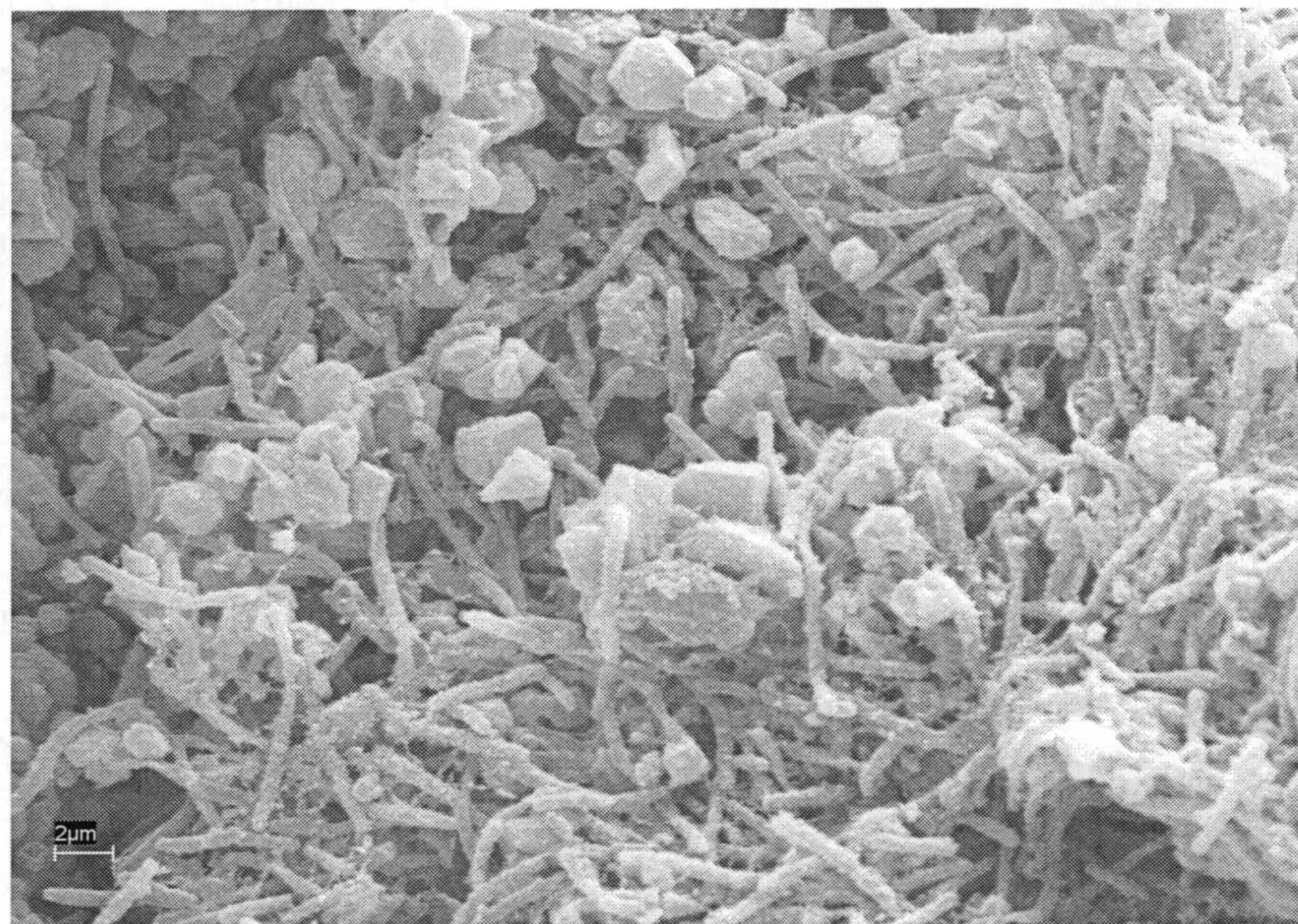
A



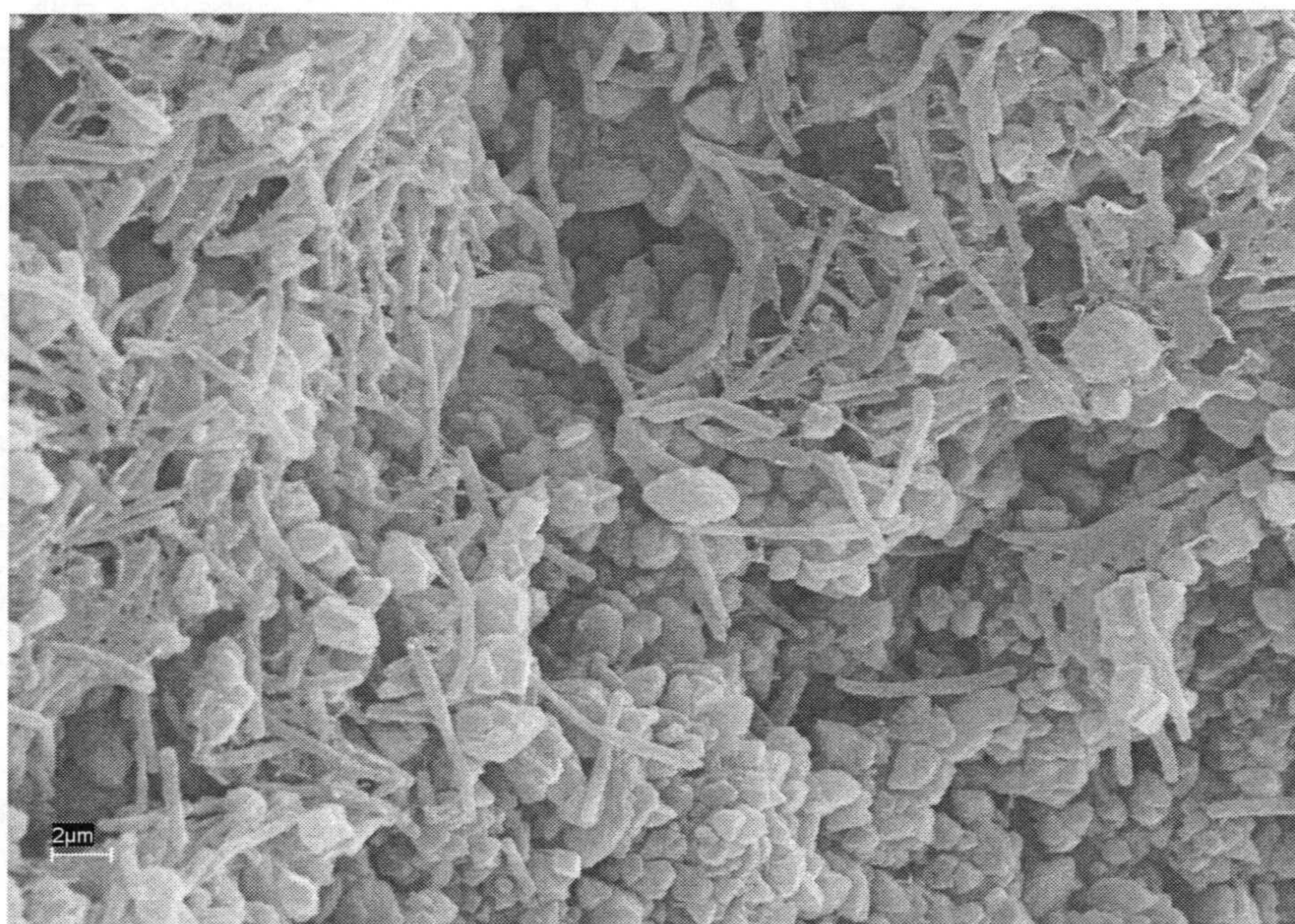
B

Figura 96.- Soporte sin biopelícula en presencia de manganeso observado con MEB. A: control sin inocular; B: Microanálisis por EDX correspondientes a A





A



B

Figura 97.- Biopelícula formada por *M. xanthus* en presencia de manganeso observada con MEB.



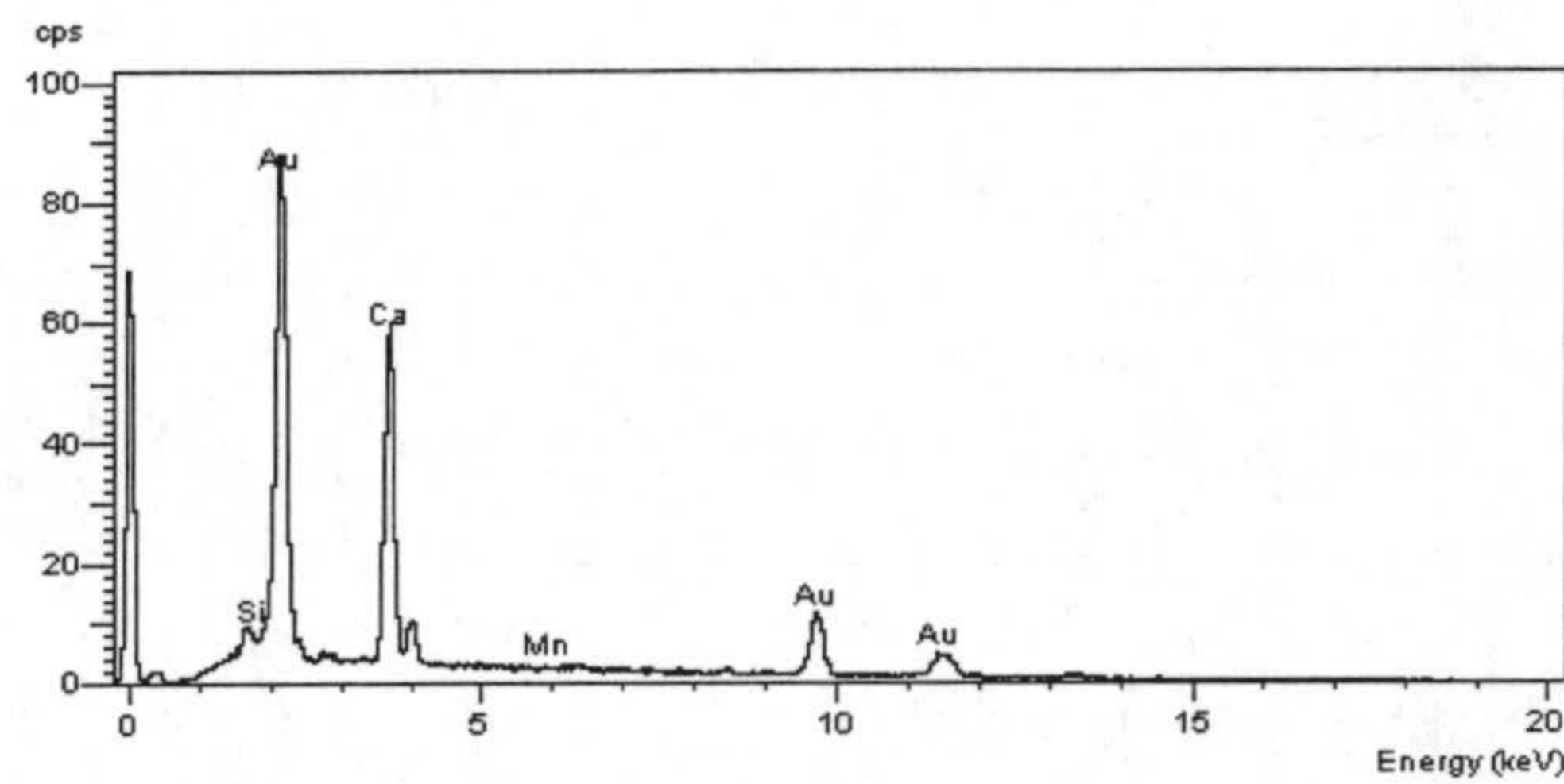


Figura 98.- Microanálisis (EDX) del soporte con la biopelícula formada por *M. xanthus* en presencia de manganeso, correspondiente a A y B

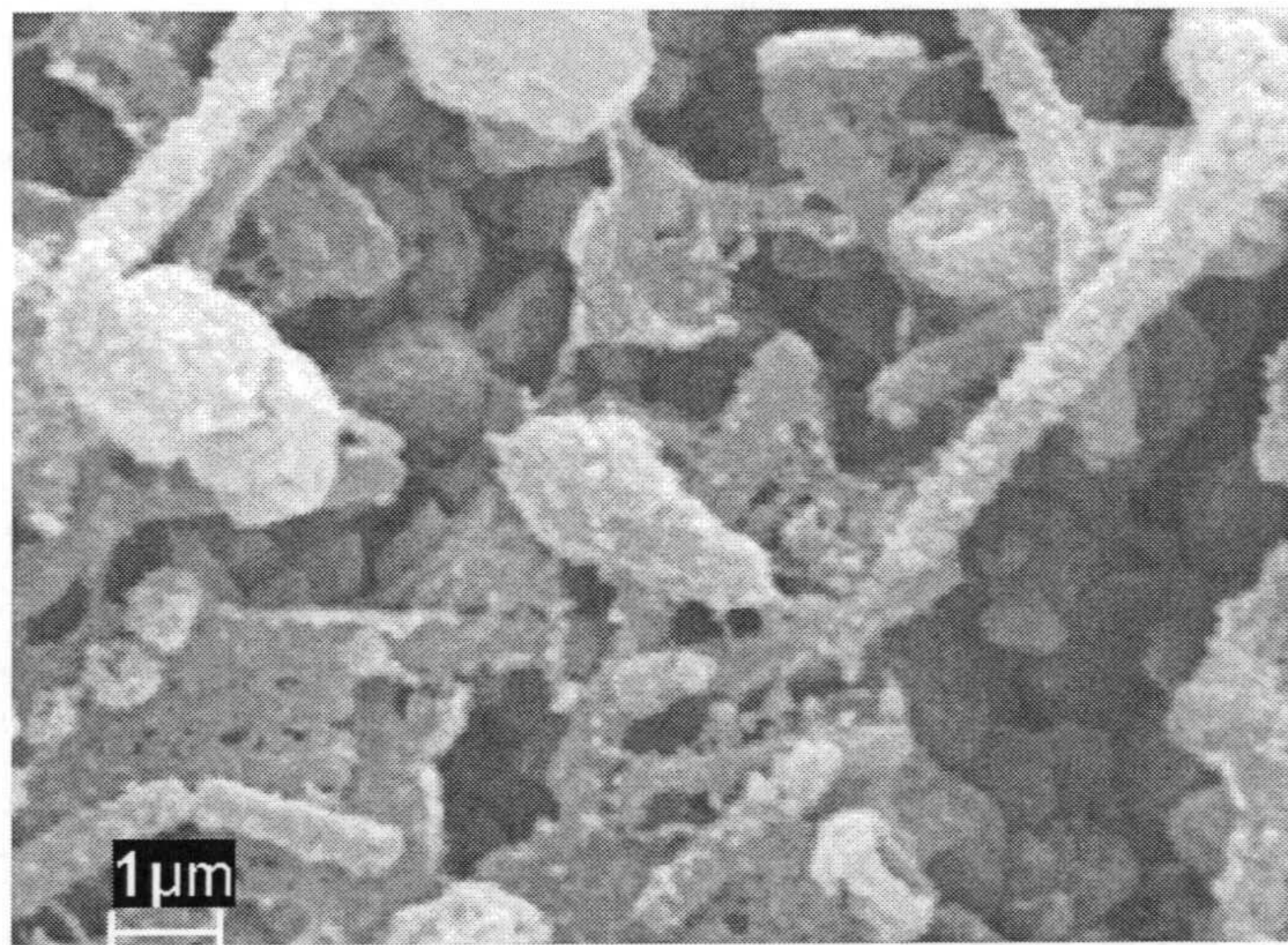
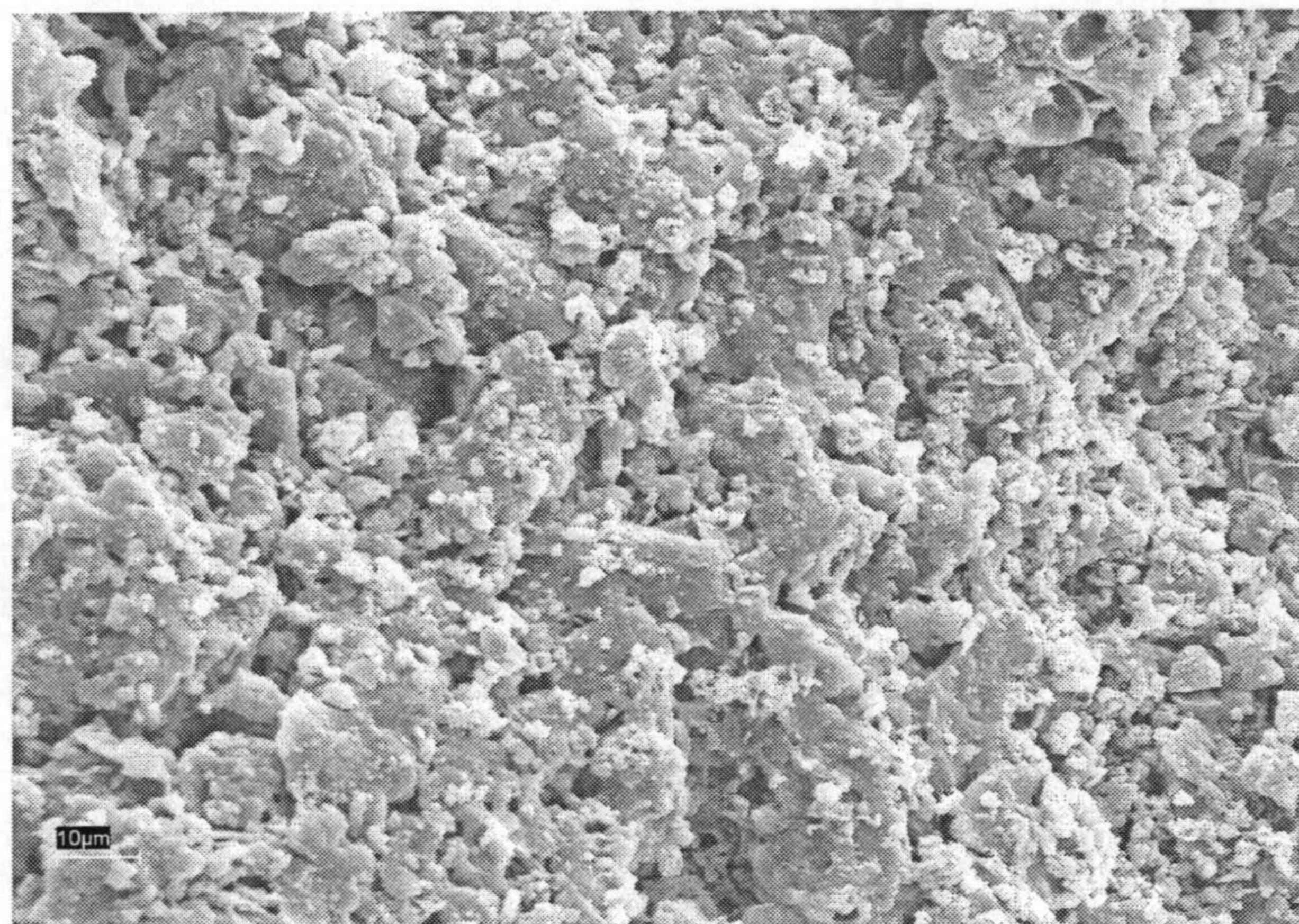


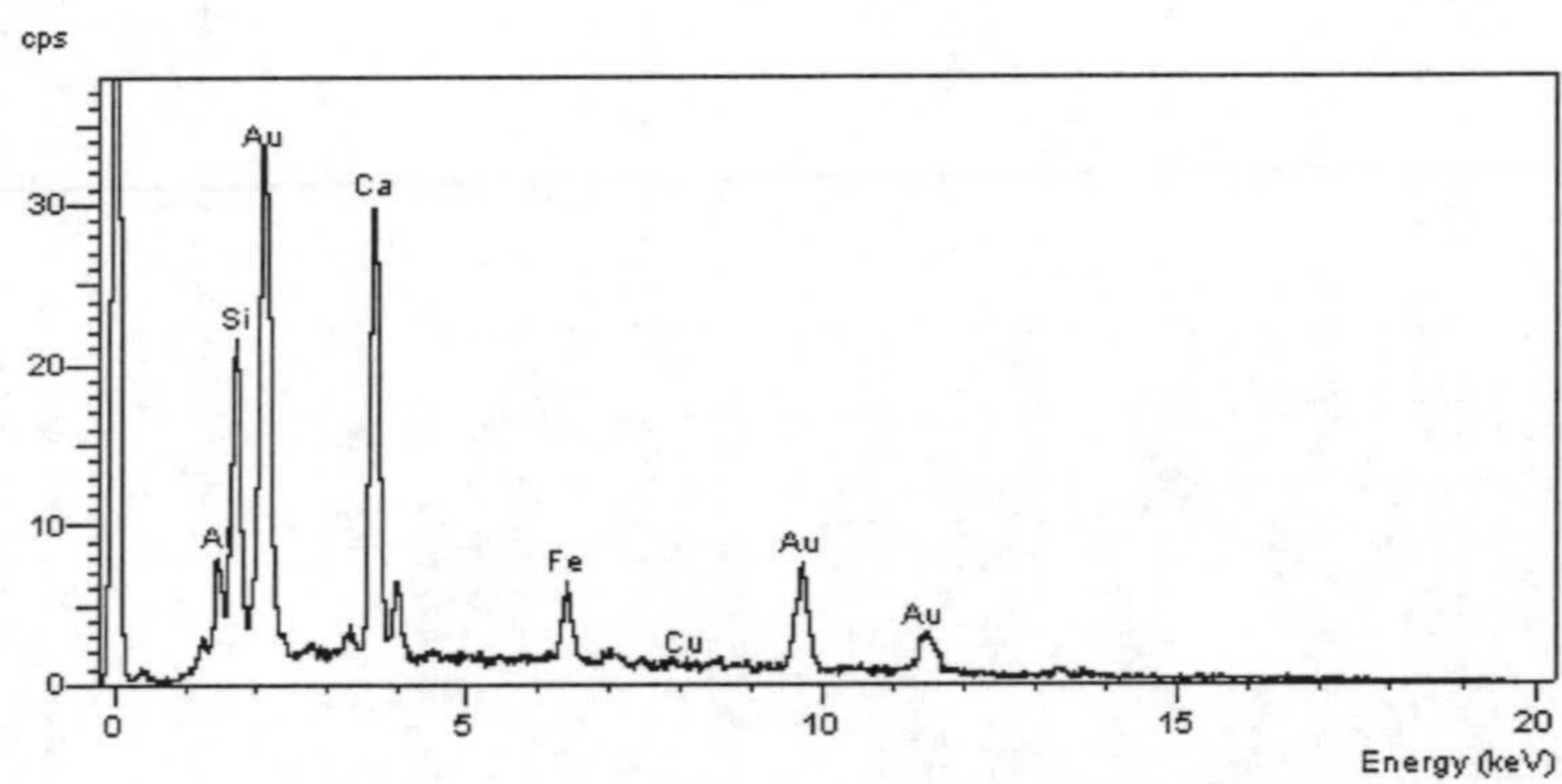
Figura 99.- Cristales precipitados en las células de la biopelícula de *M. xanthus* en presencia de manganeso observados por MEB.

En presencia del cobre la biopelícula se ha establecido perfectamente y las células se ven en buen estado agrupadas en una cantidad bastante alta y arropadas por el mismo velo que los demás metales (Figura 101). La Figura 100A, muestra fotografía del control en presencia del cobre que se presenta con aspecto bastante deteriorado comparado con el testigo. Los respectivos microanálisis de las muestras indican la presencia de los mismos componentes del soporte sin tratar además de un pequeño pico de cobre (Figuras 100B y 102).





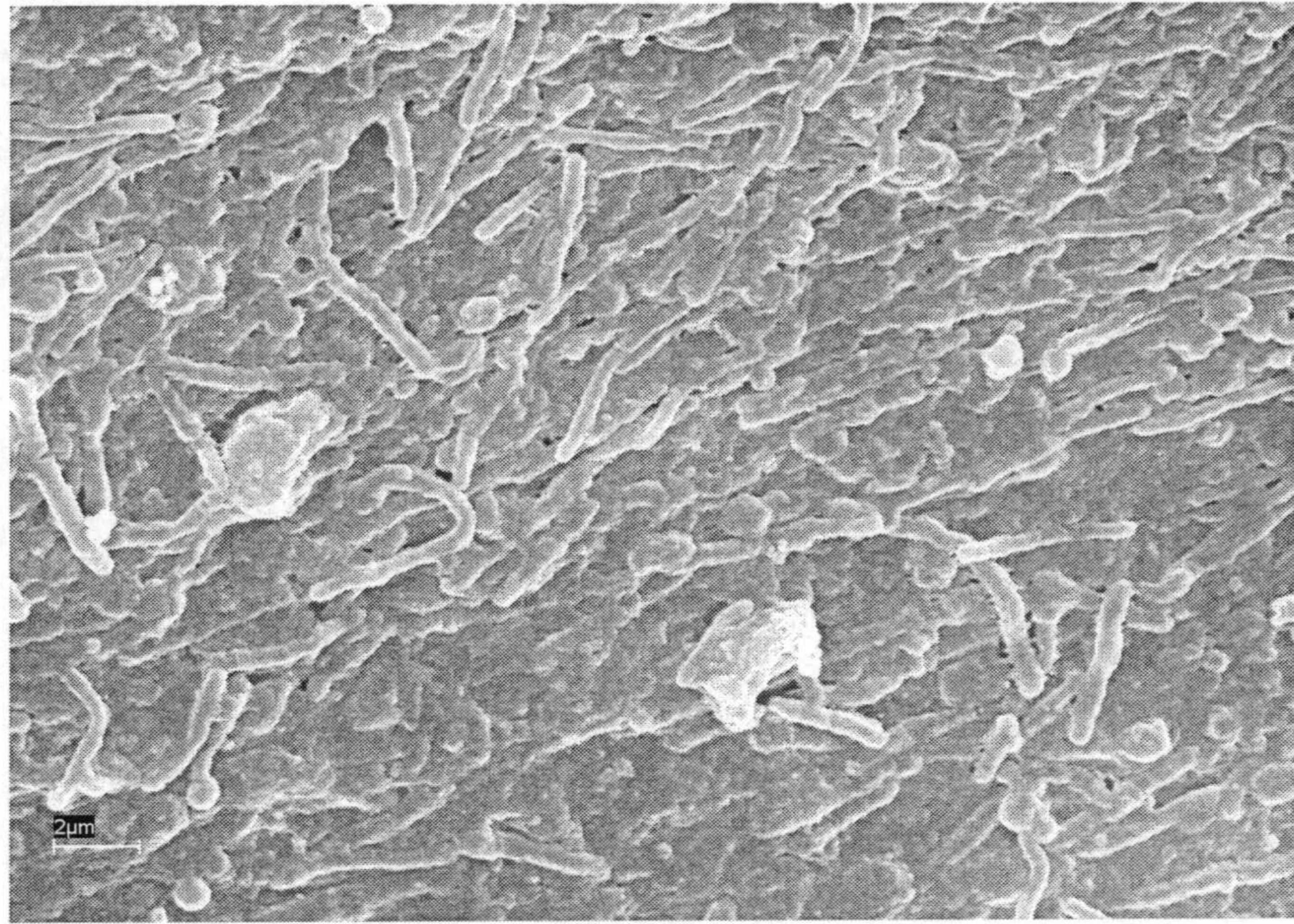
A



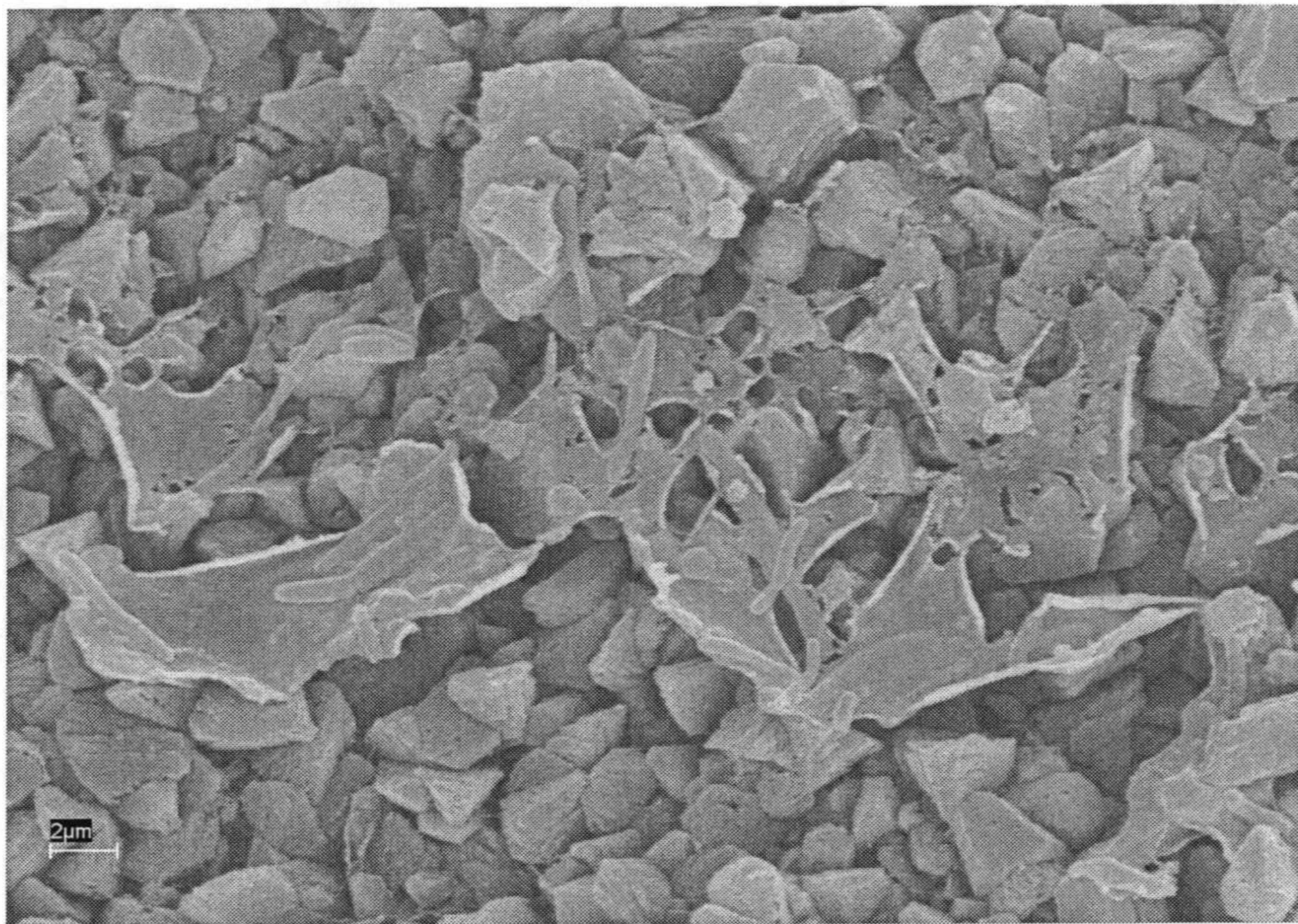
B

Figura 100.- Soporte sin biopelícula en presencia de cobre observado por MEB. A: control sin inocular; B: Microanálisis por EDX correspondientes a A





A



B

Figura 101.- Biopelícula formada por *M. xanthus* en presencia de cobre observada con MEB



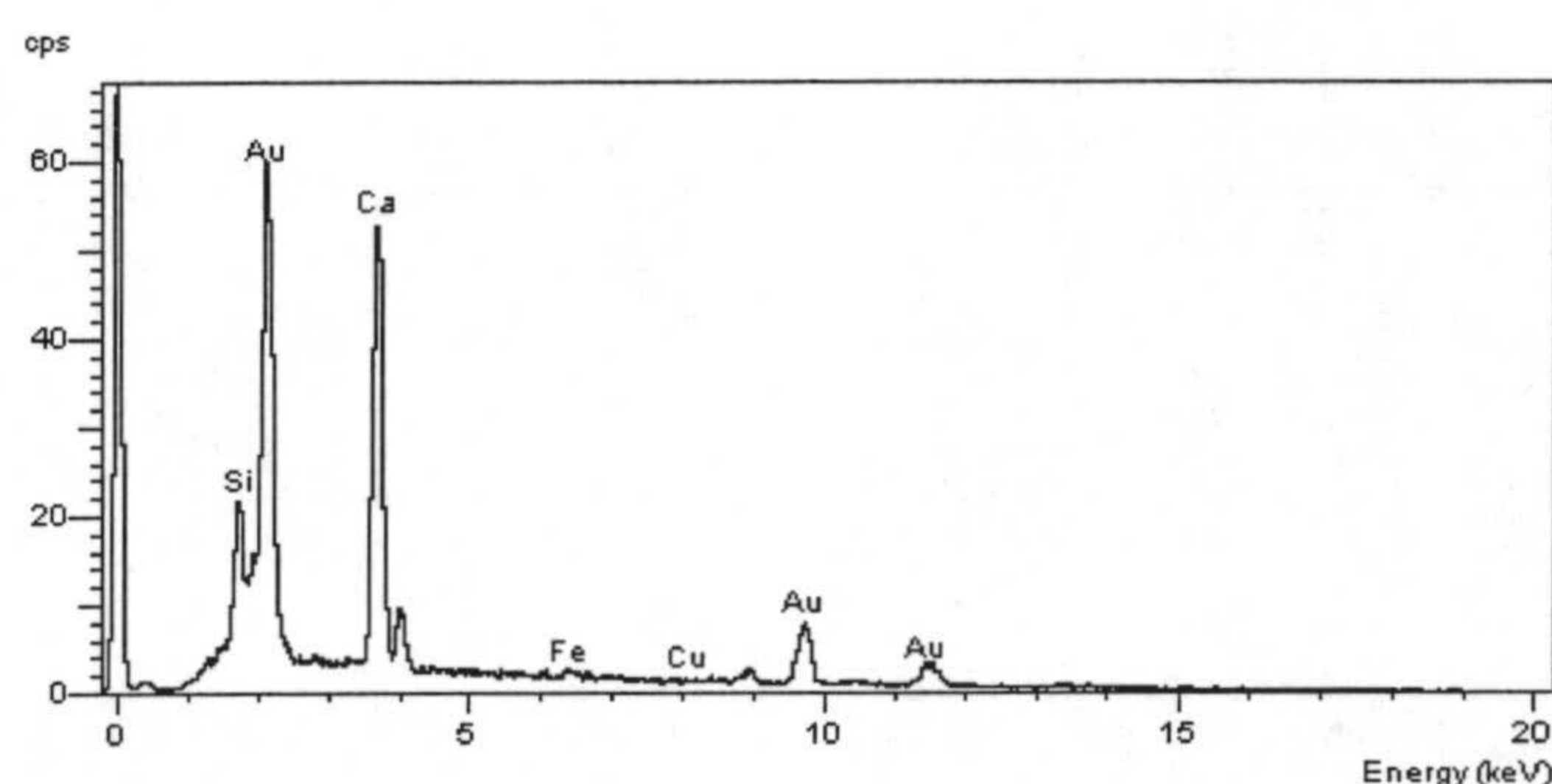


Figura 102.- Microanálisis (EDX) del soporte con la biopelícula formada por *M. xanthus* en presencia de cobre, correspondiente a A y B

### 3.- ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LAS SOLUCIONES DE METALES PESADOS

El análisis bioquímico de las soluciones de metales recogidas después del tratamiento con la biopelícula se llevó a cabo por espectroscopía de absorción atómica. Los resultados obtenidos de este análisis se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10.- Análisis por absorción atómica de las soluciones de metales después del tratamiento con biopelícula

| Muestra / Metal (ppm) | Solución testigo | Solución biopelícula |
|-----------------------|------------------|----------------------|
| Co                    | 13,87            | 13,01                |
| Cr                    | 9,24             | 3,84                 |
| Mn                    | 4,50             | 1,35                 |
| Cu                    | 4,93             | 4,89                 |

Según esta tabla existe una clara disminución de la cantidad de cromo y de manganeso hasta 1/3 después del tratamiento con biopelícula de *M. xanthus*. Mientras que, con los otros dos metales (cobalto y cobre) no se nota gran variación de la cantidad de los metales antes y después del tratamiento con la biopelícula.



*V.- DISCUSIÓN*







Este capítulo de Discusión incluye distintos apartados que se irán desarrollando uno por uno con el fin de interpretar la totalidad de los resultados presentados en la sección correspondiente de esta memoria. El primer apartado está dedicado al estudio de la toxicidad de los metales pesados sobre la cepa salvaje 422 de *M. xanthus*, y sobre la influencia de los metales sobre el ciclo de vida característico de este microorganismo, utilizando distintas cepas de esta mixobacteria. Un segundo apartado, destinado a la adsorción de plata por células proliferantes de *M. xanthus*. En un tercero se discute la fijación del uranio por células no proliferantes de *M. xanthus* y la determinación de la naturaleza de los complejos formados como consecuencia de la interacción de este radionucleido con los componentes celulares. El penúltimo apartado trata de estudiar la posible incorporación de metales pesados en minerales tales como fosfatos y carbonatos producidos por *M. xanthus*. Finalmente se concede un apartado al estudio del establecimiento de biopelícula de *M. xanthus* y a la bioadsorción de metales por la misma.

#### **TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS SOBRE *M. xanthus***

La introducción de los metales pesados bajo varias formas en el ambiente puede producir considerables modificaciones de la comunidad microbiana y de sus actividades. Los metales pesados generalmente ejercen una acción inhibitoria sobre los microorganismos bloqueando grupos funcionales esenciales, desplazando iones metálicos esenciales, o modificando conformaciones activas de moléculas biológicas; sin embargo, a concentraciones relativamente bajas, algunos metales son esenciales para los microorganismos (ej. Co, Cu, Zn, Ni) puesto que proporcionan los cofactores vitales de las metaloproteínas y enzimas (Eiland, 1981; Doelman *et al.*, 1994).

El interés por las interacciones entre los metales pesados y los microorganismos es de importancia creciente. El estudio de estas interacciones se ha centrado, en particular, sobre la selección de microorganismos resistentes a los



metales pesados, y la posibilidad de usarlos para la desintoxicación de los ambientes contaminados (Hassen *et al.*, 1998a; Hiroki, 1994; Kunito *et al.*, 1997). Por otra parte, los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia que permiten seleccionar cepas resistentes que pueden tolerar la toxicidad de los metales (Roane y Kellogg, 1996; Rosen, 1996; Silver y Phung, 1996) y que serían especialmente útiles para la finalidad indicada.

De acuerdo con los objetivos propuestos para el desarrollo de la investigación que se presenta en esta memoria, lo primero que hay que destacar es que, en lo relativo a la interacción de los metales pesados con *M. xanthus*, los trabajos realizados previamente lo habían sido siempre con biomasa no proliferante, húmeda o seca. De ahí que lo primero que se imponía era el estudio del nivel de toxicidad que diversos metales ejercían sobre el crecimiento vegetativo de *M. xanthus*, en cultivos de la bacteria llevados a cabo tanto en medios líquidos como sólidos.

Para estos estudios se eligieron los metales siguientes: plata, cobalto, cromo, cobre, uranio, plomo, lantano y manganeso. De acuerdo con la clasificación establecida por Volesky y Holan (1995), dichos metales pertenecen a las siguientes categorías: metales pesados tóxicos, metales valiosos, metales estratégicos y radionucleidos.

Para la realización de la investigación propuesta en este trabajo, se eligió la cepa 422 de *M. xanthus* dado que en nuestro laboratorio se habían realizado numerosos estudios sobre bioadsorción de metales pesados por esta mixobacteria (Merroun *et al.*, 1998; González-Muñoz *et al.*, 1997; Merroun *et al.*, 2001). En estos estudios se había puesto de manifiesto la alta capacidad de fijación de metales por este microorganismo, habiéndose encontrado que es capaz de fijar cantidades relativamente altas en algunos casos en comparación con la capacidad de fijar metales de otros microorganismos. En la Tabla 11, se indican una serie de datos que ilustran lo que se acaba de decir.



**Tabla 11.- Resumen comparativo de los niveles de bioabsorción de distintos metales pesados por diferentes tipos de biomasa**

| Metal | Tipo de biomasa                   | Captación del metal (mmol/g) | Referencia                            |
|-------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Ag    | Algas de agua dulce <sup>a</sup>  | 0.8-0.87                     | Brierley y Vance, (1988)              |
|       | <i>R. oryzae</i>                  | 0.5                          | Tobin <i>et al.</i> , (1984)          |
|       | <i>Streptomyces noursei</i>       | 0.35                         | Mattuschka <i>et al.</i> , (1993)     |
|       | <i>M. xanthus</i>                 | 0.44                         | Merroun <i>et al.</i> , (2001)        |
| Cd    | <i>Ascophyllum nodosum</i>        | 1.91                         | Holan <i>et al.</i> , (1993)          |
|       | <i>R. oryzae</i>                  | 0.26                         | Tobin <i>et al.</i> , (1984)          |
|       | <i>R. stolonifer</i>              | 0.17                         | Holan y Volesky, (1995)               |
|       | <i>M. xanthus</i>                 | 0.38                         | Merroun, (1998)                       |
| Co    | <i>Ascophyllum nodosum</i>        | 1.69                         | Kuyucak y Volesky, (1989)             |
|       | <i>S. cerevisiae</i>              | 0.08                         | Brady y Duncan, (1993)                |
|       | <i>M. xanthus</i>                 | 0.22                         | Merroun, (1998)                       |
| Cr    | <i>R. oryzae</i>                  | 0.59                         | Tobin <i>et al.</i> , (1984)          |
|       | <i>M. xanthus</i>                 | 0.26                         | Merroun, (1998)                       |
| Mn    | <i>R. oryzae</i>                  | 0.22                         | Tobin <i>et al.</i> , (1984)          |
|       | <i>M. xanthus</i>                 | 0.70                         | Merroun, (1998)                       |
| Pb    | <i>Absidia orchidis</i>           | 1.69                         | Holan y Volesky, (1995)               |
|       | <i>Sargasum natans</i>            | 1.06-1.30                    | Holan y Volesky, (1994)               |
|       | <i>R. oryzae</i>                  | 0.44                         | Tobin <i>et al.</i> , (1984)          |
|       | <i>M. xanthus</i>                 | 1.28                         | Merroun <i>et al.</i> , (1998)        |
| U     | <i>Streptomyces longwoodensis</i> | 1.84                         | Friis y Myers-Keith, (1986)           |
|       | <i>R. oryzae</i>                  | 0.92                         | Tobin <i>et al.</i> , (1984)          |
|       | <i>S. cerevisiae</i> <sup>b</sup> | 0.23-0.63                    | Volesky y May-Phillips, (1995)        |
|       | <i>S. cerevisiae</i> <sup>b</sup> | 2.40                         | Ben Omar <i>et al.</i> , (1996)       |
|       | <i>M. xanthus</i>                 | 2.40                         | González-Muñoz <i>et al.</i> , (1997) |
| Zn    | <i>R. arrhizus</i>                | 0.30                         | Tobin <i>et al.</i> , (1984)          |
|       | <i>M. xanthus</i>                 | 0.39                         | Merroun, (1998)                       |

<sup>a</sup> La biomasa no, necesariamente, en estado natural

<sup>b</sup> Subproducto de procesos industriales

En medio CT sólido, el crecimiento de la cepa 422 de *M. xanthus* se vio inhibido a partir de la concentración de 0,5mM de plata; por ello, de los metales ensayados, éste se considera el más tóxico para esta bacteria, hecho que está de acuerdo con el comportamiento general de las bacterias frente a este metal (Nies, 1999; Goddard y Bull, 1989; Bragg y Rainnie, 1974, Silver y Misra, 1988). El cromo, cobre y lantano inhiben a *M. xanthus* a la concentración de 2,5mM, mientras que para el uranio y el plomo la concentración mínima inhibitoria es de 10mM. El manganeso fue el menos tóxico de todos los ensayados, y no inhibe el crecimiento hasta la concentración de 20mM. Así que, el orden de toxicidad de los metales pesados ensayados, en medio sólido, para *M. xanthus* 422 fue el siguiente: Ag > Co >



Cr = Cu = La > U = Pb > Mn. En cuanto al estudio de la toxicidad de estos metales frente a *M. xanthus* 422 en cultivos líquidos (medio CT), la respuesta de la bacteria a las diferentes concentraciones de los metales (Ag, Co, Cr, Cu, U) fueron mostradas en las figuras (12, 13, 14, 15, 16). El orden de toxicidad de los metales para esta bacteria en medio líquido está de acuerdo con el encontrado en medio sólido, (Ag > Co > Cr = Cu > U), aunque las concentraciones inhibitorias en medio sólido fueron más altas que las que ejercían este efecto en medio líquido. Las concentraciones mínimas inhibitorias para cultivos en medio sólido presentaron un efecto bactericida cuando se empleaban en medio líquido en todos los casos salvo en el del uranio. Para este radionucleido la concentración 10mM no tiene ningún efecto aparente sobre *M. xanthus* cuando se cultiva en medio líquido.

Si se observan las curvas de crecimiento de *M. xanthus* en presencia de los metales ensayados, se puede deducir que esta mixobacteria puede tolerar altos niveles de metales pesados. No obstante, existe una disminución general en el crecimiento en relación con el incremento de la concentración del metal; en unos casos se observa menor densidad celular (con cromo a 0,5mM y 1mM) y en otros, aunque se llega a alcanzar la densidad del testigo, la pendiente de la fase exponencial de crecimiento es menor como con cobalto (0,1mM) y con cobre (0,5mM y 1mM), lo que indica que el metal presente induce que se produzca un alargamiento del tiempo de generación.

De acuerdo con estos datos, y teniendo en cuenta la bibliografía existente, se puede decir que *M. xanthus* ha demostrado altos niveles de tolerancia a los metales pesados. De hecho, estos niveles de tolerancia son considerablemente parecidos o mayores que los de otras bacterias considerados ya elevados por los respectivos autores, como es el caso de *B. circulans* (Yilmaz, 2003), *E. coli* (Nies, 1999) y *B. thuringiensis*, *Streptococcus sp.*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. paucimobilis*, entre otros (Hassen *et al.*, 1998b). No obstante lo dicho, y a pesar de existir muchos estudios sobre la tolerancia de los metales por bacterias, es difícil hacer una comparación exhaustiva y significativa con los numerosos datos recogidos en la



literatura al respecto, por causa de la diversidad de los medios de crecimiento y de las condiciones de incubación ensayadas.

Un hecho destacable es el distinto nivel de tolerancia de *M. xanthus* 422, a los metales ensayados, en medios líquidos y sólidos. La aparente mayor tolerancia en medios sólidos puede ser una consecuencia de la captación de estos metales por el agar-agar utilizado para la gelificación de estos medios. Este polisacárido, obtenido de algas marinas, posiblemente tiene esta capacidad, como se ha descrito en general para estos componentes de diversos tipos de algas (Holan y Volesky, 1994; 1995; Percival y McDowell, 1967; Majidi *et al.*, 1990; Unz y Shuttleworth, 1996). De hecho, algunos autores, como Hassen *et al.* (1998), ya han indicado que posiblemente los niveles de tolerancia o toxicidad de metales para microorganismos, que se están citando en la amplia bibliografía que sobre este tema existe, no sean correctos. Esta afirmación la hacen en base a la fijación o complejación de metales por los compuestos orgánicos que se emplean habitualmente en la preparación de medios de cultivo (extracto de levadura, peptonas, polisacáridos, entre otros). Este es un problema que convendría afrontar en un futuro, pero que de momento no parece tener fácil solución.

El caso llamativo del diferente comportamiento del uranilo, que como se ha dicho y queda recogido en los Resultados, presenta mayor toxicidad cuando la bacteria se cultiva en medio sólido que en medio líquido, podría derivar del hecho de que *M. xanthus* 422 presenta una notable mayor producción de polisacárido extracelular en cultivos líquidos. Estudios precedentes sobre la bioadsorción de uranilo por biomasa húmeda no proliferante de esta bacteria pusieron de manifiesto, de una parte, que se comporta como una de las biomasas más eficientes en esta bioadsorción y, de otra, que el uranilo bioadsorbido se fija fundamentalmente en el polisacárido extracelular (González-Muñoz *et al.*, 1997). Esto podría significar que, en medio líquido, una gran cantidad del uranilo quedaría ligado al mencionado polisacárido y por lo tanto la concentración del radionucleido libre, en las concentraciones ensayadas, no alcanzaría el nivel de toxicidad necesario para inhibir o matar al microorganismo.



Una vez conocidas las concentraciones mínimas inhibitorias de los diferentes metales ensayados sobre el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* 422, se pasó a desarrollar el estudio de la influencia de algunos de estos metales sobre el ciclo de desarrollo, de acuerdo con los objetivos propuestos para esta memoria. Esta investigación tenía como finalidad estudiar el comportamiento de distintas cepas de *M. xanthus* en presencia de varios metales, y observar los diferentes efectos de estos sobre el crecimiento, el movimiento, la pigmentación y también sobre la formación de cuerpos fructificantes por las cepas capaces de producirlos. Para ello se han utilizado la cepa salvaje 422 y las cepas mutantes *DZF1*, *frz*, *csgA*, *dsp* y *mgl* (cuyas características fueron descritos en Material y Métodos) en los medios de cultivo sólidos CYE y TPM, a los que se adicionó cada uno de los metales plata, cobalto, cromo, cobre y manganeso, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado correspondiente. Además, la cepa 422 fue ensayada, también, en presencia de uranio, plomo y lantano. Para todos estos ensayos se utilizaron dos concentraciones para cada uno de los metales: una concentración correspondía a la que se había manifestado como mínima inhibitoria para la cepa 422 en medio CTA sólido y otra concentración más baja. El medio CYE se utilizó para el estudio del crecimiento y movilidad y el medio TPM para el seguimiento de la agregación celular y la formación de cuerpos fructificantes. Los resultados obtenidos están presentados en las Figuras 17 a 30, en el apartado correspondiente.

Este estudio demostró que la velocidad y densidad de crecimiento, el movimiento y las etapas del desarrollo de las cepas de *M. xanthus* se alteran por la presencia de los metales. Así, en presencia de lantano, plomo, uranio y manganeso se muestra una inhibición total del movimiento celular de la cepa 422 con las dos concentraciones ensayadas, mientras que con cobre y cromo sólo se observa este efecto con la concentración más alta. Además, la velocidad de crecimiento de la cepa 422 se reduce por la presencia de lantano, plomo, uranio y cromo. Este último metal reduce la velocidad de crecimiento de todas las cepas cuando se utilizó a la concentración más alta (2,5mM). El crecimiento y el movimiento de todas las cepas se inhibe completamente con la concentración más alta de plata. Estos resultados



muestran diferentes efectos de los metales sobre la biología de estos microorganismos que ponen de manifiesto diferentes aspectos de su toxicidad. No obstante, como se discutirá más adelante, para algunas cepas mutantes, la presencia de alguno de ellos a ciertas concentraciones, puede resultar positiva en ciertos aspectos.

En relación a la toxicidad de los metales pesados, diversos investigadores han demostrado que la toxicidad sobre los microorganismos se expresa, por un lado, por la alteración del balance iónico de la membrana plasmática lo que ocasiona la salida de iones como el potasio o el magnesio necesarios para la mayoría de las funciones fisiológicas de las células. Por otro lado, se produce la alteración del balance iónico a nivel del citoplasma, lo que genera una inhibición del crecimiento por el bloqueo de la división celular, y alteraciones metabólicas como en el caso de las reacciones enzimáticas de la cadena respiratoria (Loveley, 1991). Un estudio sobre el efecto de la plata sobre *E. coli* ha demostrado que este metal inhibe el transporte del succinato dentro de las vesículas de la membrana. Esta inhibición se ha situado a nivel de la interacción del sustrato con la cadena respiratoria y la flavoproteína. Además, se ha demostrado que los iones de plata actúan sobre la oxidación de los sustratos de la cadena respiratoria de *E. coli*, de manera que una concentración de 86 $\mu$ M de plata inhibe rápidamente la oxidación de glucosa, glicerol, fumarato y el D-lactato (Bragg y Rainnie, 1974).

Como se ha dicho más arriba, de acuerdo con los resultados obtenidos, el movimiento de la cepa salvaje y de algunos mutantes de *M. xanthus* se inhibe por la presencia de los metales pesados. La movilidad en *M. xanthus* está controlada por dos diferentes grupos de genes, un grupo para el movimiento social (sistema S) el cual está relacionado con la presencia de los pili, y el otro grupo asociado con el movimiento aventurero (sistema A), que controla el movimiento de las células individuales (Hodgkin y Kaiser, 1979a y b; Kaiser, 2003). El mecanismo macromolecular de este tipo de movimiento celular permanece todavía enigmático. Se han propuesto varios modelos en los cuales se ofrecen diversas soluciones mecano-macromoleculares y físico-químicas de cómo se lleva a cabo el movimiento



bacteriano por deslizamiento. A partir de la bibliografía existente sobre este tema, se puede deducir que este tipo de movimiento es un fenómeno bastante complejo, y según varias hipótesis está basado e influido por:

- Un aparato intrínseco para el trabajo mecánico (Burchard *et al.*, 1977; Pate y Chang, 1979; Lünsdorf y Reichenbach, 1989; Kaiser, 2003)
- Matriz extracelular para el soporte de movilidad (Humphrey *et al.*, 1979; Sutherland y Thomson, 1975; Sutherland, 1979; Gorski *et al.*, 1993)
- Componentes de la membrana externa (Gorski *et al.*, 1992; Abbanat *et al.*, 1986)
- Componentes activos de la superficie celular (keller *et al.*, 1983)

Como con la movilidad flagelar, el movimiento de la mayoría de las bacterias deslizantes parece ser accionado más por el potencial de membrana que directamente por ATP. Pero no está tan claro que la fuerza conductora del movimiento de las mixobacterias sea el potencial de membrana (Burchard, 1981; 1984). Se ha descrito que el deslizamiento de *M. xanthus* es inhibido por los desacopladores del gradiente de protones (Burchard, 1981), pero que este efecto se revertía por adición de piruvato. El movimiento también es inhibido por el arsenato, el cuál no debe actuar como disipador del gradiente de potencial electroquímico de la membrana (McBride *et al.*, 1993). Parece que la movilidad en grupo requiere la síntesis de proteínas, pero no la movilidad individual. La razón por la cuál los inhibidores de la síntesis de proteínas limitan la movilidad en el sistema S no está clara. Podría ser que las proteínas que son requeridas para la movilidad S no estén presentes durante el crecimiento bacteriano en suspensión, o bien que estén presentes, pero se pierdan fácilmente durante el deslizamiento (Womack *et al.*, 1989).

Este tipo de movilidad se inhibe tanto por los inhibidores del transporte de electrones (Ridgway, 1977; Lünsdorf y Schairer, 2001) como por los inhibidores de la cadena respiratoria (Lünsdorf y Schairer, 2001). Los efectos tóxicos de los metales pesados incluyen desplazamiento de iones y/o sustitución de iones esenciales de sus lugares celulares y bloqueo de los grupos funcionales de importantes moléculas, por ejemplo: enzimas, polinucleótidos, y sistemas de transporte de nutrientes esenciales



(Nies, 1999). Esto se traduce en la desnaturalización e inactivación de enzimas y rotura de la integridad de la membrana celular (Gadd, 1993; Ochiai, 1987). Por su capacidad de formar componentes complejos, algunos metales pesados como Mn, Cu, o Co juegan un papel importante como elementos traza esenciales, pero, ya sean esenciales o no, la mayoría de los metales pesados son tóxicos a altas concentraciones (Nies, 1999; Sani *et al.*, 2001).

Además del efecto ejercido por los metales sobre el crecimiento y el movimiento, se observó un efecto de intensa pigmentación inducida por la presencia de la mayoría de los metales probados sobre todas las cepas de *M. xanthus*. Está muy bien documentado que *M. xanthus* se caracteriza por la presencia de pigmentos de tipo carotenoide en la membrana citoplásmica que son responsables de la coloración de las colonias y de los cuerpos fructificantes (Kleining *et al.*, 1970; Reichenbach y Kleinig, 1971; Kleinig, 1972). Estos componentes parecen tener la función de proteger las células de los daños de la fotooxidación (Arias y Montoya, 1982). Probablemente los metales pesados alteran o estimulan alguna ruta del metabolismo de producción de estos pigmentos induciendo su alta biosíntesis. Hassen *et al.*, (1998b) demostraron que los metales inducen una intensa biosíntesis de pigmentos (pioverdina y piocianina) en *P. aeruginosa*. También podría ocurrir que esta intensa producción de pigmentos por *M. xanthus* en presencia de plomo, lantano, uranio, cobre y manganeso sea una forma de defensa frente a estos metales; por ejemplo, porque sean capaces de unirse a los mismos y de esta forma, mediante su inmovilización tratar de evitar su efecto tóxico. Sería interesante, para investigaciones futuras, llevar a cabo la extracción de estos pigmentos y estudiar su afinidad o apetencia por los mencionados metales.

En relación con la agregación celular, paso previo para la formación de cuerpos fructificantes, salvo el cromo y el manganeso parece que los demás metales ensayados inhiben la agregación y/o la formación de los cuerpos fructificantes de las cepas de *M. xanthus*. Sin embargo, con el manganeso, parece que los filamentos zigzagueantes formados por la cepa *frz* en el medio pobre de nutrientes (TPM), toman la forma de los cuerpos fructificantes característicos de la cepa salvaje, lo que



indicaría que el manganeso estimula la formación de los cuerpos fructificantes por esta cepa. La cepa *frz* ha perdido el control del movimiento y cuando las células se agregan, en lugar de culminar el proceso con la formación de cuerpos fructificantes, forman filamentos zigzagueantes. Estos hechos permiten suponer que probablemente el manganeso tenga algún efecto que ayudaría a las células a moverse de forma organizada llevándolas a formar cuerpos fructificantes en lugar de filamentos desorganizados. El manganeso a bajas concentraciones es un ión nutricional necesario para llevar a cabo varias funciones fisiológicas, se transporta hacia el interior de la célula por el mismo sistema de transporte del magnesio que es otro ión necesario para el funcionamiento de muchos procesos. De hecho, entre estos dos iones existe una alta competición por los lugares de unión funcionales (Hughes y Poole, 1989).

El análisis de la secuencia de proteínas codificadas por el gen *frz* ha demostrado que existe una extraña homología con las proteínas de quimiotaxia de las bacterias entéricas (McBride *et al.*, 1989), y se ha puesto de manifiesto que los genes *frz* constituyen la vía de transducción de señales que controla la frecuencia a la cual las células cambian su dirección de deslizamiento. Se ha demostrado también que Frz E, una de las proteínas producidas por el gen *frz*, es homóloga de las proteínas Che A y Che Y de *Salmonella typhimurium* (McCleary y Zuzman, 1990). Estos últimos componentes se autofosforilan y transfieren el grupo fosfato al componente efector permitiendo la interacción directa con el mecanismo "switch" del cuerpo basal flagelar (Bourret *et al.*, 1990). Lo mismo ocurre con la proteína Frz E, cuya fosforilación hace llegar la información entre la proteína señal Frz CD y el motor del deslizamiento (McCleary y Zuzman, 1990). La transferencia del grupo fosfato de un componente a otro se lleva a cabo por la fijación de metales bivalentes como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , y  $Mn^{2+}$  entre otros (Kar *et al.*, 1992), por lo tanto la presencia de estos iones es necesaria para el cumplimiento de este proceso por las proteínas. Esto podría explicar el efecto del manganeso sobre la cepa *frz* que permite formar cuerpos fructificantes como los de la cepa salvaje.



Con la cepa *dsp* se observa un efecto curioso de los metales sobre la formación de los cuerpos fructificantes. Esta cepa es un mutante que ha perdido la capacidad de producir fibrillas extracelulares, lo que hace que se bloquee en el estado de la agregación celular y no puede llegar a formar cuerpos fructificantes. La investigación llevada a cabo para esta memoria ha puesto de manifiesto que esta mutación se ve afectada por la presencia de los metales, y sobretodo por el cromo, cobalto y manganeso que la inducen a la formación de cuerpos fructificantes. Esto podría explicarse por el hecho de que los metales estimularían o completarían algún proceso del mecanismo que lleva a las células del estado de agregación al estado de fructificación. Behmlander y Dworkin (1994a y b) y Chang y Dworkin (1994) demostraron que la cohesión entre las células y el desarrollo celular en los mutantes *dsp* se recuperan por la adición de fibrillas extracelulares. Parece que estas fibrillas tienen algún papel en la interacción entre las células, estableciendo puentes físicos entre ellas y manteniendo así el contacto célula-célula. Estas fibrillas servirían de antenas táctiles con las cuales las células controlan sus proximidades.

Otros investigadores demostraron que las fibrillas pueden participar en el intercambio de señales entre las células (Shimkets y Rafiee, 1990). En la cepa salvaje la respuesta a las fibrillas está mediada por unos receptores en la membrana celular, los cuales cuando están ocupados se transmite una señal desde una célula a otra más cercana y se manifiesta por tanto el comportamiento social llevando las células a completar su diferenciación (Chang y Dworkin, 1996). Los metales podrían tener un efecto similar sobre la cepa *dsp* procediendo a ocupar los receptores de las fibrillas dando así una señal "falsa" entre las células y permitiendo por tanto que la cepa mutante se comporte como una cepa salvaje llegando a la formación de los cuerpos fructificantes. Posiblemente los metales juegan el papel de ligandos que permiten la cohesión celular, algo similar a lo que le ocurre a esta cepa en presencia de la salvaje. Las células *dsp* pueden desarrollar cuerpos fructificantes cuando se cultivan en presencia de cepas cohesivas de *M. xanthus*. Parece que este contacto permite restaurar las características del desarrollo de estas cepas que pasan de deslizarse de una manera desorganizada a otra organizada. Posiblemente la presencia de la cepa



cohesiva ayuda a las células *dsp* a enfocar su movimiento hacia la formación de los cuerpos fructificantes (Shimkets, 1986a y b).

Teniendo en cuenta que las Mixobacterias son bacterias típicas y abundantes en el suelo, de todo lo discutido en este apartado se deduce que la contaminación de su hábitat por metales pesados tiene importantes efectos sobre su vida. Estos efectos se podrían resumir en dos categorías: por una parte un indudable efecto negativo sobre su crecimiento y movilidad; pero por otra parte, la presencia de algunos de ellos en ciertas cantidades podrían tener algunos efectos positivos, como ayudarles a una mejor defensa del efecto fotooxidante de la luz (por incremento en la producción de pigmentos protectores), o evitar la extinción de ciertos mutantes que, habiendo perdido la capacidad de formar cuerpos fructificantes, no podrían responder a las condiciones de escasez de nutrientes e incluso, en algunos casos provocar la selección de ciertos mutantes (como sería el caso de los del tipo de la cepa *dsp*) frente a la cepa silvestre. En resumen, el efecto de los metales pesados sobre *M. xanthus* va más allá del efecto meramente tóxico.

#### **ABSORCIÓN DE PLATA POR CÉLULAS PROLIFERANTES DE *M. xanthus***

Los microorganismos son capaces de acumular metales tóxicos, pudiendo extraerlos, concentrarlos y recuperarlos de corrientes acuosas y, por consecuencia, reducir la carga contaminante (Avery *et al.*, 1996; Brierley, 1990; Hutchins *et al.*, 1986; Paker *et al.*, 1998; Shumate y Strandberg, 1985). Ello ha hecho que cada día sea mayor el interés por las interacciones metal-microorganismo, especialmente en sus aspectos bioquímicos, toxicológicos, ambientales e industriales (Beveridge *et al.*, 1997).

Las bacterias han desarrollado estrategias variadas de resistencia a los metales tóxicos con los que interaccionan normalmente en el medio ambiente (Mullen *et al.*, 1989). Los mecanismos de tolerancia incluyen la precipitación extracelular, secuestro por las envueltas celulares y acumulación intracelular (Vargas *et al.*, 1998).



Los métodos biológicos desarrollados para la recuperación de metales pesados desde efluentes líquidos presentan potencialmente varias ventajas. Los procesos de acumulación de los metales pesados por microorganismos o biomasa microbiana son conocidos o agrupados bajo el término general "bioadsorción". Los mecanismos de bioadsorción pueden implicar la captación y acumulación intracelular, vía sistemas activos de transporte catiónico, unión a la superficie o algunos mecanismos indefinidos (Gadd, 1990). Las características químicas y biológicas de estos procesos de captación son importantes, no sólo para ayudar a la comprensión del papel de los iones metálicos en las funciones básicas celulares sino también para ayudar en la detoxificación de los efluentes industriales mediante el uso potencial de biomasa microbiana (Yilmaz, 2003).

Los ejemplos más comunes de elementos tóxicos son cadmio, mercurio, talio, estaño, plomo y arsénico (Hughes y Poole, 1989). En este contexto la plata es la menos conocida, pero probablemente es el elemento más tóxico para los microorganismos (Albright *et al.*, 1972), causando cambios en la fisiología y la bioquímica de la célula (Goddard y Bull, 1989). A pesar de su toxicidad la plata se utiliza en tratamientos clínicos de quemaduras (Klasen, 2000), y en la desinfección de los sistemas de agua (Yahya *et al.*, 1990). Sin embargo, esta toxicidad puede disminuir por la formación de complejos con iones cloruro y sulfuro (Slawson *et al.*, 1994). Gadd *et al.*, (1989) demostraron que la toxicidad de la plata para *P. stutzeri* AG 259 depende considerablemente de la presencia de NaCl en el medio porque reduce la disponibilidad de  $\text{Ag}^+$  al provocar la precipitación de AgCl. Además, los cationes de plata, como el mercurio y el plomo, se unen firmemente a las proteínas y ácidos nucleicos, particularmente a los residuos de cisteína-SH, a los grupos amino, imidazol, carboxilo y fosfato formando complejos insolubles con RNA y DNA celular, y pueden precipitar también con algunos aniones biológicamente importantes.

Los investigadores que han trabajado con diversos microorganismos en la bioadsorción de plata se pueden dividir en dos grupos de diferentes opiniones. En un



grupo, los que sostienen que los niveles de bioadsorción son más altos cuando se trabaja con cepas microbianas que presentan un elevado grado de resistencia a la toxicidad de la plata (Pümpel y Schinner, 1986). El otro grupo afirma que la capacidad de bioadsorción microbiana no depende de la resistencia microbiana a la plata (Ghandour *et al.*, 1988).

Estudios previos llevados a cabo con *M. xanthus* pusieron de manifiesto que la biomasa no proliferante acumulaba una buena cantidad de plata y que esta se localizaba fundamentalmente en el polisacárido extracelular, en la pared y en el interior de la célula, siendo estos acúmulos de naturaleza cristalina, identificados como clorargirita (Merroun *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta estos resultados se propuso, para esta memoria, el estudio de la captación de plata por células proliferantes, y como el mencionado trabajo previo se había realizado con la cepa 422, se decidió utilizar la misma cepa. Por otra parte, y considerando la posibilidad de que la opinión del primer grupo de investigadores citados en el párrafo precedente pueda corresponderse con la realidad, y a fin de conseguir mejores resultados, los experimentos se diseñaron como se indica en Material y Métodos (apartado 5.1.1). De esta forma se pretendía seleccionar una población de la bacteria que hubiese desarrollado una cierta resistencia a este metal tóxico o que se hubiese adaptado a vivir en su presencia.

Efectivamente, como quedó indicado en Resultados, cuando la mixobacteria se cultivaba previamente en medio sólido con una concentración de plata 0,1mM, era posible conseguir que la población bacteriana crecida en estas condiciones desarrollara su crecimiento en medio líquido con una concentración de plata de 0,1mM y en medio sólido hasta una concentración de 0,5mM. Esto no ocurría si se intentaba el crecimiento en estas condiciones a partir de un inóculo crecido en medio CT. Estos resultados ponen también de manifiesto lo que se ha comprobado con los otros metales ensayados (salvo para el uranio, como se ha indicado más arriba), y es el hecho de la mayor sensibilidad al metal en medio líquido que en medio sólido. La explicación sería la misma que se ha dado en los casos anteriores.



Como se ha indicado en Material y Métodos, los cultivos utilizados para el estudio de la localización de la plata bioadsorbida por la bacteria fueron precisamente estos cultivos seleccionados con una mayor resistencia a la plata que el cultivo de partida. Y de acuerdo con los resultados, la observación de la biomasa de *M. xanthus* por MET, confirma que la acumulación tuvo lugar en forma de un precipitado alrededor de la pared celular microbiana ligado al EPS, o bien como acúmulos intracelulares densos a los electrones, tanto a nivel de la pared celular como en el citoplasma. La aparición de los precipitados ligados al EPS eran característicos de los cultivos en medio líquido, mientras que los acúmulos a nivel de la pared o en el citoplasma lo eran de las células cultivadas en medio sólido.

La presencia de la plata en el EPS de las células de *M. xanthus* cuando se cultiva en el medio líquido puede indicar que quizá el EPS protege a las células de *M. xanthus* provocando la acumulación del metal alrededor de la célula y a una cierta distancia de la misma, más que dentro de ella. Por lo tanto, aunque esté el metal fijado, se localizaría a una distancia suficiente de la pared celular para limitar un posible daño. Britton y Freihofer (1978) demostraron que las cepas de *Klebsiella aerogenes* sobrevivieron mejor en soluciones de cadmio cuando secretaron el exopolisacárido alrededor de la célula. Esto apoyaría la hipótesis expuesta aquí.

Por otra parte, la presencia de acúmulos de plata en el citoplasma, puede indicar que esta bacteria utiliza al menos dos mecanismos para la bioadsorción de la plata: primero, el metal se une a la superficie celular y al EPS, y luego se llevaría a cabo el proceso de acumulación intracelular, para la plata que alcanzase a entrar dentro de la célula, en puntos concretos y localizados posiblemente de manera que se minimizaran los efectos adversos que su presencia provocaría.

Otros autores han encontrado precipitados de plata alrededor de las células de *C. albicans* (Kierans *et al.*, 1991), y en la pared celular y en el citoplasma de *S. cerevisiae* (Simmons y Singleton, 1996), cuando estos microorganismos se cultivaron en presencia de plata.



Teniendo en cuenta, por una parte, que en un trabajo anterior (citado al principio de este apartado) realizado con biomasa no proliferante de *M. xanthus* se encontró que este microorganismo podía acumular hasta 0,44 mmoles Ag/g de biomasa (Merroun *et al.*, 2001), y, por otra, los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que se ha encontrado un número más alto de cuerpos densos a los electrones de plata cuando se utilizó un cultivo de *M. xanthus* previamente cultivado en 0,1mM de plata, podría ser interesante determinar si la biomasa no proliferante de esta población así seleccionada, puede o no acumular más plata que la biomasa no proliferante de la cepa original de *M. xanthus*. Este estudio que se propone tendría dos utilidades diferentes: por una parte podría dar luz sobre las hipótesis que se barajan, mencionadas más arriba, en relación con la mayor capacidad de acumulación de metales pesados por los microorganismos más resistentes. Por otra, podría indicar si se puede obtener una biomasa más eficiente de *M. xanthus* que la utilizada por Merroun *et al.*, (2001) para la eliminación de plata de afluentes contaminados por este metal. Otra investigación de interés sería determinar la naturaleza de los cuerpos, densos a los electrones, intracelulares detectados en esta memoria, a fin de conocer si se trata de clorargirita como ocurre en el caso de la plata intracelular acumulada por la biomasa no proliferante. Esto podría dar luz sobre el mecanismo, o mecanismos, por los que la plata es acumulada en el interior de las células.

#### **NATURALEZA DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DE *M. xanthus* IMPLICADOS EN LA BIOABSORCIÓN DE URANIO**

La recuperación del uranio de sistemas acuáticos, especialmente, de efluentes industriales y mineros, representa un estudio interesante para la remediación de la contaminación ambiental. El uso de células microbianas como bioabsorbente de uranio recibió una atención especial de varios grupos de investigadores en los años 1970s y principios de los 1980s. La mayoría de estos estudios se restringieron a la captación de los metales por algas de aguas dulces y marinas. Pero más recientemente, el uso potencial de otros microorganismos ha sido también considerado. Los resultados de estos estudios fueron diferentes en función de los



microorganismos y las condiciones ambientales usadas (Volesky y Holan 1995; Yang y Volesky, 1999; Merroun y Selenska-Pobell, 2001). Los microorganismos vivos o muertos poseen abundantes grupos funcionales, tales como los carboxilos, hidroxilos y fosfatos sobre su superficie que fijan los iones metálicos. En las bacterias Gram-negativas, las capas del lipopolisaccárido pueden ser altamente aniónicas y se extienden mas allá de las proteínas de la membrana externa; estas capas han sido implicadas como la mayor fuente de fijación de los metales en este grupo de bacterias (Beveridge y Koval, 1981; Ferris y Beveridge, 1984).

Trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio, dedicados a examinar la capacidad de acumular uranio por la biomasa no proliferante de *M. xanthus* a fin de verificar el posible uso biotecnológico de esta bacteria para su recuperación de aguas contaminadas, pusieron de manifiesto que la biomasa seca es mejor bioadsorbente que la húmeda, siendo capaz de acumular hasta 2,4mM de uranio/g. Igualmente se comprobó que para las concentraciones de uranio comprendidas entre 0,1 y 0,3mM se puede eliminar de la solución entre 95,79% y el 95,99%. Estos estudios demostraron, además, que la bioadsorción por biomasa, tanto seca como no proliferante es un proceso relativamente rápido, alcanzándose el equilibrio entre los primeros 5 y 10 minutos, que esta bioadsorción se afecta por el pH, siendo más efectiva a pH 4,5 y que la localización celular del uranio, una vez bioadsorbido, es fundamentalmente a nivel de la pared celular y del mucopolisacárido extracelular característico de esta bacteria (González Muñoz *et al.*, 1997).

Teniendo en cuenta los estudios que se están llevando a cabo con diversas bacterias en el Instituto de Radioquímica del centro de investigación de Rossendorf, Dresden (Alemania), centro con el que nuestro grupo de investigación mantiene algunas colaboraciones, y los datos mencionados en el párrafo precedente, pareció (como se ha indicado en los objetivos de este trabajo) de interés determinar qué grupos funcionales son los implicados en la fijación del uranio por *M. xanthus* y cuales son los parámetros estructurales de los complejos formados. En este sentido se han usado métodos físicos tal como la espectroscopía por infrarrojos (IRS) y



espectroscopía por absorción de rayos X para estructuras finas (EXAFS) con el fin de obtener información estructural sobre la naturaleza de los complejos de uranio formados por *M. xanthus*.

Usando la espectroscopía por infrarrojos se ha encontrado que los grupos fosfato son los lugares de unión principales para la fijación del uranio por *M. xanthus*. De hecho, los iones metálicos están clasificados por sus lugares de unión preferidos, especialmente si lo hacen a ligandos conteniendo O-, N- o S-. Pearson (1963) clasificó los iones metálicos en ácidos duros (aceptores de oxígeno) y ácidos suaves (aceptores de nitrógeno y de azufre). Posteriormente, Nieboer y Richardson (1980) propusieron una tercera clase (frontera) definida por su comportamiento intermedio entre esos grupos, según las condiciones.

El uranio, en la forma de  $UO^{2+}$ , está clasificado en el grupo de los ácidos duros y tiene afinidad para unirse a los grupos carboxilato, fosfato, carbonilo y fosfodiéster. La implicación de los grupos fosfato de las bacterias en la fijación del uranio está muy bien documentada. Muchos estudios, usando la resonancia magnética nuclear  $^{31}P$  (RMN) sugieren que los grupos fosfato juegan un papel importante en la bioabsorción del uranio (Andres *et al.*, 1994; 1995). Además de los ligandos fosfato liberados por la fosfatasa ácida de la célula, que precipitan con los iones uranilo, se ha demostrado, sobre la base de la RMN  $^{31}P$ , que los grupos fosfato del lípido A, componente extracelular del lipopolisaccárido de *Citrobacter sp.*, están implicados en la formación de las nucleaciones de los depósitos del fosfato de uranilo (Macaskie *et al.*, 2000). Ferris y Beveridge (1986) demostraron que los residuos fosforilo de las cabezas polares de los fosfolípidos y del lipopolisaccárido de la membrana externa de *E. coli K-12* fueron los lugares de fijación más probables para los cationes metálicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, y presentados en el apartado 2 del Capítulo II de Resultados, han permitido, mediante la comparación de los espectros de infrarrojos obtenidos de la biomasa de *M. xanthus* con y sin uranilo, y mediante las sustracciones de los espectros de infrarrojos correspondientes, confirmar la



implicación de los grupos fosfato en la complejación del uranio. Resultados similares fueron encontrados por Merroun *et al.*, (2003a), que demostraron que los grupos fosfato eran los implicados en la formación de los complejos de uranio por tres eco-tipos de *A. ferrooxidans*.

Por espectroscopia XANES (datos no presentados) se ha demostrado que el U (VI) es el estado de oxidación del uranio formado como resultado de la interacción de este con las células. Por lo tanto el mecanismo de interacción de *M. xanthus* con el uranio excluye su reducción por esta bacteria.

Por otra parte, la distancia de enlace U-Oeq<sub>1</sub> ( $2,28-2,31 \pm 0,02 \text{ \AA}$ ) de los complejos de uranio formados por esta bacteria a pH 2 y 4,5 es similar a los valores descritos para los átomos de oxígeno de los fosfatos unidos al uranio en el caso de *A. ferrooxidans* W1 (Merroun *et al.*, 2003b) y *Bacillus sphaericus* JG-A12 (Kelly *et al.*, 2002).

La distancia del enlace U-P en las dos muestras, obtenidas mediante tratamiento a pH 2 y 4,5 ( $3,58$  y  $3,60 \pm 0,02 \text{ \AA}$ ) es similar a los valores descritos anteriormente para el enlace de los fosfatos al uranio formados por las tres eco-tipos de *A. ferrooxidans* a los pH 2 y 4,5 (Merroun *et al.*, 2003b; Hennig *et al.*, 2001). Esta distancia es típica del modo monodentado del enlace de uranio con los fosfatos (Hennig *et al.*, 2001).

Por lo tanto los fosfatos están implicados en la interacción del uranio con las células de *M. xanthus* tanto a pH 2 como a pH 4,5; sin embargo, el mecanismo de interacción es diferente ya que los espectros EXAFS de las dos muestras son diferentes. Las diferencias que existen entre los dos espectros son:

- 1.- El espectro correspondiente a pH 4,5 contiene un pico a  $5,19 \pm 0,02 \text{ \AA}$ , ausente en el espectro a pH 2, que corresponde a la presencia del enlace U-U que se encuentra también en el espectro de la meta-autunita. Por lo tanto, los fosfatos que interaccionan con el uranio a pH 4,5 son de tipo inorgánicos. La pregunta es la



siguiente: ¿Cual es el origen de estos fosfatos inorgánicos? En *M. xanthus*, durante el crecimiento vegetativo se liberan las fosfatasas ácida y alcalina en el medio líquido (González *et al.*, 1991). La actividad de ambas enzimas aumentó en presencia de arsénico y cobre (González *et al.*, 1989). Se sabe bien que *M. xanthus* posee fosfatasa ácida unida a las membranas de la célula, estas enzimas hidrolizan los fosfolípidos u otros compuestos de la membrana que contienen fosfatos y liberan a los fosfatos inorgánicos. Estos últimos podrían precipitar el uranilo en forma de meta-autunita. El análisis por TEM del uranio acumulado por esta bacteria ha demostrado que a pH 4,5 este metal se localiza tanto a nivel de la pared celular como en el polisacárido extracelular en forma de microagujas (Merroun, 1998). Sería de interés estudiar estas microagujas y ver si se trata efectivamente de meta-autunita.

2.- El espectro correspondiente a pH 2 contiene un pico a  $3,72 \pm 0,02 \text{ \AA}$  que indica que los fosfatos que están unidos al uranilo forman parte de una cadena orgánica. Por lo tanto se trata de fosfatos de uranilo de tipo orgánico.

La pregunta ahora es: ¿Como se explica el efecto del pH? Hay muchas posibilidades: a.- Puede ser que el pH 4,5 es óptimo para la actividad de la fosfatasa ácida. b.- Puesto que la cantidad de uranio acumulada por *M. xanthus* es mínima a pH 2 en comparación con el pH 4,5 (Merroun, 1998), puede ser que a este pH no se favorezca la precipitación del uranio en forma de fase mineral.

#### **PRECIPITACIÓN DE MINERALES (FOSFATOS Y CARBONATOS) POR *M. xanthus* EN PRESENCIA DE METALES PESADOS**

Dos aspectos destacados de las interacciones de los microorganismos con los diferentes elementos, dentro del amplio e interdisciplinar campo de la Geomicrobiología, son los procesos de biomineralización y de bioadsorción de metales (Vasconcelos *et al.*, 1995; Falini *et al.*, 1996; Belcher *et al.*, 1996; Ehrlich, 1990; Banfield y Hamers, 1997; Banfield *et al.*, 2000; Eccles y Hunt, 1986; Thompson, 1987; Brierley y Brierley, 1983). Teniendo en cuenta, en este sentido, la capacidad de *M. xanthus* para producir fosfatos (particularmente estruvita (González-



Muñoz *et al.*, 1993; Ben Omar *et al.*, 1995)) y carbonatos (sobre todo los dos polimorfos del carbonato cálcico calcita y vaterita (González-Muñoz *et al.*, 1996; 2000)), se propuso, como uno de los objetivos de este trabajo, la producción de estos minerales en presencia de algunos metales pesados. Esta decisión se tomó en base al interés creciente de la utilización de carbonatos y fosfatos para la eliminación de metales pesados de aguas contaminadas, como una vía alternativa a los procesos más tradicionales. García-Sánchez y Álvarez-Ayuso (2002), McBride (1979; 1980) y Schul'ga y Samusevich (2002), entre otros, han estudiado estos procesos, en los que la unión de los metales pesados a estos minerales se considera un fenómeno de superficie, pudiendo ocurrir adsorción o precipitación, según la concentración de los metales.

García-Sánchez y Álvarez-Ayuso (2002) estudiaron la capacidad de la calcita de absorber iones metálicos como Zn, Cd y Cr, comúnmente presentes en los efluentes industriales. Estos autores investigaron el comportamiento de la calcita para la purificación y demostraron que es el mineral más adecuado para la purificación de las aguas residuales industriales y que la capacidad de absorción depende del metal absorbido, en el orden  $Cr > Zn > Cd$ . Así que, la precipitación del Cd ocurre en la superficie de la calcita pasando primero por el proceso de adsorción vía intercambio iónico con el Ca, la retención del Zn sucede por precipitación en forma de hidrozincita  $Zn_5(OH)_6(CO_3)_2$ , y el Cr precipita como una capa de óxido de hidrocarbonatos en la superficie de la calcita. Otros autores, Zachara *et al.* (1991), demostraron que el Cd y el Mn deshidratan rápido después de su adsorción a la calcita y forman una fase que se comporta como un precipitado superficial mientras que Zn, Co y Ni forman complejos superficiales que permanecen hidratados hasta que los iones estén incorporados en la estructura por recristalización.

Por otra parte, existen numerosos estudios de la producción de carbonatos y fosfatos en presencia de metales, aunque el enfoque en estos estudios está orientado hacia las modificaciones morfológicas y de desarrollo de las caras de los cristales cuando la precipitación se produce en presencia de los mismos (Wada *et al.*, 1998; Braybrook *et al.*, 2002). Sin embargo, no se había estudiado hasta el presente la



precipitación bacteriana de estos minerales en presencia de metales pesados. De ahí el interés de este objetivo propuesto para esta memoria. Con esta finalidad se eligieron los metales Co, Cr, Cu y Mn. Los dos primeros, como exponentes de metales que presentan un notable grado de toxicidad para *M. xanthus*, el tercero, por tener una toxicidad moderada, y el último, por presentar una baja toxicidad. Las concentraciones elegidas fueron, en todos los casos, las que según los resultados obtenidos y presentados en el apartado 2 del Capítulo I de Resultados, permitían un buen crecimiento de la bacteria.

En cuanto a los medios de cultivo seleccionados para llevar a cabo estos experimentos se tuvieron en cuenta dos consideraciones fundamentales: medios que permitieran la producción abundante de los minerales buscados (fosfatos o carbonatos) y que, al mismo tiempo, previnieran la lisis de *M. xanthus*. Así, para la producción de estruvita se eligió el medio CT-F, que es un medio modificado precisamente para esta investigación, partiendo de los trabajos de Ben Omar (1996). Este medio tiene una alta concentración de sulfato magnésico (MgSO<sub>4</sub>) y de tampón fosfato, variantes que se introdujeron teniendo en cuenta la afirmación de algunos autores, como Rivadeneyra *et al.*, (1985a y b), Reddy, (1977), Sjoberb, (1978), Baker y Kastner, (1981), de que el fosfato inhibe la formación microbiana de carbonatos y que el Mg<sup>2+</sup>, según diferentes autores, inhibe a su vez la formación de carbonatos cuando está a altas concentraciones (Rivadeneyra *et al.*, 1991;1993; 1997; Buczynski y Chafetz, 1991; Kropp *et al.*, 1997). Además, la elevada concentración de fosfatos ha sido considerada como un factor que inhibe o retrasa la lisis de *M. xanthus* (Fernández-Vivas *et al.*, 1983). Para la producción de carbonatos se eligió el medio M-3, en el que Ben Chekroun (2000) encontró que la bacteria, además de permanecer viable en periodos de hasta al menos un mes, produce notable cantidad de calcita y vaterita.

Como puede verse en los resultados, el mineral obtenido en medio CT-F es, en todos los casos, estruvita. En cuanto a la captación de los metales ensayados, sólo es posible detectar la incorporación del Mn. Mediante EDX es posible detectar, además, un pequeño pico de K en casi todos los microanálisis, cuya presencia es



explicable por la capacidad del  $K^+$  para reemplazar el amonio ( $NH_4^+$ ) en las redes de estruvita (Nathan, 1984). Por otra parte, en ausencia de metales, los cristales de estruvita son de mayor tamaño. Esta diferencia de tamaño entre los cristales producidos en presencia y ausencia de Co, Cr Cu y Mn puede significar que la presencia de los cationes metálicos interfieren con la velocidad de crecimiento de algunas caras de los cristales.

La incorporación de sólo Mn podría ser consecuencia de la mayor concentración usada de este metal. No obstante, hay que tener en cuenta que los fosfatos (especialmente los fosfatos de calcio, magnesio y amonio) son estructuras "abiertas" que favorecen la entrada de cationes relativamente grandes como el  $Mn^{2+}$  (0,80 Å). Efectivamente, en estruvitas naturales se ha medido contenido de Mn del 2% y en otros fosfatos (fosforitas) hasta 1230 ppm (Altschuler, 1980). Los radios iónicos del Co, del Cr y del Cu son 0,63 Å, 0,69 Å y 0,69 Å, respectivamente. Este menor tamaño en comparación con el Mn, podría ser la causa de su ausencia en la estruvita producida.

En el caso de los minerales producidos en el medio M-3, sistemáticamente se trata de vaterita salvo en el caso de los cultivos realizados en presencia de manganeso, en que el polimorfo de carbonato cálcico producido es calcita y, además, se produce weddelita. No obstante esto, la observación de los cristales en MEB y los microanálisis, indican que la presencia de los metales tiene una marcada influencia en el desarrollo de diversos tipos de cristales. En el testigo (Figura 56), las morfologías corresponden claramente con las formas esferulíticas características de la vaterita. Pero en presencia de los metales aparecen formas fibrosas en las que, además, frecuentemente se detecta la presencia de fósforo. Por tanto, cabe pensar en la producción de apatito, junto con vaterita, aunque en escasa cantidad o de muy baja cristalinidad, de modo que no llega a ser detectada por difracción de rayos X. La producción de apatito o hidroxilapatito por *M. xanthus* fue descrita previamente en otros medios de cultivo en presencia de Fe, Co y Mn junto con calcita y vaterita (Fernández-Luque, 2002). Por otra parte, en presencia de cromo la mencionada diversidad de morfologías alcanza un grado sorprendente. Hay cristales que podrían



ser de estruvita (Figura 66, nº 6), apatito (Figura 65, nº 1 y 2) y weddelita (Figura 65, nº 3 y 7). Posiblemente la pequeña proporción en relación a la vaterita hace que no sean detectables por difracción de rayos X. La producción de weddelita por *M. xanthus* ha sido descrita previamente en varios medios de cultivo (Fernández-Luque, 2002).

Si se acepta, como se ha demostrado en trabajos previos realizados con esta bacteria (González Muñoz *et al.*, 1996), que los núcleos heterogéneos de cristalización son fundamentalmente las fracciones membranosas de la célula bacteriana, los resultados presentados en esta memoria podrían indicar que los metales utilizados podrían afectar de alguna forma a los componentes de las membranas (externa y citoplasmática). Esto podría condicionar su habilidad para actuar como núcleos heterogéneos de cristalización para un rango mayor de minerales. Por otra parte, su presencia podría estar influyendo además en el metabolismo celular, lo que condicionaría algún tipo de variación en los metabolitos liberados, que también podría influir en el tipo de minerales a precipitar. De hecho, la morfología de los cristales en los que el microanálisis pone de manifiesto la presencia de Mn está de acuerdo con la morfología propia de calcita (Figura 75).

En cuanto a las variaciones en las morfologías de la vaterita producida en presencia de los metales, podría estar condicionada por interferencia de estos cationes en el desarrollo de algunas caras de los cristales, como se ha comentado más arriba en el caso de la estruvita. La modificación de la morfología cristalina de los carbonatos por la incorporación de metales ha sido descrita, por ejemplo, por Braybrook *et al* (2002). Söhnel y Mullin, (1982) estudiaron la influencia de  $\text{Cr}^{3+}$  sobre la cinética de crecimiento y la modificación de los hábitos del cristal de  $\text{CaCO}_3$ . Estos investigadores indicaron que la calcita romboédrica y la vaterita esferulítica fueron formados en el sistema  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-CaCl}_2$  y que el  $\text{Cr}^{3+}$  causó una reducción significativa en sus tamaños y aumentó el tiempo de inducción de la precipitación. Otros investigadores (Wada *et al.*, 1998), en este mismo contexto, demostraron que la morfología de la vaterita cambió ligeramente en presencia de los metales. Por otra parte, la adición de  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Cr}^{3+}$ , provocó la precipitación de calcita



y aragonito como dendritas y esferulitas, respectivamente, y se observó una fimbrillación en las esferulitas. El estudio de la estructura de estos últimos reveló la presencia de dos niveles de textura: una morfología macroscópica de paquetes en forma de espinas y una morfología microscópica de agujas. La morfología de la calcita dendrítica es fácilmente explicable por el alto nivel de sobresaturación en la etapa de cristalización, y los paquetes en forma de espinas en las esferulitas de aragonito también indican que las esferulitas crecieron en condiciones de alta sobresaturación. Sin embargo, en presencia de  $\text{Ag}^+$  no observaron las mismas morfologías; precipitó calcita y aragonito como romboedros y esferulitas pero sin fimbrillación. Estas morfologías sugirieron que los cristales de  $\text{CaCO}_3$  precipitaron a baja sobresaturación (Wada *et al.*, 1998).

En el caso del manganeso, en cuya presencia se produce calcita en lugar de vaterita, hay que tener en consideración que la red de la calcita (más compacta que la de la vaterita) debe favorecer la entrada de un catión como el  $\text{Mn}^{2+}$ , más pequeño que el  $\text{Ca}^{2+}$ , con un radio iónico de 1.01 Å. De hecho, por encima de los 500° C hay perfecta miscibilidad calcita-rodocrosita ( $\text{CO}_3\text{Mn}$ ) y a baja temperatura, con relativa frecuencia aparece Mn en calcita, hasta un 15 % (Deer *et al.*, 1965). Por el contrario, la vaterita no parece que tenga una red tan propicia para albergar cationes extraños, más pequeños que el  $\text{Ca}^{2+}$ , al ser mas abierta que la de la calcita. Esto hace suponer que la presencia de Mn en el medio de cultivo frena la formación del polimorfo menos adecuado a incorporarlo.

En relación con la marcada producción de weddelita en presencia de Mn, la evolución del pH en los medios de producción de carbonatos (ver Tabla 8, Apartado 3.2 del Capítulo II) es consistente con este hecho. Puesto que la weddelita es un oxalato cálcico, significa que hay una importante producción de ácido oxálico, de ahí que el pH en este caso no se eleve, sino que por el contrario ocurre una ligera disminución. A raíz de estos resultados surge una cuestión: ¿Por qué se produce ácido oxálico? Posiblemente la respuesta venga condicionada por la presencia de acetato cálcico en el medio de cultivo. Se ha demostrado que *M. xanthus* posee el



ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el ciclo del glioxilato (Shimkets, 1984). Este ciclo se muestra en la Figura 103.

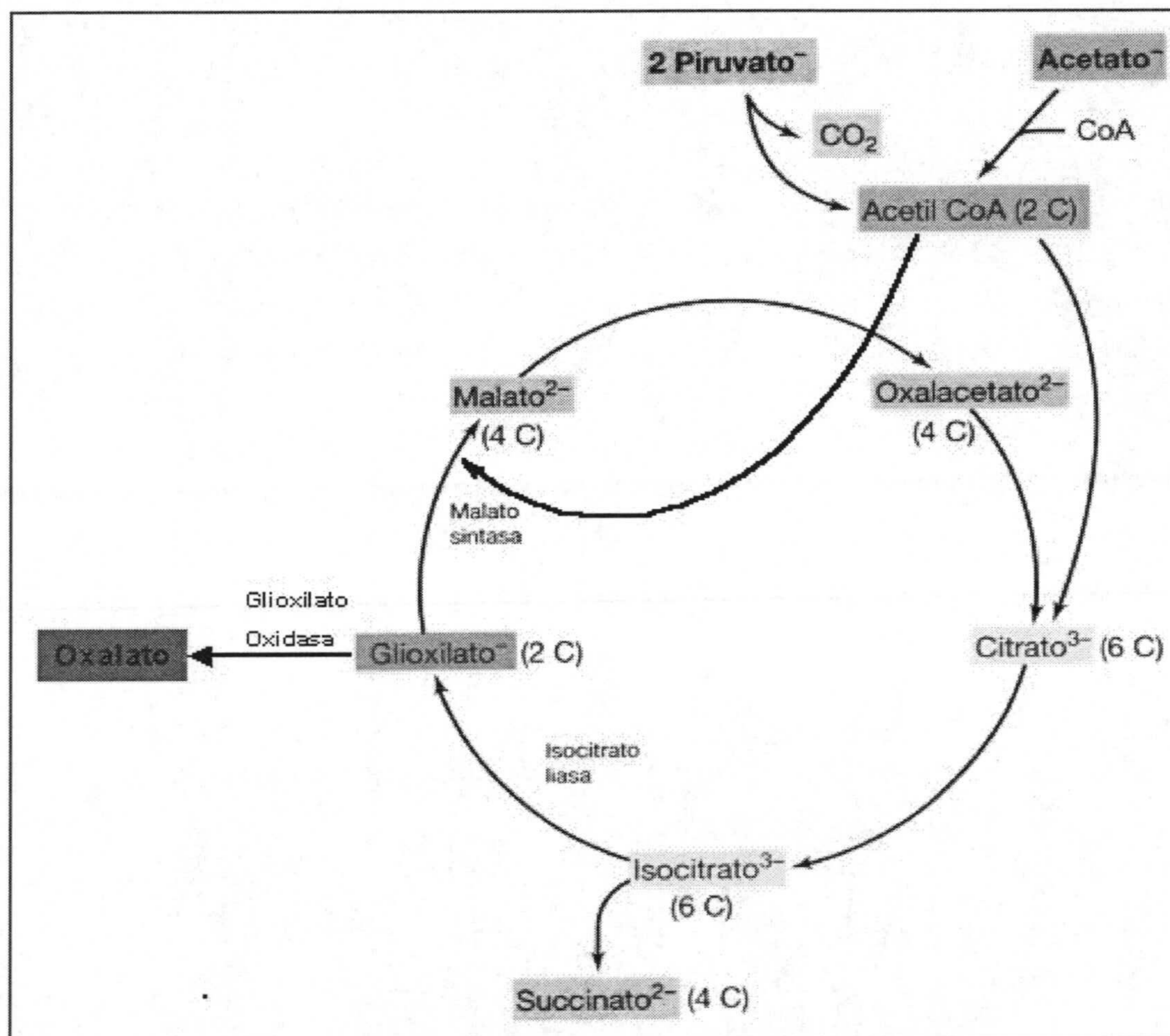


Figura 103.- Ciclo del glioxilato mostrando la vía de la oxidación del glioxilato a oxalato. (Tomado de Madigan *et al.*, 2004)

Como puede observarse en esta figura el ciclo del glioxilato se ve activado por la presencia de acetato (Shimkets, 1984) y es posible que una relativamente elevada concentración de acetato pueda promover la producción y acumulación de oxalato a partir del glioxilato, si están presentes los cofactores adecuados para que funcionen las enzimas correspondientes. El ciclo del glioxilato permite a las bacterias y a las plantas crecer en acetato. El isocitrato que se produce, a través de este ciclo, tiene dos destinos principales. Si se requiere energía, se descarboxila de forma oxidativa a  $\alpha$ -cetoglutarato. Cuando la energía es abundante, se rompe en succinato y



glioxilato. El ciclo del ácido cítrico y el del glioxílico compiten por el isocitrato en este punto clave. A niveles elevados de ATP, la isocitrato deshidrogenasa se desconecta mediante fosforilación, lo cual sirve para dirigir el isocitrato hacia la vía del glioxilato para formar intermediarios biosintéticos (Styer, 1988). Puede que, al menos en parte, este sea uno de los motivos que conducen a la formación de weddelita, que ocurriría mediante conversión del glioxílico a oxálico por acción de una glioxilato oxidasa. Cabe pensar que, tal vez el Mn podría ser cofactor para alguna de estas enzimas. De hecho, en algunos hongos, como *Aspergillus niger*, se sabe que el Mn es cofactor de la oxalacetato acetil hidrolasa (Ruijter *et al.*, 1999) y que es necesario para el funcionamiento de la isocitrato deshidrogenasa (Crueger y Crueger, 1989). Con el Co, Cr y Cu, así como en ausencia de metales, posiblemente no ocurra lo mismo, aunque también haya un reaprovisionamiento de acetato, porque estos metales no puedan ejercer esa función.

Estos resultados, si bien no son prometedores en cuanto a la utilización de la producción de fosfatos y/o carbonatos para la eliminación de metales pesados, al menos en las condiciones ensayadas, sí que abren perspectivas interesantes para la investigación de nuevos aspectos del metabolismo intermediario en *M. xanthus*, como son el papel de los metales pesados. Un hecho destacable, como se discutió en el primer apartado, es la recuperación de la capacidad de formación de cuerpos fructificantes por las cepas *dsp* y *frz*, en presencia de Mn. Según Bland *et al.* (1971), durante la esporulación se incrementa la actividad específica de las enzimas del ciclo del glioxilato. De acuerdo con lo que se viene discutiendo en los párrafos precedentes, los resultados obtenidos son concordantes con este hecho. El Mn debe activar alguna o algunas enzimas de este ciclo y contribuir a la mencionada recuperación de la capacidad de esporulación, cuando el medio es el adecuado.

Por otra parte, y de acuerdo con lo que se ha venido comentando en este apartado de Discusión, parece ser que, tanto en el caso del fosfato producido (estruvita) como de los carbonatos (calcita y/o vaterita), la incorporación del Mn detectada no se debe a adsorción sobre el mineral formado, sino a incorporación del mismo en las redes cristalinas formadas que, como se ha discutido, son propicias a la



incorporación del manganeso, pero no de otros metales de menor radio iónico. Por tanto, no parece que esta sea una vía adecuada para la eliminación de metales pesados de aguas contaminadas.

### FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE *M. xanthus* SOBRE SOPORTES POROSOS Y BIOADSORCIÓN DE METALES POR LA MISMA

El término “biopelícula” en *M. xanthus* fue usado por primera vez por Kearns *et al.*, (2002). Con este término estos autores se refieren a la forma en que las células de este microorganismo se asocian o relacionan unas con otras, inmersas en una red de polímeros extracelulares, dando sus típicas colonias planas que se desarrollan sobre superficies sólidas o medios sólidos nutricionales. Este término ha sido usado por Stoodley y Stoodley (2002) en este mismo sentido. Claramente, este concepto dado al término “biopelícula” en relación a *M. xanthus* es diferente del que habitualmente suele tener cuando se habla en general de “biopelícula”, según se ha explicado con detalle en la introducción de esta memoria. Al referirnos ahora al “establecimiento de biopelícula por *M. xanthus* sobre soportes porosos”, se hace con este segundo significado, siendo, en este sentido, la primera vez que se aplica a esta bacteria y, también, la primera vez que se lleva a cabo una investigación con esta finalidad. Los experimentos realizados con este objetivo tenían una doble finalidad: por una parte dilucidar la posibilidad de establecer este tipo de biopelícula sobre los soportes elegidos y por otra, si esto se conseguía, investigar si la biopelícula establecida tenía la capacidad de bioadsorber metales. Ambas finalidades enfocadas a la posibilidad de su utilización para biofiltros o filtros sumergidos.

La formación de la biopelícula de una bacteria es un proceso dinámico y continuo, necesiándose varios factores para la producción y el establecimiento de una biopelícula madura. Por lo tanto se han intentado conseguir las condiciones favorables para que *M. xanthus* pueda llegar a establecerla. Para ello, como se ha mencionado anteriormente, se ha propuesto como superficie sólida un soporte poroso. En cuanto a las condiciones de cultivo, teniendo en cuenta el rápido proceso de autólisis de *M. xanthus* en sus medios de cultivo habituales (Mason y Powelson, 1958; Arias y Montoya, 1982) se acudió a la utilización del medio M-9 en donde la



mixobacteria se mantiene viable durante largos periodos de tiempo. En este medio, según investigaciones llevados a cabo en nuestro laboratorio (Ben Chekroun, 2000) se consigue la viabilidad de esta bacteria durante periodos de varios meses. De esta forma se permitía disponer de un tiempo suficiente para el potencial desarrollo de *M. xanthus* en la forma de biopelícula deseada. Como quedó indicado, los resultados conseguidos fueron satisfactorios, y se ha podido demostrar que *M. xanthus* era capaz de formar biopelícula madura y bien establecida. En todos estos experimentos la cepa empleada fue la silvestre, *M. xanthus* 422.

Una observación detenida del soporte antes y después de su incubación, así como de éste en ausencia y presencia de *M. xanthus*, se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido. Las Figuras 79 a 88 ofrecen los resultados obtenidos, que permiten distinguir diversos aspectos morfológicos en relación con el desarrollo y formación de la biopelícula. La agrupación de las típicas células de *M. xanthus* se puede observar (Figura 81) inmersa en una matriz mucilaginosa. Visto con detalle (Figura 85 C) puede distinguirse la forma en que se disponen las células, y la matriz de polisacárido extracelular que mantiene unidas e inmersas a las mismas (Figura 85 B y D). Además, se puede observar la formación o precipitación de minerales con diferentes morfologías (Figuras 87). Estas observaciones muestran que los aspectos morfológicos de la biopelícula establecida por *M. xanthus* están de acuerdo con los datos recogidos en la bibliografía sobre biopelículas.

Muchos investigadores han demostrado que una biopelícula esta compuesta principalmente por células bacterianas, polímeros extracelulares producidos por las bacterias, productos de lisis e hidrólisis, materia orgánica y algunos componentes inorgánicos (Nielsen *et al.*, 1997). La composición de los polímeros extracelulares o exopolímeros bacterianos de la biopelícula ha sido estudiada por Jahn y Nielsen (1998), quienes afirmaron que estos componentes contienen principalmente polisacáridos, proteínas, ácido urónico, ácido húmico, ácidos nucleicos, lípidos y fragmentos celulares. Además, esta composición está casi siempre mayoritariamente integrada por el polisacárido extracelular (Wang *et al.*, 2002).



El hecho de que *M. xanthus* sea una bacteria que se caracteriza por su capacidad de producir una gran cantidad de polisacárido extracelular en un medio líquido (Arnold y Shimkets, 1988a; Dworkin y Kaiser, 1993; Behmlander y Dworkin, 1991; 1994 a y b) facilitaría el establecimiento de biopelícula.

Saur *et al.* (2002) demostraron que la interacción microbiana con una superficie y la formación de la biopelícula requieren la producción del material extracelular que ayuda en la adhesión inicial de las células al soporte, al mantenimiento de la estructura de la biopelícula, y a la separación de los agregados que migrarían para establecerse en otros puntos. En los trabajos citados al principio de este apartado, y en concreto en la investigación de Kearns *et al.*, (2002), se identificó una metaloproteasa del zinc FibA (proteína de fimbria A) asociada a la matriz del EPS de *M. xanthus* con funciones implicadas en la formación de la matriz extracelular. La FibA parece afectar, también, a las estructuras de agregación que las bacterias establecen para formar los cuerpos fructificantes. La proteína de la matriz podría formar parte del mecanismo de transducción de señales implicado en la regulación de la quimiotaxis. Este estudio demuestra que la comunicación por señales entre las células es importante en la formación de la biopelícula por estas especies (Stoodley y Stoodley, 2002). Por lo tanto esta proteína podría tener algún papel en el establecimiento de la biopelícula que aquí estamos estudiando.

Otra de las características que podría tener un papel importante en la formación de biopelícula por diversas bacterias, o mas bien en la adhesión inicial de las células a la superficie sólida, serían los flagelos celulares y pili que son necesarios para su movilidad, la unión de las células que los poseen a superficies y la consiguiente colonización de las mismas. Según Pratt y Kolter (1998) existen tres mecanismos por los cuales los flagelos celulares podrían ser requeridos para la formación de la biopelícula: primero es posible que sean requeridos directamente para la unión a la superficie, lo que facilitaría la iniciación de la formación de la biopelícula. Alternativamente, la movilidad podría ser necesaria para permitir a la bacteria buscar la superficie (por ejemplo para moverse en la interfase líquido-superficie). Además, la movilidad puede ser requerida por las bacterias en el



desarrollo de la biopelícula, para moverse a lo largo de la superficie, facilitando el crecimiento y la extensión de la biopelícula. Finalmente puede que la quimotaxia esté requerida por la bacteria para moverse hacia los nutrientes asociados a la superficie. El movimiento por deslizamiento típico de las mixobacterias sobre superficies sólidas podría cumplir estas funciones en el caso de *M. xanthus*.

Aspectos destacados de las biopelículas microbianas son los papeles que desempeñan, según su naturaleza y localización, en procesos de biomineralización y de biodeterioro. En efecto, muchos investigadores han puesto en evidencia que la biopelícula favorece particularmente la biomineralización (Lebranz *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 1998; Langley y Beveridge, 1999). De ahí que no sea de extrañar la presencia de los minerales producidos en la biopelícula de *M. xanthus*. Los cristales precipitados, observados por microscopía electrónica de barrido, aparecen con diferentes morfologías: unos con forma de esferulitas, otros lenticulares (Figura 87A y B), que podrían ser de vaterita, y otros presentan formas triangulares que serían de calcita (Figura 87C). Los microanálisis de estos cristales (Figura 88) muestran picos de Ca, lo que junto con las morfologías observadas, indicaría que los minerales precipitados por la biopelícula de *M. xanthus* serían, como se ha dicho, vaterita y calcita. En este contexto, Barkay y Schaefer (2001) demostraron que los microorganismos en biopelícula son especialmente activos para la biomineralización por el establecimiento de gradientes químicos y condiciones físicas en la capa celular y en las proximidades inmediatas de las células activas, que son propicias para la formación de minerales.

En algunas de las esferulitas (Figura 87A) pueden observarse pequeños orificios centrales que se han interpretado como la huella dejada por la bacteria que dio lugar a la esferulita. Formaciones parecidas han sido observadas y discutidas por Rodríguez-Navarro *et al.*, (2003) en un estudio sobre biomineralización por *M. xanthus*. El proceso que conduce a su formación podría ser el que se indica a continuación. La actividad metabólica de *M. xanthus* produce  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$ . Esto conlleva el que el  $\text{NH}_3$  liberado provoque una subida del pH y el  $\text{CO}_2$  un incremento de la concentración de  $\text{CO}_3^{2-}$  alrededor de la bacteria (González-Muñoz *et al.*, 2000).



La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio, en estas condiciones, conduce a la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  alrededor de las células bacterianas. Esta mineralización alrededor de las bacterias continúa hasta que la pared celular está completamente cubierta impidiendo la permeabilidad celular a los gases. Una vez que la respiración está completamente interrumpida por el grosor del precipitado, la bacteria muere. Finalmente, el proceso de mineralización continúa y provoca esa especie de “concha esferulítica” de cristales de vaterita precipitados alrededor de la bacteria que permanecen cuando la bacteria se lisa.

Con la finalidad de comprobar el efecto de los metales pesados sobre la biopelícula de *M. xanthus* y/o su posible adsorción por la misma se han ensayado los metales Co, Cr, Mn y Cu a la concentración a la cual se había demostrado anteriormente que se acumula la mayor cantidad del metal por biomasa no proliferante de este microorganismo (Merroun, 1998).

La observación al MEB de las muestras, después de que la biopelícula había estado en contacto con los metales, pone de manifiesto que la biopelícula conserva su intensidad y no se observa degeneración de las células (Figuras 90, 93, 97, 101). Por otra parte los datos recogidos en la Tabla 9, que dan la determinación de la concentración de estos metales en la solución antes y después de su contacto con el material poroso recubierto de biopelícula de *M. xanthus*, ponen de manifiesto que la biopelícula no parece fijar Cu, que fija una pequeñísima cantidad de Co y que fija alrededor de 2/3 del Cr y del Mn presentes. Los datos recogidos sólo permiten hacer una valoración cualitativa, pero no cuantitativa. El volumen del material poroso recubierto de biopelícula utilizado fue de 130 ml, pero es difícil cuantificar la superficie de biopelícula que se ofrece a la solución del metal para su bioadsorción. Baste, por tanto, sólo la afirmación de que esta biopelícula se muestra eficiente en la eliminación de algunos metales y no en la de otros.

Estos datos son una primera aproximación a la utilidad de esta bacteria en el diseño de biofiltros para la eliminación de metales pesados de aguas contaminados con los mismos. Los resultados encontrados y discutidos abren un nuevo campo de



interés y de potencial aplicación de las mixobacterias, pero a la vez una serie de cuestiones que será preciso abordar en futuras investigaciones. Entre otras, la estabilidad de la biopelícula a lo largo del tiempo, su comportamiento frente a efluentes que pudiesen aportar otros microorganismos, los aspectos cuantitativos de eliminación de metales.

Un hecho que habrá que tener en cuenta de manera particular es la producción de calcita y vaterita observada en relación con el establecimiento de esta biopelícula. Habrá que estudiar si su papel podría ser positivo o negativo. Sería positivo si ayudase en la eliminación de metales. En este sentido, sería posible precipitar o adsorber algunos metales (en los casos y condiciones ensayadas, el Mn). Pero podría darse un aspecto negativo en el caso de que esa producción de minerales pudiese afectar el tamaño de los poros o canales que se estableciesen al utilizar el material de soporte recubierto de biopelícula como material de relleno de columnas o biofiltros, llegando a obstruirlos parcial o totalmente y provocando, por tanto la pérdida de carga.



*VI.- CONCLUSIONES*







1<sup>a</sup>.- El nivel de toxicidad de los metales ensayados frente a *M. xanthus* está dentro de los márgenes considerados como de elevada resistencia para otros microorganismos. Las concentraciones inhibitorias en medio sólido fueron más altas que las que ejercían este efecto en medio líquido. Este hecho puede poner de manifiesto que el agar-agar utilizado para la gelificación de los medios sólidos secuestra parte de los metales presentes. Un caso en el que esta mixobacteria se comporta de forma diferente es frente al uranio, presentando mayor resistencia en medios líquidos que sólidos. Esto podría deberse a la mayor cantidad de polisacárido extracelular que produce en los primeros medios y la gran cantidad de uranio que se fija en estos polisacáridos, dejando disponible un bajo porcentaje del radionucleido.

2<sup>a</sup>.- Los metales pesados tienen importantes efectos sobre *M. xanthus* disminuyendo su crecimiento, e inhibiendo la movilidad, en la mayoría de las cepas ensayadas. No obstante, las cepas mutantes *dsp* y *frz* recuperan la capacidad de formación de cuerpos fructificantes en presencia de manganeso, lo que también ocurre a la cepa *dsp* en presencia de cobalto y cromo. Estos hechos permiten suponer que, en el caso de la cepa *frz*, el manganeso tiene algún efecto que ayude a las células a moverse de forma organizada llevándolas a formar cuerpos fructificantes en lugar de filamentos desorganizados. En el caso de la cepa *dsp*, los metales podrían pasar a ocupar los receptores de las fibrillas dando así una señal "falsa" entre las células y permitiendo, por tanto, que la cepa mutante se comporte como una cepa salvaje.

3<sup>a</sup>.- La presencia de plomo, lantano, uranio, cobre y manganeso, induce la producción de pigmentos por *M. xanthus*, algunos de ellos difusibles. La producción de estos pigmentos podría suponer un mecanismo de defensa de este microorganismo frente a estos metales.

4<sup>a</sup>.- En el caso de la plata, es posible conseguir una adaptación de las células de *M. xanthus*, en fase vegetativa, a concentraciones crecientes del metal. La plata bioadsorbida por estas células, se encuentra en la pared celular y en el citoplasma, o bien se fija al polisacárido extracelular, según se usen medios sólidos o líquidos, respectivamente. Esto indicaría la existencia de al menos dos mecanismos diferentes



utilizados por esta bacteria para reducir el efecto tóxico del metal. De una parte la plata se uniría al EPS evitando el contacto de las células con el metal, y de otra caso de que pase al citoplasma, este metal adsorbido se acumularía en forma de cuerpos electrón-densos localizados evitando la posible producción de daños.

5ª.- El estudio, mediante espectroscopía por infrarrojos (IRS) y espectroscopía por absorción de rayos X para estructuras finas (EXAFS), de los complejos formados por la interacción del uranio con la biomasa no proliferante de *M. xanthus* ha puesto de manifiesto que los grupos funcionales implicados en los mismos son grupos fosfato orgánico e inorgánico a pH 2 y 4,5 respectivamente, dando lugar a la formación de meta-autunita en el segundo caso.

6ª.- Cuando *M. xanthus* 422 crece en presencia de cobalto, cromo, cobre, y manganeso, únicamente el manganeso es capaz de incorporarse a minerales como la estruvita y la calcita. El hecho de que sea este el único metal incorporado se interpreta como consecuencia de su radio iónico, que le permitiría entrar en la red cristalina de estos minerales. Además, la producción de weddelita en presencia de manganeso en los medios de carbonatogénesis, parece indicar la inducción del ciclo del glioxilato y la consiguiente producción de oxalato, probablemente por la participación del manganeso como cofactor para la actuación de enzimas implicadas en las reacciones correspondientes.

7ª.- *Myxococcus xanthus* es capaz de desarrollar biopelícula sobre soportes inorgánicos porosos. Esta biopelícula tiene la habilidad de fijar cromo y manganeso, eliminando dos tercios del metal presente en la solución. Así mismo, la biopelícula formada muestra una notable capacidad biomineralizadora.



*VII.- BIBLIOGRAFÍA*







**Abbanat D.R., E.R. Leadbetter, W., III, Godchaux, A. Escher** (1986). Sulphonolipids are molecular determinants of gliding motility. *Nature*, **324**: 367-369.

**Acuña M.E., C. Villanueva, B. Cárdenas, P. Christen, S. Revah** (2002). The effect of nutrient concentration on biofilm formation on peat and gas phase toluene biodegradation under biofiltration conditions, *Process Biochemistry*, **38**: 7-13.

**Agranoff D.D., S. Krishna** (1998). Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol. Microbiol.*, **28**: 403-412.

**Aiking H., A. Stijnman, C. van Garderen, H. van Heerikhuizen, van' T Riet** (1982). Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 938-944.

**Aiking H., A. Stijnman, C. van Garderen, H. van Heerikhuizen, van' T Riet** (1984). Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 374-377.

**Aksu Z., U. Acikel, T. Kutsal** (1997). Application of multicomponent adsorption-isotherms to simultaneous biosorption of iron (III) and Chromium (VI) on *Chlorella vulgaris*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **170**: 368-378.

**Albright L.J., J.W. Wentworth, E.M. Wilson** (1972). Techniques for measuring metallic salt effects upon indigenous heterotrophic microflora of natural waters. *Water Res.*, **6**: 1589-1596.

**Altschuler Z.S.** (1980). The geochemistry of the trace elements in marine phosphorites. Part I.- Characteristic abundances and enrichment. In Bentor YK (ed) SEPM Spec. Publ., **29**: 19-30.

**An Y.H., R.J. Friedman** (1997). Laboratory methods for studies of bacterial adhesion, *Journal of Microbiological Methods*, **30**: 141-152.

**Andres Y., H.J. MacCordick, J-C. Hubert** (1993). Adsorption of several actinide (Th, U) and lanthanide (La, Eu, Yb) ions by *Mycobacterium smegmatis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**: 413-417.

**Andres Y., H.J. MacCordick, J-C. Hubert** (1994). Binding sites of sorbed uranyl ion in the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **115**: 27-32.

**Andres Y., H.J. MacCordick, J-C. Hubert** (1995). Selective biosorption of thorium ions by an immobilized mycobacterial biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**: 271-276.

**Arias J.M., J.M. Almendral, E. Montoya** (1979a). Two methods of large scale extraction of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides* D. *Microbios*, **25**: 19-23.

**Arias J.M., C. Rodríguez, E. Montoya** (1979b). Production and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides* D. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **32**: 205-211.



**Arias J.M., A. Fernández-Vivas, E. Montoya** (1983). "Evidence for a activating substance related to autolysis in *Myxococcus coralloides* D". *Arch. Microbiol.*, **134**: 164-166.

**Arias J.M., E. Montoya** (1982). Influencia de la luz sobre los ciclos de vida de *Myxococcus coralloides* D. *Microbiología Española*, **35**: 13-20.

**Arnold J.W., L.J. Shimkets** (1988a). Inhibition of cell-cell interactions in *Myxococcus xanthus* by Congo red. *J. Bacteriol.*, **170**: 5765-5770.

**Arnold J.W., L.J. Shimkets** (1988b). Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **170**: 5771-5777.

**Assmann S., K. Sigler, H. Höfer** (1996). Cd<sup>2+</sup>-induced damage to yeast plasma membrane and its alleviation by Zn<sup>2+</sup>: Studies on *Schizosaccharomyces pombe* cells and reconstituted plasma membrane vesicles. *Arch. Microbiol.*, **165**: 279-284.

**Atkinson B.W., F. Bux, H.C. Kasan** (1998). Considerations for application of biosorption technology to remediate metal contaminated industrial effluents. *Water Res.*, **24**: 129-135.

**Avery S.V., N.G. Howlett, S. Radice** (1996). Copper Toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on Plasma Membrane Fatty Acid Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 3960-3966.

**Avery S.V., J.M. Tobin** (1992). Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3883-3889.

**Baker P.A., M. Kastner** (1981). Constraints on the formation of dolomite. *Science*, **213**: 214-216.

**Banfield J.F., R.J. Hamers** (1997). Processes at minerals and surfaces with relevance to microorganisms and prebiotic synthesis. *Geomicrobiology*, **35**: 81-122

**Banfield J.F., S.A. Welch, H. Zhang, T.T. Ebert, R.L. Penn** (2000). Aggregation-Based Crystal Growth and Microstructure Development in Natural Iron Oxyhydroxide Biomineralization Products. *Science*, **289**: 751-754.

**Bang S-W., D.S. Clark, J.D. Keasling** (2000). Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of thiosulfate reductase gene (*phsABC*) from *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 3939-3944.

**Baran E.J.** (1994). Química Bioinorgánica. McGraw-Hill, Madrid.

**Barkay T.** (2000). The mercury cycle, In Encyclopedia of Microbiology, 2nd edn. San Diego: Academic Press Inc, 171-181.

**Barkay T., J. Schaefer** (2001). Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*, **4**: 318-323.

**Basnakova G., L.E. Macaskie** (1999). Accumulation of zirconium and nickel by *Citrobacter* sp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74**: 509-514.



**Baty A.M. I.I.I., C.C. Eastburn, Z. Diwu, S. Techkarnjanaruk, A. Goodman and G.G. Geesey (2000).** Differentiation of chitinase-active and non-chitinase-active subpopulations of a marine bacterium during chitin degradation. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 3566-3573.

**Baty A.M. I.I.I., C.C. Eastburn, Z. Diwu, S. Techkarnjanaruk, A. Goodman, G.G. Geesey (2000).** Spatial and temporal variations in chitinolytic gene expression and bacterial biomass production during chitin degradation. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 3574-3585.

**Beebe, J.M. (1943).** Studies on the myxobacteria. 3. The utilization of carbohydrates. *Iowa State Coll. J. Sci.*, **17**: 227-240.

**Behmlander R.M., M. Dworkin (1991).** Extracellular fibrils and contact-mediated cell interactions in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **173**: 7810-1821.

**Behmlander R.M., M Dworkin (1994a).** Biochemical and structural analyses of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **176**: 6295-6303.

**Behmlander R.M., M. Dworkin (1994b).** Integral proteins of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol*, **176**: 6304-6311.

**Beijer K., A. Jernelov (1984).** Microbial methylation of lead, in Biological Effects of Organolead Compounds. Grandjean, Ph., Ed., CRC Press, Boca Ratón, FL, 13.

**Beijer K., A. Jernelov (1986).** General aspects of specific data on ecological effects of metals. En: Handbook on the Toxicology of Metals (Friberg L., Nordberg G.F., Vonk V. eds.). 2ª ed. pp. 253-268. Elsevier Science Publishers.

**Belcher A.M., X.H. Wu, R.J. Christensen, P.K. Hansma, G.D. Stucky, D.E. Morse (1996).** Control of cristal phase switching and orientation by soluble molusk-shell proteins. *Nature*, **381**: 56-58.

**Ben Chekroun K. (2000).** Producción de diversos minerales por núcleos heterogéneos de cristalización aportados por *Myxococcus xanthus* y comparación con otros microorganismos. Tesis Doctoral, Universidad de Granada (España).

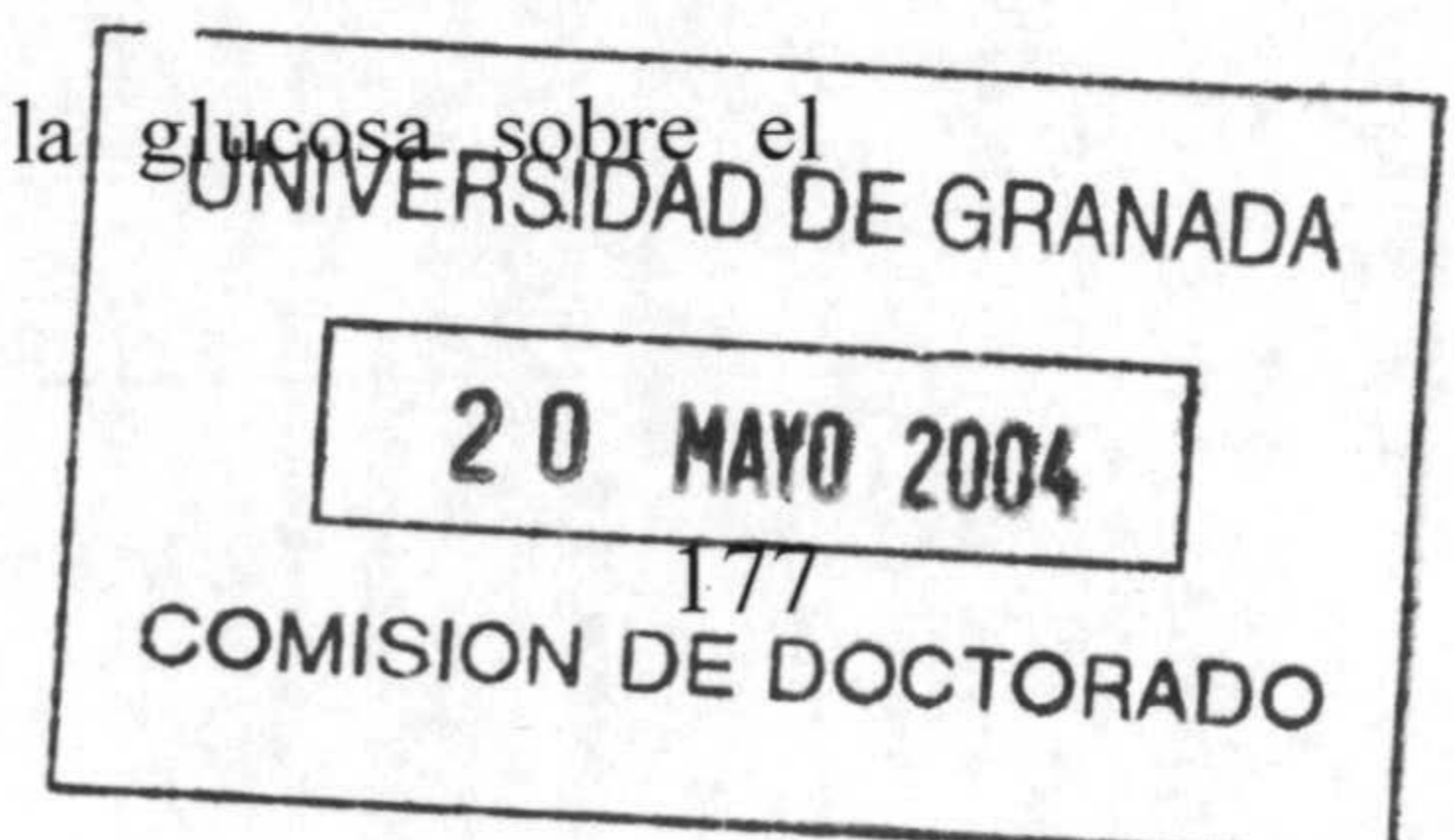
**Ben Omar N. (1996).** Biomineralización por *Myxococcus xanthus*. Estudio de núcleos heterogéneos de cristalización. Tesis doctoral, Universidad de Granada (España).

**Ben Omar N., M. Martínez-Cañamero, M.T. González-Muñoz, J.M. Arias, F. Huertas (1995).** *Myxococcus xanthus* killed cells as inducers of struvite crystallization. Its possible role in the biomineralization process. *Chemosphere*, **30**: 2387-2396.

**Ben Omar N., M.L. Merroun, M.T. González-Muñoz, J.M. Arias (1996).** Brewery yeast as biosorbent of uranium. *Journal of Applied Bacteriology*, **81**: 284-287.

**Ben Omar N., M.L. Merroun, J.M. Arias Peñalver, M.T. González-Muñoz, (1997).** Comparative heavy metal biosorption study of brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere*, **35**: 2277-2283

**Benhamú C., J.M. Arias, E. Montoya (1979).** Efecto de la glucosa sobre el crecimiento de *M. coralloides* D. *ARS pharmaceutica*, **3**: 237-246.





- Bender J., R.F. Lee, P. Phillips** (1995). Uptake and transformation of metals and metalloids by microbial mats and their use in bioremediation. *J. Indust. Microbiol.*, **14**: 113-118.
- Bengtsson L., B. Johanson, T.J. Hackett, L. McHale, A.P. McHale** (1995). Studies on the biosorption of uranium by *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**: 807-811.
- Benoit J.M., C.C. Gilmour, R.P. Mason, A. Heyes** (1999). Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore water, *Environ. sci. Technol.*, **33**: 951-957.
- Benoit J.M., C.C. Gilmour, R.P. Mason** (2001). The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3), *Environ. sci. Technol.*, **35**: 127-132.
- Beveridge T.J., R.J. Doyle** (1989). Metal Ions and Bacteria. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Beveridge T.J., M.N. Hughes, H. Lee, K.T. Leung, R.K. Poole, I. Sawaidis, S. Silver, J.T. Trevors** (1997). Metal- microbe interactions: contemporary approaches. *Adv. Microb. Physiol.*, **65**: 2256-2259.
- Beveridge T., S. Koval** (1981). Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**: 325-335.
- Bisalputra T., B.R. Oakley, D.C. Walker, C.M. Shields** (1975). Microtubular complexes in blue-green algae. *Protoplasma*, **86**: 19-28.
- Bitton G., V. Freihofer** (1978). Influence of extracellular polysaccharide on the toxicity of copper and cadmium towards *Klebsiella aerogenes*. *Microb. Ecol.*, **4**: 119-125.
- Bhagat R., S. Srivastava** (1993). Biorecovery of zinc by *Pseudomonas stutzeri* RS34. En: Biohydrometallurgical Technologies (Torma A.E., Apel M.L., Brierley C.L. eds.). vol. 2. pp. 209-217. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, Pennsylvania.
- Blackhart, B.D., D. R. Zusman** (1985a). Cloning and complementation analysis of the frizzy genes of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.*, **198**: 243-254.
- Blackhart, B.D., D. R. Zusman** (1985b). "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 8767-8770.
- Bland J., W. Yeh, D. White, A. Hendricks** (1971). Increase in glyoxylate shunt enzymes during cellular morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Can. J. Microbiol.*, **17**: 209-211.
- Bond P.L., G.K. Druschel, J.F. Banfield** (2000). Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems, *Applied Environmental Microbiology*, **66**: 4962- 4971.



- Bourret R.B., J.F. Hess, M.I. Simon** (1990). Conserved Aspartate Residues and Phosphorylation in Signal Transduction by the Chemotaxis Protein CheY *PNAS*, **87**: 41-45.
- Brady D., J.R. Duncan** (1993). Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. En: Biohydrometallurgical Technologies (Torma A.E., Apel M.L., Brierley C.L. eds.). vol. 2. pp. 711-724. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, Pennsylvania.
- Brady D., J.R. Duncan** (1994). Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**: 149-154.
- Bragg P.D., D.J. Rainnie** (1974). The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, **20**: 883-889.
- Brauss R.W., I. Heyne-Katzenberger, H. Pech, H. Barth** (1967). Beitrage zur Mikrobiologie von Binnengesassern (I). *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **150**: 716-724.
- Braybrook A.L., B.R. Heywood, R.A. Jackson, K. Pitt** (2002). Parallel computational and experimental studies of the morphological modification of calcium carbonate by cobalt. *Journal of Crystal Growth*, **243**: 336-344.
- Bremer P.J., M.W. Loutit** (1986). The effect of Cr(III) on the form and degradability of a polysaccharide produced by a bacterium isolated from a marine sediment. *Mar. Environ. Res.*, **20**: 249-251.
- Bretscher T.D., D. Kaiser** (1978). Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J. Bacteriol.*, **133**: 763-768.
- Bridge T.A.M., C. White, G.M. Gadd** (1999). Extracellular metal-binding activity of the sulphate-reducing bacterium *Desulfococcus multivorans*. *Microbiology*, **145**: 2987-2995.
- Brierley C.L.** (1990). Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. *Geomicrobiol. J.*, **8**: 202-223.
- Brierley J.A., C.L. Brierley** (1983). In Biomineralization and biological metal accumulation, (Eds. P. Westbroek and E.W. de Jong), Reidel, pp. 499-509.
- Brierley J.A., G.M. Goyak, C.L. Brierley** (1986). Considerations for commercial use of natural products for metals recovery. En: Immobilization of Ions by Biosorption. (Eccles H., Hunts S. eds.). pp. 105-107. Ellis Horwood, Chichester.
- Brierley J.A., D.B. Vance** (1988). Recovery of precious metals by microbial biomass. En: Biohydrometallurgy: Proceedings of the International Symposium (Norris P.R., Kelly D.P. eds.). pp. 477-486. Sci. Technol. Letters, Kew Surrey.
- Brown N.L., R.P. Burchard, D.W. Morris, J.H. Parish, N.D. Stow, D. Tsopanakis** (1976). Phage and defective phages of strains of *Myxococcus*. *Arch. Microbiol.*, **108**: 271-279.
- Brockman E.R.** (1976). Myxobacters from arid Mexican soils. *J. Bacteriol.*, **126**: 642-644.



- Burchard R.P.** (1977). Studies on gliding motility on *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **132**: 666-672.
- Burchard A.C., Burchard R.P., J.A. Kloetzel** (1977). Intracellular, periodic structures in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **132**: 666-672.
- Burchard R.P.** (1981). Gliding motility of procariotes: ultrastructure, physiology, and genetics. *Annu.Rev.Microbiol.*, **35**: 497-529.
- Burchard R.P.** (1984). Gliding motility and taxes. In *The Myxobacteria*, pp. 139-161. Edited by E. Rosenberg. Berlin & Heidelberg: Springer.
- Cervantes C., J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J.C. Torres-Guzmán, R. Moreno-Sánchez** (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**: 335-347.
- Cervantes C., F. Gutiérrez-Corona** (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**: 121-137.
- Chang, B.Y., M. Dworkin** (1994). Isolated fibrils rescue cohesion and development in the *Dsp* mutant of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **176**: 7190-7196.
- Chang B.Y, M. Dworkin** (1996). Mutants of *Myxococcus xanthus dsp* defective in fibril binding. *J. Bacteriol.*, **178**: 697-700.
- Chen H., J.M. Keseler, L.J. Shimekts** (1990). Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.*, **172**: 4206-4213.
- Cheng L., N.C. Sturchio, J.C Woicik, K.M. Kemmer, P.F. Lyman, M.J. Bedzyk** (1998). High-resolution structural study of zinc ion incorporation at the calcite cleavage surface. *Surface Sci.*, **415**: L976- L982.
- Churchill S.A., J.V. Walters, P.F. Churchill** (1995). Sorption of heavy metals by prepared bacterial surfaces. *J. Environ. Eng.*, **121**: 706-711.
- Cid A., C. Herrero, E. Torres, J. Abalde** (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum* :effects on photosynthesis and related parameters, *Aquatic Toxicology*, **31**: 165-174.
- Corzo J., M. León-Barrios, V. Hernando-Rico, M. Gutiérrez-Navarro** (1994). Precipitation of metallic cations by the acidic exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* strain BGA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 4531-4536.
- Costa A.C.A., S.G.F. Leite** (1990). Cadmium and zinc biosorption by *Chlorella homosphaera*. *Biotechnol. Lett.*, **12**: 941-944.
- Costerton JW., Z. Lewndowski, DE. Caldwell, DR. Korber, HM. Lappin-Scott** (1995). Biofilm bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**: 711-745.
- Costerton J.W., P.S. Stewart** (2001). Battling biofilms. *Sci Am*, **285**: 74-81.



- Costley S.C., F.M. Wallis** (2001). Bioremediation of heavy metals in a synthetic wastewater using a rotating biological contactor. *Wat. Res.*, **35**(15): 3715-3723.
- Crocket J.H., J.W. Winchester** (1966). Coprecipitation of zinc with calcium carbonate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **30**: 1093-1109.
- Cucarella C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, J.R.C. Penades** (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.*, **183**: 2888-2896.
- Crueger W., A. Crueger** (1989). Biotechnology. Second edition. Oldenbourg Verlag GmbH, Munchen.
- Danese P.M., L.A. Pratt, R. Kolter** (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.*, **182**: 3593-3596.
- Davis J.A., C. Fuller, A.D. Cook** (1987). A model for trace metal sorption processes at the calcite surface: adsorption of Cd<sup>2+</sup> subsequent solid solution formation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **51**: 1477-1490.
- Dawid W.** (1978). Fruchtkörper-bildende Myxobakterien in Boden Brasiliens. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **18**: 83-93.
- Dawid W.** (1979). Vorkommen und verbreitung fruchtkörperbildender Myxobakterien im Siebengebirge. *Z. Allg. Mikrobiol.* **19**: 705-719.
- Dawid W.** (2000). Biology and global distribution of mixobacteria in soils, *FEMS Microbiology Reviews*, **24**: 403- 427.
- Decho A.W.** (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview, *Continental Shelf Research*, **20**: 1257-1273.
- Deer W.A., R.A. Howie, J. Zussman** (1965). The Rock-Forming Minerals. vol V (Non-silicates). Longman. London.
- Diels L., M. De Smet, L. Hooyberghs, P. Corbisier** (1999). Heavy metals bioremediation of soil. *Mol. Biotechnol.*, **12**: 149-158.
- Dobson W.J., H.D. McCurdy, T.H. MacRae** (1979). The function of fimbriae in *Myxococcus xanthus*. II. The role of fimbriae in cell-cell interactions. *Can. J. Microbiol.*, **25**: 1359-1372.
- Doelman P.** (1995). Microbiology of soil and sediments, in Biogeodynamics of Pollutants in soils and sediments. Salomon, S.W. and Stigliani, W., Eds, Springer. Berlin.
- Doelman P., E. Jansen, M. Michels, M. Van-Til** (1994). Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Abiol. Fertil. Soil.*, **17**: 177-184.
- Doetsch R.N., G.J. Hageage** (1968). Motility in procariotic organisms: problems, points of view, and perspectives. *Biol. Rev.*, **43**: 317-362.



**Downard J., S.V. Ramaswamy, K.-S. Kil** (1993). Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.*, **175**: 7762-7770.

**Dworkin M.** (1972). The Myxobacteria: New directions in studies of procariotic development. *C.R.C. Crit. Rev. In. Microbiol.*, **1**: 435-452.

**Dworkin M., D. Kaiser** (1993). Myxobacteria II. Washington, American Society for Microbiology, 404 p.

**Dworkin M., K.H. Keller, D. Weisberg** (1983). Experimental observations consistent with a surface tension model of gliding motility of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **155**: 1367-1371.

**Eccles H.** (1995). Removal of heavy metals from effluent streams-why select a biological process. *Int. Biodeter. Biodeg.*, 5-16.

**Eccles H., S. Hunt** (1986). Immobilisation of ions by biosorption. Ellis Horwood, Chrichester.

**Ehrlich H.L.** (1978). How microbes cope with heavy metals, arsenic and antimony in their environment. In *Microbial Life in Extreme Environments* ed. Kushner, D.J. pp. 381-408. London: Academic Press.

**Ehrlich H.L.** (1990). Geomicrobiology. 2ND ED. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.

**Ehrlich H.L.** (1996). Geomicrobiology. Marcel Dekker, Inc., New York.

**Ehrlich H.L.** (1997). Microbes and metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**: 687-692.

**Ehrlich H.L.** (1999). Microbes as geologic agents: their role in mineral formation. *Geomicrob. J.*, **16**: 135-153.

**Eiland F.** (1981). The effects of application of sewage sludge on microorganisms in soil. *Tidsskrift planteavl.*, **85**: 39-46.

**Falini G., S. Albeck, S. Weiner, L. Addidi** (1996). Control of aragonite and calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, **271**: 67-69.

**Fang H.H.P., L. Xu, K. Chan** (2002). Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Wat. Res., In press.*

**Fautz E., G. Rosenfelder, L. Grotjhan** (1979). Iso-branched-2-and 3-hydroxy fatty acids as characteristics constituents of some gliding bacteria. *J. Bacteriol.*, **140**: 852-858.

**Fernández-Luque B.** (2002). Estudio fenotípico del mutante *DZF1Δoar* de *Myxococcus xanthus* y de su capacidad biomineralizadora. Tesis Doctoral. Universidad e Granada.

**Fernández-Vivas A., J.M. Arias, E. Montoya** (1983). Autolysis in *Myxococcus coralloides* D. *FEMS Microbiol. Letters*, **20**: 97-101.



**Fernández-Vivas A., J.M. Arias, E. Montoya** (1985). Lysis induced by uncoupling agents in *Myxococcus coralloides* D. *FEMS Microbiol. Letters*, **27**: 99-102.

**Ferris F.G., T.J. Beveridge** (1986). Site specific of metallic ion binding of *Escherichia coli* K-12 lipopolysaccharide. *Can. J. Microbiol.*, **32**: 52-55.

**Flemming HC, J. Wingender, C. Mayer, V. Korstgens, W. Borchard** (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In *Community Structure and Cooperation in Biofilms*. Edited by Allison D., P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott, M. Wilson SGM Symposium Series 59. Cambridge: Cambridge University Press, 87-105.

**Fortin D., F.G. Ferris, T.J. Beveridge** (1997). Surface-Mediated mineral development by bacteria, *Geomicrobiology*, **35**: 161-180.

**Fourest E., C. Canal, J.C. Roux** (1994). Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**: 325-332.

**Fourest E., B. Volesky** (1996). Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Sargassum fluitans*. *Environ. Sci. Technol.*, **30**: 277-282.

**Francis C.A., B.M. Tebo** (1999). Marine *Bacillus* Spores as catalysts for oxidative precipitation and sorption of metals. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **1**(1): 71-78.

**Francki K. T., B.J. Chang, B.J. Mee, P.J. Collignon, V. Susai, P.K. Keese** (2000). Identification of genes associated with copper tolerance in an adhesion-defective mutant of *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **29**: 115-121.

**Fredrickson J.K., H.M. Kostandarithes, S.W. Li, A.E. Plymale, M.J. Daly** (2000). Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(5): 2006-2011.

**Friis N., P. Myers-Keith** (1986). Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**: 212-28.

**Fuller C., J.A. Davis** (1987). Processes and kinetics of Cd<sup>2+</sup> sorption by calcareous aquifer sand. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **51**: 1491-1502.

**Fuqua, C., S.C. Winans, E.P. Greenberg** (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: The luxR-luxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, **50**: 727-751.

**Gadd G.M.** (1990). Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, **46**: 834-840.

**Gadd G.M.** (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.*, **124**: 25-60.

**Gadd G.M.** (2000). Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion of Biotechnology*, **11**, 271-279.



**Gadd G.M., de Rome L.** (1988). Biosorption of copper by fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**: 610-617.

**Gadd G.M., A.J. Griffiths** (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbiol. Ecol.*, **4**: 303-317.

**Gadd G.M., O.S. Laurence, P.A. Briscoe, J.T. Trevors** (1989). Silver resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Biol. Met.*, **2**(3): 168-173.

**Gadd G.M., J.L. Mowll** (1983). The relationship between cadmium uptake, potassium release and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **16**: 45-48.

**Gadd G.M., C. White** (1993). Microbial treatment of metal pollution -a working biotechnology? *Trends Biotechnol.*, **11**: 353-359.

**Galun M., S.M. Siegel, M.L. Cannon, B.Z. Siegel, E. Galun** (1987). Ultrastructural localization of uranium biosorption in *Penicillium digitatum* by stem x-ray microanalysis. *Enzyme Pollut.*, **43**: 209-218.

**García-Sánchez A., E. Álvarez-Ayuso** (2002). Sorption of Zn, Cd and Cr on calcite. Application to purification of industrial wastewaters. *Minerals Engineering*, **15**, 539-547

**Geesey G.G.** (2001). Bacterial behavior at surfaces. *Current Opinion in Microbiology*, **4**: 296-300.

**Geesey G.G., L. Jang** (1989). Interactions between metal ions and capsular polymers. In: Beveridge T.J., Doyle R.J.,(Eds.), *Metal Ions and Bacteria*. Wiley, New York, 325-357.

**Geesey G.G., L. Jang** (1990). Extracellular polymers for metal binding. En: *Microbial Mineral Recovery* (Ehrlich H.L., Brierley C.L. eds.). pp. 223-247. McGraw-Hill Book Co., New York.

**Geitler L.** (1925). Über *Polyangyum parasiticum* sp. eine submerse, parasitische *Myxobacteriaceae*. *Arch. Protistenkd.* **50**: 67-88.

**Gemeiner P., L. Rexova, F. Sevec, O. Norrlov** (1994). Natural and synthetic carriers suitable for immobilization of viable cells, active organelles and molecules. In: Veliky, I.A. and McLean R.J (Eds.) *Immobilized biosystems*. Chapman & Hall, London.

**Ghandour W., J.A. Hubbard, J. Deistung, M.N. Hughes, R.K. Poole** (1988). The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12: toxic effects and interaction with copper ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**: 559-565.

**Goddard P.A., A.T. Bull** (1989). The isolation and characterisation of bacteria capable of accumulating silver. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31**: 308-313.

**Gómez M., M. Zamorano, J.M. Cardenete, A. Menéndez, J. González-López, E. Hontoria** (1996). Desnitrificación biológica de aguas subterráneas: estudios a escala de planta piloto. *IV Simposio sobre el agua en Andalucía*, **2**: 331-340.

**González F., M.D. Montoya, E. Fárez-Vidal, J.M. Arias, E. Montoya** (1990). Effects of phosphate on antibiotic and extracellular protein production by *Myxococcus coralloides* D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**: 78-80.



**González F., J. Muñoz, J.M. Arias, E. Montoya** (1989). Production of acid and alkaline phosphatases by *Myxococcus coralloides*. *Folia Microbiol.*, **34**: 185-194.

**González F., A. Vargas, J.M. Arias, E. Montoya** (1991). Phosphatase activity during development cycle of *Myxococcus xanthus*. *Can. J. Microbiol.*, **37**: 74-77.

**González-López J., M.A. Gómez, E. Hontoria** (1998). Influence of carbon source on nitrate remove of contaminated groundwater in denitrifying submerged filter. Contamination par des nitrates et des pesticides des eaux des pays Mediterraneens. Tetouan (Marruecos).

**González-Muñoz M.T., N. Ben Omar, J.M. Arias, E. Montoya, M. Rodríguez-Gallego** (1993). Struvite production by *Myxococcus xanthus* D. *Chemosphere* **26**: 1881-1887

**González-Muñoz M.T., N. Ben Omar, M. Martínez-Cañamero, M. Rodríguez-Gallego, A. López-Galindo, J.M. Arias** (1996). Struvite and Calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*. *J. Crystal Growth*, **163**: 434-439.

**González-Muñoz M.T., K. Ben Chekroun, A. Ben Aboud, J. M. Arias, M. Rodríguez-Gallego** (2000). Bacterially induced Mg-Calcite formation: role of Mg<sup>2+</sup> in development of crystal morphology. *J. Sedim. Res.*, **70**: 559-564.

**González-Muñoz M. T., M. L. Merroun, N. Ben Omar, J. M. Arias** (1997). Biosorption of uranium by *Myxococcus xanthus*. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **40**: 107-114

**Gorski L., W., III Godchaux, E.R. Leadbetter, R.R. Wagner** (1992). Diversity in surface features of *Cytophaga johnsonae* motility mutants. *J.Gen. Microbiol.*, **138**: 1767-1772.

**Gorski L., W., III Godchaux, E.R. Leadbetter** (1993). Structural specificity of sugars that inhibit gliding motility of *Cytophaga johnsonae*. *Arch. Microbiol.*, **160**: 121-125.

**Gräf W.** (1975). Myxobakterien der gattung *Myxococcus* als indirekte fakalstoffindikatoren in oberflachengewasser. I. Mitteilung. Zentralblatt fur bakterologie, parasiten kunde, infektionkrankhetiten und hygiene. I. Abteilung Originale B. **160**: 28-39.

**Guibal E., C. Roulph, P. Le Cloirec** (1992). Uranium biosorption by a filamentous fungus *Mucor miehei* pH effect on mechanisms and performances of uptake. *Water Res.*, **26**: 1139-1145.

**Günther A., G. Bernhard, G. Geipel, T. Reich, A. Rossberg, H. Nitsche** (2003). Uranium speciation in plants. *Radiochim. Acta*, **91**: 319-328.

**Gutnick D., H. Bach** (2000). Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**: 451-460.

**Hagen D.C., A.P. Bretscher, D. Kaiser** (1978). Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.*, **64**: 284-296.

**Halfen L.N.** (1973). Gliding motility of oscillatoria: ultrastructural and chemical characterization of the fibrillar layer. *J. Phycology*, **9**: 248-253.



- Halfen L.N., R.W. Gastenholz** (1971). Gliding motility in the blue-green alga *oscillatoria princeps*. *J. Phycology.*, **7**: 133-145.
- Harcke E., A. Huttermann, H. Kühlwein** (1971). Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacterales). I. Purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity. *Arch. Microbiol.*, **77**: 86-95.
- Harcke E., A. Huttermann, H. Kühlwein** (1972). Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacterales). II Identification of the bacteriolytic enzyme as a muramidase. *Arch. Microbiol.*, **85**: 6-12.
- Hart B.A., S.A. Zahler** (1966). Lytic enzyme produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **92**: 1632-1637.
- Hartzell P., Kaiser, D.** (1991a). Function of MglA, a 22-kilodalton protein essential for gliding in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **173**: 7615-7624.
- Hartzell P., D. Kaiser**, (1991b). Upstream gene of the *mgl* operon controls the level of MglA protein in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **173**: 7625-7635.
- Haska G.** (1974). Extracellular lytic enzymes of *Myxococcus virescens*. IV. Purification and characterization of a D-alanyl-N-Lysine endopeptidase. *Physiol. Plant.*, **31**: 251-256.
- Haska G., S. Stahl** (1971). Variantes of *Myxococcus virescens* exhibiting dispersed growth. Growth and production of extracellular enzymes and slime. *Physiol. Plant.*, **24**: 136-142.
- Hassen A., N. Saidi, M. Cherif, A. Boudabous** (1998a). Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus Thuringiensis*. *Bioresource Technology*, **65**: 73-82.
- Hassen A., N. Saidi, M. Cherif, A. Boudabous** (1998b). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, **64**: 7-15.
- Helm D., H. Labischinski, G. Schallehn, D. Naumann** (1991). Classification and identification of bacteria by Fourier-Transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.*, **137**: 69-79.
- Hennig C., P.J. Panak, T. Reich, A. Roßberg, J. Raff, S. Selenska-Pobell, W. Matz, J.J. Bucher, G. Bernhard, H. Nitsche** (2001). EXAFS investigation of uranium (VI) complexes formed at *Bacillus cereus* and *Bacillus sphaericus* surfaces. *Radiochim. Acta*, **89**: 625-631.
- Henrichsen J.** (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* **36**: 478-503.
- Heydorn A., A.T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B.K. Ersboll, S. Molin** (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, **146**: 2395-2407.
- Higgins I.J., R.G. Burns** (1975). *The Chemistry and Microbiology of Pollution*. Academic Press, London.



- Hiroki M.** (1994). Populations of Cd-tolerant microorganisms in soil polluted with heavy metals. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **40**: 515-524
- Hirsch H.J.** (1977). Bacteriocins from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *Arch. Microbiol.*, **115**: 45-49.
- Hodgkin J., D. Kaiser** (1977). Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2938-2942.
- Hodgkin, J., D. Kaiser** (1979a). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): genes controlling movements of singles cells. *Mol. Gen. Genet.*, **171**: 167-172.
- Hodgkin, J., D. Kaiser** (1979b). Genetics of gliding motility in *M.xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.*, **171**: 177-191.
- Holan Z.R., B. Volesky** (1994). Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng.*, **43**: 1001-1009.
- Holan Z.R., B. Volesky** (1995). Accumulation of cadmium, lead and nickel by fungal and wood biosorbents. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **53**: 133-146.
- Holan Z.R., B. Volesky, I. Prasetyo** (1993). Biosorption of cadmium by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**: 819-825.
- Holmes D.S., J.R. Yates, J.A. Schrader** (1990). En: Biohydrometallurgy 87 (Norris P.R., Kelly D.P. eds.). *Sci. Technol. Letters*, Kew, Surrey. pp. 133.
- Humphrey B.A., M.R. Dickson, K.C. Marshall** (1979). Physico-chemical and in situ observations on the adhesion of gliding bacteria to surfaces. *Arch. Microbiol.*, **120**: 231-238.
- Hontoria E., M. Zamorano, M.A. Gómez** (1998). Nuevos soportes para la depuración biológica en filtros inundados. *Tecno. Ambiente.*, **79**: 63-65.
- Hook L.A.** (1977). Distribution of myxobacters in aquatic habitats in an alkaline bog. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 333-335.
- Hu M.Z.C., M. Reeves** (1997). Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain CSU immobilized in a novel matrix. *Biotechnol. Prog.*, **13**: 60-70.
- Hu M.Z.C., J.M. Norman, B.D. Faison, M.E. Reeves** (1996). Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain CSU: characterization and comparison studies. *Biotechnol. Bioeng.*, **51**: 237-247.
- Huckle J.W., A.P. Morby, J.S. Turner, N.J. Robinson** (1993). Isolation of a prokaryotic metallothionein and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol. Microbiol.*, **7**: 177-187.
- Hughes M.N., R.K. Poole** (1989). *Metals and Microorganisms*. Chapman and Hall, London-New York.
- Humphrey B.A., M.R. Dickson, K.C. Marshall** (1979). Physico-chemical and in situ observations on the adhesion of gliding bacteria to surfaces. *Arch. Microbiol.*, **120**: 231-238.



- Hutchins S. R., M.S. Davidson, J.A. Brierley** (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.*, **40**: 311-336
- Inouye S., M.Y. Hsu, S. Eagle, M. Inouye** (1989). Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xanthus*. *Cell*, **56**: 709-717.
- Irschik H., H. Reichenbach** (1985). An unusual pattern of carbohydrate utilization in *coralloccoccus (Myxococcus) corallooides (Myxobacterales)*. *Arch. Microbiol.*, **142**: 40-44.
- Jackson G., H. Beyenal, W.M. Rees, Z. Lewandowski** (2001). Growing reproducible biofilms with respect to structure and viable cell counts. *Journal of microbiological Methods*, **47**: 1-10.
- Jackson D., K. Suzuki, L. Oakford, J.W. Simecka, M.A. Hart, T. Romeo** (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global carbon regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **184**: 290-301
- Jackson R.L., R.S. Wolfe** (1968). Composition properties and substrate specificities of myxobacter AL-1 protease. *J. Biol. Chem.* **243**: 870-888.
- Jahn A., P.H. Nielsen** (1998). Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Science and Technology*, **37**(1): 17-24.
- Jang A., S.M. Kim, S.Y. Kim, S.G. Lee, I.S. Kim** (2001). Effect of heavy metals (Cu, Pb, and Ni) on the compositions of EPS in biofilms, *Water Science and Technology*, **43** (6), 41-48.
- Janssen G.R.J., M. Dworkin** (1985). Cell interactions in developmental lysis of *Myxococcus xanthus*. *dev. Biol.*, **112**: 194-202.
- Janssen G.R.J., J.W. Wireman, M. Dworkin** (1977). Effect of temperature on the growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **130**: 561-562.
- Jeffers E.E.** (1964). Myxobacters of a freshwater lake and its environs. *Int. Bull. Bacterial Nomencl. Taxon.* **14**: 115-136.
- Kabata- Pendias, H. Pendias** (1992). Trace elements in soil and plants: CRC Press Boca Raton. *Ann. Arbor London* 365 p.
- Kaplan D., D. Christiaen, A. Shoshana** (1987). Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella sp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2953-2956.
- Kapoor A., T. Viraraghavan** (1998a). Removal of heavy metals from aqueous solutions using immobilized fungal biomass in continuous mode. *Water Res.*, **32**: 1968-1977.
- Kapoor A., T. Viraraghavan** (1998b). Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*. Effect of pretreatment. *Bioresource Technol.*, **63**: 109-113.
- Kaiser D.** (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5952-5956.



**Kaiser D.** (1998). How and why mixobacteria talk to each other. *Current Opinion in Microbiology*, **1**: 663- 668.

**Kar L., P. Matsumura, M.E. Johnson** (1992). Bivalent-metal binding to CheY protein. Effect on protein conformation. *Biochem. J.*, **287**(2): 521-531.

**Kasan H.C., P. Stegmann** (1987). Intracellular bioaccumulation of zinc by an *Enterobacter* species. *Microbios*, **51**: 89-96.

**Katz W., J.L. Stominger** (1967). Structure of the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*. II. Study of the structure of the peptides produced after lysis with the myxobacterium enzyme. *Biochem.* **6**: 930-937.

**Katznelson H.K., D.C. Gillespie, F.D. Cook** (1964). Studies on the relationships between nematodes and other soil microorganisms. III. Lytic action of soil myxobacters on certain species of nematodes. *Can. J. Microbiol.*, **10**: 699-704.

**Kearns D.B., P.J. Bonner, D.R. Smith, L.J. Shimkets** (2002). An extracellular matrix associated zinc metalloprotease is required for dilauroly phosphatidylethanolamine chemotactic excitation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacterol.*, **184**: 1678-1684.

**Keasling J.D., S.J. Van Dien, P. Trelstad, N. Renninger, K. MacMahon** (2000). Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Mosc)*, **65**: 385-393.

**Keiber R.J., X. Zhou, K. Mopper** (1990). Formation of carbonyl compounds from UV-induced photodegradation of humic substances in natural waters: fate of riverine carbon in the sea. *Limnology and Oceanography*, **35**: 1503-1515.

**Keller K.H., M. Grady, D. Dworkin** (1983). Surface tension gradients: Feasible model for gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **155**: 1358-1366.

**Kelly S. D., M. I. Boyanov, B. A. Bunker, J. B. Fein, D. A. Fowle, N. Yee, K.M. Kemner** (2001). XAFS determination of the bacterial cell wall functional groups responsible for complexation of Cd and U as a function of pH. *J. Synchrotron Rad.* **8**, 946.

**Kierans M., A.M. Staines, H. Bennett, G.M. Gadd** (1991). Silver tolerance and accumulation in yeasts. *BioMetals*, **4**: 100-106.

**Kim S.H., S. Ramaswamy, J. Downard** (1999). Regulated Exopolysaccharide production in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology*. **181**(5): 1496- 1507.

**Klasen H.J.** (2000). A historial review of the use of silver in treatment of burns.II. Renewed interest for silver. *Burns*, **26**(2): 131- 138.

**Klaus-Joerger T., R. Joerger, E. Olsson and C.G. ran Granqvist** (2001). Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science, *TRENDS in Biotechnology*, **19**(1): 15-20.

**Kleinig H.** (1972). Membranes from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*) containing carotenoid glycosides. I. Isolation and composition. *Biochem. Biophys. Acta.*, **274**: 489-498.



- Kleinig H., H. Reichenbach, H. Achenbach** (1970). Carotenoid pigments of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). II. Acylated carotenoid glucosides. *Arch. Microbiol.*, **74**: 223-234.
- Klimmek S., H.J. Stan** (2001). Comparative analysis of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environ. Sci. Technol.*, **35**: 4283-4288.
- Kolsto A.B., A. Gronstad, H. Oppegaard** (1990). Physical Map of the *Bacillus cereus* Chromosome. *J. Bacteriol.*, **172**(7): 3821-3825.
- Konopka A., T. Zakharova, M. Bischoff, L. Olivier, C. Nakatsu, R.F. Turco** (1999). Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2256-2259.
- Kroos L., A. Kuspa, D. Kaiser** (1986). A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **117**: 252-266.
- Kröpfl K., G. Zárny, É. Ács** (2003). Investigation of lead and nickel contaminated natural biofilms. *Spectrochimica Acta Part B.*, **58**: 2177-2181.
- Kropp J., A. Block, W. Von Bloh, T. Klenke, H.J. Schellnhuber** (1997). Multifractal characterization of microbially induced magnesian calcite formation in recent tidal flat sediments. *Sedim. Geol.*, **109**: 37-51.
- Kühlwein H.** (1950). Zur Systematik und Verbreitung der Myxobakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Abt.*, **113**: 480-490.
- Kunito T., K. Nagaoka, N. Tada, K. Saeki, K. Senoo, H. Oyaizo and S. Matsumoto** (1997). Characterization of Cu-resistant bacterial communities in Cu-contaminated soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **43**: 709-717.
- Kuspa A., L. Kross, D. Kaiser** (1986). Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.*, **117**: 267-276.
- Kuyucak N., B. Volesky** (1988). Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnol. Lett.*, **2**: 137-142.
- Kuyucak N., B. Volesky** (1989). Accumulation of cobalt by marine alga. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**: 809-814.
- LaRossa R., J. Kuner, D. Hagen, C. Manoil, D. Kaiser** (1983). Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants. *J. Bacteriol.*, **153**: 1394-1404.
- Lancero H., J. E. Brofft, J. Downard, B. W. Birren, C. Nusbaum, J. Naylor, W. Shi, L. J. Shimkets** (2002). Mapping of *Myxococcus xanthus* Social Motility dsp Mutations to the dif Genes. *J. Bacteriol.*, **184**(5): 1462-1465.
- Langley S., T.J. Beveridge** (1999). Metal binding by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is influenced by growth of the cells as a biofilm. *Can J Microbiol.*, **45**: 616-622.



- Lawrence J.R., D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, D.E. Caldwell** (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.*, **173**: 6558- 6567.
- Lawrence J.R., G.D.W. Swerhone, Y.T.J. Kwong** (1998). Natural attenuation of aqueous metal contamination by an algal mat. *Can J Microbiol*, **44**: 825- 832.
- Lazarova V.Z., D. Bellahcen, J. Manen, D. Staahl, R. Rittmann** (1999). Influence of operating conditions on population dynamics in nitrifying biofilms. *Water Science & Technology*, **37** (7): 5- 11.
- Lee J.U., T.J. Beveridge** (2001). Interaction between iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms attached to Sepharose surfaces. *Chemical Geology*, **180**: 67-80.
- Lebranz M, G.K. Druschel, T. Thomsen-Ebert, B. Gilbert, S.A. Welch, K.M. Kemner, G.A. Logan, R.E. Summons, G. De Stasio, P.L. Bond et al.**, (2000). Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. *Science*, **290**: 1744-1747.
- Li Y., H. Sun, X. Ma, A. Lu, R. Lux, D. Zusman, and W. Shi** (2003). Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *PNAS*, **100**: 5443-5448.
- Lindberg B.** (1990). Components of bacterial polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **48**: 279 -318.
- Lovley D.** (1991). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Microbiol. Rev.*, **55**: 259-287.
- Lovley D.R** (Ed) (2000). Environmental Microbe-Metal Interactions. Washington DC: *American Society for Microbiology Press*, 395.
- Lowenstan H.A.** (1981). Minerals formed by organisms. *Science*, **211**: 1126-1131
- Lünsdorf H., H. Reichenbach** (1989). Ultrastructural details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J. Gen. Microbiol.*, **135**: 1633-1641.
- Lünsdorf H., H.U. Schairer** (2001). Frozen motion of gliding bacteria outlines inherent features of motility apparatus. *Microbiology*, **147**: 939-947.
- Macaskie L.E., K.M. Bonthron, P. Yong, D. Goddard** (2000). Enzymatically-mediated bioprecipitation of uranium by *Citrobacter* sp.: a concerted role for extracellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiology*, **146**: 1855-1867.
- MacRae T.H., H.D. McCurdy** (1975). Ultrastructural studies of *Chondromyces crocatus* vegetative cells. *Can. J. Microbiol.*, **21**: 1815-1826.
- MacRae T.H., H.D. McCurdy** (1976). The isolation and characterisation of gliding motility mutants in *Myxococcus xanthus*. *Can. J. Microbiol.*, **22**: 1282-1292.



**Madigan M.T., J.M. Martinko, J. Praker** (2004). Brock. Biología de los microorganismos. Décima edición. pp: 596.

**Majidi V., D.A. Laude, J.A. Holcombe** (1990). Investigation of the metal-algae binding site with  $^{113}\text{Cd}$  nuclear magnetic resonance. *Environ. Sci. Technol.*, **24**: 1300-1312.

**Makarov E.S., V.I. Ivanov** (1960). Doklady Akademii Nauk SSSR, **132**: 673.

**Manoil C., D. Kaiser** (1980a). Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.*, **141**: 297-304.

**Manoil C., D. Kaiser** (1980b). Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J. Bacteriol.*, **141**: 305-315.

**Manoil C., D. Kaiser** (1980c). Purine-containing compounds, including cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate, induced fruiting of *Myxococcus xanthus* by nutritional imbalance. *J. Bacteriol.*, **141**: 374-377.

**Marañón E., H. Sastre** (1990). Eliminación y recuperación de metales pesados de efluentes industriales: Análisis y comparación de procesos de tratamiento. *Revista Técnica de Medio Ambiente*, Julio-Agosto 9-23.

**Mason O.J., D. Powelson** (1958). Lysis of *Myxococcus xanthus*. *J. Gen. Microbiol.*, **19**: 65-70.

**Matis K.A., A.I. Zouboulis, A.A. Grigoriadou, N.K. Lazaridis, L.V. Ekateriniadou** (1996). Metal biosorption-flotation. Application to cadmium removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 569-573.

**Mattuschka B., K. Junghaus, G. Straube** (1993). Biosorption of metals by waste biomass. En: Biohydrometallurgical Technologies (Torma A.E., Apel M.L., Brierley C.L. eds.). vol. 2. pp. 125-132. The Minerals, Metals and Materials Society. Warrendale, Pennsylvania.

**McBride M.B.** (1979). Chemisorption and precipitation of  $\text{Mn}^{2+}$  at the  $\text{CaCO}_3$  surface. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 693-698.

**McBride M.B.** (1980). Chemisorption of  $\text{Cd}^{2+}$  on calcite surfaces. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **44**: 26-28.

**McBride M.J., P. Hartzell, D.R. Zusman** (1993). Motility and tactic behavior of *Myxococcus xanthus*. In Dworkin and D. Kaiser (ed), Myxobacteria II. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.

**McBride M.J., R.A. Weinberg, D.R. Zusman** (1989). "Frizzy" aggregation genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus* show sequence similarities to the chemotaxis genes of enteric bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 424-428.

**McCleary W.R., D.R. Zusman** (1990). Frz E of *Myxococcus xanthus* is homologous to both CheA and CheY of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5898-5902.



- McCurdy H.D.** (1969). Studies on the taxonomy of the *Myxobacterales*. I. Record of canadian isolates and survey of methods. *Can. J. Microbiol.*, **15**: 1453-1461.
- McCurdy H.D., T.M. MacRae** (1974). Xanthacin, a bacteriocin of *Myxococcus xanthus* fb. *Can. J. Microbiol.*, **20**: 131-135.
- McLean R.J.C., D. Beauchemin, L. Clapham, T.J. Beveridge** (1990). Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 3671-3677.
- McLean R.J.C., D. Fortin, D.A. Brown** (1996). Microbial metal-binding mechanisms and their relation to nuclear waste disposal. *Can. J. Microbiol.*, **42**: 392-400.
- Mergeay M.** (1997). Microbial resources for remediation of sites polluted by heavy metals. *Perspectives in Bioremediation* (Wild, J.R. et al., Eds.), pp 65- 73. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Merroun M.L.** (1998). Bioadsorción de metales por *Myxococcus xanthus*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Merroun M.L., N. Ben Omar, E. Alonso, J.M. Arias, M.T. González Muñoz** (2001). Silver sorption to *Myxococcus xanthus* biomass. *Geomicrobiol. J.*, **18**: 183-192
- Merroun M. L., N. Ben Omar, M. T. González-Muñoz, J. M. Arias** (1998) *Myxococcus xanthus* biomass as biosorbent for lead. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 63-67.
- Merroun M.L., C. Hennig, A. Rossberg, T. Reich, S. Selenska-Pobell** (2003a). Characterization of U(VI)-*Acidithiobacillus ferrooxidans* complexes using EXAFS, transmission electron microscopy and energy-dispersive X-ray analysis. *Radiochim. Acta*, **91**: 1-9.
- Merroun M.L., G. Geipel, R. Nicolai, K.H. Heise, S. Selenska-Pobell** (2003b). Complexation of uranium (VI) by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Studied using time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy. *Biometals*, **16**: 331-339.
- Merroun M.L., S. Selenska-Pobell** (2001). Interaction of the three ecotypes of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with U(VI). *Biometals*, **14**: 171-179.
- Mittleman M.W., G.G. Geesey** (1985). Copper binding characteristics of exopolymers from a freshwater sediment bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 846-851.
- Mogollon L., R. Rodriguez, W. Larrota, N. Ramirez, R. Torres** (1998). Biosorption of nickel using filamentous fungi. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **70-72**: 593-601.
- Montoya M.D.** (1988). Producción, actividad biológica y actividad in vivo de los antibióticos producidos por *Myxococcus coralloides* D. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Montoya M.D., A. Gálvez, J.M. Arias, E. Montoya** (1994). Autolytic effect of the antibiotic produced by *Myxococcus coralloides* D. *Microbiología SEM*, **10**: 395-402.



- Mullen M.D., D.C. Wolf, F.G. Ferris, T.J. Beveridge, C.A. Flemming, G.W. Bailey (1989). Bacterial sorption of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 3143-3149.
- Nariya H., S. Inouye (2002). Activation of 6-phosphofruktokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.*, **46**(5): 1353-1366.
- Nathan Y., J. Lucas (1976). Expériences sur la précipitation directe de l'apatite dans l'eau de mer: implication dans la genèse des phosphorites. *Chem. Geol.*, **18**: 181-186.
- Naumann D., D. Helm, H. Labischinski (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*, **351**: 81-82.
- Neuman B., A. Pospiech, H.U. Schairer (1992). Size and stability of the genome of the myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*. *J. Bacteriol.*, **174**: 6307-6310.
- Newman D.K., T.J. Beveridge, F.M.M. Morel (1997). Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2022-2028.
- Nicaud J.M., A. Breton, G. Younes, J. Guespin-Michel (1984). Mutants of *Myxococcus xanthus* impaired in protein secretion: an approach to study of a secretory mechanism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**: 344-350.
- Nieboer E., D.H.S. Richardson (1980). The replacement of the non-descript term: Heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. (Ser B)*, **1**: 3-26.
- Nielsen P.H., A. Jahn, R. Palmgren (1997). Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilm. *Water Science and Technology*, **36**(1): 11-19.
- Nies D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 730-750.
- Norén B. (1955). Studies on myxobacteria. III. organic factors in nutrition. *Startryck Bot. Notiser.*, **108**: 81-134.
- Norris P.R., D.P. Kelly (1979). Accumulation of metals by bacteria and yeasts. *Dev. Ind. Microbiol.*, **20**: 299-308.
- Ochiai E.I. (1987). General principles of biochemistry elements. *Plenum Press*, New York, N.Y.
- Ohsumi Y., K. Kitamoto, Y. Anraku (1988). Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J. Bacteriol.*, **170**: 2676-2682.
- Ohtake H., C. Cervantes, S. Silver (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.*, **169**: 3853-3856.
- Orndorff P.E., M. Dworkin (1980). Separation and properties of the cytoplasmic and outer membranes of vegetative cells of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **141**: 914-927.



- Osorio F., E. Hontoria** (2001). Optimization of bed material height in a submerged biological aerated filter. *J. Env. Eng.* (ASCE). Nov. 2001.
- O'Toole G.A., R. Kolter** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, **30**: 295-304.
- Oyaizu H., C.R. Woese** (1985). Phylogenetic relationships among the sulfate respiring bacteria, myxobacteria and purple bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**: 257-263.
- Pagnanelli F., M.P. Panini, L. Toro, M. Trifoni, F. Veglio** (2000). Biosorption of metal ions on *Arthrobacter sp.*: Biomass characterization and biosorption modeling. *Environ. Sci. Technol.*, **34**: 2773-2778.
- Panichev N.A., A.O. Diakov, K.V. Kvitko** (1997). Biotransformation of cadmium species by microorganisms. *Can. J. Anal. Sciences Spectros.*, **42**: 116-120.
- Papadopoulos P., D.L. Rowell** (1988). The reaction of cadmium with calcium carbonate surfaces. *J. Soil Sci.*, **39**: 23-36.
- Papadopoulos P., D.L. Rowell** (1989). The reaction of copper and zinc with calcium carbonate surfaces. *J. Soil Sci.*, **40**: 39-48.
- Parker D.L., L.C. Rai, N. Mallick, P. K.Rai, H.D. Kumar** (1998). Effects of cellular metabolism and viability on metal ion accumulation by cultured biomass from a bloom of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Env. Microbiol.*, **64**:1545-1547.
- Passador L., H.D. McCurdy** (1985). Cyclic nucleotides and development of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants. *Curr. Microbiol.*, **12**: 289-297.
- Pate J.L., L.-Y.E. Chang** (1979). Evidence that gliding motility in procariotic cells is driving by rotatory assemblies in the cell envelopes. *Curr. Microbiol.*, **2**: 59-64.
- Pearson R.G.** (1963). Hard and soft acid bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**: 3533-3539.
- Percival E., R.H. McDowell** (1967). Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. *Academic Press*, London, pp. 83-92.
- Pérez-López J.A., C. Rodriguez, E. Montoya** (1978). Repression of proteolytic enzymatic system in *Myxococcus xanthus*. *Microbios lett.*, **6**: 27-31.
- Piggot P.J.** (1973). Mapping of asporogenous mutations of *Bacillus subtilis*: a minimum estimate of the number of sporulation operons. *J. Bacteriol.*, **114**:1241-1253.
- Pradham A.A., Levine A.D.** (1995). Microbial biosorption of copper and lead from aqueous systems. *Sci. Total Environ.*, **170**: 209-220.
- Pratt L.A., R. Kolter** (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, **30**(2): 285.
- Pratt L.A., R. Kolter** (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, **2**: 598-603.



**Pujol R., H. Lemmel, Gousailles** (1998). A keypoint of nitrification in an upflow biofiltration reactor. *Wat. Sci. & Technol.*, **38**(3): 43-49.

**Pümpel T., F. Schinner** (1986). Silver tolerance and silver accumulation of microorganisms from soil materials of a silver mine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**: 244-247.

**Puranik P.R., K.M. Paknikar** (1997). Biosorption of lead and zinc from solutions using *Streptoverticillium cinnamoneum* waste biomass. *J. Biotechnol.*, **55**: 113-124.

**Reddy M.M.** (1977). Crystallization of calcium carbonate in the presence of trace concentrations phosphorous-containing anions. I. Inhibition of phosphate and glycerophosphate ions at pH 8.8 and 25°C. *J. Crystal Growth*, **41**: 287-295.

**Reichenbach H.** (1984). Myxobacteria: a most peculiar group of social prokaryotes. En: *Myxobacteria: Development and Cell Interactions* (Rosenberg E. ed.). pp. 1-50. Springer-Verlag, New York.

**Reichenbach H.** (1986). The myxobacteria: common organisms with an uncommon behavior. *Microbiol. Sci.*, **3**: 268-274.

**Reichenbach H.** (1993). Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy. En: *Myxobacteria II* (Dworkin M., Kaiser D. eds.). *American Society of Microbiology*, Washington, D.C.

**Reichenbach H., H. Kleinig** (1971). The carotenoids of *Myxococcus fulvus* (*Myxobacteriales*). *Arch. Microbiol.* **76**: 364-380.

**Remacle J., C. Vercheval** (1992). A zinc-binding protein in a metal-resistant strain, *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Can. J. Microbiol.*, **37**: 875-877.

**Richard Y., P. Thrébault** (1992). Biological removal of nitrates-report on 7 years of operation and progress. *Water supply*, **10**(3): 151-160.

**Ridgeway H.F.** (1977). Source of energy for gliding motility in *Flexibacter polymorphus*: effects of metabolic and respiratory inhibitors on gliding movement. *J. Bacteriol.*, **131**: 544-556.

**Ridgeway H.F., R.A. Laewin** (1973). Globletshaped subunits from the wall of a marine gliding microbi. *J. Gen. Microbiol.*, **79**: 119-128.

**Rivadeneyra M.A., J. González López, A. Ramos-Cormenzana** (1985a). Influence of ammonium ions on calcite and struvite formation by *Azotobacter* in chemically defined media. *Folia Microbiol.*, **30**: 55-57.

**Rivadeneyra M.A., I. Pérez-García, V. Salmerón, A. Ramos-Cormenzana** (1985b). Bacterial precipitation of calcium carbonate in presence of phosphate. *Soil. Biol. Biochem.*, **17**: 171-172.

**Rivadeneyra M.A., R. Delgado, E. Quesada, A. Ramos-Cormenzana** (1991). Precipitation of calcium carbonate by *Deleya halophila* in media containing NaCl as sole salt. *Curr. Microbiol.*, **22**: 185-190.



- Rivadeneira M.A., R. Delgado, G. Delgado, A. del Moral, M.R. Ferrer, A. Ramos-Cormenzana** (1993). Precipitation of carbonates by *Bacillus sp.* isolated from saline soils. *Geomicrobiol. J.*, **11**: 175-184.
- Rivadeneira M.A., G. Delgado, A. Ramos-Cormenzana, R. Delgado** (1997). Precipitation of carbonates by *Deleya halophila* in liquid media: pedological implications in saline soils. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, **11**: 35-47.
- Roane T.M., S.T. Kellogg** (1996). Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can J. Microbiol.*, **42**: 593-603.
- Rodríguez C., E. Montoya** (1980). Enzimas proteolíticos y bacteriolíticos producidos por *Myxococcus xanthus*. *Anales de Edafología y Agrobiología XXXIX*, 169-176.
- Rodríguez A.M., A.M. Spormann** (1999). Genetic and molecular analysis of *cglB*, a gene essential for single-cell gliding in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **181**: 4381-4390.
- Rodríguez-Navarro C., M. Rodríguez-Gallego, K. Ben Chekroun, M.T. González-Muñoz** (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2182-2193
- Rosen P.B.** (1996). Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. *J. Biol. Chem.*, **1**: 273-277.
- Rosenberg E., D. Filer, D. Zafriti, S.M. Kindler** (1973). Aspartokinase activity and the development cycle of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **115**: 29-34.
- Rosenberg E., M. Varon** (1984). Antibiotics and lytic enzymes. En *Myxobacteria: Development and Cell Interactions* (Rosenberg E. ed.). 109-125. Springer-Verlag, New York.
- Rosenbluch A., M. Eisenbach** (1992). The effect of mechanical removal of pili on gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **174**: 5406-5413.
- Rosenfelder G., O. Luderitz, O. Wetsphal** (1974). Composition of lipopolysaccharides from *Myxococcus fulvus* and other fruiting and no-fruiting myxobacteria. *Eur. J. Biochem.*, **44**: 411-420.
- Rückert G.** (1973). Biogeographische Untersuchungen über die Verbreitung Fruchtkörperbildender Myxobakterien in Island. *Acta Bot. Isl.* **2**: 56-63.
- Rückert G.** (1976). Myxobakterien (Myxobacterales) in natürlichen und naturnahen Substraten aus der europäischen Subarktis. *Acta Bot. Isl.* **4**: 4-9.
- Rückert G.** (1978). Myxobakterien in Substraten aus ariden Gebieten unter besonderer Berücksichtigung Südwesafrikas. *Namb und Meer.*, **8**: 53-66.
- Rückert G.** (1979). Myxobakterien-Artenspektren von Boden in Abhängigkeit von bodenbildenden Faktoren unter besonderer Berücksichtigung der Bodenreaktion. *Z. Pflanzenernährung Bodenkunde*, **142**: 330-343.
- Rückert G., Heym G.** (1977). Bakteriophile Myxobakterien (Myxobacterales) in aridensubstraten. *Karlsruher Geographische Heft*, **8**: 101-111.



**Rudd T., R.M. Sterritt, J.N. Lester** (1983). Mass balance of heavy metal uptake by encapsulated cultures of *Klebsiella aerogenes*. *Microbiol. Ecol.*, **9**: 261-263.

**Ruijter G.J.G., van de Vondervoort P.J.I., Visser J.** (1999). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in presence of manganese. *Microbiology*, **145**: 2569-2576.

**Ruiz-Rodríguez C.** (1980). Enzimas lipásicas de *Myxococcus xanthus MD4*. Memoria de licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

**Running Z., L. Yi, X. Zhixiong, S. Ping, Q. Songsheng** (2000). A microcalorimetric method for studying the biological effects of  $\text{La}^{3+}$  on *Escherichia coli*. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **46**: 1-9.

**Sani R.K., G. Geesey, B.M. Peyton** (2001). Assessment of lead toxicity to *Desulfovibrio desulfuricans* G20: influence of components of Lactate C medium, *Advances in Environmental Research*, **5**: 269-276.

**Sani R.K., S. Chakraborti, R.C. Sobti, P.R. Patnaik, U.C. Banerjee** (1999). Characterization and some reaction engineering aspects of thermostable extra-cellular  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus* sp., *Folia Microbiol.*, **44**: 367-371.

**Sauer K., A.K. Camper, G.D. Erhlich, J.W. Costerton, D.G. Davies** (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*, **184**: 1140-1154.

**Schlekat C.E., A.W. Decho, G.T. Chandler** (1998). Sorption of cadmium to bacterial extracellular polymeric sediment coatings under estuarine conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**: 1867-1874.

**Schmidt-Lorenz W., H. Kuhlwein** (1968). Intracelluläre Bewegungsorganellen der Myxobakterien. *Arch. Microbiol.*, **60**: 95-98.

**Schröder R.J., H. Reichenbach** (1970). The fatty acid composition of vegetative cells and myxospores of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales), *Arch. Microbiol.* **71**: 384-390.

**Schummer D., Irschik H., Reichenbach H., Hofle G.** (1994). Tartrolons new boron-containing macrodiolides from *Sorangium cellulosum*. *Leibigs. Ann. Chem.* **1994**: 283-289.

**Scott J.A., A.M. Karanjkar, D.L. Rowe** (1995). Biofilm covered granular activated carbon for decontamination of streams containing heavy metals and organic chemicals, *Minerals Engineering*, **8**: 221-230.

**Scott J.A., S.J. Palmer** (1990). Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**: 221-225.

**Shi, W., D. R. Zusman.** (1993). The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 3378-3382.

**Shimkets L.J.** (1984). Nutrition, metabolism and the initiation of development. En *Myxobacteria: Development and Cell Interactions* (Rosenberg. E. ed.). pp. 91-108. Springer-Verlag, New York.



**Shimkets L.J.** (1986a). Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **166**: 837-841.

**Shimkets L.J.** (1986b). Role of cell cohesion in *Myxococcus xanthus* fruiting body formation. *J. Bacteriol.*, **166**: 842-848.

**Shimkets L.J.** (1987). Control of morphogenesis in Myxobacteria. *C.R.C. Critical Reviews in Microbiology*, **14**: 195-227.

**Shimkets L.J.** (1990). Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.*, **54**: 473-501.

**Shimkets L.J.** (1993). The myxobacterial genome. En *Myxobacteria II* (Dworkin M. and Kaiser D.eds.). pp. 85-108. *American Society of Microbiology*, Washington, D.C.

**Shimkets, L.J.** (1999). Intercellular signalling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **53**: 525-549.

**Shimkets L.J., Dworkin M.** (1981). Excreted adenosine is a cell density signal for the the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.*, **84**: 51-60.

**Shimkets L.J., D. Kaiser** (1982a). A Murein components rescue developmental sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **152**: 462-470.

**Shimkets, L.J., D. Kaiser** (1982b). Induction of coordinate cell movement in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **152**: 451-461.

**Shimkets, L.J., H. Rafiee** (1990). CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.*, **172**: 5299-5306.

**Shimkets L.J., C. Woese** (1992). A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis of their clasification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 9459-9463.

**Shul'ga, N.B., V.V. Samusevich** (2002). Sorption and ion-exchange processes. Lead(II) sorption by magnesium phosphates. *Russian Journal of Applied Chemistry*, **75**: 378-384.

**Shumate S.E., G.W. Strandberg** (1985). Accumulation of metalsby microbial cells. In *Moo-Young M, Robinson C.N., Howell J.A.*, editors. *Comprehensive biotechnology*. New York:Pergamon Press, 235-247.

**Shumate S.E., G.W. Strandberg, J.R. Parrot** (1978). Removal of metal ions from aqueous process steams. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **8**: 13-20.

**Silver S., T.K. Misra** (1988). Plasmid-Mediated heavy metal resistances, *Ann. Rev. Microbiol.*, **42**: 717-743.

**Silver S., L.T. Phung** (1996). Bacterial heavy metal resistance: New surprises. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**: 753-789.

**Simmons P., I. Singleton** (1996). A method to increase silver biosorption by an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 278-285.



- Singh B.N., N.B. Singh** (1971). Distribution of fruiting myxobacteria in Indian soils bark of trees and dung of herbivorous animals. *Indian J. Microbiol.*, **11**: 47-92.
- Sjoberg E.L.** (1978). Kinetics and mechanism of calcite dissolution in aqueous solutions at low temperatures. *Acta University Stokholm, Contrib. Geology*, **332**: 1-92.
- Slawson R.M., E.M. Lohmeier-Vogel, H. Lee, J.T. Trevors** (1994). Silver resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Biometals*, **7**: 30- 40.
- Söhnle O., J.W. Mullin** (1982). Precipitation of calcium carbonate, *Journal of Crystal Growth* **60**: 239-250
- Sokolova- Dubinina G.A., Z.P. Deryugina** (1967). On the role of microorganisms in the formation of rhodochrosite in Punnus-Yarvi Lake. *Mikrobiologiya*, **36**: 535-542 (Engl. transl. pp. 445- 451).
- Solntseva L.I.** (1940). La biología de las mixobacterias. I. *Myxococcus*. *Mikrobiologiya*, **9**: 217-231.
- Solntseva L.I.** (1941). La Biología de las Mixobacterias. II. Géneros *Mellitangium* y *Chondromyces*. *Mikrobiologiya*, **10**: 505-512.
- Spormann, A.M.** (1999). Gliding motility in bacteria: Insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**(3): 621-641.
- Spormann, A. M., D. Kaiser** (1995). Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. *J.Bacteriol.*, **177**(20): 5846-5852.
- Spormann, A. M., D. Kaiser** (1999). Gliding mutants of *Myxococcus xanthus* with high reversal frequency and small displacements. *J. Bacteriol.*, **181**: 2593-2601
- Staley J.T., M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt** (1989). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3. 2139-2170.
- Stephens C.** (2002). Microbiology: Breaking Down Biofilms. *Current Biology*, **12**: 132-134.
- Stephens K., D. Kaiser** (1987). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus*: molecular cloning of the *mgl* locus. *Mol. Gen. Genet.*, **207**: 256-266.
- Sterrit R.M., J.N. Lester** (1986). Heavy metal immobilization by bacterial extracellular polymers. En: Immobilization of Ions by Bio-sorption (Eccles H., Hunt S. eds.). pp. 121. Ellis harwood, chichester.
- Stickler D.** (1999). Biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, **2**: 270-275.
- Stipp S.L., M.F. Hochella, G.A. Parks, J.O. Leckie** (1992). Cd<sup>2+</sup> uptake by calcite, solid-state diffusion, and the formation of solid-solution: interface processes observed with near-surface sensitive techniques (XPS, LEED, and AES). *Geochim. Cosmochim. Acta*, **56**: 1941-1954.



**Stohs S.J., D. Bagachi** (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Ned.*, **18**: 321-336.

**Stoodley P., Z. Lewandowski, J.D. Boyle, H.M. Lappin-Scott** (1999). The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environ Microbiol*, **1**: 447-457.

**Stoodley P., L.H. Stoodley** (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**: 228-233.

**Stoodley P., L.H. Stoodley, H.M. Lappin-Scott** (2000). Detachment, surface migration and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging. *Methods Enzymol.*, **337**: 306-319.

**Stryer L.** (1988). Biochemistry, third edition. Freeman and Company, New York.

**Sturchio N.C., R.P. Chiarello, L. Cheng, P.F. Lyman, M.J. Bedzyk, Y. Qian, H. You, D. Yee, P. Geissbuhler, L.B. Sorensen, Y. Liang, D.R. Baer** (1997). Lead adsorption at calcite-water interface: synchrotron X-ray standing wave and X-ray reflectivity studies. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **61**: 251-263.

**Sudo S.Z., M. Dworkin** (1972). Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **110**: 236-245.

**Suh J.H., J.W. Yun, D.S. Kim** (1998). Comparison of Pb<sup>2+</sup> accumulation characteristics between live and dead cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.*, **20**: 247-251.

**Sun, H., D. R. Zusman, W. Shi.** (2000). Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Curr. Biol.*, **10**:1143-1146.

**Sutherland I.W.** (1979). Polysaccharides produced by *Cystobacter*, *Archangium*, *Sorangium* and *Stigmatella* species. *J. Gen. Microbiol.*, **74**: 259-266.

**Sutherland I.W.** (1990). Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press, Cambridge, 163pp.

**Sutherland I.W.** (2001). The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*, **9**: 222-227.

**Sutherland I.W., M.L. Smith** (1973). The lipopolysaccharides of fruiting and non-fruiting myxobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **74**: 259-266.

**Sutherland I.W., S. Thomson** (1975). Comparison of polysaccharides produced by *Myxococcus* strains. *J. Gen. Microbiol.*, **89**: 124-132.

**Swift D.T., D. Forciniti** (1997). Accumulation of lead by *Anabena cylindrica*: Mathematical modeling and an energy dispersive x-ray study. *Biotechnol. Bioeng.*, **55**: 408-418.



- Tampion J., M.D. Tampion** (1987). Immobilized cells: Principles and application. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tan E.L., M.W. Loutit** (1976). Concentration of molybdenum by extracellular material produced by rhizosphere bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, **8**: 461-465
- Templeton A.S., T.P. Trainor, S.J. Traina, A.M. Spormann, and G.E. Jr. Brown** (2001). Pb(II) distributions at biofilm-metal oxide interfaces. *PNAS*, **98**(21): 11897-1902.
- Thaxter R.** (1892). On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot. Gaz.*, **17**: 389-406.
- Thomasson B., J. Link, A.G. Starsinopoulos, N. Burke, L. Plamann, L. Hartzell** (2002). MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, **46**(5): 1399-1413.
- Thompson R.** (1987) (Ed.). Trace elements removal from Aqueous solution. Special publication No. 61, Royal Society of chemistry, London.
- Till M.** (1982). Das vorkommen von Myxobakterien im darminhalt von fischen. pp. 84-86. 23. Arbeitstagung des IAD, Vienna.
- Ting Y.P., F. Lawson, I.G. Prince** (1989). Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: Part 1. Individual ion species. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**: 990-999.
- Tipper D.J., J.L. Stominger, J.C. Ensign** (1967). Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain. Copenhagen. VII. Mode of action of the bacteriolytic peptidase from myxobacter and the isolation of intact cell wall polysaccharides". *Biochem.*, **6**: 906-920.
- Tobin J.M., D.G. Cooper, R.J. Neufeld** (1984). Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 821-824.
- Tolker-Nielson T., U.C. Brinch, P.C. Ragas, J.B. Andersen, C.S. Jacobsen and S. Molin** (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *J Bacteriol*, **182**: 6482-6489.
- Tomioka N., H. Uchiyama, O. Yagi** (1994). Cesium accumulation and growth characteristics of *Rhodococcus erythropolis* CS98 and *Rhodococcus* sp. Strain CS402. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2227-2231.
- Trevors J.T., K.M. Oddie, B.H. Belliveau** (1985). Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**: 39-54.
- Trzilová B., L. Mikolovicová, E. Golaisová, M. Bobková** (1980). Indikatoren der Verunreinigung des Donauwassers im tschechoslowakischem Abschnitte. *Acta Ecologica (Bratislava)* **8**: 91-102.
- Tsai T.S., D.R. Whitaker, K. Jurasek, D.C. Gillespie** (1965). Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Action of the  $\alpha$  and  $\beta$ -lytic proteases on two bacterial mucopeptides. *Ca. J. Biochem.* **43**: 1971-1983.



**Tsezos M.** (1985). The selective extraction of metals from solutions by microorganisms. A brief overview. *Can. Metal Q.*, **24**: 141-144.

**Tsezos M.** (1986). Adsorption by microbial biomass as a process for removal of ions from process or waste solutions. En: Immobilization of Ions by Biosorption (Eccles H., Hunt S. eds.). Ellis Horwood, Chichester.

**Tsezos M., Volesky B.** (1981). Biosorption of uranium and thormium. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**: 583-604.

**Tsezos M., Volesky B.** (1982). Mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**: 385-400.

**Tynecka Z., Gos Z., Zajac J.** (1981). Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **147**: 305-319.

**Umbaguer H.E.** (1978). Aminoacid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 533-606.

**Unz R, K. Shuttleworth** (1996). Microbial mobilization and immobilization of heavy metals. *Curr. Opinion Biotechnol.*, **7**: 307-310.

**Urrutia M.M., M. Kemper, M. Doyle, T.J. Beveridge** (1992). The membrane-induced proton motive force influences the metal binding ability of *Bacillus subtilis* walls. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3837-3844.

**Valls M., V. De Lorenzo** (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology. Review*, **26**: 327-338.

**Van Aswegen P.C.** (1981). Recovery of dissolved gold from rotary filter residues by the addition of fine activated carbon powder followed by flotation. En: Congrès International de Mineralurgie, 11th GEDIM. pp. 510-519. St. Etienne.

**Vande Weghe J.G., D.W. Ow** (2001). Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires *hmt2*<sup>+</sup>. *Molecular Microbiology*, **42**(1): 29-36.

**Vargas E., A.H. Alvarez, C. Cervantes** (1998). Bacterial Systems for expelling toxic metals. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **40**(1-2): 53-71

**Varon M., A. Tietz, E. Rossenberg** (1986). *Myxococcus xanthus* autocide AMI. *J. Bacteriol.*, **167**: 356-361.

**Vasconcelos C., J.A. McKenzie, S. Bernasconi, D. Grujic, A.J. Tien** (1995). Microbial mediation as a possible mechanism for natural dolomite formation at low temperatures. *Nature*, **377**: 220-222.

**Vasudevan P., V. Padmavathy, S.C. Dhingra** (2002). Biosorption of monovalent and divalent ions on baker's yeast, *Bioresource Technology*, **82**: 285-289.

**Veglio F., F. Beolchini** (1997) Removal of metals by biosorption. A review. *Hydrometal l.*, **44**(3): 301-316.



- Vesper S.J., R. Donovan-Brand, K.P. Paris, S.R. Al-Abed, J.R. Ryan, W.J. Davis-Hover (1996). Microbial removal of lead from solid media and soil. *Water Air Soil Poll.*, **86**: 207-219.
- Voelz H.G., M. Dworkin (1962). Fine structure of *Myxococcus xanthus* during morphogenesis. *J. Bacteriol.*, **84**: 943-952.
- Volesky B. (1994). Advances in biosorption of metals: Selection of biomass types: *FEMS. Microbiol. Rev.*, **14**: 291-302.
- Volesky B., Z.R. Holan (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* **11**: 235-250.
- Volesky B., H.A. May-Phillips (1995). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**: 797-806.
- Volesky B., H. May, Z.R. Holan (1993) Cd(II) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**(8): 826-829.
- Wada N., K. Yamashita, T. Umegaki (1998). Effects of Silver, Aluminum, and Chrome Ions on the Polymorphic Formation of Calcium Carbonate under Conditions of Double Diffusion. *J. Colloid Interface Sci.*, **201**: 1-6.
- Wall D., D. Kaiser (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.*, **32**: 1-10.
- Wall D., P.E. Kolenbrander, D. Kaiser (1999). The *Myxococcus xanthus pilQ* (SglA) gene encodes a secretin homolog required for type IV pilus biogenesis, social motility and development. *J. Bacteriol.*, **181**: 24-33.
- Wang C.L., P.D. Maratukulam, A.M. Lum, D.S. Clark, J.D. Keasling (2000). Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction pathway and its application to precipitation of cadmium on the cell, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 4497-4502.
- Wang W., W. Wang, X. Zhang, D. Wang (2002). Adsorption of p-chlorophenol by biofilm components. *Water Research*, **36**: 551-560.
- Ware J.C., M. Dworkin (1973). Fatty acids of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **115**: 253-261.
- Ward M.J., D.R. Zusman (1999). Motility in *Myxococcus xanthus* and its role in developmental aggregation. *Current Opinion of Microbiology*, **2**: 624-629.
- Watnick P.I., C.M. Lauriano, K.E. Klose, L. Croal, R. Kolter (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139, *Mol Microbiol.*, **39**: 223-235.
- Wireman J.W., M. Dworkin (1975). Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. *Science* **189**: 516-523.
- Wireman J.W., M. Dworkin (1977). Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **129**: 796-802.



- Whitaker D.R.** (1965). Lytic enzymes of *Sorangium sp.* Isolation and enzymatic properties of the  $\alpha$  and  $\beta$ -lytic proteases. *Can. J. Biochem.* **43**: 1935-1954.
- Whitchurch C.B., T. Tolker-Nielsen, P.C. Ragas, J.S. Mattick** (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, *Science*, **295**: 1487.
- White D., M. Dworkin, D.J. Tipper** (1968). Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: structure and relation to morphogenesis. *J. Bacteriol.* **95**: 2186-2197.
- White C., J.A. Sayer, G.M. Gadd** (1997). Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: Key biogeochemical processes for treatment of contamination, *FEMS Microbiology Reviews*, **20**: 503-516.
- Williams C.J., R.G.J. Edyvean** (1997). Ion exchange in nickel biosorption by seaweed materials. *Biotechnol. Prog.*, **13**: 424-428.
- Womack B.J., D.F. Gilmore, D. White** (1989). Calcium requirement for gliding motility in myxobacteria. *J. Bacteriol.*, **171**: 6093-6096.
- Xu N., M.F. Hochella, G.E. Brown, G.A. Parks** (1996). Co(II) sorption at the calcite-water interface: I. X-ray photoelectron spectroscopic study. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **60**: 2801-2815.
- Yahya M.T., L.K. Landeen, M.C. Messina, S.M. Kutz, R. Schultz, C.P. Gerba** (1990). Disinfection of bacteria in water systems by using electrolytically generated copper: silver and reduced levels of free chlorine. *Can. J. Microbiol.*, **36**: 109-116.
- Yang Z., Y. Geng, D. Xu, H. B. Kaplan, Shi W.** (1998a). A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol. Microbiol.* **30**: 1123-1130
- Yang, Z., Y. Geng, W. Shi** (1998b). A DnaK homolog in *Myxococcus xanthus* is involved in social motility and fruiting body formation. *J. Bacteriol.* **180**: 218-224
- Yang J., B. Volesky** (1999). Biosorption and elution of uranium with seaweed biomass. *Proceedings of IBS 99*, Madrid, Spain.
- Yee N., J. Fetn** (2001). Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge? *Geochimica et cosmochimica Acta*, **65**(13): 2037-2042.
- Yee T., M. Inouye** (1984). Genome of *Myxococcus xanthus*. En *Myxobacteria: Development and Cell Interactions*. (Rosenberg E. ed.). pp. 69-90. Springer-Verlag, New York.
- Yildiz F.H., N.A. Dolganov, G.K. Schoolnik** (2001). VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPSETr-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* **183**: 1716-1726.
- Yilmaz E.I.** (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in Microbiology*, **154**: 409-415.



**Yun Y.S., D. Park, J.M. Park, B. Volesky** (2001). Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass. *Environ. Sci. Technol.*, **35**: 4353- 4358.

**Zachara J.M., C.E. Cowan, C.T. Resch** (1991). Sorption of divalent metals on calcite. *Geochimica et cosmochimica Acta*, **55**(6): 1549-1562.

**Zhu C.** (2002). Estimation of surface precipitation constants for sorption of divalent metals onto hydrous ferric oxide and calcite. *Chemical Geology*, **188**: 23- 32.

**Zouboulis A.I., K.A. Matis, I.C. Hancock** (1997). Biosorption of metals from dilute aqueous solutions. *Sep. Purif. Methods*, **26**: 255-295.

**Zouboulis A.L., P. Solari, K.A. Matis, G.A. Stalidis** (1995). Toxic metals removal from dilute solutions by biosorptive flotation. *Water Sci. Tech.*, **32**: 211-220.

**Zusman D.R.** (1982). Frizzy mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **150**: 1430-1437.

**Zusman D.R.** (1984). Developmental program of *Myxococcus xanthus*. En: *Myxobacteria: Developmental and Cell Interactions* (Rosenberg, E.ed) Springer-Verlag. New York.